HAL
open science

Incorporation de l'alpha-trifluorométhylalanine au sein de chaînes peptidiques : Conséquences sur l'hydrophobie, les interactions peptides-protéines et la stabilité protéolytique.

Emmanuelle Devillers

To cite this version:

Emmanuelle Devillers. Incorporation de l'alpha-trifluorométhylalanine au sein de chaînes peptidiques : Conséquences sur l'hydrophobie, les interactions peptides-protéines et la stabilité protéolytique.. Chimie organique. Université de Cergy Pontoise, 2014. Français. NNT : 2014CERG0708 . tel-01143022

HAL Id: tel-01143022

https://theses.hal.science/tel-01143022

Submitted on 16 Apr 2015

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

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

UNIVERSITÉ
de Cergy-Pontoise

ECOLE DOCTORALE SCIENCES ET INGENIERIE
De l'Université de Cergy-Pontoise

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Cergy-Pontoise
Spécialité : Chimie Organique

INCORPORATION DE L'α-TRIFLUORORMÉTHYLALANINE AU SEIN DE CHAÎNES PEPTIDIQUES. CONSÉQUENCES SUR L'HYDROPHOBIE, LES INTERACTIONS PEPTIDES-PROTÉINES, ET LA STABILITÉ PROTÉOLYTIQUE

Par
Emmanuelle DEVILLERS
Laboratoire de Chimie Biologique (LCB)

Le 13 Novembre 2014

Devant le jury composé de

M. Thierry BRIGAUD	Directeur de thèse
M. Philippe KAROYAN	Rapporteur
M. Thierry LEQUEUX	Rapporteur
Mme Anna-Maria PAPINI	Examinatrice
M. Bruno LINCLAU	Examinateur
Mme Evelyne CHELAIN	Invitée
M. Julien PYTKOWICZ	Invité

A ma mère

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au « Laboratoire de Chimie Biologique » de l'Université de Cergy-Pontoise, dirigé par Monsieur Thierry BRIGAUD et sous sa direction.

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres du jury, Monsieur Philippe KAROYAN, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie et Monsieur Thierry LEQUEUX, Professeur à l'Université de Caen pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse.

Je remercie Madame Anna-Maria PAPINI, Professeure à l'Université de Cergy-Pontoise et Monsieur Bruno LINCLAU, directeur du département de Diagnostics et Thérapies Moléculaires de l'Université de Southampton, pour avoir accepté d'être examinateurs de mon travail de thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur Thierry BRIGAUD pour m'avoir accueillie dans son laboratoire à l'occasion de cette thèse, pour les nombreuses discussions scientifiques et les judicieux conseils qu'il m'a apportés durant cette thèse. Qu'il reçoive ici l'expression de ma profonde gratitude, de mon estime et ma haute considération.

Je remercie le Dr. Lucie KHEMTEMOURIAN de l'Université Pierre et Marie Curie et le Dr. Claudio DALVIT de l'Université de Neuchâtel et le Dr. Vincent GASPARIK de l'Université de Cergy-Pontoise pour leur collaboration.

J'exprime toute ma gratitude au Docteur Evelyne CHELAIN, Maître de Conférences, pour m'avoir encadrée durant cette thèse, m'avoir conseillée et écoutée. Je remercie vivement le Docteur Julien PYTKOWICZ pour sa motivation et sa joie de vivre. Ses conseils judicieux au quotidien ainsi que sa bonne humeur ont fait de cette thèse un réel plaisir.

Je remercie le Docteur Nathalie LENSEN, Maître de Conférences, pour sa gentillesse et sa compassion, ses nombreux conseils mais surtout pour tous les bons moments que nous avons passées ensemble. Je tiens également à remercier le Docteur Grégory CHAUME, Maître de Conférences pour ses conseils, sa bonne humeur. Je remercie également tous les membres du laboratoire, Mme Nadège LUBIN-GERMAIN, Mme Elisa PERONI, Mme Maud LARREGOLA, M. Florian GALLIER, M. Jacques AUGE, Mme Nancy LINDER et M. Jacques UZIEL ainsi que notre secrétaire Mme Jocelyne GOUGEROT.

J'adresse mes remerciements chaleureux à Mme Gwenaëlle SIZUN-THOME ingénieure de recherche en charge de tous les appareillages du laboratoire. Merci pour ton écoute, ton soutien et ton aide précieuse tout au long de ma thèse. Un très grand merci à tous mes amis thésards, ex-thésards, Post-Doc, ATER : Mme Véronique DOAN, Mme Matthea IERONIMAKI, Mme Fanny COSSON, Mme Carlotta SANTORO, Mme Charlène GADAIS, M. Cédric RENTIER, M. Khoubaib BEN HAJ SALAH et Bube.

Parlons peu parlons bien ! Il y a à présent des personnes sans qui cette thèse n'aurait pas eu la même saveur, la même couleur et qui tiennent une place toute particulière dans mon cœur. En premier lieu, je remercie très chaleureusement Nicolas PASTERNAK, alias le « Grand Chauve », qui est très rapidement passé de collègue thésard à l'un de mes meilleurs amis. Nous avons rapidement compris que nous partagions beaucoup toi et moi. Merci pour ton sourire et ta générosité.

Un grand merci à notre petite portugaise Nathalie SARAIVA ROSA alias « Petite Nathalie », pour m'avoir énormément aidée par ton travail au cours de mes trois années de thèse, mais surtout pour tous les délires que nous avons partagés. Il n'y a qu'avec toi qu'on peut danser la Zumba dans un laboratoire !

Je remercie vivement M. Olivier MONASSON pour son humour inégalable et sa grande générosité. Merci pour tous les excellents moments que nous avons partagés. J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon ami Julien SIMON qui a partagé le même bureau et le même laboratoire que moi pendant ma première année de thèse. Je n'ai jamais autant rigolé qu'en ta présence ! Tinky et Winky n'ont qu'à bien se tenir !

Cette thèse n'aurait pas été aussi joyeuse sans mes amis de Cergy et de 100% Forme !! J'y ai passé de si nombreuses heures à évacuer mon anxiété et mon stress et à suer à vos côtés! Je tiens à citer Dominique, Laurence, Mumu, Marie, Mimi, Martine, Odiiiiile, Nathalie, Emmanuelle, Valérie et tout spécialement Sarah... Une dédicace particulière à Christian et à Sandrine qui ont été là pour moi dans les vrais moments difficiles, à la toute fin de cette thèse, durant la période de rédaction. Merci infiniment à vous deux pour m'avoir redonné la motivation d'aller au bout. Enfin, une dédicace très particulière à Franck, mon coach. Je n'oublierai jamais que « la douleur n'est qu'une information ».

Une dédicace toute particulière à ma meilleure amie, ma sœur Fabienne, qui a su comprendre et m'apaiser lors des moments difficiles. Je garderai toujours en mémoire les longues pauses déjeuner au bord de l'Oise où nous refaisions la vie. Merci tout simplement d'être là pour moi au quotidien et de partager tant de choses avec moi.

J'adresse ma reconnaissance infinie à mon Rafik. Ta présence à mes côtés chaque jour, tes nombreux conseils et ta patience durant toute la période de cette thèse et en particulier dans mes moments de doutes n'a pas de prix. Tu m'as donnée la force d'aller au bout et de croire en moi.

Enfin, j'adresse mes profonds remerciements à mon père. Trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon amour le plus sincère.

RÉSUMÉ

Dans le but de déterminer l'influence du groupement trifluorométhyle sur les propriétés physico-chimiques et biologiques de peptides fluorés, nous avons désiré synthétiser des peptides incorporant un aminoacide α-trifluorométhylé.

Chaque énantiomère de l'α-Tfm-Alanine a été synthétisé de manière énantiomériquement pure et à grande échelle selon une voie synthétique efficace. Le groupement trifluorométhyle placé en position α désactivant fortement sa fonction amine, son couplage a nécessité des conditions d'activation puissantes à l'aide des anhydrides mixtes.

La variation de l'hydrophobie de peptides fluorés par une méthode analytique basée sur la mesure d'indices dérivés des temps de rétention par RP-HPLC a permis de mettre en évidence l'influence considérable du groupement trifluorométhyle sur l'augmentation de l'hydrophobie.

Les interactions peptides fluorés/peptides ont été étudiées dans le cadre de l'inhibition de l'agrégation du peptide Aβ42 responsable du dépôt de plaques amyloïdes chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les premiers résultats montrent un ralentissement de l'agrégation de Aβ42 par un peptide fluoré.

La digestion enzymatique par la pepsine d'un tétrapeptide fluoré indique un ralentissement considérable de sa vitesse d'hydrolyse par rapport au peptide incorporant un résidu Alanine. L'utilisation de la méthode de détection sensible par RMN ^{19}F appelée 3-FABS a permis de mettre en évidence la reconnaissance et le clivage d'un peptide fluoré par la trypsine, caractéristiques d'un bon substrat.

Mots clés : α-trifluorométhylalanine, peptides, couplages, hydrophobie, interactions peptides-peptides, stabilité métabolique.

ABSTRACT

In order to determine the impact of the trifluoromethyl group on the physico-chemical and biological properties of fluorinated peptides, we have decided to synthesize peptides incorporating α-trifluoromethyl amino-acids.

Each enantiomer of α-Tfm-Alanine was prepared in an enantiopure form and in a large scale. The trifluoromethyle group placed in the α position deactivates its amine function so that its coupling needs harsh activation conditions to be achieved with mixed anhydride.

The determination of the hydrophobicity of fluorinated peptides with an analytical method based on the measurement of indexes derived from retention times by RP-HPLC showed the dramatic influence of the trifluoromethyl group on the increase of the hydrophobicity.

Fluorinated peptides/peptides interactions were studied for the inhibition of the aggregation of Aβ42 in patients suffering from Alzheimer's disease. The first results indicate a reduction of Aβ42 aggregation by a fluorinated peptide.

Pepsin digestion of a fluorinated tetrapeptide showed a dramatic reduction of the rate of its cleavage in comparison with the peptide incorporating an alanine residue. The use of the sensitive 3-FABS ^{19}F NMR detection method showed the recognition and the cleavage of a fluorinated peptide by trypsin which definite it as a substrate for trypsin.

Key words : α-trifluoromethylalanine, peptides, coupling reactions, hydrophobicity, peptides-peptides interactions, proteolytic stability.

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS 15
INTRODUCTION GÉNÉRALE 19
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES CONSEQUENCES DE L'INTRODUCTION D'ATOMES DE FLUOR AU SEIN DE CHAÎNES PEPTIDIQUES 23
1) Généralités sur l'atome de fluor 25
1.1. Electronégativité et force de liaison 25
1.2. Effets stériques et électroniques 26
1.3. Modification du pKa 28
1.4. Modification de l'hydrophobie 29
2) Conséquences et intérêt de l'incorporation d'aminoacides fluorés dans des peptides 31
2.1. Stabilisation de structures secondaires ou d'interactions protéines-protéines 32
2.1.1. Interaction fluor-fluor 32
2.1.2. Effets électroniques, caractère donneur de liaisons hydrogène 35
2.1.3. Stabilisation de structures secondaires par augmentation de l'hydrophobie 37
2.1.4. Stabilisation de peptides par formation de liaisons hydrogène 39
2.1.5. Cas particulier des prolines fluorées 41
2.2. Augmentation de la résistance métabolique et inhibition enzymatique 44
2.3. Utilisation du fluor dans des structures enzymatiques comme preuves mécanistiques de processus biologiques. 50
3) Utilisation de l'atome de fluor comme sonde pour la RMN du ^{19}F 53
3.1. Avantages de la RMN du ^{19}F pour les études biologiques 54
3.2. Incorporation d'aminoacides fluorés dans des structures peptidiques pour l'étude des structures et des réactivités protéiques 54
3.3.Utilisation du ^{19}F pour des études de métabolisme moléculaire par la technique 3-FABS 56
CHAPITRE II : INCORPORATION D'AMINO-ACIDES α-TRIFLUOROMETHYLES DANS UNE CHAÎNE PEPTIDIQUE 61
I) Rappels bibliographiques sur la synthèse d'aminoacides trifluorométhylés et leur incorporation dans des peptides 63
1) Synthèse d'aminoacides α-trifluorométhylés 64
1.1. α-Tfm-aminoacides dérivés du fluoral ou de trifluorométhylcétones 64
1.2. α-trifluorométhylaminoacides dérivés de trifluoropyruvate 67
1.2.1. En série racémique 68
1.2.2. Synthèse asymétrique 69
1.2.2.1. A partir de sulfoxydes lithiés 70
1.2.2.2. A partir de sulfinimines chirales 70
1.2.2.3. Oxazolidinone chirale 71

1.3. α-Tfm-aminoacides dérivés de trifluoroacétoacétates 72
1.4. Synthèse d'α-Tfm-aminoacides par l'approche dipeptidique 74
2) Formation de liaisons peptidiques engageant un aminoacide α-trifluorométhylé : état de l'art.. 75
2.1. Rappel sur la synthèse peptidique en solution 76
2.1.1. Les anhydrides symétriques et les anhydrides mixtes 77
2.1.2. Les carbodiimides et esters activés 79
2.1.3. Les halogénures d'acyle 81
2.2. Couplages de la position *C*-terminale de divers aminoacides α-trifluorométhylés 83
2.3. Couplages de la position *N*-terminale de divers aminoacides α-trifluorométhylés 85
II) Application à l'incorporation d'aminoacides fluorés dans de petits peptides 89
1) Travaux antérieurs du laboratoire 89
1.1. Couplages de la position *C*-terminale de l' α-Tfm-Proline 90
1.2. Couplages de la position *C*-terminale de l'α-Tfm-Alanine 91
1.2.1. Essais de protection de la position *C*-terminale 91
1.2.2. Couplages de l'α-Tfm-Alanine non protégée 91
1.2.2.1. Couplage de la position *C*-terminale 91
1.2.2.2. Couplage en position *N*-terminale 92
1.3. Conclusion 92
2) Travaux personnels 93
2.1. Synthèse de chaque énantiomère de l'α-trifluorométhylalanine sous forme énantiopure ... 94
2.2. Couplage de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine non protégée 95
2.2.1. Utilisation des carbodiimides et esters activés 96
2.2.2. Utilisation des chlorures d'acyle 98
2.3. Protections sélectives de l'α-Tfm-Alanine 102
2.3.1. Protections de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine 102
2.3.1.1. Protection par un groupement *N*-Carboxybenzyle 102
2.3.1.2. *N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-α-Tfm-Alanine 105
2.3.1.3. *N*-(9-Fluorénylméthoxycarbonyl)-α-Tfm-Alanine 107
2.3.1.4. Conclusion 108
2.3.2. Protections de la position *C*-terminale de l'α-Tfm-Alanine 109
2.3.2.1. Ester méthylique de l'α-Tfm-Alanine 109
2.3.2.2. Ester benzylique de l'α-Tfm-Alanine 111
2.3.2.3. Ester *tert*-butylique de l'α-Tfm-Alanine 112
2.3.2.4. Conclusion 114
2.4. Couplage de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine protégée 114
2.4.1. Utilisation des chlorures d'aminoacides 115
2.4.2. Utilisation des anhydrides mixtes 116
2.5. Couplage de l'α-Tfm-Alanine sur support solide 117

2.5.1. Principe de la SPPS 117
2.5.1.1. Stratégie Boc 119
2.5.1.2. Stratégie Fmoc 120
2.5.2. Incorporation de l'α-Tfm-Alanine sur support solide 121
2.5.2.1. Couplage de la position *C*-terminale de l'α-Tfm-Alanine en SPPS 122
2.5.2.2. Couplage de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine en SPPS 123
2.5.3. Stratégie d'incorporation de l'α-Tfm-Alanine sous forme de dipeptides Fmoc/*t*Bu . 124
2.5.3.1. Synthèse de blocs dipeptidiques pour l'incorporation de l'α-Tfm-Alanine en SPPS 125
2.5.3.2. Exemple d'incorporation de blocs dipeptidique incorporant une α-Tfm-Alanine par SPPS 127
III) Conclusion du chapitre 128
CHAPITRE III : ETUDE DE L'HYDROPHOBIE DE PETITS PEPTIDES FLUORES 131
I) Etat de l'art sur les méthodes de mesure de l'hydrophobie des aminoacides et des peptides 134
1) Partage entre deux phases liquides 134
2) Partage entre une phase stationnaire et une phase liquide : utilisation de la chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC) 139
2.1. Prémices de l'utilisation de la HPLC pour la mesure de l'hydrophobie de peptides naturels 139
2.2. Détermination de l'hydrophobie intrinsèque des chaînes latérales des aminoacides au sein d'une chaîne peptidique 142
2.2.1. Choix des séquences étudiées 142
2.2.2. Choix des conditions d'élution 143
2.2.2.1. Composition de la phase mobile 144
2.2.2.2. Choix du mode d'élution et de l'indice de rétention utilisé pour mesurer l'hydrophobie de composés 145
3) Conclusion 148
II) Application à l'étude de l'hydrophobie de petits peptides fluorés 149
1) Elaboration et mise en œuvre d'une méthode analytique de mesure d'indice d'hydrophobie par RPLC 149
1.1. Etude préliminaire : aminoacides libres 150
1.2. Peptides 152
1.2.1. Détermination des séquences peptidiques choisies pour l'étude d'hydrophobie 152
1.2.2. Synthèse des peptides et purification 153
1.2.2.1. Série *N*-acétyle/amide 153
1.2.2.2. Série déprotégée variant en position centrale 156
1.2.2.3. Série déprotégée variant en position *N*-terminale 157
1.2.3. Conclusion sur les séquences synthétisées 159
2) Résultats de l'étude d'hydrophobie 159
2.1. Principe et conditions de la méthode utilisée 159

2.1.1. Principe général de la méthode 159
2.1.2. Conditions opératoires 160
2.2. Résultats 160
2.2.1. Série protégée acétyle/amide 161
2.2.1.1. Valeurs obtenues 161
2.2.1.2. Conclusion 165
2.2.2. Série déprotégée variant en position centrale 166
2.2.2.1. Valeurs obtenues 167
2.2.2.2. Conclusion 172
2.2.3. Série déprotégée variant en position *N*-terminale 172
2.2.3.1. Valeurs obtenues 173
2.2.3.2. Conclusion 177
3) Conclusion du chapitre 178
CHAPITRE IV : CONSÉQUENCES DES INTERACTIONS PEPTIDES FLUORÉS-PROTÉINES SUR L'INHIBITION DE PROCESSUS BIOLOGIQUES 179
I) La maladie d'Alzheimer, une maladie de mauvais repliement protéique 182
1) Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer 182
1.1. Les fibres amyloïdes 183
1.2. Les dégénérescences neurofibrillaires 185
2) Au niveau moléculaire 185
2.1. Mécanisme de l'agrégation 185
2.2. Stratégies thérapeutiques 187
3) Intérêt potentiel de petits peptides fluorés pour l'inhibition de l'agrégation du peptide Aβ 188
3.1. Séquences peptidiques envisagées 189
3.2. Synthèse des peptides 190
3.2.1. Synthèse des peptides fluorés (*S*,*R*,*S*)-33 (P-(*R*)-Tfm) et (*S*,*S*,*S*)-36 (P-(*S*)-Tfm) 190
3.2.2. Synthèse des peptides non fluorés (*S*,*S*)-31 (P-Aib) et (*S*,*S*,*S*)-32 (P-Ala) 191
3.3. Mesure de l'agrégation 192
3.3.1. Principe des mesures effectuées 192
3.3.2. Résultats 193
3.4. Conclusion 199
II) Etude de l'inhibition d'une enzyme peu spécifique, la pepsine par un peptide fluoré l'Ac-Ala-Phe-(*R*)-Tfm-Ala-Ala-NH_2 200
1) La pepsine 200
2) Digestion enzymatique de peptides fluorés 202
2.1. Matériel et méthode 203
2.2. Synthèse des peptides 203
2.2.1. Synthèse du peptide Ac-Ala-Phe- Ala-Ala-NH_2 (*S*,*S*,*S*,*S*)-39 203
2.2.2. Synthèse du peptide fluoré Ac-Ala-Phe-(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-NH_2 (*S*,*S*,*R*,*S*)-24 204

2.3. Digestion 205
2.3.1. Résultats 205
2.3.1.1. Peptide non fluoré (*S*,*S*,*S*,*S*)-39 205
2.3.1.2. Peptide fluoré (*S*,*S*,*R*,*S*)-24 206
2.4. Conclusion 207
III) Etude de l'interaction de peptides fluorés avec la trypsine par les techniques FABS et FAXs 209
1) Méthodes de criblage à haut débit (High Throughput Screening – HTS) 209
2) Stratégies FAXs et 3-FABS 211
2.1. Sélection préalable d'une molécule espion 213
2.2. Mise en œuvre d'un screening par technique FAXs 215
3) Etude de petits peptides fluorés envers la trypsine 217
3.1. Trypsine 217
3.2. Etude de l'interaction de petits peptides fluorés avec la trypsine par RMN 3-FABS 218
3.2.1. Synthèse des peptides 219
3.2.1.1. Synthèse en solution du tripeptide H-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg-Ala-NH_2 219
3.2.1.2. Synthèse du tétrapeptide H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg-Ala-NH_2 220
3.2.1.3. Synthèse du tripeptide H-Ala-Arg-(*R*)-α-Tfm-Ala-NH_2 221
3.2.2. Etude de 3-FABS 223
3.2.2.1. Digestion du peptide (*S*,*R*,*S*,*S*)-46 par la trypsine et analyse par étude de type 3-FABS 223
3.2.2.2. Digestion du peptide (*R*,*S*,*S*)-43 par la trypsine et analyse par étude de type 3-FABS 225
3.3. Conclusion 226
IV) Conclusion du chapitre 226
CONCLUSION GÉNÉRALE 229
EXPERIMENTAL PART 233
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 281

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide aminé
AMP	Active Membrane Peptide
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
Boc	*Tert*-butyloxycarbonyl
Boc_2O	di-ter-butylcarbamate
Bn	Benzyl
BOP-Cl	Chlorure de Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphorodiamidique
CAN	Nitrate de cérium et d'ammonium
Cbz	Carbobenzyloxy
DBU	1,8-diazabicyclo[5,4,0]undéc-7-ène
DCC	Dicyclohéxylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DCU	*N,N'*-dicyclohexylurée
DIC	Diisopropylcarbodiimide
DIPEA	*N,N* diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dr	Rapport diastéréoisomérique (diastereoisomeric ratio)
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
ELSD	Détecteur à Diffusion de Lumière (Evaporating Light Scattering Detector)
Et_2O	Ether diéthylique

EtOAc	Acétate d'éthyle
FAXs	Fluorine chemical shift Anisotropy and eXchange for Screening
Fmoc	9-fluororénylméthoxycarbonyl
GST	Glutathion S-transférase
HATU	2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyl uronium
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétramethyluronium hexafluorophosphate
HOAT	1-hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	*N*-Hydroxybenzotriazole
HPLC	Chromatographie liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography)
HRMS	Spectroscopie de masse haute résolution (High Resolution Mass Spectroscopy)
HTS	High Throughput Screening
IR	Infrarouge
LCMS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectroscopie de masse (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)
MeOH	Méthanol
MW	Micro onde (Micro Wave)
NCA	*N*-Carboxyanhydrides
NMM	*N*-Méthylmorpholine
NO	Monoxyde d'azote
nOe	Effet nucléaire overhauser (Nuclear OverHauser Effect)
Oxyma Pure	Ethyle 2-cyano-2-(hydroxyimino)acétate
PCl_5	Pentachlorure de phosphore
PF	Point de fusion

PFP	Pentafluorophénol
POP	Prolyle Oligopeptidase
PyBOP	Hexafluorophosphate benzotriazol-1-yloxytri(pyrrolidino)phosphonium
PPTS	*Para*-toluène sulfonate de pyridinium
P4H	Proline 4-Hydroxylase
Rdt	Rendement
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNase	Ribonucléase A
SNase	Staphylococcal nuclease
SNC	Système Nerveux Central
SPPS	Synthèse peptidique sur support solide (Solid Phase Peptide Synthesis)
t.a.	Température ambiante
TFA	acide trifluoroacétique
TMSCN	Cyanotriméthylsilane
UV	Ultraviolet
$[\alpha]_D$	Pouvoir rotatoire spécifique
α-Tfm-Ala	α-trifluorométhylalanine
3-FABS	Three Fluorine Atoms for Biochemical Screening

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'ensemble des médicaments actuellement sur le marché peut être divisé en deux catégories : les petites molécules de poids moléculaire inférieur à 500 Da, et les molécules biologiques dont les peptides et les protéines de taille bien plus importante généralement de plus de 5000 Da. Les premières possèdent l'avantage d'être administrables facilement par voie orale. Cependant, leur faible taille les autorise potentiellement à cibler d'autres récepteurs que celui pour lequel elles sont destinées diminuant ainsi leur sélectivité et les rendant souvent responsable de nombreux effets secondaires. Les peptides et protéines, au contraire, de par leur taille plus imposante, sont plus spécifiques de leurs cibles grâce à des sites plus nombreux susceptibles d'interagir avec leurs récepteurs ou la possibilité d'adopter diverses conformations. Malheureusement, ils sont difficilement formulables pour la voie orale car métaboliquement instables, sensibles aux nombreuses protéases physiologiques et peu aptes à traverser les membranes.

Il serait donc intéressant de développer des composés à l'interface entre ces deux familles et qui possèderaient les avantages de chacun. Ces composés, de nature peptidique, allieraient restrictions conformationnelles et lipophilie (pour une meilleure biodisponibilité que les protéines et un bon passage transmembranaire), aux avantages des protéines qui sont des composés naturels, hautement spécifiques de leur cible.[1]

L'activité d'un peptide dépend spécifiquement de ses interactions avec le milieu environnant, notamment les autres protéines (récepteurs, transporteurs, protéases…). Le mode de repliement, les interactions engagées avec ces autres protéines sont à l'origine de la reconnaissance d'un substrat protéique pour sa cible, et donc de son activité. Parmi les différents types d'interactions peptide-protéine existantes, nombreux sont les auteurs à considérer que les interactions hydrophobes sont prédominantes.[2,3,4,5] La modification locale de l'hydrophobie d'une protéine, par incorporation de résidus hydrophobes, serait susceptible de modifier son interaction avec sa cible et donc, son activité. La mesure de l'hydrophobie de fragments peptidiques représente donc un enjeu majeur.

---

[1] Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. *Chem. Biol. Drug Des*. **2013**, *81*, 136-147.
[2] Kauzmann, W. Adv. *Protein Chem*. **1959**, *14*, 1-63.
[3] Tanford, C. *J. Phys. Chem*. **1962**, *84*, 4240-4247.
[4] Dill, K. A. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7133-7155.
[5] Honig, B.; Yang, A.-S. *Adv. Protein Chem*. **1995**, *46*, 27-58.

Le laboratoire dans lequel ont été effectués ces travaux s'intéresse depuis de nombreuses années aux propriétés de l'atome de fluor au sein des biomolécules et en particulier aux conséquences de l'introduction d'un groupement trifluorométhyle sur des aminoacides. Différents aminoacides α-trifluorométhylés ont été préparés sous forme énantiopure.[6,7,8]

Le fort caractère électroattracteur de l'atome de fluor, l'hydrophobie qu'il apporte aux molécules dans lesquelles il est inséré et l'encombrement stérique généré par la présence des trois atomes de fluor au sein du groupement trifluorométhyle de ces aminoacides, leur confèrent des propriétés électroniques et structurales particulières. Leur incorporation dans une chaîne peptidique est susceptible de modifier ses propriétés et représente donc un enjeu majeur.

L'incorporation de groupements fluorés dans des systèmes peptidiques est devenue un véritable outil pour la modulation des propriétés des biomolécules. La première partie de cette thèse présentera un état de l'art des conséquences de la présence d'atomes de fluor dans des systèmes biologiques d'un point de vue électronique, structural mais également sur les interactions avec leur environnement.

Mes travaux de thèse ont porté dans un premier temps sur la synthèse de manière énantiomériquement pure d'un aminoacide α-trifluorométhylé particulier, l'α-trifluorométhylalanine (α-Tfm-Ala), et sur son incorporation au sein de chaînes peptidiques. Le chapitre II présentera l'optimisation de la synthèse de l'α-Tfm-Alanine de manière reproductible et à grande échelle. La présence du groupement trifluorométhyle en position α de l'aminoacide désactivant fortement les fonctions acide carboxylique et amine adjacentes, le couplage de tels aminoacides est rendu fortement difficile. Si le couplage de la fonction acide reste relativement classique, celui de la fonction amine requiert quant à lui des conditions plus puissantes pour être réalisé. Mon travail de thèse a alors consisté, dans un premier temps, à optimiser ces conditions de couplage en solution afin de mettre au point une stratégie d'incorporation de l'α-Tfm-Alanine sur support solide, permettant l'accès à de longues séquences peptidiques. Cette stratégie, consistant à synthétiser préalablement, en solution, un bloc dipeptidique, permet de s'affranchir du couplage de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine irréalisable dans les conditions classiques de SPPS.

[6] Lebouvier, N.; Laroche, C.; Huguenot, F.; Brigaud, T. *Tetrahedron Lett*. **2002**, *43*, 2824-2830.
[7] Simon, J.; Nguyen, T. T.; Chelain, E.; Lensen, N.; Pytkowicz, J.; Chaume, G.; Brigaud, T. Tetrahedron: Asymmetry **2011**, *22*, 309-314.
[8] Chaume, G.; Lensen, N.; Caupène, C.; Brigaud, T. *Eur. J. Org. Chem*. **2009**, 5717-5724.

L'incorporation d'aminoacides fluorés dans un peptide étant susceptible d'augmenter localement son hydrophobie, pouvoir mesurer l'hydrophobie de fragments représente un outil particulièrement intéressant. Dans le but de déterminer l'influence du groupement trifluorométhyle sur la variation de l'hydrophobie de peptides, nous avons choisi de synthétiser différentes familles de tripeptides comprenant un peptide fluoré. La troisième partie de cette thèse détaillera l'étude physico-chimique réalisée afin de déterminer et comparer l'hydrophobie de ces peptides incorporant une α-Tfm-Alanine à celles de leurs analogues non fluorés. Cette étude, faisant intervenir des techniques de chromatographie en phase inverse (RP-HPLC), repose sur la mesure de grandeurs spécifiques dérivant des temps de rétention des peptides sur une colonne de silice C_{18}. La synthèse des peptides, le principe de la méthode analytique mise en œuvre ainsi que les résultats seront présentés dans le chapitre III.

Enfin, la présence d'aminoacides α-trifluorométhylés en des positions stratégiques de peptides d'intérêt permet de moduler leur métabolisme par des enzymes cibles[9] ou leurs interactions avec les protéines. Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, l'activité de peptides comportant une α-Tfm-Alanine a été mesurée sur l'inhibition de l'agrégation du peptide Aβ42 responsable de la formation de fibres amyloïdes se déposant dans le cerveau des personnes atteintes. Ces dépôts sont responsables des nombreux symptômes de la maladie. La première partie du chapitre IV détaillera les séquences peptidiques choisies ainsi que les expériences réalisées pour mesurer et comparer l'inhibition de l'agrégation de Aβ42 par ces peptides fluorés à celle de leurs analogues non fluorés.

Par ailleurs, afin d'étudier la résistance enzymatique de peptides α-trifluorométhylés, l'α-Tfm-Alanine a été incorporée dans différents peptides dont l'hydrolyse par deux enzymes digestives, la trypsine et la pepsine a été évaluée. La deuxième partie du chapitre IV présentera la synthèse d'un tétrapeptide comportant l'α-Tfm-Alanine de configuration (*R*) et sa digestion par la pepsine, une enzyme généraliste. Enfin, la troisième partie de ce chapitre étudiera le comportement de peptides fluorés vis-à-vis de la trypsine, une enzyme clivant les liaisons peptidiques dans lesquelles un aminoacide basique engage sa fonction acide. La présence d'atomes de fluor dans les séquences peptidiques permet alors de suivre ces expériences de digestion enzymatique par une méthode de détection sensible reposant sur la RMN du ^{19}F appelée 3-FABS. Cette technique de détection permet, par la variation sensible du déplacement chimique de produits fluorés, d'observer la disparition d'un substrat enzymatique fluoré et l'apparition de produits de digestion fluorés. Quantitative, elle permet également le calcul de constantes d'inhibition ou d'affinité, par

[9] Koksch, B.; Sewald, N.; Hofmann, H.-J.; Burger, K.; Jakubke, H.-D. *J. Pept. Sci.* **1997**, *3*, 157-167.

mesure à intervalles de temps réguliers de l'intensité des signaux RMN ^{19}F du substrat et des produits de clivage enzymatique. Par ailleurs, réalisée en présence d'un inhibiteur fluoré connu de la trypsine, il est possible d'observer si les peptides fluorés sont déplacés du site enzymatique par l'inhibiteur et de déterminer leur caractère inhibiteur. Le principe des techniques utilisées ainsi que les résultats de ces études de digestion enzymatique seront donnés dans la troisième partie du chapitre IV.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES CONSEQUENCES DE L'INTRODUCTION D'ATOMES DE FLUOR AU SEIN DE CHAÎNES PEPTIDIQUES

L'atome de fluor est devenu un élément fondamental en chimie médicinale à tel point qu'à l'heure actuelle, plus de 25% des médicaments sur le marché contiennent au moins un atome de fluor.[10] Les substitutions d'atomes d'hydrogène par un atome de fluor sont maintenant une stratégie classique pour la modulation des propriétés des molécules, et en particulier des peptides.[11] Cet intérêt découle des propriétés électroniques et structurales uniques qu'apporte la présence de fluor au sein d'une molécule.[12]

1) Généralités sur l'atome de fluor[13,14,15,16]

1.1. Electronégativité et force de liaison

Avec une électronégativité $\chi = 4$ assignée par Pauling, le fluor est l'élément le plus électronégatif de la table périodique.[17] Quand il est lié à un atome de carbone, il forme la plus forte des liaisons en chimie organique. Dans le cas d'une liaison C-F, ceci a notamment pour conséquence la création d'une liaison C-F hautement polarisée avec un moment dipolaire de l'ordre de 1,4 D. Dans les systèmes saturés, la présence d'un atome de fluor provoque un effet inductif où les électrons sont fortement attirés vers l'atome de fluor. Dans les systèmes insaturés, la double liaison est ainsi également polarisée (Figure 1).

Figure 1 : Polarisation de la liaison C-F dans les systèmes saturés et insaturés

La force de la liaison C-F est ainsi attribuée à l'attraction électronique considérable entre $F^{\delta-}$ et $C^{\delta+}$ plutôt qu'à un partage d'électrons comme dans le cas de liaisons covalentes classiques.

[10] Purser, S.; Moore, P. R. ; Swallow, S.; Gouverneur, V.; *Chem. Soc. Rev*. **2008**, *37*, 320-330.
[11] Salwiczek, M.; Nyakatura, E. K.; Gerling, U. I. M.; Ye, S.; Koksch, B. *Chem. Soc. Rev*. **2012**, *41*, 2135-2171.
[12] O'Hagan, D., *Chem. Soc. Rev*. **2008**, *37*, 308-319.
[13] Uneyama, K. *Organofluorine chemistry*; Blackwell Publishing Ltd.; Oxford, 2006.
[14] Chambers, R. *Fluorine in organic chemistry*; Blackwell Publishing Ltd.; Oxford, 2004.
[15] Mikami, K.; Itoh, Y.; Yamanaka, M. *Chem. Rev*. **2004**, *104*, 1-16.
[16] Bégué, J.-P.; Bonnet-Delpon, D.; *Chimie bioorganique et médicinal du fluor*; CNRS Editions, Paris, 2005.
[17] Pauling, L.*; The Nature of the Chemical Bond and the Structure of Molecules and Crystals : An Introduction to Modern Structural Chemistry;* Cornell University Press; Ithaca, NY, **1939**.

Ainsi, Wiberg *et al.*[18] utilisent cet argument pour expliquer la diminution de la taille des liaisons C-F du groupe CH_nF_n plus le nombre d'atomes de fluor augmente (Figure 2).

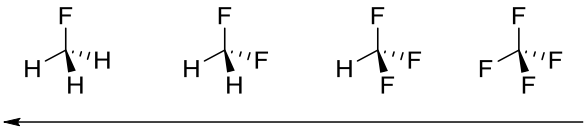


Figure 2 : Distance entre atomes de carbone et de fluor dans le système CH_nF_n

Le cas extrême du tétrafluorométhane CF_4 peut être considéré comme un carbone $C^{4\delta+}$, neutralisé par quatre ions partiels fluor. La densité de charge positive présente sur l'atome de carbone augmente linéairement de 0,5 unité de charge par atome de fluor supplémentaire. Ainsi, chaque atome de fluor est attiré vers un atome de carbone de plus en plus chargé positivement, résultant en une diminution de la longueur des liaisons C-F. Du à cette forte électronégativité, les trois paires d'électrons libres présentes sur l'atome de fluor sont fortement retenues par celui-ci. Ainsi, quand le fluor d'une liaison C-F interagit avec son environnement, il s'agit généralement d'interactions électrostatiques ou dipolaires.[12]

1.2. Effets stériques et électroniques

Concernant sa taille, l'atome de fluor possède un rayon de Van der Walls (1,47 Å) compris entre celui de l'oxygène (1,57 Å) et celui de l'hydrogène (1,20 Å). La substitution d'un atome d'hydrogène ou d'un groupe hydroxyle par un atome de fluor est donc souvent observée en chimie médicinale dans les molécules biologiquement actives car cela n'entraine pas de contrainte stérique trop importante au niveau des sites récepteurs.[10]

En revanche, l'introduction d'un groupement trifluorométhyle au sein d'une molécule impose un changement stérique bien plus drastique. Son volume de Van der Walls est ainsi similaire à celui d'un groupement éthyle.[19] Cependant, ces deux groupes ont des formes bien différentes, celle du groupement trifluorométhyle se rapprochant plus d'un groupement isopropyle.

Les effets purement électroniques peuvent aussi influencer la conformation d'une molécule. L'exemple du 1,2-difluoroéthane illustre ce concept. Alors que nous pourrions nous

[18] Wiberg, K. B.; Rablen, P. R. *J. Am. Chem. Soc*. **1993**, *115*, 614-625.
[19] Leroux, F. *ChemBioChem*. **2004**, *5*, 644-649.

attendre à une répulsion des deux atomes de fluor, favorisant une conformation *anti*, le 1,2-difluoroéthane adopte préférentiellement une conformation *gauche* (Figure 3). [12,17,20]

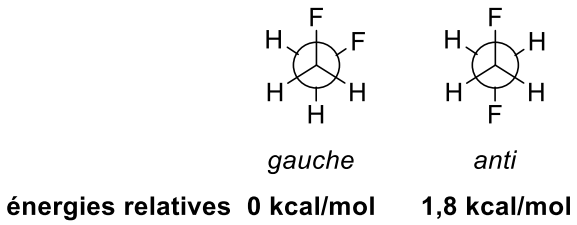


Figure 3 : Représentation de Newman des conformations *gauche* et *anti* du 1,2-difluoroéthane

O'Hagan[12] explique cette préférence du 1,2-difluoroéthane pour la conformation *gauche* par le phénomène d'hyperconjugaison. Dans le modèle d'hyperconjugaison, le conformère *gauche* possède deux interactions $\sigma_{C\text{-}H}$ ---$\sigma^*_{C\text{-}F}$ stabilisantes. MacDougall *et al*.[21] interprètent par ailleurs cet effet du fluor par le phénomène de « liaison C-F courbée ». Les liaisons C-C et C-H sont riches en électrons comparativement aux liaisons C-F, avec des électrons globalement répartis au milieu de la liaison, alors que dans le cas de la liaison C-F polarisée, les électrons sont proches de l'atome de fluor. Dans le cas d'une conformation *anti* du 1,2-difluoroéthyle (Figure 3), la trajectoire de la densité électronique ne permettrait pas un bon recouvrement des orbitales (Figure 4) alors que dans celui d'une conformation *gauche*, l'attraction électronique vers les atomes de fluor permet de conserver un bon recouvrement orbitalaire.

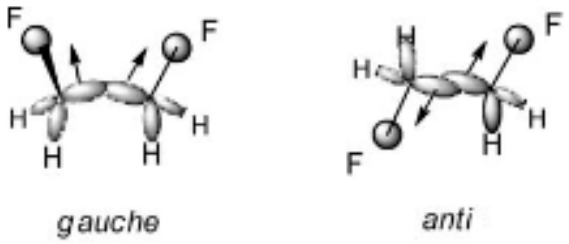


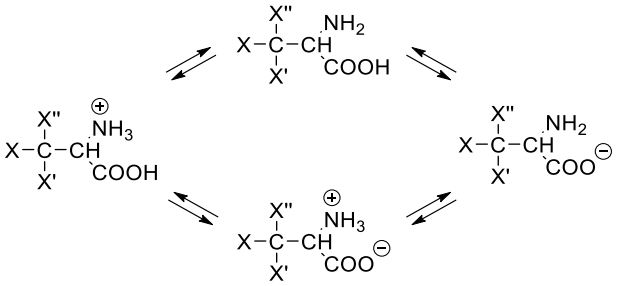
Figure 4 : Recouvrements orbitalaires dans la théorie de « liaison courbée » de Wiberg.[12,21]

Parmi les phénomènes d'hyperconjugaison ou de « liaison courbée » décrit par l'équipe de Mac Dougall pour la mise en place d'une conformation *gauche* du 1,2-difluoroéthane, l'hyperconjugaison apparait ainsi comme le contribuant majoritairement.[22]

[20] Muller, K.; Faeh, C.; Diederich, F. *Science* **2007**, *317*, 1881-1886.
[21] Wiberg, K. B.; Murcko, M. A.; Laidig, K. E.; MacDougall, P. J. *J. Phys. Chem*. **1990**, *94*, 6956-6969.
[22] Goodman, L.; Gu, H.; Pophristic, V., *J. Phys. Chem., A*. **2005**, *109*, 1223-1229.

1.3. Modification du pKa

Le remplacement d'un atome d'hydrogène par un atome de fluor n'a pas seulement des conséquences stériques ou électroniques mais peut aussi entrainer des modifications importantes du pKa des fonctions voisines. Dans les cas des α-aminoacides où deux coefficients de dissociation pKa peuvent être mesurés, ceux des fonctions amine et acide, ceci est particulièrement observable.[23] Plus on introduit d'atomes de fluor en position β d'une alanine, et plus on acidifie les deux fonctions acide et amine. Le Tableau 1 résume ainsi les différences de pKa (ΔpKa) observées par introduction progressive de fluor en position β d'une alanine.



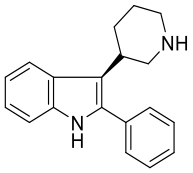
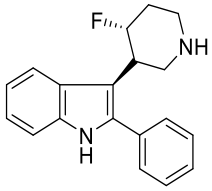
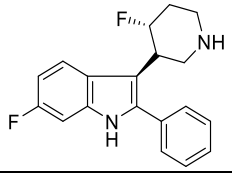
X	X'	X''	ΔpK_a (COOH)	ΔpK_a ($^+NH_3$)
H	H	H	0,0	0,0
F	H	H	+0,1	-0,1
F	F	H	-0,8	-1,5
F	F	F	-1,1	-4,5

Tableau 1 : Différence de Pka observées par ajout de fluor en position β d'une alanine23

Cette perturbation du pKa peut, en dehors de considérations physicochimiques modifier les propriétés pharmacocinétiques et l'affinité de liaison d'agents biologiques pour leur cible. Par ailleurs, cette modulation du pKa peut avoir des conséquences sur la biodisponibilité d'un produit (pourcentage de produit qui atteint la circulation sanguine et noté F) par modification du processus d'absorption.[10] En effet, un produit administré par voie orale peut voir sa biodisponibilité diminuée par une mauvaise absorption intestinale ou un métabolisme de premier passage hépatique, contrairement aux produits administrés par voie intra-veineuse (biodisponibilité de 100%). Dans certains cas, une augmentation de la biodisponibilité par voie orale est observée par fluoration de produits pharmaceutiques aminés par diminution de la basicité de cette fonction. Ainsi, dans le cas de drogues antipsychotiques de type 3-piperidinylindole, il a été prouvé que la fluoration en

[23] Schlosser, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *110*, 1496-1513.

position γ de l'amine réduisait son pKa de plus d'une unité et augmentait de ce fait sa biodisponibilité de 18% chez le rat et 37% chez le chien (Tableau 2).[24] De plus, comme le composé initial est métabolisé par hydroxylation en position 6 de l'indole, l'incorporation en cette position d'un atome de fluor bloque l'action enzymatique augmentant considérablement la biodisponibilité ainsi que l'affinité d'interaction.

Indole	5-HT_{2A}[a]	pK_a[b]	F(%)
	0,99	10,4	Faible
	0,43	8,5	18
	0,06	-	80

a affinités pour des clones de récepteurs humains 5-HT_{2A} (nM)
b Biodisponibilités calculées pour des doses de 0,5-2 $mg.kg^{-1}$ par injection intraveineuse ou par voie orale

Tableau 2 : Basicité et biodisponibilité de dérivés antipsychotiques de type 3-piperidinylindole

D'autres exemples sont également décrits dans la littérature, comme dans le cas de composés à visée antimigraineuse sélectifs des récepteurs 5-HT1D. La basicité de la fonction amine est réduite par mono- ou di-fluoration avec comme conséquence une augmentation importante de la biodisponibilité.

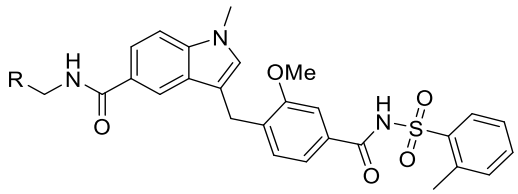
1.4. Modification de l'hydrophobie

La présence d'atomes de fluor au sein de molécules permet généralement d'augmenter l'hydrophobie des molécules fluorées.[10] La substitution d'atomes d'hydrogènes par des atomes de fluor n'entrainant pas de contraintes stériques particulièrement importantes, celle-ci est ainsi souvent employée dans le but d'augmenter la biodisponibilité de produits potentiellement actifs.

[24] Rowley, M.; Hallett, D. J.; Goodacre, S.; Moyes, C.; Crawforth, J.; Sparey, T. J.; Patel, S.; Marwood, R.; Patel, S.; Thomas, S.; Hitzel, L.; O'Connor, D.; Szeto, N.; Castro, J. L.; Hutson, P. H.; Macleod, A. M.; *J. Med. Chem*. **2001**, *44*, 1603-1614.

En effet, il existe deux manières pour un médicament potentiel d'être absorbé. La première consiste en un transport actif à l'aide de transporteurs et qui nécessite de l'énergie obtenue par hydrolyse de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP). La seconde, qui est la manière la plus souvent empruntée, est un transport passif au travers des membranes cellulaires lipophiles. Un médicament administré par voie orale doit donc d'être assez lipophile pour posséder une bonne biodisponibilité. L'hydrophobie d'une molécule se mesure par le log*P* qui est un coefficient représentant le partage d'un composé entre l'eau et une phase huileuse, généralement l'octanol. Plus sa valeur est élevée, plus le composé est lipophile.

Les conséquences de l'augmentation de l'hydrophobie de molécules par fluoration sont représentées par l'exemple des inhibiteurs des récepteurs aux leucotriènes qui permettent de réduire la bronchoconstriction chez les individus atteints d'asthme. Pour augmenter la lipophilie de ces composés, augmenter la longueur de la chaîne carbonée aboutit à une perte de reconnaissance par le récepteur. En revanche, l'incorporation d'atomes de fluor permet d'augmenter la lipophilie des molécules et d'améliorer jusqu'à dix fois l'activité *in vivo* des molécules fluorées par rapport à leurs analogues non fluorés (Tableau 3).[10]



R	**log*P***
$CH_3CH_2CH(CH_3)$	5,85
$CF_3CH_2CH(CH_3)$	6,18
$(CH_3CH_2)_2CHCH_2$	6,29
$CF_3CH_2CH(CH_3CH_2)CH_2$	6,45
$CF_3CH(CH_3)CH_2CH_2$	6,30
$CF_3CH(CH_3)CH_2$	5,89

Tableau 3 : Augmentation de l'hydrophobie de dérivés fluorés de leucotriènes

Or, l'incorporation d'atomes de fluor ne permet pas dans tous les cas d'augmenter l'hydrophobie des molécules. En effet, Smart montre que la monofluoration ou la trifluorométhylation terminales du *n*-propylbenzène résultent en une baisse des valeurs de log*P* par rapport au composé non fluoré (Figure 5).[25]

[25] Smart, B. E. *J. Fluorine Chem*. **2001**, *109*, 3-11.

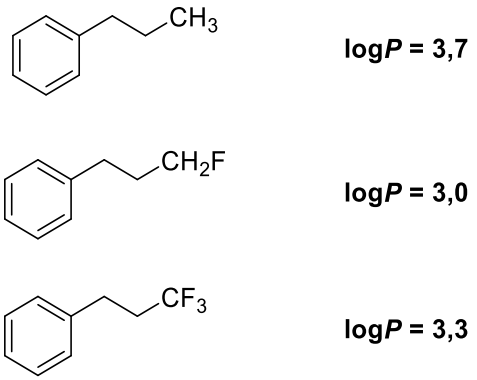


Figure 5 : Diminution des valeurs de log*P* par monofluoration ou trifluorométhylation du *n*-propylbenzène

Cette tendance est également observable dans le cas du difluoroéthane par rapport à l'éthane.[10] Dans le cas de ces systèmes saturés, Carreira *et coll.*[26] expliquent cette baisse d'hydrophobie par l'effet de polarisation induit par la présence d'atomes de fluor et qui compensent l'hydrophobie induite par ceux-ci (paragraphe 1.1).

2) Conséquences et intérêt de l'incorporation d'aminoacides fluorés dans des peptides

L'introduction d'atomes de fluor est un moyen utile de modifier les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques des composés biologiquement actifs. Cette stratégie s'avère être si efficace qu'à l'heure actuelle, plus de 20% des produits pharmaceutiques contiennent au moins un atome de fluor.[10,11] Les peptides et protéines étant des produits à fort potentiel pharmaceutique, ils sont cependant relativement sensibles à l'hydrolyse enzymatique. Ce manque de stabilité est responsable d'une faible biodisponibilité par voie orale et intraveineuse. A ce titre, le développement et l'incorporation d'aminoacides non naturels fluorés au sein de chaînes peptidiques a gagné une attention particulière auprès des chimistes médicinaux. Or, la synthèse de peptides fluorés est actuellement principalement limitée d'une part, par l'accès à des synthons fluorés puis, d'autre part, à leur incorporation dans des peptides par synthèse sur support solide (SPPS).[11]

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux conséquences que peut avoir la présence d'un aminoacide fluoré au sein d'un peptide ou d'une protéine, d'un point de vue structural, mais

[26] Huchet, Q. A.; Kuhn, B.; Wagner, B.; Fischer,H.; Kansy, M.; Zimmerli, D.; Carreira, E. M.; Müller, K. *J. Fluorine Chem.* **2013**, *152*, 119-128.

également physicochimique ou pharmacocinétique. Nous verrons, par ailleurs, au travers de quelques exemples, comment l'introduction d'atomes de fluor dans des structures protéiques ou peptidiques, est devenue un véritable outil pour la mise en évidence de processus biologiques.

2.1. Stabilisation de structures secondaires ou d'interactions protéines-protéines

Il a déjà été prouvé par le passé qu'incorporer un aminoacide α,α-disubstitué en des positions clefs de chaînes peptidiques était un moyen efficace de retarder leur dégradation enzymatique par la création ou la stabilisation de structures secondaires[27] ou tertiaires particulières. Ainsi, la présence d'acides aminoisobutyriques (Aib) au sein de chaînes peptidiques favorise la formation et la stabilisation d'hélices α. Cette observation renforce l'intérêt d'étudier la substitution en des points clefs par des aminoacides α-disubstitués mais également fluorés. L'encombrement stérique généré par la présence de plusieurs atomes de fluor en position α pourrait ainsi accroître la stabilité des structures secondaires de peptides, indispensable à leur activité biologique.

2.1.1. Interaction fluor-fluor

Tirrell *et al*. ont ainsi incorporé des mélanges racémiques de 5,5,5-trifluoroleucines en chacune des quatre positions d d'un sous-domaine de GCN4-pl, un facteur de transcription naturel, et étudié leur impact sur le repliement de ce dimère sous forme d'hélice (Figure 6).[28] Naturellement, ce sous-domaine adopte une conformation en hélice et s'associe sous forme de dimères *C*-terminaux, ou « leucine-zippers », par interactions hydrophobes des chaînes latérales des leucines à chaque position d des heptamères (Figure 6a). Dans ce type d'agencement, chaque leucine en position d fait face à la leucine de la position d' de l'hélice parallèle. Ainsi, pour les analogues fluorés, les chaînes latérales trifluorométylées se font face. Ces peptides fluorés montrent en fait une stabilité thermique plus élevée que celle des peptides natifs et une meilleur résistance vis-à-vis d'agents chimiques dénaturants. Les auteurs montrent que cette résistance accrue est due à des interactions de Van der Walls entre les résidus fluorés de chaque monomère

[27] Toniolo, C.; Benedetti, E. *Macromolecules* **1991**, *24*, 4004-4009.
[28] Tang, Y.; Ghirlanda, G.; Vaidehi, N.; Kua, J.; Mainz, D. T.; Goddard III, W. A.; DeGrado, W. F.; Tirrell, D. A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2790-2796.

(Figure 6). L'affinité et l'activité du sous domaine fluoré vis-à-vis des brins d'ADN sont par ailleurs conservées.

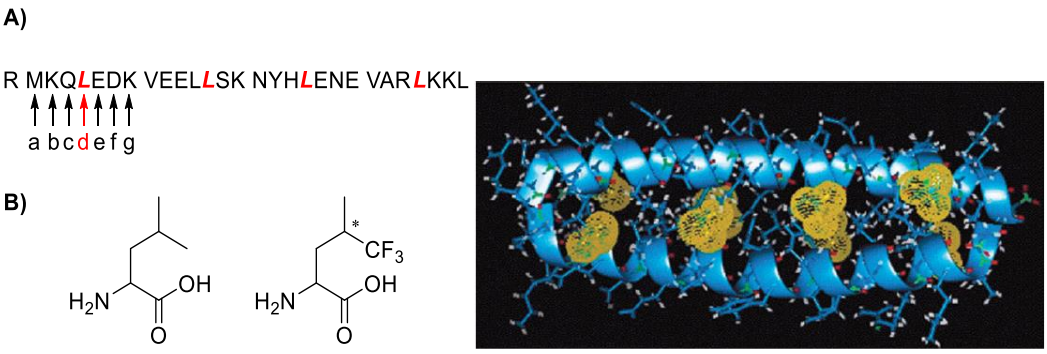


Figure 6 : A) Séquence du domaine *C*-terminal de GCN4-pl. Les leucines substituées figurent en gras, à chaque position d des heptamères abcdegf. B) Comparaison des structures des leucine et 5,5,5-trifluoroleucines. C) Modélisation moléculaire du sous-domaine de GCN4 modifié par la substitution par des trifluoroleucines en positions d.[11,28]

L'équipe de Tirrell a également étudié ce sous-domaine mais en substituant cette fois les aminoacides en positions a par des (*2S,3R*)-5,5,5-trifluoroisoleucines (δ-Tfm-Ile) ou (*2S,3R*)-4,4,4-trifluorovalines (γ-Tfm-Val) pour donner les peptides synthétiques INL et VNL respectivement (Figure 7).[29] Comme déjà précédemment observé,[28] la substitution par les homologues fluorés augmente la stabilité intrinsèque du dimère mais différemment selon la nature de l'aminoacide substitué. En effet, les études de dénaturation thermique et chimique montrent que la substitution des Ile par les δ-Tfm-Ile entraine une stabilisation approximativement huit fois plus importante que celle observée par remplacement des résidus valine par les γ-Tfm-Val. Les auteurs attribuent ces observations à une perte d'entropie des chaînes latérales des valines fluorées. Ainsi, au cours de la formation de l'hélice, les groupements méthyles des valines naturelles subissent normalement des chocs avec le squelette de l'hélice. En présence d'un groupement trifluorométhyle, plus encombrant, ces chocs sont augmentés, ce qui entraine une perte d'entropie plus importante. Ceci a pour conséquence de diminuer en partie l'effet stabilisant des interactions de Van der Walls entre valines fluorées (Figure 7).

[29] Son, S.; Tanrikulu, I. C.; Tirrell, D. A. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1251-1257.

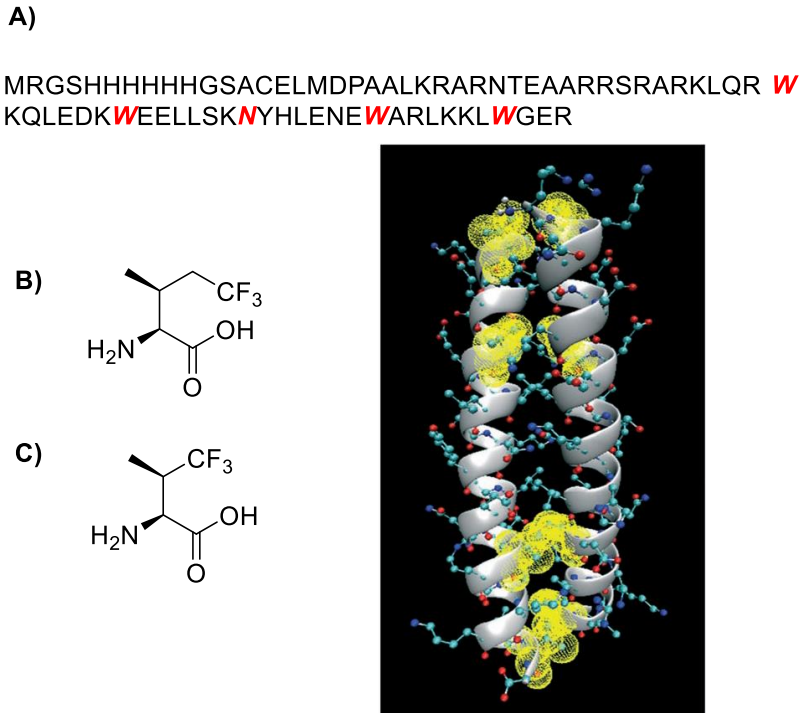


Figure 7 : A) Séquence du domaine C-terminal des peptides INL et VNL. B/C) Structures des δ-Tfm-Ile et γ-Tfm-Val C) Modélisation moléculaire du sous-domaine de GCN4 modifié par la substitution par des trifluorovalines et trifluoroisoleucines en positions a (d'après Son *et al.*[29])

Ainsi, ces exemples de stabilisation proviendraient d'interactions entre atomes de fluor, ce que les auteurs nomment l' « effet fluor ». Afin d'affirmer plus spécifiquement ces suppositions, Kumar *et coll*. étudient à nouveau la conception de ces dimères de GCN4-pl.[30,31] Pour cela, ils synthétisent des dimères reliés par des ponts disulfures, dans lesquels tous les résidus de leucine en position a et d par des 5,5,5,5',5',5'-hexafluoroleucines. Nous les appelerons les dimères F-F. Ils construisent également des dimères F-H, où un seul des deux monomères est fluoré ainsi que des dimères H-H, totalement non modifiés. Soumis à des conditions oxydoréductrices dénaturantes, les hétérodimères F-H ont alors tendance à reformer soit des dimères HH ou FF mais ne se réassemblent pas sous forme d'hétérodimères FH. Ces observations mènent alors les auteurs à la conclusion que le fluor empêcherait les interactions avec les chaînes carbonées par préférence pour celles fluorées. Ce phénomène appelé « effet fluor » est le même que celui qui est responsable de la non-miscibilité des composés perfluorés dans des solvants organiques.

[30] Bilgiçer, B.; Xing, X.; Kumar, K. *J. Am. Chem. Soc*. **2001**, *123*, 4393-4399.
[31] Bilgiçer, B.; Kumar, K. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4105.

2.1.2. Effets électroniques, caractère donneur de liaisons hydrogène

Les molécules aromatiques et perfluoroaromatiques ont tendance à s'associer entre elles par attraction électrostatique. En effet, l'effet électroattracteur des atomes de fluor diminuant considérablement la densité électronique du noyau benzénique, le moment quadrupolaire des molécules perfluoroaromatiques est de polarité inverse à celui des molécules aromatiques. Le résultat observé alors est une nette attraction électrostatique entre les deux faces π des composés aromatiques et perfluoroaromatiques (Figure 8). Ainsi, il a été calculé que l'énergie de stabilisation de l'interaction benzène/hexafluorobenzène est de 3,7 kcal.mol^{-1}. [32]

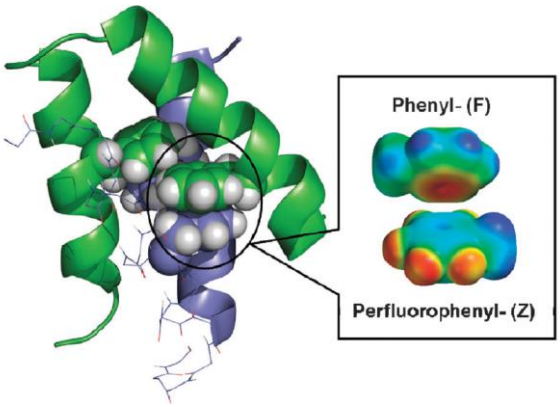


Figure 8 : Attraction électrostatique entre les noyaux aromatique d'une phénylalanine et une perfluorophénylalanine. La couleur bleue indique une charge positive, la couleur rouge une charge négative.11 (d'après Zheng *et al.*[32])

Concernant les peptides, ce type de phénomène peut être observé dans le cas des phénylalanines. Zheng et Gao[32] ont récemment rapporté l'intérêt de ce type d'assemblage pour favoriser les interactions proteine-proteines. Pour démontrer leur théorie, ils se servent d'un peptide modèle l'α2D. Ce peptide de 35 résidus adopte une structure en hélice quatre brins en se repliant sous forme d'homodimères avec un corps hydrophobe interne opposant les faces de deux phénylalanines de chaque brin. Un double mutant de ces dimères, comportant à la place des phénylalanines les perfluorophénylalanines a été synthétisé et peuvent également s'assembler sous forme d'homodimères perfluorés plus stables. De plus, quand ces deux types de dimères sont mélangés (non fluorés d'un côté et perfluorés de l'autre), ils subissent une transition complète vers la formation d'hétérodimères (Schéma 1).[33]

[32] Zheng, H.; Gao, J.; *Angew. Chem. Int. Ed*. **2010**, *49*, 8635-8639.
[33] Marsden, H. R.; Fraaije, J. G. E. M.; Kros, A. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2010**, *49*, 8570-8572.

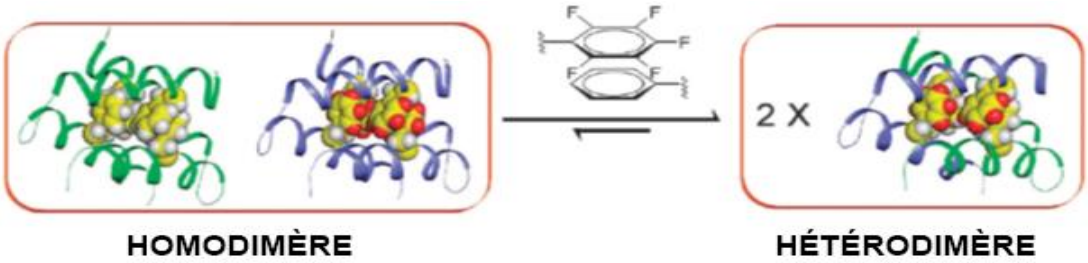


Schéma 1

Cette particularité conformationnelle est susceptible, d'après les auteurs, de provenir d'interaction quadrupole entre les noyaux aromatiques des phénylalanines d'un dimère et des perfluorophénylalanines de l'autre, leur attraction électrostatique contribuant à une stabiblisation de plus de 1,0 kcal.mol^{-1}.

De manière similaire, la fluoration de dérivés tyrosine sur leur cycle aromatique diminue considérablement la densité électronique de celui-ci. Or, l'effet électroattracteur du fluor sur un cycle aromatique de tyrosine a comme effet supplémentaire une diminution du pKa du groupe hydroxyle.[34,35] L'équipe de Schultz a étudié la stabilisation de l'état replié d'une nucléase, la Staphylococcal nuclease (SNase) dont la conformation est due à la présence d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle de la tyrosine 27 et le carboxylate du glutamate103.[36] A cause de la relative petite taille de l'atome de fluor, une monofluoration ne devrait pas engendrer de perturbation stérique dans l'environnement de la tyrosine modifiée. Les études de dénaturation entreprises révèlent que, plus le noyau de la tyrosine possède d'atomes de fluor, plus le peptide est stable dans son état replié avec, par exemple, une stabilisation de 1,59 kcal.mol^{-1} pour le dérivé tétrafluoré (Figure 9). Cette stabilisation provient de l'augmentation de l'acidité du groupement hydroxyle provoquant une augmentation de la force de la liaison hydrogène mise en jeu. Une corrélation linéaire entre les valeurs de pKa et la constante apparente de dénaturation K_{app} renforce encore cette observation (Figure 9).

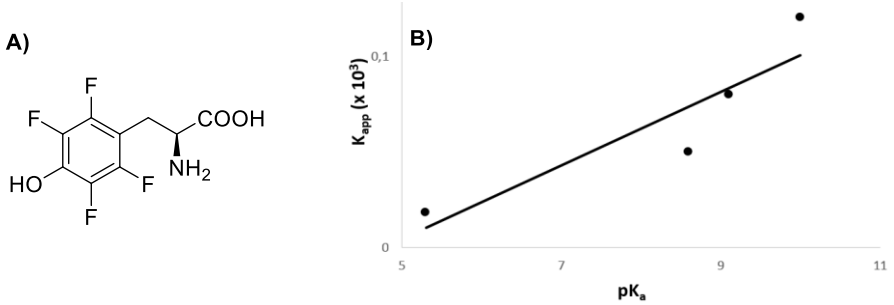


Figure 9 : A) Structure de la 2,3,5,6-tétrafluorotyrosine B) Courbe de dénaturation de la SNase en fonction du pKa du groupement hydroxyle de la tyrosine 27 (d'après Thorson *et al.*[36])

[34] Cole, P. A.; Sondhi, D.; Kim, K. *Pharmacol. Ther*. **1999**, *82*, 219-229.
[35] Kim, K.; Cole, P. A. *J. Am. Chem. Soc*. **1998**, *120*, 6851-6858.
[36] Thorson, J. S.; Chapman, E.; Murphy, E. C.; Schultz, P. G.; Judice, J. K. *J. Am. Chem. Soc*. **1995**, *117*, 1157-1158.

2.1.3. Stabilisation de structures secondaires par augmentation de l'hydrophobie

L'unique considération d'interactions entre atomes de fluor n'est pas suffisante pour expliquer la stabilisation de diverses structures tertiaires. Dans le but d'étudier les influences relatives de l'effet de fluor et de l'hydrophobie sur la stabilisation d'hélices par la présence d'hexafluoroleucines, l'équipe de Marsh a tenté de perturber l'hélicité d'une protéine synthétisée *de novo*, α_4F_6, par l'utilisation de solvants organiques non fluorés et fluorés.[37] Alors que l'addition de 2-propanol ou d'éthanol dénature de manière rapide et réversible les hélices non modifiées et n'affecte pas les fluorées, la mise en présence avec des solvants fluorés comme le trifluoroéthanol perturbe l'hélicité des deux types d'hélices, fluorées et natives, de manière irréversible (Schéma 2).

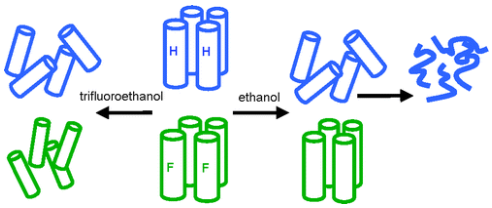


Schéma 2[37]

La conclusion des auteurs est que, si un unique effet du fluor était à l'origine de la stabilisation de la structure des protéines, le solvant fluoré aurait préférentiellement affecté l'hélice incorporant les héxafluoroleucines. Leur stabilité est, dans ce cas, attribuée à des interactions hydrophobes entre chaînes fluorées, inexistantes dans le cas des dérivés non fluorés.

Les hélices α ne sont pas les seules structures à subir l'influence de groupements fluorés présents sur les chaînes latérales des protéines. Un type de repliement plus influencé par le caractère hydrophobe des atomes de fluor que par des interactions fluor-fluor est le feuillet β. Pour étudier l'effet du groupement trifluorométhyle sur la stabilité des structures adoptées par NTL9, le domaine *N*-terminal de 56 résidus de la protéine ribosomale L9, Raleigh *et coll.* ont substitué les valines en positions 3 et 21 présentes à l'intérieur du corps du feuillet β par leur analogues trifluorométhylés (Figure 10).[38]

[37] Gottler, L. M.; de la Salud-Bea, R.; Marsh, E. N. G. *Biochemistry* **2008**, *47*, 4484-4490.
[38] Horng, J.-C.; Raleigh, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9286-9287.

Figure 10 : Représentation schématique du sous-domaine de NTL9 montrant l'emplacement des deux Valines 3 et 21 substituées[38]

Les auteurs indiquent que la substitution en position 3 augmente la stabilité du feuillet β de 0,8 kcal.mol^{-1} et de 1,4 kcal.mol^{-1} pour la position 21. Une cinétique de repliement et dépliement du feuillet également effectuée, révèle que la fluoration augmente le taux de repliement tout en ralentissant le dépliement. Ces deux observations sont, d'après les auteurs, explicables par une augmentation de l'hydrophobie qui stabilise cette structure en feuillet et déstabilise l'état déplié par rapport à l'état de transition.

Cheng *et coll*. ont par ailleurs mené une étude intéressante consistant à démontrer le potentiel d'aminoacides trifluorométhylés à former des structures secondaires sous forme de feuillet en substituant la position 53 du brin exposé au solvant du domaine B1 d'une protéine G par différents aminoacides trifluorométhylés (Figure 11).[39]

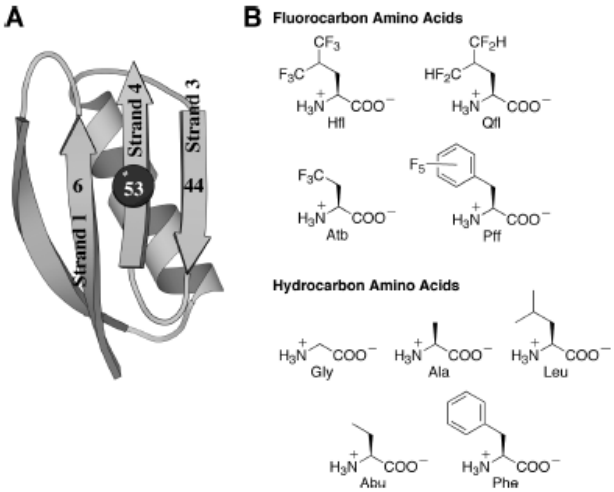


Figure 11 : A) Modèle ruban du domaine G B1 B) Structure des aminoacides utilisés pour étudier la formation de feuillets β par G B1[39]

[39] Chiu, H.-P.; Kokona, B.; Fairman, R.; Cheng, R. P. *J. Am. Chem. Soc*. **2009**, *131*, 13192-13193.

Tous ont montré une meilleure stabilisation de la structure de G B1 en comparaison à leurs analogues non fluorés. Par exemple, la substitution en position 53 d'une phénylalanine par une pentafluorophénylalanine stabilise la structure en feuillet β de 0,34 kcal.mol^{-1}. Le remplacement d'une leucine, en cette même position, par une 5,5,5,5′,5′,5′-hexafluoroleucine, s'accompagne d'une stabilisation de 0,29 kcal.mol^{-1}. Cette stabilisation est attribuée par les auteurs à une hydrophobie plus importante des aminoacides fluorés accompagnée d'effets stériques. En effet, ils observent une corrélation linéaire entre les énergies de stabilisation et les valeurs de log*P* ou de du volume R des chaînes latérales des aminoacides substitués. Les chaînes latérales plus volumineuses d'aminoacides auraient donc plus tendance à contraindre la chaîne peptidique dans laquelle ils sont incorporés à adopter une conformation sous forme de feuillet β, plus stable que les structures d'origine.

2.1.4. Stabilisation de peptides par formation de liaisons hydrogène

Au sein d'un peptide, la présence d'atomes de fluor en position éloignée sur les chaînes latérales des aminoacides composant la séquence peptidique de la chaîne principale du peptide favorise les interactions interpeptidiques sans dénaturer la conformation de chaque peptide. C'est le cas, par exemple, des agencements de type « leucines-zipper » fluorés vus précédemment. Dans ces agencements particuliers de peptides, deux peptides adoptant chacun une conformation en hélice, sont liés par interactions hydrophobes entre les chaînes latérales des leucines en position d de chaque hélice. Dans le cas de leucines hexafluorées en position γ, la stabilité de ces interactions est renforcée par interactions fluor-fluor.

D'après une étude réalisée par le groupe d'Ishida *et coll.*,[40] lorsque les groupements fluorés sont placés plus près de l'axe principal du peptide, en position α mais aussi β des aminoacides, ils exercent dans ce cas une forte attraction électronique sur les fonctions voisines, notamment les NH amides favorisant la formation de liaisons hydrogène entre leurs protons et les carbonyles d'une même chaîne peptidique. Ils favorisent ainsi les interactions intramoléculaires au sein de peptides par renforcement des liaisons hydrogène. Ainsi, pour illustrer leur théorie, ils synthétisent des hexapeptides composés d'un β-aminoacide cyclique composé d'un motif cyclohexane (résidu **C**, Figure 12).

[40] Cho, J.; Sawaki, K.; Hanashima, S.; Yamaguchi, Y.; Shiro, M.; Saigo, K.; Ishida, Y. *ChemComm* **2014**, *50*, 9855-9858.

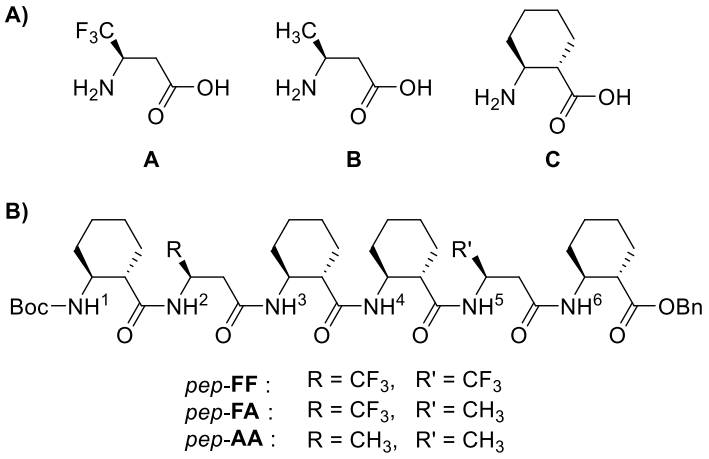


Figure 12 : A) Différents synthons des hexapeptides, F, A et C. B) Structure moléculaire des peptides hexamériques, *pep*-FF, *pep*-FA et *pep*-AA (d'après Cho *et al.*[40]).

Ce β-aminoacide contraint est l'un des β-aminoacides les plus utilisés pour la formation d'hélices de type 14. La substitution de deux des six résidus **C** par un résidu trifluoro-β-alanine (**F**) ou son analogue non fluoré β-alanine (**A**) a alors été effectuée en positions 2 et 5 des peptides, fournissant les trois peptides homologues *pep*-**FF**, *pep*-**FA** et *pep*-**AA** (Figure 12). Les spectres de dichroïsme circulaire enregistrés pour ces trois peptides présentent un pic négatif avec un maximum à 216 nm. Cela est caractéristique d'une structuration sous forme d'hélice 14 gauche. Les structures obtenues par cristallographie aux rayons X révèlent que les deux peptides *pep*-**CC** (comportant deux résidus C en positions 2 et 5) et *pep*-**FF** présentent effectivement la même conformation sous forme d'hélice 14. Les expériences de dichroïsme circulaire réalisées à températures croissantes (de -10°C à 100°C) montrent que le minimum à 216 nm est réduit de 60% dans le cas du peptide non fluoré *pep*-**CC** alors qu'il ne diminue que de 22% et 33% pour les peptides fluorés *pep*-**FF** et *pep*-**FA** respectivement. Ainsi, l'introduction d'un groupement trifluorométhyle permet d'augmenter la stabilité des structures hélices de β peptides Les structures par rayons X prouvent par ailleurs que les groupements trifluorométhyles, dans le cas du peptide *pep*-**FF** ne présentent pas de contacts entre eux ce qui exclut des interactions de type fluor-fluor. Les auteurs attribuent donc cette stabilité accrue à l'augmentation de la capacité des résidus fluorés à former et stabiliser les liaisons hydrogène.

2.1.5. Cas particulier des prolines fluorées

La présence d'un résidu proline dans une chaîne peptidique a des conséquences particulières en termes de structuration. On retrouve ainsi ces résidus le plus souvent dans des boucles ou extrémités de feuillets. En effet, leur structure cyclique contrainte ainsi que l'absence d'atome d'hydrogène sur l'atome d'azote de la fonction amide empêche la stabilisation du peptide par liaisons hydrogènes. Ceci explique la faible présence de prolines dans des structures classiques comme les hélices α ou les feuillets β.[41,42]

A l'échelle de l'aminoacide, la présence de fluor sur un résidu de proline a des structurales sur l'orientation du cycle dans l'espace. Le cycle pyrrolidine peut adopter deux conformations majoritaires : Cγ-*endo* et Cγ-*exo* (Schéma 3).

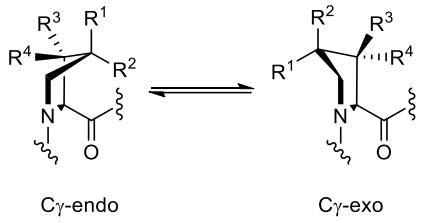


Schéma 3[11]

La substitution d'un atome d'hydrogène en position 3 ou 4 du cycle par un atome de fluor favorise ainsi la conformation Cγ-*endo* lorsque la configuration est (*S*), et la conformation Cγ-*exo* quand il s'agit de la configuration (*R*). Ceci peut être expliqué par l'effet *gauche*. La présence d'un atome de fluor ou de tout autre substituants électroattracteur favorise une orientation *gauche* du cycle plutôt que *anti* (Schéma 4).

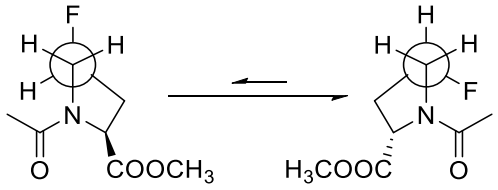


Schéma 4[11]

A l'échelle d'un peptide maintenant, la structure cyclique d'une proline peut modifier les angles rotationnels ψ, ω et ϕ, de la liaison peptidique engageant l'amide de la proline (Schéma 5).

[41] Yaron, A.; Naider, F. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **1993**, *28*, 31-81.
[42] Vanhoof, G.; Goossens, F.; De Meester, I.; Hendriks, D.; Scharpe, S. *FASEB J*. **1995**, *9*, 736-744.

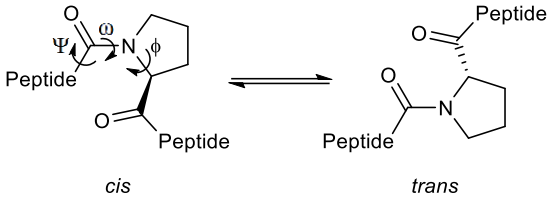


Schéma 5[11]

Ainsi, l'équilibre *cis/trans* de la liaison Xaa-Pro dépend de la conformation Cγ-*endo* ou *exo*.[43] Bien que les effets stériques favorisent une liaison amide de type *trans*, dans le cas d'un enchainement Xaa-Pro, une configuration *cis* est observée plus souvent qu'en présence d'un autre résidu (5,2 % d'observation contre 0,03 %). Des analyses par rayons X de cristaux révèlent que la conformation *cis* est associée à un puckering Cγ-*endo*. Un puckering Cγ-*exo* favorise l'interaction entre l'oxygène de l'amide de la liaison amide et le carbonyle du groupement carboxyle de la proline ce qui stabilise la conformation *trans* de la liaison peptidique. Ainsi, les dérivés fluorés *4R* et *3R*, qui favorisent un puckering de type Cγ-*exo*, possèdent une constate d'équilibre $K_{trans/cis}$ plus élevé que les dérivés *4S* et *3S* respectivement, préférant ainsi une orientation *trans* de la liaison peptidique. La probabilité de former une liaison peptidique de type *cis* est donc plus élevée en présence des dérivés *4R* et *3R*. Sachant que la présence d'un résidu de proline dans une chaîne peptidique est un facteur limitant dans les processus de repliement protéique, la découverte de l'importance des effets inductifs du fluor pour la modulation de la cinétique d'isomérisation *cis/trans* de cette liaison est donc d'un grand intérêt. La substitution de prolines par leurs dérivés fluorés permet de moduler les structures tertiaires adoptées par les protéines. De par leurs propriétés mécaniques intéressantes, les protéines fibrillaires comme l'élastine et le collagène sont d'un grand intérêt en médecine biologique ou pour le développement de biotechnologies. Ces protéines contiennent des séquences répétitives incorporant des résidus de proline responsables de propriétés et de repliements particuliers.

Le collagène est la protéine animale la plus abondante. C'est un composant essentiel des tissus connectifs où il forme des fibrilles composées de motifs en triples hélices PPII extrêmement stables. Leur structure primaire est souvent composée de séquences riches en prolines comme Pro-Hyp-Gly ou Gly-Pro-Hyp (Figure 13).[44]

[43] DeRider, M. L.; Wilkens, S. J.; Waddell, M. J.; Bretscher, L. E.; Weinhold, F.; Raines, R. T.; Markley, J. L. *J. Am. Chem. Soc*. **2002**, *124*, 2497-2505.
[44] Shoulders, M. D.; Raines, R. T. *Annu. Rev. Biochem*. **2009**, *78*, 929-958.

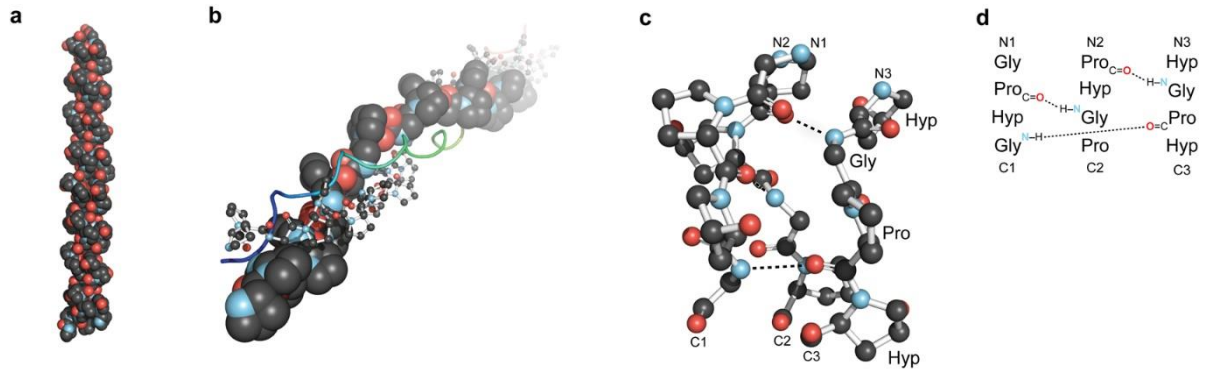


Figure 13 : Vue générale de la triple hélice de collagène. (a) Première structure cristalline haute résolution d'une triple hélice de collagène formée à partir de (ProHypGly)$_4$–(ProHypAla)–(ProHypGly)$_5$ (b) Vue du dessous d'une triple hélice (ProProGly)$_{10}$ (c) Coupe transversale d'une triple hélice de collagène, montrant le réseau de liaisons hydrogène (d) Vue étalée des brins du segment (c)[44]

La substitution des hydroxyprolines de ces motifs par des (*4R)*-fluoroprolines stabilise l'hélice deux fois plus que les hydroxyprolines par rapport à un enchainement Pro-Pro-Gly. Cette stabilisation est impartie aux effets stéréoélectroniques du fluor sur la conformation du cycle des prolines et l'équilibre *cis/trans* des liaisons peptidiques.[45] A la suite des travaux pionniers du groupe de Raines, plusieurs équipes ont étudié le rôle des effets stéréoélectroniques du fluor en substituant les positions Xaa ou Yaa d'enchainements Xaa-Yaa-Gly répétitifs par les deux diastéréoisomères des 4-fluororolines. A l'état natif, la conformation des prolines en position X ou Y n'est pas la même : le puckering est Cγ-*endo* en position Xaa et Cγ-*exo* pour les prolines en position Yaa.[46] Comme nous l'avons déjà vu, chaque diastéréoisomère de fluoroprolines, *4R* ou *4S*, stabilise un plissement de cycle particulier. Ainsi, en substituant les positions Xaa ou Yaa, par le diastéréoisomères de 4-fluoroprolines stabilisant le plissement de cycle existant, il serait possible de synthétiser des analogues de collagène hautement stabilisés.

Ainsi, les groupes de Raines[45] et Moroder[47], ont substitué la position Yaa des motifs répétitifs par des résidus (*4R)*-fluoroproline et prouvé que cela stabilisait effectivement la triple hélice de collagène. A l'inverse, la substitution de cette position par l'autre diastéréoisomère (*4S)*-fluoroproline déstabilise l'hélice. Des travaux identiques ont été menés sur la position Xaa[47] où le plissement de cycle natif est de type Cγ-*endo* et ont conduit aux mêmes résultats : la triple hélice est stabilisée par la substitution de Xaa par le dérivé (*4S)*-fluoroproline (plissement de cycle favorisé Cγ-*exo*) et déstabilisées par la présence du dérivé (*4R)*-fluoroproline.

[45] Bretscher, L. E.; Jenkins, C. L.; Taylor, K. M.; DeRider, M. L.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 777-778.
[46] Bella, J.; Eaton, M.; Brodsky, B.; Berman, H. M. *Science* **1994**, *266*, 75-81.
[47] Barth, D.; Milbradt, A. G.; Renner, C.; Moroder, L. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 79-86.

Ainsi, les fluoroprolines représentent des résidus de grand intérêt pour la modulation ou la stabilisation de structuration secondaires et tertiaires, permettant l'accès à des analogues de protéines naturelles à propriétés modifiées.

2.2. Augmentation de la résistance métabolique et inhibition enzymatique

L'une des limitations majeures à l'utilisation de peptides comme agents pharmaceutiques est leur extrême sensibilité aux peptidases et leur manque de sélectivité pour les cibles biologiques à cause de leur grande flexibilité conformationnelle. L'incorporation d'aminoacides α,α-disubstitués, notamment l'acide α-aminoisobutyrique, permet de favoriser et stabiliser la formation des structures secondaires que sont les hélices α et ralentir la dégradation enzymatique des peptides les incorporant.[27] De par les propriétés électroniques de l'atome de fluor (paragraphe 1.2) un groupement trifluorométhyle, lorsqu'il est placé en position α d'un aminoacide, exerce sur les fonctions environnantes des effets de polarisation considérables susceptibles de renforcer cette résistance. Ainsi, depuis les travaux de Koksch *et coll.*[9], il a été envisagé d'incorporer un aminoacide α-trifluorométhylé en des points stratégiques d'une séquence peptidique afin de ralentir voir empêcher l'hydrolyse par des peptidases. Afin d'étudier la résistance protéolytique de peptides α-trifluorométhylés vis-à-vis d'une enzyme à sérine, l'α-chymotrypsine, l'équipe de Koksch a synthétisé une série de peptides modèles contenant des α-Tfm-aminoacides en cinq positions différentes autour du site de clivage de l'enzyme (Figure 14).

Site de clivage ↓

	P_3	**P_2**	**P_1**	**P_1'**	**P_2'**	
		Z	**α-Tfm-Phe**	Leu	NH_2	
		Z	**α-CH_3-Phe**	Leu	NH_2	
	Z	**α-Tfm-Ala**	Phe	Leu	NH_2	
	Z	**Aib**	Phe	Leu	NH_2	
Z	**α-Tfm-Ala**	Ala	Phe	Leu	NH_2	
Z	**Aib**	Ala	Phe	Leu	NH_2	
		Z	Phe	**α-Tfm-Ala**	Ala	NH_2
		Z	Phe	**Aib**	Ala	NH_2
		Z	Phe	Leu	**α-Tfm-Ala**	NH_2
		Z	Phe	Leu	**Aib**	NH_2

Figure 14 : Séquences des peptides modèles de l'étude de résistance à l'hydrolyse par la chymotrypsine réalisée par le groupe de Koksch avec représenté le site de clivage de l'enzyme

Cette enzyme pancréatique humaine qui coupe préférentiellement après les aminoacides aromatiques est l'une des plus utilisées pour l'étude des mécanismes enzymatiques.

L'hydrolyse enzymatique par l'α-chymotrypsine de chaque peptide modèle a ainsi été étudiée (Figure 15).

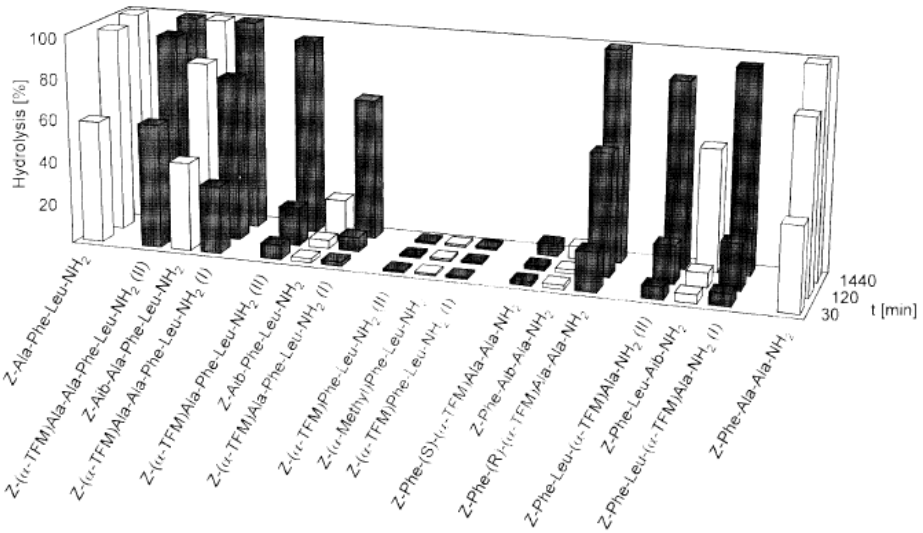


Figure 15 : Suivi de l'hydrolyse enzymatique par la chymotrypsine au cours du temps de peptides incorporant des α-Tfm-AA en différentes positions. (d'après Koksch *et al.*[9])

D'une part, les peptides témoins non fluorés ont tous été hydrolysés rapidement par l'enzyme. D'autre part, les analogues α-trifluorométhylés ont tous montré une résistance accrue à l'hydrolyse mais dépendante de la position de la substitution. Ainsi, les peptides substitués en position P1 montrent la résistance protéolytique la plus prononcée. Les substitutions en positions P2 et P3, où un acide α-aminoisobutyrique ou une α-Tfm-Alanine remplacent une alanine, entrainent également une résistance protéolytique élevée avec un retard de l'hydrolyse enzymatique. Ces résultats sont également dépendants de la configuration absolue de l'aminoacide fluoré introduit. Ainsi, concernant les peptide Z-Phe-α-Tfm-Ala-Ala-NH2, substitué par une α-Tfm-Ala en position P1', les deux diastéréoisomères (*S*,*S*,*S*) et (*S*,*R*,*S*) ont été étudiés séparément. Le peptide (*S*,*S*,*S*) montre une stabilité protéolytique considérable par rapport au diastéréoisomère (*S*,*R*,*S*). Une modélisation moléculaire montre que dans le cas du diastéréoisomère (*S*,*R*,*S*), une interaction des atomes de fluor avec la chaîne latérale de la sérine s'opère ce qui n'est pas possible dans le cas du dérivé (*S*,*S*,*S*). Les atomes de fluor agiraient comme accepteurs de liaison hydrogène vis-à-vis de la chaîne latérale de la sérine, augmentant le caractère nucléophile de l'atome d'oxygène de la sérine et ainsi, facilitant l'attaque nucléophile sur le groupe carbonyle du substrat et donc son hydrolyse par l'enzyme.

Déjà en 1983, Hortin *et al.*[48] prouvent que la présence d'aminoacides fluorés, dans le cas des fluoroasparagines, peut empêcher certains processus enzymatiques comme les glycosylations de protéines. Ces phénomènes concernent essentiellement les protéines membranaires et les protéines sécrétées et jouent un rôle dans la reconnaissance cellulaire. Les *N*-glycosylations consistent ainsi en un transfert d'oligosaccharides à partir de résidus dolichol pyrophosphates (Schéma 6). La ligation s'opère par substitution nucléophile de type 2 de l'amide de l'asparagine sur le carbone anomérique du sucre.

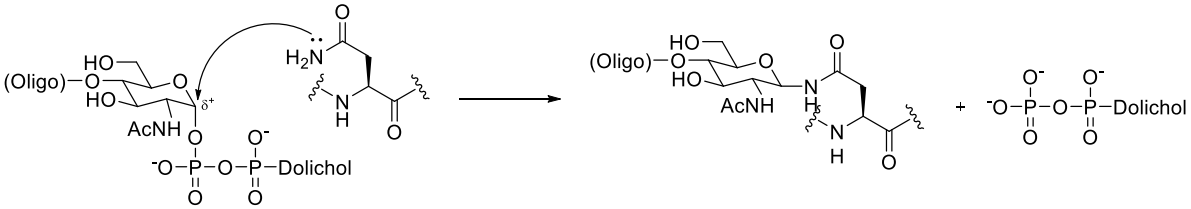


Schéma 6

Ainsi, les auteurs étudient la réaction enzymatique de *N*-glycosylation par un milieu cellulaire, d'un petit peptide synthétique Ac-Asn-Leu-Thr-CONHMe en substituant l'asparagine naturelle par une β-fluoroasparagine. En utilisant la *threo*-fluoroasparagine à la place de l'asparagine, le peptide modifié n'est plus glycosylé par le milieu cellulaire. Plusieurs hypothèses ont alors été proposées pour expliquer ce phénomène. Afin d'activer la réaction de glycosylation, il y a, au sein du peptide natif non fluoré, formation d'une liaison hydrogène entre l'oxygène du groupement hydroxyle de la thréonine et un hydrogène de l'amide de la chaîne latérale de l'asparagine (Schéma 7).

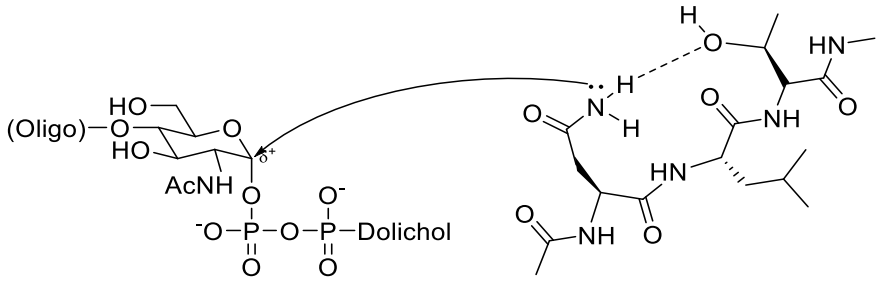


Schéma 7

La formation de cette liaison hydrogène augmente la nucléophilie de l'amide, ce qui favorise ainsi l'attaque nucléophile de la fonction amide de l'asparagine dans la réaction de *N*-glycosylation. La présence d'un atome de fluor, très électroattracteur, en position β de l'asparagine

[48] Hortin, G.; Stern, A. M.; Miller, B.; Abeles, R. H.; Boime, I. *J. Biol. Chem*. **1983**, *258*, 4047-4050.

de ce tripeptide a donc tendance à diminuer la nucléophilie de l'atome d'azote de l'amide. Ainsi, la réaction de *N*-glycosylation est inhibée par la présence de fluor en β (Schéma 8).

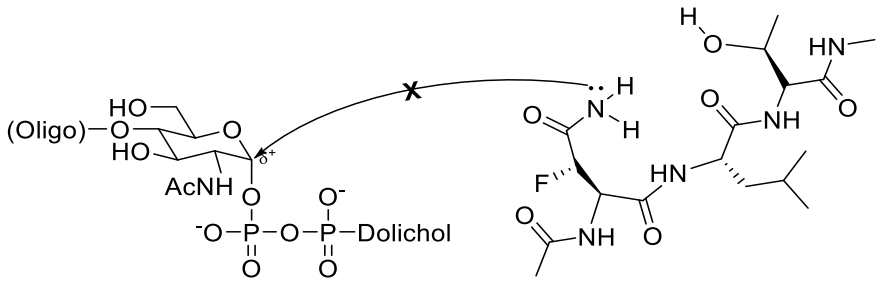


Schéma 8

Le cas des prolines fluorées en position 4 se révèle également intéressant dans le cadre de l'inhibition de la proline 4-hydroxylase (P4H) humaine. Cette enzyme se présente sous forme d'un tétramère constitué de deux sous-unités α et de deux sous-unités β de 59 kDa chacune. Elle catalyse l'hydroxylation en position C4 des prolines des brins de collagène. L'hydroxylation s'accompagne de la décarboxylation oxydante d'un α-cétoglutarate pour former un succinate (Schéma 9).

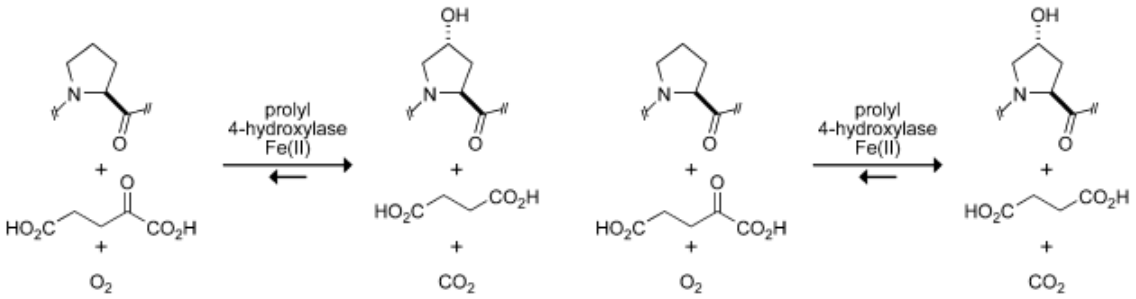


Schéma 9

Afin d'étudier le mécanisme catalytique de cette enzyme, Raines *et al*. utilisent un peptide modèle PEG-Gly-Tyr-Pro-Gly-OEt ainsi que les deux diastéréoisomères dérivés fluorés contenant à la place de la proline, la (4*R*)-fluoroproline ou la (4*S*)-fluoroproline.[49] L'atome de fluor étant sensiblement isostère à l'atome d'hydrogène, sa monosubstitution ne devrait pas altérer la reconnaissance du peptide par l'enzyme, donc son activité.[10] Ainsi, le peptide contenant la (4*R*)-fluoroproline n'est ainsi pas hydroxylé par l'enzyme. En effet, son mécanisme d'action consiste à extraire l'atome d'hydrogène *4R* des prolines avant d'hydroxyler cette position. Au sein de ce peptide, le fluor présent en position 4R bloque donc l'action de la P4H.

[49] Gorres, K. L.; Edupuganti, R.; Krow, G. R.; Raines, R. T. *Biochemistry* **2008**, *47*, 9447-9455.

Par ailleurs, ces études d'inhibition montrent que l'enzyme n'est pas inhibée par la présence de ce dérivé fluoré, prouvant que son mécanisme d'action ne fait intervenir de liaison entre le peptide et l'enzyme.

Parallèlement, le peptide diastéréoisomère contenant la (4*S*)-fluoroproline a également été testé vis-à-vis de la P4H et a révélé être hydroxylé par celle-ci. En revanche, la 4-cétoproline est récupérée comme produit final de la réaction. L'action de la P4H dépend fortement de la conformation de la liaison peptidique Xaa-Pro. En effet, la proline et la (4*S*)-fluoroproline adoptent toutes deux un puckering de type Cγ-*endo* (cf paragraphe 2.1.5) et conduisent à des ratios *trans/cis* faibles, tandis que la (4*R*)-fluoroproline ainsi que la 4-hydroxyproline préfèrent adopter un puckering Cγ-*exo* avec des ratio *trans/cis* élevés. Les peptides incorporant ces derniers résidus ne sont pas convertis par la P4H et ne l'inhibent pas, ils ne sont pas reconnus par l'enzyme.

Une autre classe d'enzymes importante qui catalyse l'isomérisation *cis/trans* de la liaison peptidique mettant en jeu la fonction amine des prolines sont les proline *cis/trans* isomérases (PPIases). Ces enzymes jouent un rôle déterminant pour le repliement protéique puisque l'isomérisation *cis/trans* est une étape limitante pour ce processus. Schiene-Fischer *et coll.* utlisent un peptide modèle (succinyl-Ala-Ser-Pro-Phe-p-nitroanilide) pour étudier l'efficacité catalytique de quatre PPIases différentes.[50] Leur approche consiste à substituer la proline de ce peptide par ses dérivés fluorés (4*R*)-fluoroproline, (4*S*)-fluoroproline et 4-difluoroproline. Cette substitution est sensée générer des effets inductifs important sur l'isomérisation *cis/trans* de la liaison peptidique de la proline sans engendrer néanmoins de contraintes stériques. Ainsi, les auteurs étudient l'efficacité catalytique de cette enzyme vis-à-vis de ces peptides modifiés et observent que les peptides contenant la (4*S*)-fluoroproline sont plus susceptibles à l'isomérisation par l'enzyme PPIase que les dérivés contenant la (4*R*)-fluoroproline. Ainsi, le taux d'isomérisation vers la configuration cis est augmentée de 22% avec un taux d'interconversion de la conformation *trans* vers la conformation *cis* deux fois plus rapide.

L'émergence de résistances bactériennes aux les antibiotiques les plus utilisés en clinique force à développer de nouvelles classes d'antibiotiques plus efficaces. Les peptides membranaires actifs ou peptides antimicrobiens (AMPs pour Membrane Active Peptides) sont de petits peptides (15 à 30 résidus) qui se révèlent biologiquement actifs contre les bactéries. Ils exercent leur activité

[50] Golbik, R.; Yu, C.; Weyher-Stingl, E.; Huber, R.; Moroder, L.; Budisa, N.; Schiene-Fischer, C. *Biochemistry* **2005**, *44*, 16026-16034.

en cassant les membranes bactériennes, leur capacité à interagir avec celles-ci est donc importante pour leur activité. Les bases structurelles de cette activité résident dans leur caractère amphiphile, opposant une face hydrophobe, à une autre comportant des aminoacides chargés positivement. Par ailleurs ces peptides sont souvent de structure hélicoïdale. Comme nous l'avons déjà vu auparavant, l'un des obstacles à l'utilisation de peptides comme agents thérapeutiques est leur rapide dégradation par les enzymes de l'organisme.

Marsh *et al.*[51] ont étudié la substitution des leucines et isoleucines du pexiganan, un analogue synthétique de magainin 2, un AMP de structure α-hélicoïdale ayant une activité antimicrobienne intéressante, par leurs analogues hexafluorométhylés. L'activité antimicrobienne ainsi que la résistance vis-à-vis de la trypsine et de la chymotrypsine ont été évaluées. En solution, le peptide natif n'est pas structuré mais forme des hélices α anti-parallèles en association avec les bicouches lipidiques de membranes. C'est dans cette structuration que le peptide exerce son activité.

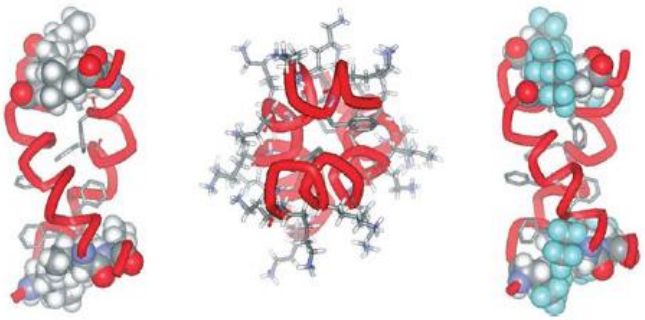


Figure 16 : Structuration en hélice α du pexiganan montrant les résidus de leucines et isoleucine

En incorporant l'hexafluoroleucine en des points stratégiques de ce peptide, les auteurs espèrent stabiliser cette structure et augmenter ainsi l'activité antimicrobienne tout en augmentant la résistance à l'hydrolyse par la trypsine et la chymotrypsine. D'une part, les études d'activité antimicrobiennes montrent que les peptides fluorés conservent une bonne activité. Concernant la résistance métabolique, les auteurs étudient l'hydrolyse en présence ou en absence de bicouches lipidiques. En présence de bicouches, les peptides ne montrent aucun signe de dégradation même après dix heures d'expérience alors qu'en absence de membranes, ils sont rapidement hydrolysés. Ces résultats prouvent que cette résistance peut être attribuée, non pas à la présence de fluor elle-même, mais à un auto-assemblage favorisé.

[51] Gottler, L. M.; Lee, H. Y.; Shelburne, C. E.; Ramamoorthy, A.; Marsh, E.N. G. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 370-373.

Ainsi, les conséquences conformationnelles de la présence d'un aminoacide hautement fluoré au sein d'un peptide ne s'expliquent pas seulement par un phénomène d'encombrement stérique mais résultent d'auto-assemblage inter ou intra moléculaire empêchant la dénaturation enzymatique de la structure.

2.3. Utilisation du fluor dans des structures enzymatiques comme preuves mécanistiques de processus biologiques.

Les aminoacides à chaîne latérale fonctionnalisée sont souvent engagés dans des interactions tertiaires qui stabilisent la structure protéique mais également dans la liaison d'un substrat à son enzyme ou même dans le processus catalytique de réactions enzymatiques. Le fluor exerçant une forte attraction électronique, il diminue le pKa des fonctions des chaînes latérales acides (Asp, Glu), stabilisant les carboxylates, et déstabilisant la charge positive des ammonium protonés (Lys), imidazolium (His) ou entités guanidinium (Arg).[11]

Les aminoacides présents dans des sites catalytiques d'enzymes et portant des chaînes latérales incorporant des groupements fonctionnels polaires comme des fonctions hydroxyles (Ser, Tyr, Thr) ou des amines (Asn, Gln) prennent souvent part à des liaisons hydrogène et peuvent temporairement former des liaisons covalentes avec des substrats pendant le déroulement d'une réaction enzymatique. De plus, leur chaîne est souvent le site de modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations ou des glycosylations. La présence d'atomes de fluor sur ce type d'aminoacides peut donc modifier ces interactions et perturber l'activité catalytique des enzymes qui utilisent ces propriétés dans leur mécanisme d'action.

Le rôle des résidus tyrosine au sein de sites enzymatiques dans des processus catalytiques de type acide / base peut être modifié par incorporation de dérivés tyrosines fluorés. En effet, l'ajout d'atomes de fluor sur le cycle des aminoacides aromatiques comme la phénylalanine résulte en une profonde diminution de la densité électronique sur le cycle aromatique. Il en est de même pour les résidus tyrosine. Cependant, un effet supplémentaire de la fluoration du cycle de la tyrosine est la diminution du pKa de la fonction phénol présent sur celui-ci.[34,35]

Ainsi, Zheng et Ornstein ont étudié l'influence de la fluoration d'une tyrosine hautement conservée du site actif de glutathion S-transférases (GST).[52] Ces protéines forment une classe

[52] Zheng, Y.-J.; Ornstein, R. L. *J. Am. Chem. Soc*. **1997**, *119*, 1523-1528.

d'enzymes détoxifiantes qui catalysent la conjugaison d'un tripeptide glutathion (γ-Glu-Cys-Gly) sur une grande variété de composés organiques qui possèdent des groupes électrophiles ou des alkyles ou aryles halogénés, lactones, époxydes, quinones, esters et quelques alcènes activés. Toutes les isoformes de cette enzyme se présentent sous forme d'homo- ou hétérodimères d'environ 50 kD (Figure 17).

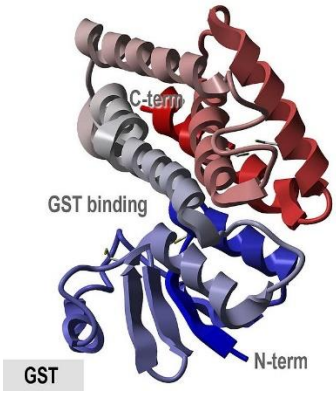


Figure 17 : Structure de la GST

Au cours d'une réaction enzymatique, le résidu tyrosine stabilise le thiolate du glutathion par une liaison hydrogène où le proton est plutôt déplacé vers le groupement phénolique (Figure 18). En, effet, le pKa de la fonction thiol de la cystéine du glutathion à l'intérieur du complexe enzyme-substrat est compris entre 6,2 et 6,7 alors que celui de la fonction phénol de la tyrosine de l'enzyme est compris entre 8,3 et 8,5.

Tyr-OH------ $^{-}$SG

Figure 18 : Liaison hydrogène mise en jeu au cours d'une réaction de conjugaison par une GST

Ainsi, en substituant cette tyrosine par son analogue 3-fluorotyrosine, les auteurs constatent qu'au sein du complexe, le pKa de la fonction phénol de la chaîne latérale de la tyrosine diminue de 1,2 unités pKa,[36] ce qui a pour conséquence le déplacement du proton vers l'atome de soufre de la cystéine du glutathion (Figure 19).

3F-Tyr-O^{-}------H-SG

Figure 19 : Déplacement du proton de la liaison hydrogène par fluoration de la tyrosine du site actif de GST

Ce changement dans l'état de protonation peut expliquer une perte d'activité catalytique de l'enzyme par fluoration. C'est pourquoi ces tyrosines fluorées sont souvent incorporées dans des sites catalytiques d'enzyme où leur rôle catalytique est supposé important. Si, par substitution du résidu naturel par son dérivé fluoré il y a perte d'activité enzymatique, ce résidu possède bien une fonction dans le mécanisme catalytique.

Un autre exemple d'utilisation d'aminoacide fluoré comme preuve de mécanismes catalytiques enzymatiques concerne le rôle des résidus histidine. Leur chaîne latérale imidazole joue un rôle crucial dans de nombreuses fonctions protéiques. L'une d'entre elles est leur caractère accepteur de liaisons hydrogènes au cours de catalyses acide / base.

L'incorporation d'atomes de fluor en position 2 et 4 du noyau imidazole diminue considérablement la valeur du cation imidazolium de plusieurs unités de pKa, celui-ci passant de 6,0 à 1,22 pour la 2-fluorohistidine et à 1,76 pour la 4-fluorohistidine.[53] Ceci a des conséquences sur les processus biologiques faisant intervenir le caractère acide / base d'une histidine.

Ainsi, Jackson *et al*. étudient le processus enzymatique catalytique par lequel la Ribonucléase A (RNAse A) clive les nucléotides des ARN.[54] Pour cela, deux histidines du site catalytique de l'enzyme His12 et His119 ont été remplacées par leur analogue 4-fluorohistidine et l'hydrolyse du substrat-urydil 3',5'-adénosine a été étudié. Le mécanisme supposé ainsi qu'une représentation du site actif de la RNAse présentant les deux histidines 12 et 119, complexées avec un substrat uridine vanadate sont montrés sur le Schéma 10 suivant.

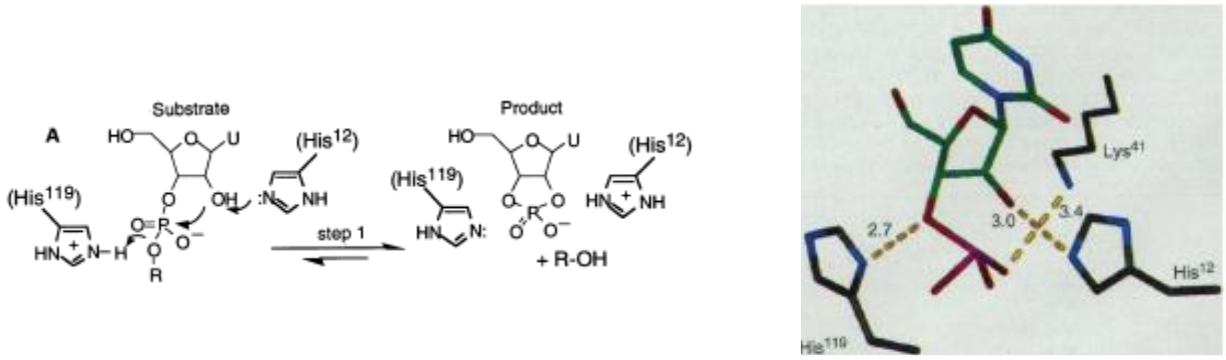


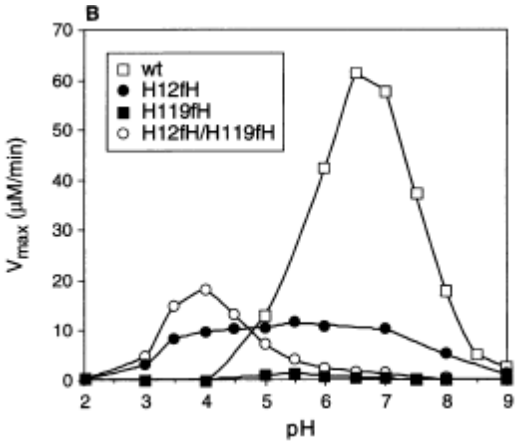
Schéma 10

Au cours de la réaction d'hydrolyse, l'histidine 12 jouerait un rôle basique alors que l'histidine 119 agirait plutôt comme un acide.

Le Graphe 1 suivant montre les taux relatifs d'hydrolyse du substrat par les enzymes non mutée, mutée sur l'histidine 12 ou mutée sur l'histidine 119, soit doublement modifiée. Ainsi si l'histidine 119 est remplacée par son analogue fluoré, aucune activité catalytique de la RNAse n'est observée. Une faible activité est conservée sur seule l'histidine 12 est modifiée. La présence

[53] Yeh, H. J. C.; Kirk, K. L.; Cohen, L. A.; Cohen, J. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1975**, 928-934.
[54] Jackson, D. Y.; Burnier, J.; Quan, C.; Stanley, M.; Tom, J.; Wells, J. A. *Science* **1994**, *266*, 243-247.

d'un atome de fluor augmente l'acidité de l'imidazole et déstabilise fortement la forme protonée nécessaire à la réaction enzymatique.



Graphe 1[54]

Ainsi, la modification par fluoration d'histidines dans le site catalytique de cette RNAse a permis de mettre en évidence, par modification du pKa du noyau imidazole, leur rôle catalytique par implication dans un mécanisme de type acide/base.

L'utilisation d'aminoacides fluorés se révèle donc intéressante pour prouver certains processus mécanistique enzymatiques.

3) Utilisation de l'atome de fluor comme sonde pour la RMN du ^{19}F

Les propriétés physico-chimiques de l'atome de fluor se montrent incroyablement utiles pour le design d'analogues de molécules biologiques importantes. L'analyse de composés organofluorés par RMN du ^{19}F était jusqu'à il y a peu réservée aux chimistes fondamentaux mais cette technique trouve dorénavant de plus en plus d'applications pour l'analyse de processus biologiques.

3.1. Avantages de la RMN du ^{19}F pour les études biologiques[55]

L'atome de fluor possède une relative petite taille, son rayon de Van der Walls est proche de celui d'un atome d'hydrogène. Sa substitution dans des molécules biologiques engendre donc peu de perturbations stériques.

Comme le ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, et ^{31}P, le noyau ^{19}F possède un spin de I = ½. Celui-ci est donc bien adapté pour des études simples par RMN. Possédant le rapport gyromagnétique γ le plus élevé du tableau périodique juste après le ^{1}H (γ_H = 267, 513 . 10^6 rad.s^{-1}.T^{-1}, γ_F = 251,662 . 10^6 rad.s^{-1}.T^{-1}), il est extrêmement sensible en détection RMN avec des couplages dipolaires forts. En pratique une augmentation de sensibilité de 10 à 100 fois celles des noyaux ^{2}H ou ^{15}N est observée.[56] Pour l'étude de systèmes biologiques, ceci s'avère très intéressant puisqu'il est possible de le détecter à des concentrations µM. Cette forte sensibilité apporte également l'avantage de pouvoir observer aisément des couplages longue distance. Ainsi, alors que le noyau ^{13}C permet un accès à des distances maximales de 7 Å, le noyau ^{19}F permet d'atteindre des distances supérieures à 18 Å.[57,58]

Même si le ^{1}H offre des avantages, il devient inutilisable en RMN du solide car les biomolécules souffrent souvent d'une diffusion de spin rapide résultant en un élargissement des raies homogène perturbant l'interprétation des signaux et difficilement améliorable par des techniques de traitement des signaux. Les couplages hétéronucléaires du fluor ainsi que les interactions bien définies au sein d'échantillons dilués génèrent des élargissements de raies non homogènes facilement supprimables par traitement des signaux et découplage du ^{1}H. En outre, ceci permet également des analyses sans purification préalable des échantillons.

3.2. Incorporation d'aminoacides fluorés dans des structures peptidiques pour l'étude des structures et des réactivités protéiques

La RMN du fluor est devenue depuis quelques années un outil intéressant pour la détection d'interactions protéines-protéines ou protéines-molécules biologiques dans de nombreux systèmes biologiques notamment les réactions enzymatiques ou impliquant les acides nucléiques. Pouvoir

[55] Ulrich, A. S. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc*. **2005**, *46*, 1-21.
[56] Grage, S. L.; Wang, J.; Cross, T. A.; Ulrich, A.S. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 3335–3336.
[57] Smith, S. O.; Aschheim, K.; Groesbeek, M. *Quart. Rev. Biophys*. **1996**, *29*, 395–449.
[58] Gilchrist Jr., M. L.; Monde, K.; Tomita, Y.; Iwashita, T.; Nakanishi, K.; McDermott, A.E. *J. Magn. Reson*. **2001**, *152*, 1–6.

incorporer des résidus fluorés au sein de ces grosses structures protéiques est donc un prérequis incontournable pour l'étude de leur structure et de leur activité. Une méthode permettant de marquer des protéines biologiques au moyen de résidus fluorés implique l'incorporation biochimique, à l'aide d'enzymes, de résidus fluorés préalablement synthétisés. Cependant, il est très difficile d'incorporer des aminoacides modifiés fluorés à un endroit précis de la molécule. Plusieurs groupes développent actuellement des méthodes d'introduction et, récemment, le premier exemple d'incorporation d'aminoacide fluoré (Tfm-Phe) a été décrit par l'équipe de Mehl.[59] De nombreux aminoacides fluorés ont été incorporés par des techniques d'expression protéique mais la majorité d'entre eux sont de nature aromatique (Figure 20). Cet état de fait provient de leur disponibilité commerciale, de leur relative facilité d'obtention par des méthodes synthétiques et de leur faible modification structurale par rapport aux aminoacides naturels correspondants.

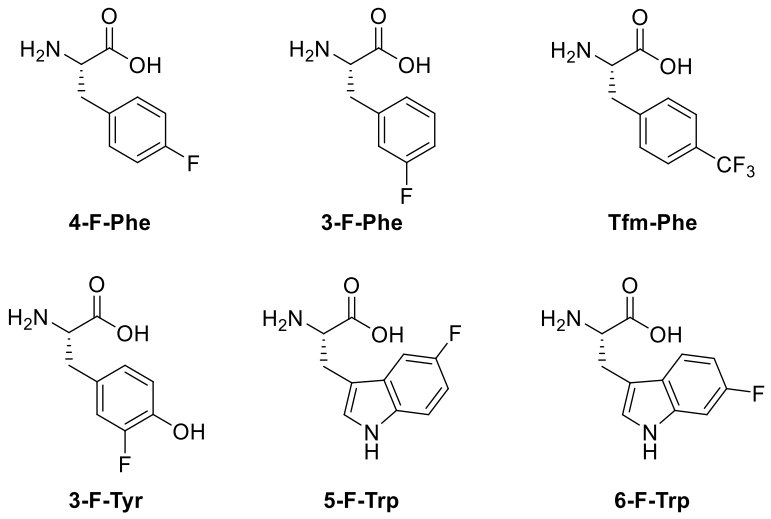


Figure 20 : Aminoacides fluorés aromatiques incorporés dans des structures peptidiques

Bien que les aminoacides aromatiques fluorés aient été largement favorisés dans le but d'étudier la conformation des protéines ou leurs interactions par RMN du fluor, on ne retrouve pratiquement que des exemples d'études faisant intervenir des aminoacides aliphatiques. L'un des premiers exemples d'aminoacides aliphatiques fluorés utilisés dans ce domaine est décrit par Feeney *et al*. en 1996.[60] Dans cette étude, les auteurs parviennent à incorporer une (*2S,4S*)-5-fluoroleucine de la dihydrofolate réductase de *Lactobacillus casei*, par modification génétique du

[59] Jackson, J. C.; Hammill, J. T.; Mehl, R. A. *J. Am. Chem. Soc*. **2007**, *129*, 1160-1166.
[60] Feeney, J.; McCormick, J.E.; Bauer, C.J.; Birdsall, B.; Moody, C.M.; Starkmann, B.A.; Young, D. W.; Francis, P.; Havlin, R. H.; Arnold, W. D.; Oldfield, E. *J. Am. Chem. Soc*. **1996**, *118*, 8700-8706.

gène codant l'enzyme de *L. casei*. Et mise en présence dans le milieu de culture de 5F-Leucine à une concentration de 60 mg/L et de leucine non modifiée à 40 mg/L.

Plus tard, d'autres exemples d'incorporation d'aminoacides fluorés dans des structures protéiques seront rapportés concernant des analogues de méthionines trifluorées ou difluorées, ou d'histidine (Figure 21).

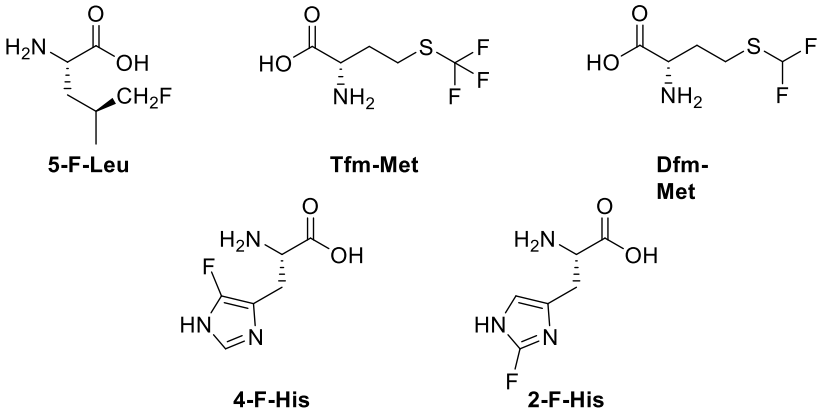


Figure 21 : Divers aminoacides fluorés ayant été incorporés dans des peptides

3.3. Utilisation du ^{19}F pour des études de métabolisme moléculaire par la technique 3-FABS

Une application intéressante et qui sera discutée plus en détail dans la chapitre IV est le suivi du catabolisme des composés organofluorés et en l'occurrence ici, de peptides fluorés par RMN ^{19}F par détection et dosage des produits d'hydrolyse enzymatique d'un peptide d'intérêt. Au cours des phases précoces de la découverte d'un médicament, il est important d'avoir une connaissance parfaite du métabolisme d'un composé avant de procéder aux études cliniques. Or, les méthodes traditionnelles utilisées pour identifier de nouveaux composés potentiellement inhibiteurs d'enzymes possèdent de nombreux inconvénients comme la génération de résultats faux positifs ou faux négatifs atteignant parfois des taux supérieurs à 95%.[61]

La RMN est donc une alternative intéressante pour le criblage de ligands capables d'interagir avec les protéines en général et les enzymes en particulier. Certaines de ces méthodes, comme la perturbation du déplacement chimique, sont basées sur l'observation d'une protéine en particulier, alors que d'autres suivent le ligand.

[61] Dalvit, C.; Ardini, E.; Flocco, M.; Fogliatto, G. P.; Mongelli, N.; Veronesi, M. Drug Discov. Today **2004**, *9*, 505-602.

Les travaux de Dalvit *et al*. sont pionniers dans le domaine du screening de candidats ligands à une enzyme.[62] Ils présentent une méthode sensible de détection par RMN du fluor qui permet le criblage rapide et efficace de protéines et substrats enzymatiques dans une gamme de concentrations comparable à celle des techniques classiques de criblage à haut débit (High Throughput Screening, HTS). Cette technique, appelée 3-FABS (three Fluorine Atoms for Biochemical Screening) requiert le marquage du substrat par un groupement trifluorométhyle. Plus de détails pratiques concernant la mise ne œuvre de cette méthode seront décrits dans le chapitre IV.

Ainsi, l'équipe de Dalvit a suivi par RMN du fluor l'évolution de deux substrats enzymatiques connus (1) et (2) de la protéine Sérine/Thréonine kinase APK1, modifiés par la présence d'un groupement trifluorométhyle (Figure 22).[62]

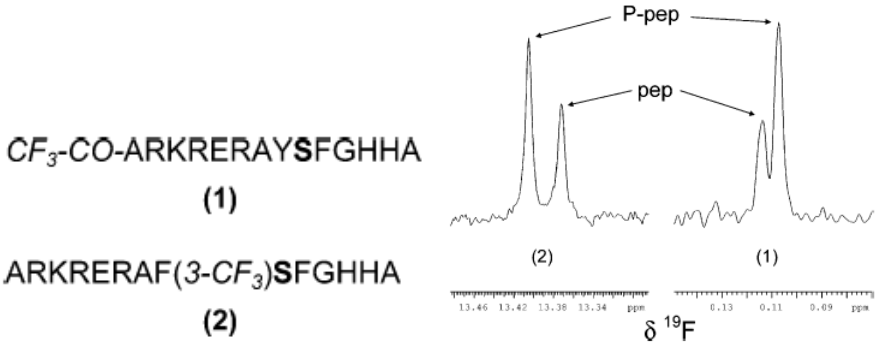


Figure 22 : Observation par RMN ^{19}F de l'évolution de la phosphorylation de deux substrats connus de APK1

La protéine kinase AKT1, qui phosphoryle les sérines et/ou thréonines est une enzyme anti-apoptotique, qui voit son activité augmentée dans plusieurs cancers. Le déplacement chimique du fluor étant extrêmement sensible même aux plus petites modifications structurales, la phosphorylation de ces peptides résulte en deux pics de deux déplacements chimiques suffisamment discriminés, pour le peptide de départ et le peptide modifié par phosphorylation enzymatique, et ce, même si le groupement trifluorométhyle est situé loin du site de phosphorylation comme dans le cas du peptide (2) (Figure 22). La technique 3-FABS permet donc d'observer la dégradation ou résistance d'un peptide face à son enzyme cible.

En corrélant l'intensité du signal du produit fluoré formé avec la concentration initiale en substrat il devient alors possible de déterminer la constante d'affinité du ligand fluoré étudié Km (Figure 23).

[62] Dalvit, C.; Ardini, E.; Flocco, M.; Fogliatto, G. P.; Mongelli, N.; Veronesi, M. *J. Am. Chem. Soc*. **2003**, *125*, 14620-14625.

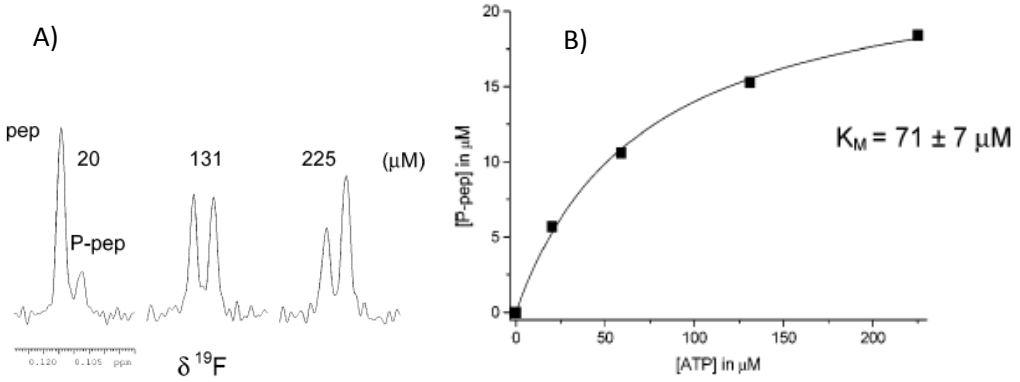


Figure 23 : A) Spectres RMN ^{19}F du substrat (1) à trois concentrations différentes en ATP (µM). B) Corrélation de l'intensité du signal RMN ^{19}F du produit P-pep de phosphorylation de (1) en fonction de la concentration respective en ATP utilisée permettant le calcul du Km de l'enzyme.[62]

Ceci est mis à profit lors du criblage de potentiels ligands pour une enzyme. En effet, si, pour une concentration donnée en substrat fluoré et en présence d'un potentiel ligand, l'intensité du produit de dégradation fluoré connu diminue, c'est donc que le produit criblé possède une meilleure affinité pour l'enzyme que le substrat fluoré de référence. En comparant la concentration en peptide fluoré non modifié (calculée par rapport à l'intensité du signal RMN) à la concentration en potentiel inhibiteur il devient alors possible de calculer son IC_{50}. Plus de détails concernant cette technique seront donnés au chapitre IV.

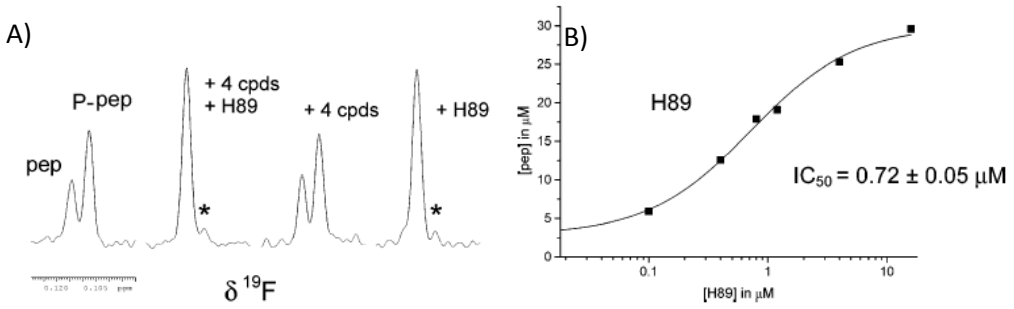


Figure 24 : A) Spectres RMN ^{19}F de la phosphorylation du substrat pep, respectivement en absence d'inhibiteur, en présence de 4 composés et de l'inhibiteur H89 et en présence seule de H89. B) Corrélation de l'intensité du signal RMN ^{19}F du substrat pep en fonction de la concentration en inhibiteur H89 permettant le calcul de son IC50.[62]

Giralt *et al.*, ont utilisé cette méthode de criblage par RMN pour trouver de nouveaux inhibiteurs de la prolyle oligopeptidase (POP), qui est une enzyme impliquée dans les troubles neuropsychiatriques et extraite de plantes traditionnelles utilisées en médecine Chinoise (Figure 25).[63] Cette enzyme est une protéase à sérine cytosolique qui hydrolyse les peptides contenant des résidus proline du côté C-terminal de la proline. De nombreux peptides bioactifs comme la

[63] Tarrago, T.; Frutos, S.; Rodriguez-Mias, R. A.; Giralt, E. *ChemBioChem*. **2006**, *7*, 827-833.

substance P ou la β-endorphine sont des substrats de la POP. De plus, plusieurs inhibiteurs spécifiques de la POP ont été récemment développés et sont en cours d'essais cliniques. Il est alors devenu important de pouvoir trouver de manière rapide et efficace de nouveaux inhibiteurs potentiels.

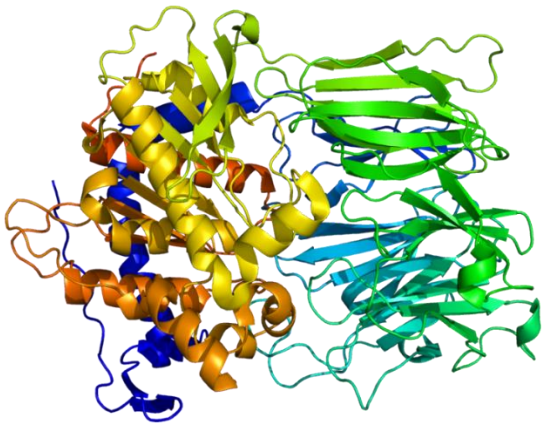


Figure 25 : Structure de la POP (d'après Tarrago *et al.*[63])

Ainsi, leur équipe a synthétisé un nouveau substrat fluoré de la POP, le peptide Z-Gly-Pro-Phe-4(CF_3)-NH_2 en se basant sur des structures connues d'inhibiteurs. Ce peptide possédant un groupement CF_3 sur la phénylalanine adjacente à la proline, il a d'abord été vérifié sa capacité à être employé comme référence dans une technique de criblage de type 3-FABS. Son incubation, à différentes concentrations, a montré une constante d'affinité Km de 85 µM autorisant celui-ci à être utilisé pour évaluer l'activité inhibitrice de mélanges complexes comme ceux présents dans différentes plantes utilisées en médecine traditionnelle chinoise. Après incubation de l'enzyme POP, du substrat fluoré à une certaine concentration et de divers extraits de plantes, les réactions ont été stoppées et les spectres RMN ^{19}F enregistrés. Le calcul des pourcentages d'inhibition a révélé que certains d'entre eux possédaient une bonne activité inhibitrice. L'utilisation, en parallèle, d'autres techniques de screening se sont révélées inefficaces. En particulier, le recours à une analyse colorimétrique utilisant le substrat coloré ZGP-pNA jaune s'est montré inutile, certains extraits possédant initialement la même couleur.

Cette nouvelle technique de criblage se révèle donc particulièrement efficace dans le cas de mélanges complexes difficilement purifiables. Très sensible, la RMN du fluor permet de se placer à des concentrations µM voire nM compatibles avec les réactions physiologiques, et permet la mise en place de protocoles rapides et reproductibles.

CHAPITRE II

INCORPORATION D'AMINO-ACIDES α-TRIFLUOROMETHYLES DANS UNE CHAÎNE PEPTIDIQUE

Le fort caractère électroattracteur de l'atome de fluor ainsi que ses propriétés stériques et électroniques modifient la réactivité des fonctions amine et acide des aminoacides α-trifluorométhylés de sorte que la basicité de la fonction amine est considérablement diminuée alors que l'acidité de la fonction acide carboxylique est augmentée. Ainsi, leur incorporation au sein de chaînes peptidiques par des méthodes conventionnelles n'est souvent pas possible, en particulier en ce qui concerne le couplage de la fonction amine. Néanmoins, cette réactivité particulièrement diminuée de l'amine permet le couplage de la fonction acide carboxylique sans protection *N*-terminale préalable.

Par ailleurs, peu de méthodes de synthèse énantiosélective d'aminoacides α-trifluorométhylés sont reportées dans la littérature.[64] La majorité des peptides incorporant un α-Tfm-aminoacide ont donc été synthétisés en mélange racémique, l'obtention des peptides énantiomériquement purs correspondants requérant une séparation minutieuse et délicate par HPLC des mélanges diastéréoisomériques.[65]

Nous présenterons dans un premier temps les différentes stratégies synthétiques décrites dans la littérature pour l'obtention d'aminoacides trifluorométhylés, en mélange racémique ou de manière énantiosélective. Dans un second temps, nous verrons que l'incorporation de ces aminoacides particuliers au sein de chaînes peptidiques n'est pas toujours aisée et nous intéresserons aux différentes stratégies envisagées pour la création d'une liaison peptidique engageant un aminoacide α-trifluorométhylé.

I) Rappels bibliographiques sur la synthèse d'aminoacides trifluorométhylés et leur incorporation dans des peptides

La synthèse d'aminoacides α-trifluorométhylés suscite un vif intérêt parmi la communauté des chimistes médicinaux et peptidistes. En effet, les applications directes d'aminoacides modifiés comme médicaments sont aujourd'hui bien connues mais celle des peptides natifs comme agents thérapeutiques sont limitées en particulier à cause de leur instabilité conformationnelle et protéolytique. Incorporer, en des positions stratégiques, des aminoacides modifiés par la présence

[64] Smits, R.; Cadicamo, C. D.; Burger, K.; Koksch, B. *Chem. Soc. Rev*. **2008**, *37*, 1727-1739.
[65] Koksch, B.; Dahl, C.; Radics, G.; Vocks, A.,; Arnold, K.; Arnhold, J.; Sieler, J.; Burger, K. *J. Pept. Sci*. **2004**, *10*, 67-81.

d'atomes de fluor constitue donc aujourd'hui un enjeu synthétique et pharmacocinétique majeur. Si, à l'heure actuelle, de nombreuses synthèses ont été décrites, peu concernent la synthèse énantiosélective d'aminoacides fluorés et la majorité d'entre eux sont obtenus en mélange racémique.

1) Synthèse d'aminoacides α-trifluorométhylés

Quel que soit la pureté énantiomérique des aminoacides α-trifluorométhylés dont la synthèse est rapportée dans la littérature, celle-ci met en général en jeu des aldéhydes ou cétones trifluorométhylés ou leurs dérivés imines (Figure 26).

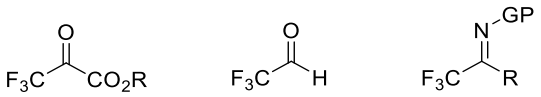


Figure 26 : Synthons de départ pour la synthèse des aminoacides α-trifluorométhylés

Il y a deux différentes stratégies fondamentales pour l'introduction de groupes fluoroalkyles dans des molécules organiques : la fluoration directe et l'utilisation de synthons fluorés. Bien que la première semble plus directe, les régio- et stéréosélectivités sont souvent difficiles à gérer. De plus, la réactivité importante des agents de fluoration rend nécessaire la protection des différents groupements fonctionnels de la molécule. En outre, une grande partie des réactifs actuellement utilisés pour l'introduction d'atomes de fluor sont chers, toxiques, corrosifs et parfois même explosifs. Ainsi, la stratégie mettant en jeu des synthons fluorés est une alternative intéressante pour le développement d'acides aminés trifluorométhylés.

Une des méthodes les plus utilisées pour la préparation d'aminoacides α-trifluorométhylés est la réaction de Strecker. Par cette méthode, les aldéhydes et cétones réagissent avec des nitriles pour donner des α-aminonitriles qui peuvent ensuite subir une réaction d'hydrolyse pour conduire aux α-aminoacides désirés. Cette réaction a été utilisée à de nombreuses reprises à partir des produits de départ fluorés précédents pour l'introduction de la fonction carboxylique ou de la chaîne latérale.

1.1. α-Tfm-aminoacides dérivés du fluoral ou de trifluorométhylcétones

L'utilisation du fluoral et de ses dérivés est souvent retrouvée pour la synthèse d'aminoacides α-trifluorométhylés. Les amines et imines dérivées du fluoral ou de cétones

fluoroalkylées se sont révélées être de bons synthons de départ pour la réaction de type Strecker.[66] L'addition de composés nucléophiles cyanures sur ce type de composés est généralement réalisée par activation grâce à des acides de Lewis. Il se forme un intermédiaire iminium qui peut alors réagir avec les ions cyanures pour donner les nitriles correspondants.[67] Or, la double liaison C=N de ce type d'imines n'a généralement pas besoin d'être activée, celle-ci l'étant déjà par la présence du groupement trifluorométhyle fortement électroattracteur. Par cette méthode, Weygand et Steglich ont été les premiers à reporter la synthèse de l'α-trifluoroalanine (Tfm-Gly) (Schéma 11).[68]

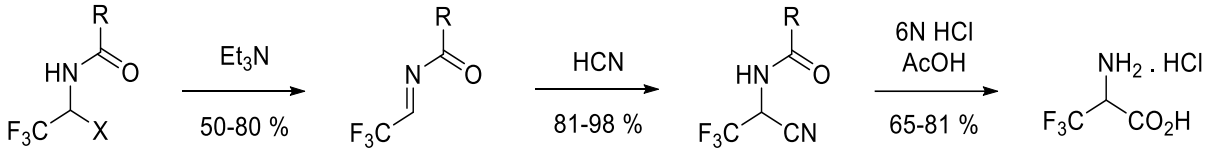


Schéma 11

Sa synthèse met en jeu une *N*-acyle trifluoroacetaldimine hautement électrophile dans une réaction d'hydrocyanation qui, après hydrolyse, fournit le chlorhydrate de l'α-Tfm-Glycine.

Cette première synthèse de la glycine α-trifluorométhylée, bien qu'efficace, n'en reste pas moins achirale. Notre laboratoire a également utilisé le fluoral comme synthon fluoré pour la synthèse énantiosélective de la (*R*)-α-Tfm-Glycine (Schéma 12).[6] Par condensation du fluoral avec un auxiliaire chiral, le (*R*)-phénylglycinol, puis élimination azéotropique d'eau, un mélange des deux oxazolidines diastéréoisomères dans des proportions 62 : 38 est obtenu avec un très bon rendement de 91%. Ce mélange est ensuite mis en jeu dans une réaction de type Strecker à l'aide de cyanotriméthylsilane (TMSCN) en présence d'un acide de Lewis, le diéthylétherate de trifluorure de bore ($BF_3.OEt_2$), pour fournir un mélange des deux aminonitriles diastéréoisomères avec un rendement de 91%, et un rapport diastéréoisomérique (*R*,*R*):(*S*,*R*) de 83:17. Le diastéréoisomère majoritaire est séparé par chromatographie sur gel de silice. La déprotection de l'auxiliaire chiral puis l'hydrolyse en conditions acides fournit la (*R*)-α-Tfm-Gly avec un rendement de 70%. Il faut signaler que cet aminoacide n'a pu être obtenu que sous forme énantioenrichie car il épimérise facilement.

[66] Bégué, J.-P.; Bonnet-Delpon, D.; Crousse, B.; Legros, J. *Chem. Soc. Rev*. **2005**, *34*, 562-572.
[67] Xu, Y.; Dolbier Jr., W. R. *J. Org. Chem*. **2000**, *65*, 2134-2137.
[68] Weygand, F.; Steglich, W.; Oettmeier, W.; Maierhofer, A.; Loy, R. S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **1966**, *5*, 600-601.

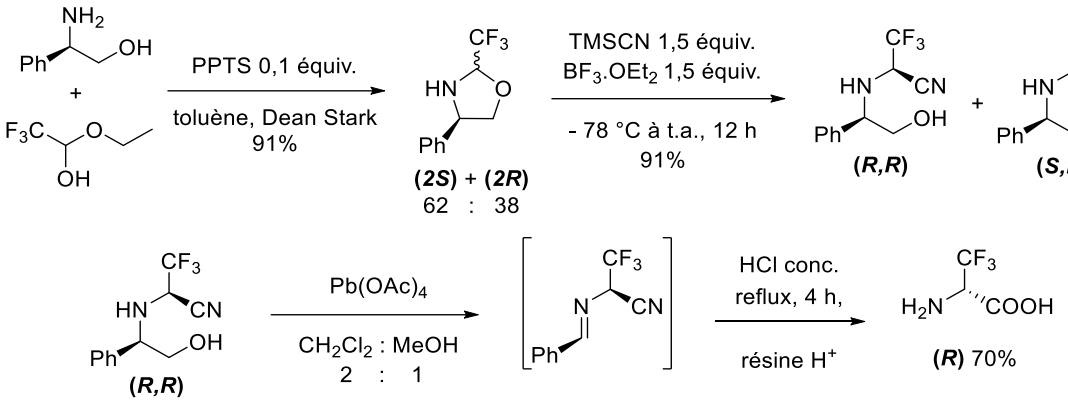


Schéma 12

De même, la synthèse énantiosélective de l'α-Tfm-Alanine utilise la trifluorométhylcétone (Schéma 13).[8,69] Celle-ci est également condensée au (*R*)-phénylglycinol à reflux du toluène avec élimination azétropique d'eau. Après réaction de type Strecker les deux aminonitriles diastéréoisomères sont pré séparés par précipitation sélective du dérivé (*R*,*S*) dans le pentane ce qui permet d'enrichir chaque fraction en un diastéréoisomère. La séparation par chromatographie sur gel de silice permet ensuite d'obtenir chaque diastéréoisomère avec d'excellents rendements.

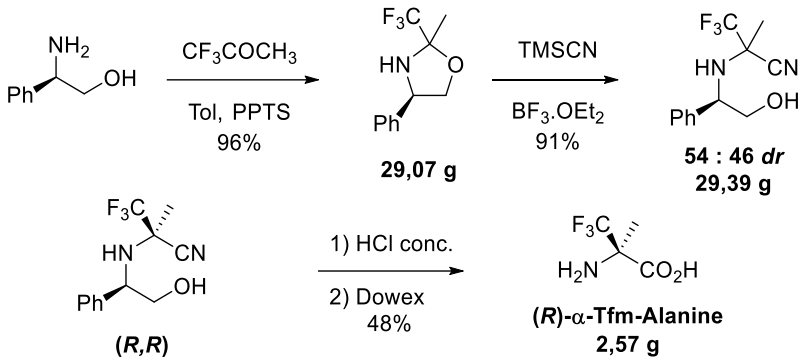


Schéma 13

L'hydrolyse acide de chaque diastéréoisomère, suivie d'une purification sur résine échangeuse d'ions permet ensuite d'isoler l'énantiomère (*R*) de l'α-Tfm-Alanine avec un rendement de 48%.

Enfin, Lu *et coll.*[70] mettent en œuvre cette stratégie pour synthétiser l'α-Tfm-Phénylglycine. Une réaction de Strecker stéréosélective sur une sulfinyllimine chirale suivie d'une hydrolyse en milieu acide conduit à l'α-Tfm-Phénylglycine énantiopure avec de bons rendements (Schéma 14).

[69] Huguenot, F.; Brigaud, T. *J. Org. Chem*. **2006**, *71*, 7075-7078.
[70] Wang, H.; Zhao, X.; Li, Y.; Lu, L.; *Org. Lett*. **2006**, *8*, 1379-1381.

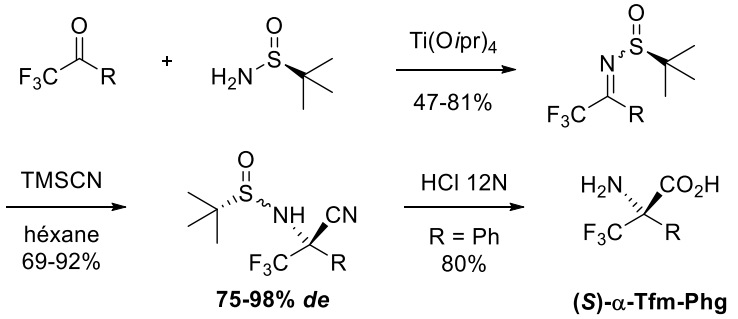


Schéma 14

1.2. α-trifluorométhylaminoacides dérivés de trifluoropyruvate[71]

Les imines dérivées des 3,3,3-trifluoropyruvates d'alkyle sont des produits de départ fluorés privilégiés pour la préparation d'aminoacides α-trifluorométhylés, et ont initialement été décrits par les groupes de Kukhar[72] et Kolomiets[73] en 1986. Les trifluoropyruvates d'alkyles étant des composés hautement électrophiles, la préparation des imines correspondantes a longtemps représenté un challenge (Schéma 15).

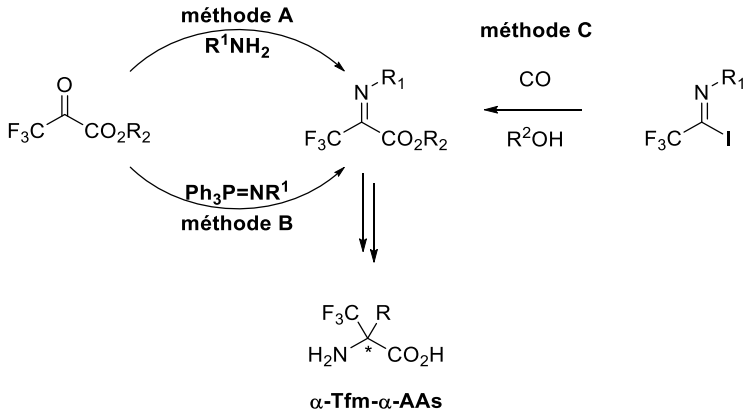


Schéma 15[71]

Par exemple, Soloshonok décrit leur synthèse par condensation directe d'amines ou amides (Schéma 15, méthode A).[74] Cette réaction produit un composé *gem*-amino-alcool qui a tendance à subir une réaction de type haloforme produisant des trifluoroacétamides. Cependant, l'obtention des imines désirées nécessite alors la déshydratation du composé intermédiaire dans des conditions drastiques. C'est pourquoi, en général, le contrôle de la régiosélectivité de ces réactions entre des carbonyles fluorés hautement électrophiles et des amines nucléophiles demeure un problème. Cette régiosélectivité peut être améliorée par réaction de Staudinger (Schéma 15, méthode B), mettant

[71] Aceña, J. L.; Sorochinsky, A. E.; Soloshonok, V. A. *Synthesis* **2012**, *44*, 1591-1602.
[72] Soloshonok, V. A.; Gerus, I. I.; Yagupolskii, Y. L. *Zh. Org. Khim*. **1986**, *22*, 1335-1337.
[73] Osipov, S. N.; Chkanikov, N. D.; Kolomiets, A. F.; Fokin, A. V. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim*. **1986**, 1384-1387.
[74] Ohkura, H.; Berbasov, D. O.; Soloshonok, V. A. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 1647-1656.

en jeu des phophazènes *N*-substitués. Or, leur préparation à partir des azides et triphénylphosphines correspondants reste difficile et la purification des imines désirées est généralement laborieuse.[72] Enfin, le groupe de Uneyama a développé une autre voie de synthèse efficace d'iminoesters par alkoxycarbonylation d'iodo imidoyl fluoroalkylés (Schéma 15, méthode C).[75]

1.2.1. En série racémique

L'addition de chaînes saturées alkyles sur des imines *N*-protégées dérivées de trifluoropyruvates de benzyle ou de *tert*-butyle obtenues dans les conditions d'Uneyama, a permis la préparation de divers aminoacides aliphatiques comme l'α-Tfm-Alanine, l'α-Tfm-Norleucine ou l'α-Tfm-Glycine (Schéma 16).[76]

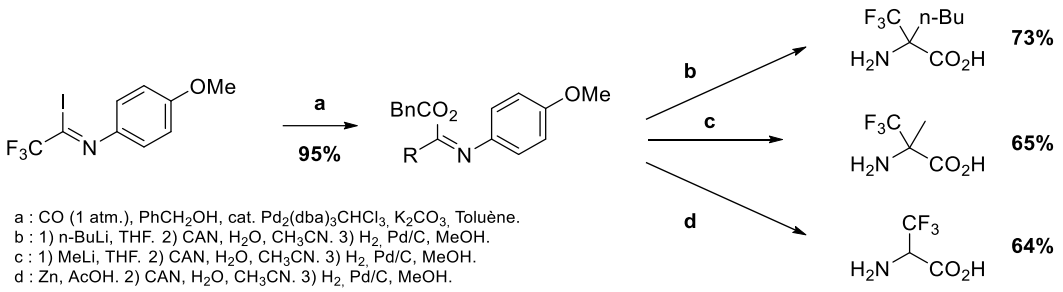


Schéma 16

La même approche utilisant comme synthon de départ une imine *N*-protégée de trifluoropyruvate de méthyle, a prouvé être une méthode efficace pour l'introduction de chaînes alkyles plus complexes et fonctionnalisées. Ainsi, Burger *et al*. utilisent cette stratégie pour la préparation de deux aminoacides fonctionnalisés : l'acide α-Tfm-Aspartique[77] ou l'α-Tfm-Arginine[78] (Schéma 17). En partant d'une imine dérivée de trifluoropyruvate de méthyle *N*-protégée par un groupement *N*-*tert*-butyloxycarbonyle (Boc) ou *N*-benzyloxycarbonyle (Cbz), nous remarquons que cette méthode permet l'obtention des aminoacides α-trifluorométhylés directement sous forme *N*-protégée, prêts pour leur incorporation dans une chaîne peptidique.

[75] Uneyama, K. *J. Fluorine Chem*. **1999**, *97*, 11-25.
[76] Watanabe, H.; Hashizume, Y.; Uneyama, K. Tetrahedron Lett. **1992**, *33*, 4333-4336.
[77] Burger, K.; Gaa, K. *Chem.–Ztg*. **1990**, *114*, 101-104.
[78] Moroni, M.; Koksch, B.; Osipov, S. N.; Crucianelli, M.; Frigerio, M.; Bravo P.; Burger, K. *J. Org. Chem*. **2001**, *66*, 130-133.

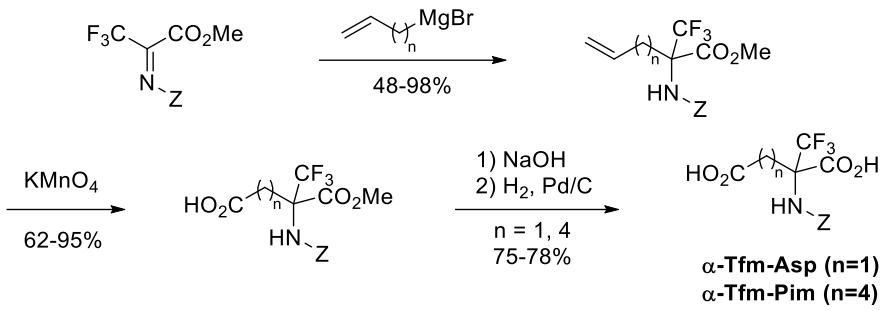


Schéma 17

Osipov *et al*. utilisent également dès 1997, une imine dérivée du trifluoropyruvate de méthyle protégée par un groupement Boc comme produit de départ fluoré de départ pour la synthèse de l'α-Tfm-Ornithine racémique (Schéma 18).[79]

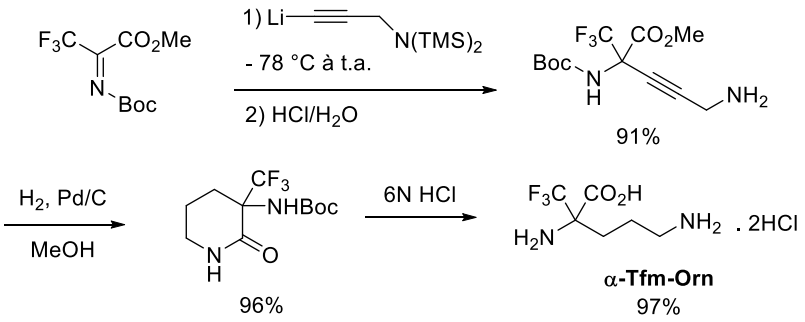


Schéma 18

Pour cela, ils additionnent sur cette imine un nucléophile organolithié. Par hydrogénation de la triple liaison de l'intermédiaire à l'aide de dihydrogène en présence de palladium sur charbon, celui-ci est cyclisé en dérivé 2-pipéridone. Enfin, ce composé subit une ouverture de cycle accompagnée de la déprotection du groupement Boc en conditions acide pour donner, sous forme de mélange racémique, l'α-Tfm-Ornithine avec un très bon rendement.

1.2.2. Synthèse asymétrique

Les aminoacides racémiques, fluorés ou non, sont, malgré la diversité des structures que l'on peut obtenir par additions sur des imines de trifluoropyruvates, d'un intérêt limité pour l'industrie pharmaceutique. En effet, considérant les différences de propriétés biologiques des deux énantiomères disponibles d'un même aminoacide, il est important de pouvoir préparer ces aminoacides sous leur forme énantiomériquement pure. Afin d'y parvenir, les auteurs décrivent l'addition nucléophile asymétrique des chaînes latérales en utilisant des auxiliaires chiraux variés, ce qui conduit à des mélanges diastéréoisomériques. Malgré la faible diastéréosélectivité de ces

[79] Osipov, S. N.; Golubev, A. S.; Sewald, N.; Burger, K. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5965-5966.

additions, cela permet néanmoins l'accès à chaque énantiomère des aminoacides α-trifluométhylés synthétisés.

1.2.2.1. A partir de sulfoxydes lithiés

L'équipe de Bravo a été la première à présenter la synthèse des deux énantiomères de l'α-Tfm-Alanine.[80] Cette synthèse met en jeu une imine fluorée dérivée du trifluoropyruvate de méthyle et procède par addition d'un sulfoxyde lithié chiral sur cette imine (Schéma 19). L'addition n'étant pas stéréosélective, les deux diastéréoisomères obtenus peuvent être séparés. Les (*R*)-α-Tfm-Alanine et (*S*)-α-Tfm-Alanine peuvent ainsi être obtenues après clivage de l'auxiliaire chiral et déprotection.

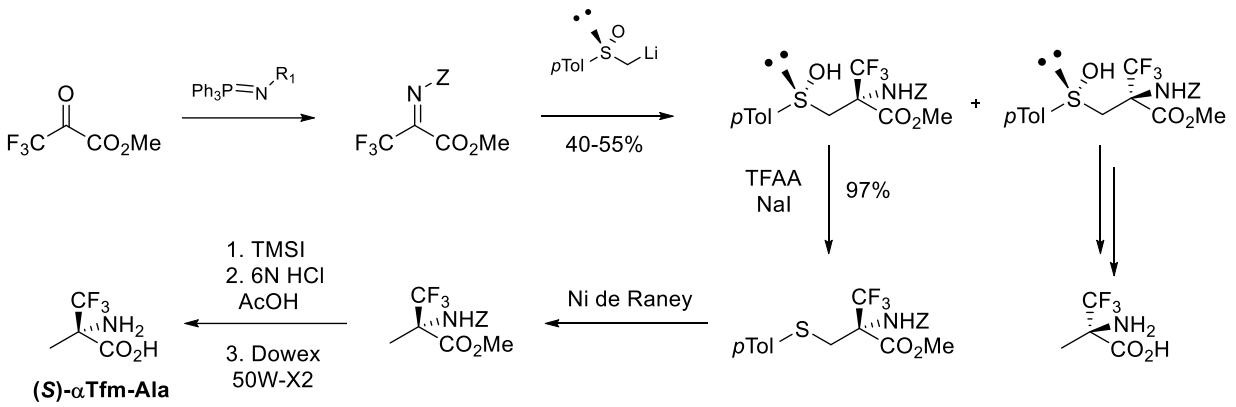


Schéma 19

Cette méthode a également permis l'obtention des deux énantiomères de l'α-Tfm-Thréonine[81] ou de l'α-Tfm-Sérine.[82] Cependant, cette stratégie se trouve limitée et n'est pas efficace pour la synthèse d'aminoacides plus complexes ou fonctionnalisés.

1.2.2.2. A partir de sulfinimines chirales

L'équipe de Bravo et Zanda utilise une méthode plus sophistiquée pour la préparation d'aminoacides α-trifluorométhylés énantiopures.[83] Pour cela, ils utilisent des sulfinimines hautement électrophiles préparées par réaction de Wittig à partir d'un réactif de Staudinger avec le trifluoropyruvate d'éthyle (Schéma 20). Ces sulfinylimines présentent l'avantage d'être stables.

[80] Bravo, P.; Capelli, S.; Meille, S. V.; Viani, F.; Zanda, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 2009-2018.
[81] Crucianelli, M.; Bravo, P.; Arnone, A.; Corradi, E.; Meille, S. V.; Zanda, M. *J. Org. Chem*. **2000**, *65*, 2965-2971.
[82] Bravo, P.; Soloshonok, V. A.; Viani, F.; Zanda, M. *Gazz. Chim. Ital*. **1995**, *125*, 149-150.
[83] Bravo, P.; Crucianelli, M.; Vergani, B.; Zanda, M. *Tetrahedron Lett*. **1998**, *39*, 7771-7774.

De plus, l'auxiliaire chiral peut être facilement déprotégé et récupéré sous forme de sulfinate de menthyle. Cette méthode est donc économique et permet la synthèse à l'échelle de plusieurs grammes d'aminoacides α-trifluorométhylés sous forme énantiomériquement pure. Les sulfinimes peuvent réagir avec une grande variété de réactifs de Grignard pour fournir une librairie d'aminoacides α-trifluorométhylés énantiopurs. La diastéréosélectivité de l'addition dépend de la nature du magnésien utilisé, les nucléophiles les plus encombrés engendrant les meilleurs excès diastéréoisomériques supérieurs à 76%.

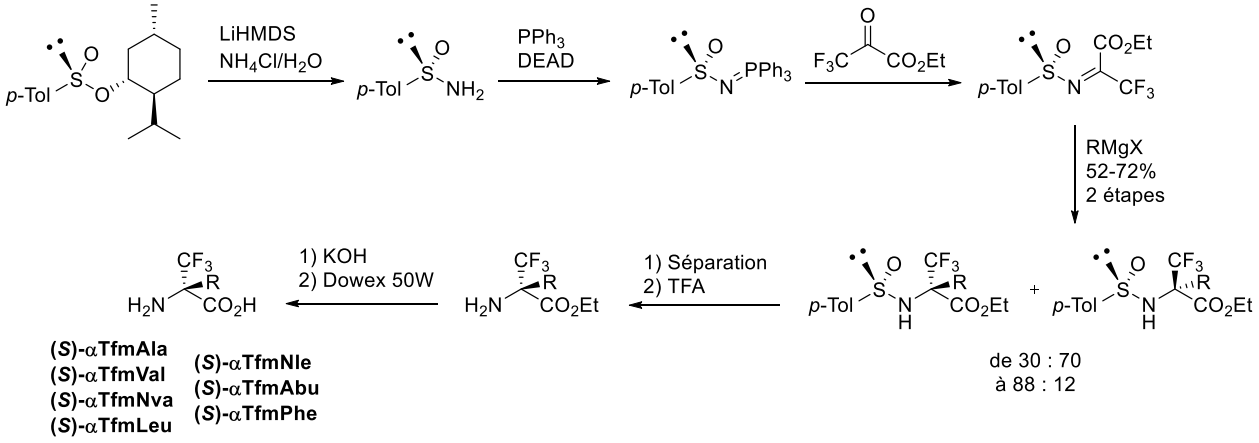


Schéma 20

Les esters éthyliques des (*S*)-α-Tfm-vinylglycine et de l'acide (*S*)-α-Tfm-aminobutyrique ont aussi été préparés à partir de ces sulfinimines. Ils sont quant à eux obtenus par addition d'un éthynylmagnésien avec une bonne diastéréosélectivité (de 84 %) puis réduction de la triple liaison (Schéma 21).

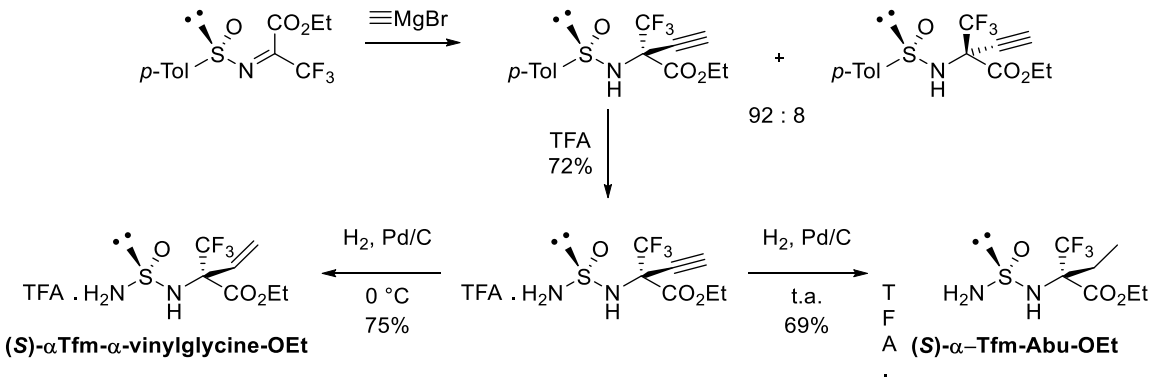


Schéma 21

1.2.2.3. Oxazolidinone chirale

Le groupe de Zanda a également exploité les potentialités d'une oxazolidinone chirale, pour la synthèse énantiosélective de dérivés de l'acide α-Tfm-Aspartique à partir d'une imine

achirale dérivée du trifluoropyruvate d'éthyle (Schéma 22).[84] En présence de $TiCl_4$, seuls deux des quatre stéréoisomères possibles se forment : les dérivés de type « Evans » *anti* et « non Evans » avec un ratio 91:9. Après clivage de la copule chirale du diastéréoisomère majoritaire, les auteurs obtiennent ainsi l'acide D-*erythro*-α-Tfm-β-hydroxy-aspartique.

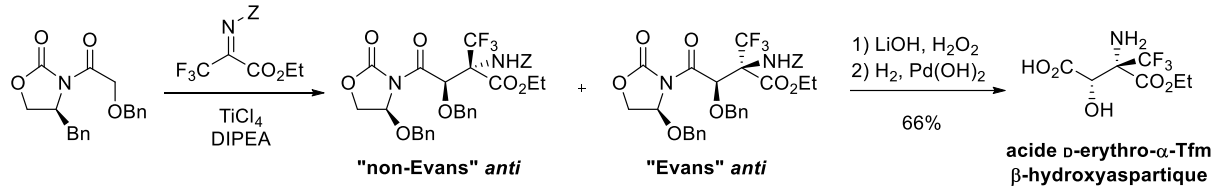


Schéma 22

La synthèse de l'α-Tfm-Proline a également été rapportée par notre laboratoire. Celle-ci met en jeu comme synthon fluoré de départ le trifluoropyruvate d'éthyle qui, par condensation avec le (*R*)-phénylglycinol forme une oxazolidine chirale (Schéma 23).[8] Celle-ci est alors allylée à l'aide d'allylTMS puis le dérivé allylé intermédiaire obtenu subit une cyclisation pour fournir un mélange de morpholinones diastéréoisomères. Un nouveau cycle pyrrolidine accolé au noyau morpholinone existant vient alors se former par hydroboration de la double liaison puis fermeture de cycle successive. Ces diastéréoisomères bicycliques peuvent être séparés par chromatographie pour donner respectivement les (*R*) et (*S*)-α-Tfm-Proline après clivage de l'auxiliaire chiral.

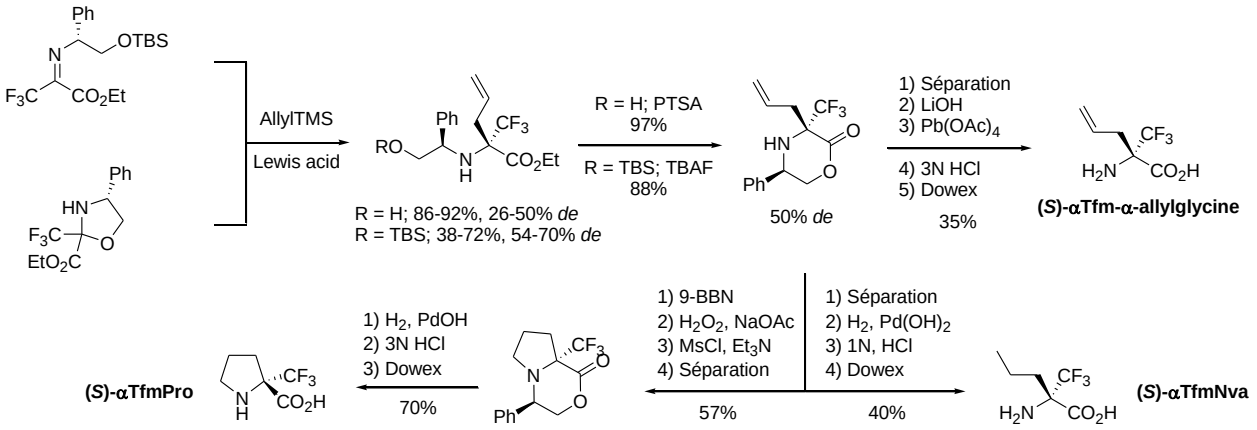


Schéma 23

1.3. α-Tfm-aminoacides dérivés de trifluoroacétoacétates

Dans la continuité des synthèses d'aminoacides α-trifluorométhylés précédemment décrites par notre laboratoire, l'attention s'est ensuite portée sur l'obtention d'α-Tfm-aminoacides à chaînes latérales fonctionnalisées. Malgré leur intérêt, peu de synthèses stéréosélectives de ces

[84] Bravo, P.; Fustero, S.; Guidetti, M.; Volonterio, A.; Zanda, M. *J. Org. Chem*. **1999**, *64*, 8731-8735.

aminoacides ont été rapportées. Bien que plusieurs procédés d'obtention de l'acide α-Tfm-Aspartique en mélange racémique soient décrits, la meilleure synthèse asymétrique a été reportée par Zanda *et al.*[84] Notre laboratoire propose un mode d'obtention des deux énantiomère de l'α-Tfm-Asp plus direct et efficace, basée sur l'utilisation d'une oxazolidine fluorée hautement fonctionnalisée obtenue par réaction du trifluoroacétoacétate d'éthyle avec le (*R*)-phénylglycinol.[7] La réaction de type Strecker dans les conditions précédemment décrites, à l'aide de TMSCN et de $BF_3.OEt_2$ fournit un mélange de deux aminonitriles diastéréoisomères avec une faible diastéréosélectivité. Le mélange subit alors une cyclisation en morpholinones en conditions acides. Ces deux dernières, séparées par chromatographie, permettent l'obtention respectivement des acides (*R*) et (*S*) α-Tfm-Aspartique par hydrolyse acide (Schéma 24).

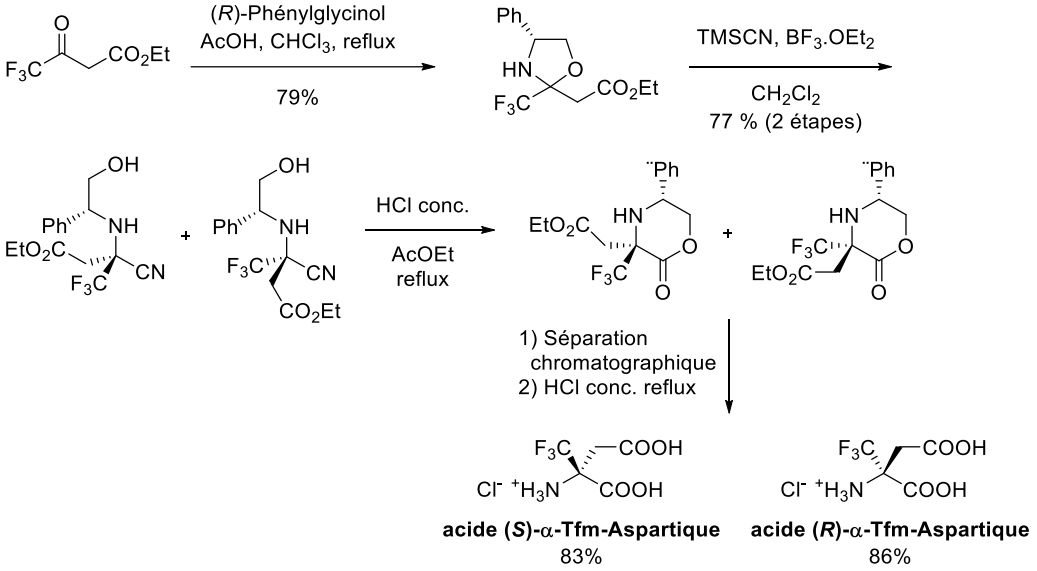


Schéma 24

Partant de l'oxazolidine trifluorométhylée dérivée du trifluoroacétoacétate d'éthyle, une étape supplémentaire de réduction par du tétrahydroborate de sodium $NaBH_4$ convertit l'ester éthylique de l'oxazolidine en alcool. La réaction de type Strecker réalisée sur ces oxazolidines racémiques permet l'obtention de deux aminonitriles séparables par chromatographie, qui après hydrolyse acide puis passage sur Dowex fournissent respectivement les deux énantiomères (*R*) et (*S*) de l'α-Tfm-Sérine avec de bons rendements (Schéma 25).[7]

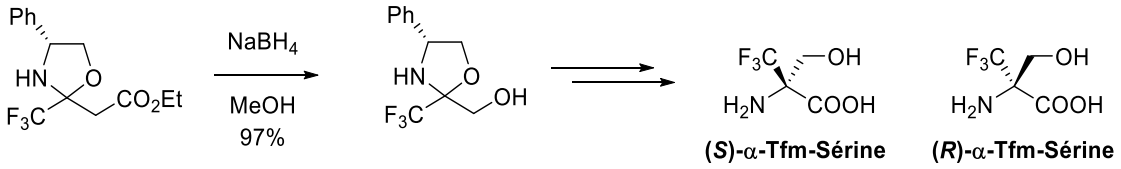


Schéma 25

1.4. Synthèse d'α-Tfm-aminoacides par l'approche dipeptidique

La synthèse d'aminoacides α-trifluorométhylés par la formation simultanée de la liaison peptidique entre la fonction amine de l'acide aminé fluoré et l'acide carboxylique du résidu *i* – 1 a été pour la première fois décrite par le groupe Burger en 1993.[85] Cette stratégie tire avantage du centre chiral d'un acide aminé pour créer un nouveau centre asymétrique en position α du groupement trifluorométhyle d'une imine dérivée du trifluoropyruvate de méthyle. Ainsi, ils synthétisent une série de dipeptides incorporant des α-Tfm-aminoacides en position *C*-terminale. La réduction de l'imine chirale intermédiaire par $NaBH_4$ génère ainsi une trifluoroalanine. Sinon, la réaction de cette imine avec des réactifs de Grignard diversement substitués mène à la formation d'une α-Tfm-Alanine ou d'une α-Tfm-Phénylalanine suivant la nature de la chaîne (Schéma 26).

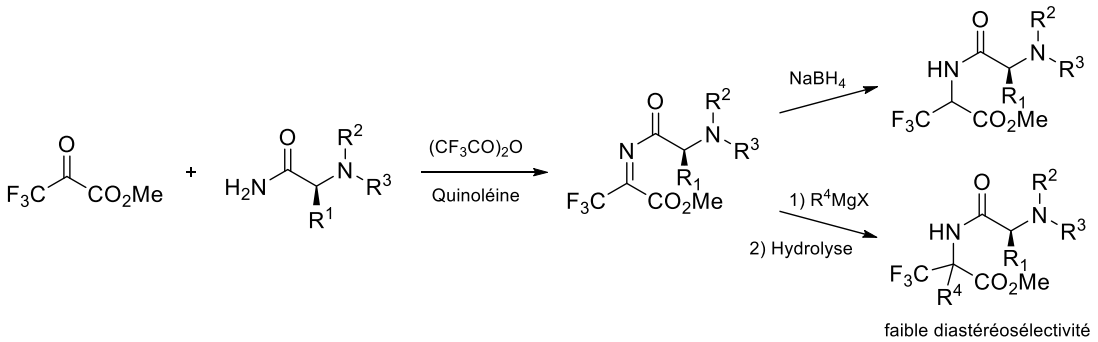


Schéma 26

Néanmoins, malgré l'intérêt de cette stratégie pour l'incorporation d'aminoacides fluorés dans des chaînes peptidiques, les diastéréosélectivités des additions nucléophiles ne sont relativement pas bonnes et plafonnent à 59% pour le meilleur excès diastéréomérique. Quelques années plus tard, cette même équipe étudie l'intérêt de la formation d'une dicétopipérazine chirale pour l'amélioration de la diastéréosélectivité.[86] Ainsi, suivant la même stratégie dipeptidique précédente, Sewald *et al*. mettent en jeu cette fois-ci un aminoacide dont la fonction amine est protégée par un groupement Cbz. Après synthèse des dipeptides, les groupements protecteurs sont déprotégés par hydrogénation catalytique, ce qui entraine la formation d'une dicétopipérazine chirale. L'addition nucléophile de réactifs de Grignard diversement substitués suivie d'une réestérification permettent de générer les dipeptides attendus avec des excès diastéréomériques améliorés jusqu'à 82% (Schéma 27).

[85] Hoss, E.; Rudolph, M.; Seymour, L.; Schierlinger, C.; Burger, K. *J. Fluorine Chem*. **1993**, *61*, 163-170.
[86] Sewald, N.; Seymour, L. C.; Burger, K.; Osipov, S. N.; Kolomiets, A. F.; Fokin, A. V. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1051-1060.

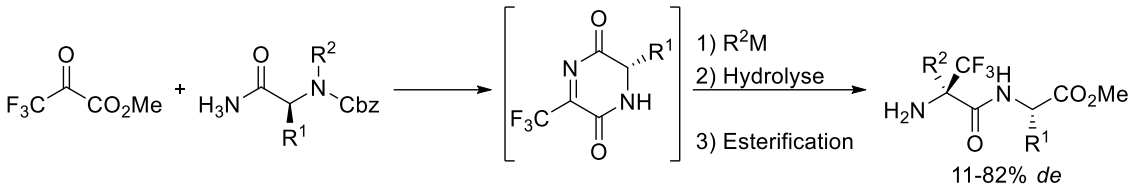


Schéma 27

Cas particulier des difluoroénamines

Plus récemment, l'équipe d'Uneyama a décrit l'utilisation de β,β-difluoroènamines trifluorométhylées comme synthons fluorés de départ pour la préparation de la trifluoroalanine, à la place d'imines de trifluoropyruvate.[87]

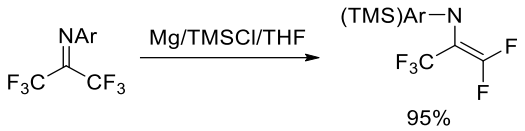


Schéma 28

Ce composé est préalablement préparé par défluoration et *N*-silylation d'une hexafluoroimine par le système Mg-TMSCl-THF à 0 °C (Schéma 28). Le dérivé peut ainsi réagir avec l'ester d'un aminoacide pour former un dipeptide contenant une trilfluoroalanine en mélange diastéréoisomérique après hydrolyse acide de l'intermédiaire imidoyle fluoré (Schéma 29).

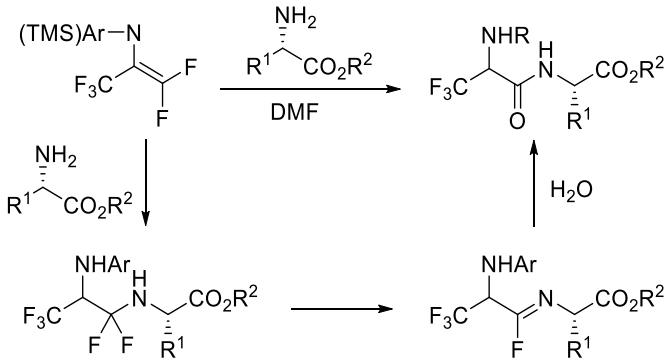


Schéma 29

2) Formation de liaisons peptidiques engageant un aminoacide α-trifluorométhylé : état de l'art

La synthèse de dipeptides contenant des aminoacides α-trifluorométhylés par des méthodes conventionnelles de couplage peptidique a été peu exploitée. L'une des raisons à ce manque de description dans la littérature est d'une part, le fort caractère électroattracteur du groupement

[87] Guo, Y.; Fujiwara, K.; Uneyama, K. Org. *Lett*. **2006**, *8*, 827-829.

trifluorométhyle en position α qui diminue la réactivité des fonctions acide et basique.[23] Associé à l'encombrement stérique généré par les trois atomes de fluor, ce manque de réactivité rend difficile le couplage de ces aminoacides qui nécessitent des méthodes d'activations moins conventionnelles et plus drastiques pour être couplés.

2.1. Rappel sur la synthèse peptidique en solution

La synthèse peptidique requiert la formation d'une liaison amide entre la fonction acide carboxylique d'un acide aminé *i* et la fonction amine de l'acide aminé suivant *i*+1 (Figure 27).

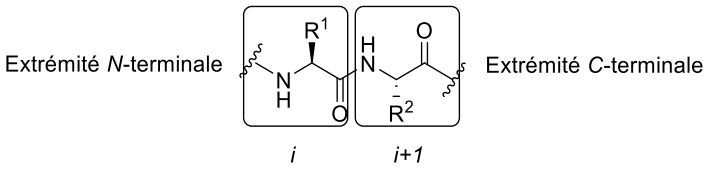


Figure 27 : Résidu *i* et *i* + 1 d'une chaîne peptidique

Le couplage entre ces deux fonctions implique une déshydratation qui n'a pas lieu de façon spontanée à température ambiante et nécessite des températures élevées qui ne sont généralement pas compatibles avec l'intégrité des substrats. C'est pourquoi la fonction acide carboxylique est généralement activée par conversion du -OH en un groupement activateur. Cette réaction est effectuée par ce qu'on appelle un agent de couplage (Schéma 30).

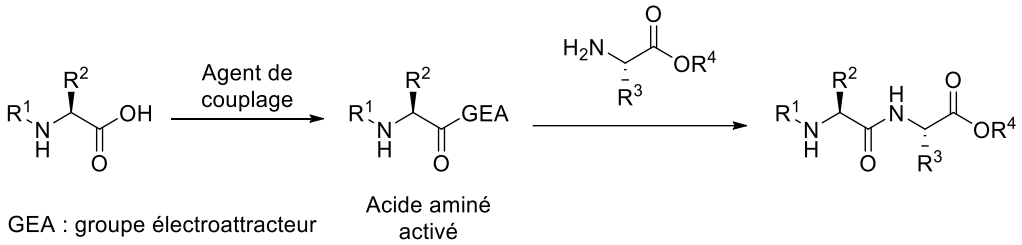


Schéma 30

La synthèse peptidique s'effectue généralement de l'extrémité *C*-terminale à l'extrémité *N*-terminale à partir des acides aminés dont les fonctions réactives non impliquées dans le couplage sont protégées afin d'éviter la formation de produits secondaires. Les conditions de synthèse peptidique doivent, de plus, préserver la stéréochimie des acides aminés. Ainsi la cyclisation de l'acide aminé activé sous forme d'oxazolone (Schéma 31) doit être évitée pour limiter l'épimérisation du centre en α.

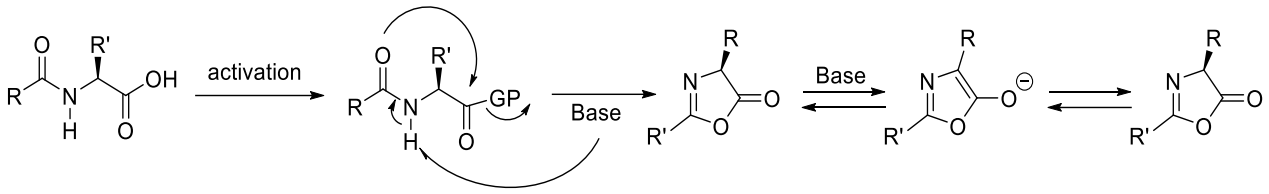


Schéma 31

De très nombreux réactifs de couplage ont été développés pour activer la fonction acide carboxylique de l'acide aminé à coupler. Quelques méthodes de couplage parmi les plus utilisées seront décrites dans cette partie bibliographique, non exhaustive du fait du très grand nombre d'agents de couplage décrits dans la littérature. De nombreuses revues ont été écrites à ce jour.[88,89,90]

2.1.1. Les anhydrides symétriques et les anhydrides mixtes

L'activation de la fonction acide carboxylique sous forme d'anhydride est classiquement employée en synthèse peptidique. Elle s'effectue par réaction de l'acide aminé *N*-terminal avec une seconde unité du même acide aminé (anhydride symétrique) ou avec un chloroformiate (anhydride mixte) (Schéma 32).

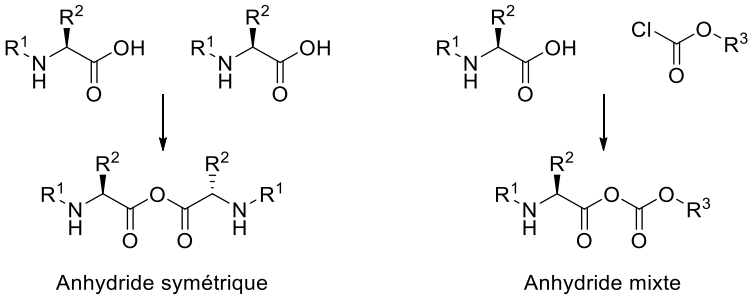


Schéma 32

Les anhydrides symétriques sont généralement préparés en faisant réagir l'acide aminé à coupler avec 0.5 équivalent de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans le DCM ou le DMF. Au cours de cette réaction il forme de la *N*,*N*-dicyclohéxylurée (DCU) qui est finalement éliminée par filtration (Schéma 33).

[88] El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev*. **2011**, *111*, 6557-6602.
[89] Prasad, K. V. S. R. G.; Barathi, K.; Haseena, B. B. *IJPSRR*, **2011**, *8*, 108-119.
[90] Joullié, M.; Lassen, K. *ARKIVOC*, **2010**, 189-250.

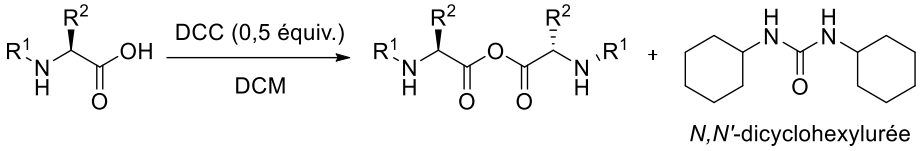


Schéma 33

La formation de l'espèce réactive n'est pas réalisée directement dans un solvant polaire car celui-ci empêche sa formation. L'avantage de cette méthode est qu'elle n'est pas dépendante de la régiosélectivité. En effet, l'aminolyse de l'un ou l'autre des carbonyles de l'anhydride conduit à la formation du peptide attendu. Cependant 0,5 équivalent de l'acide aminé de départ n'est au minimum pas couplé au cours de la réaction mais peut être récupéré.

L'autre méthode consiste à utiliser un anhydride mixte, et ainsi ne pas perdre la moitié de l'acide aminé que l'on souhaite coupler. L'anhydride mixte se forme par réaction d'un chloroformiate sur l'acide aminé *N*-protégé de départ en présence d'une amine tertiaire comme la N-méthylmorpholine. L'utilisation de cette dernière permet de diminuer l'isomérisation par rapport à la triéthylamine (pKa NMM : 7.38, pKa Et3N : 10.75). Ces réactions d'activation ont lieu à basse température (-5 à -15°C) pour éviter les réactions secondaires (formation de l'uréthane selon la voie B) (Schéma 34).

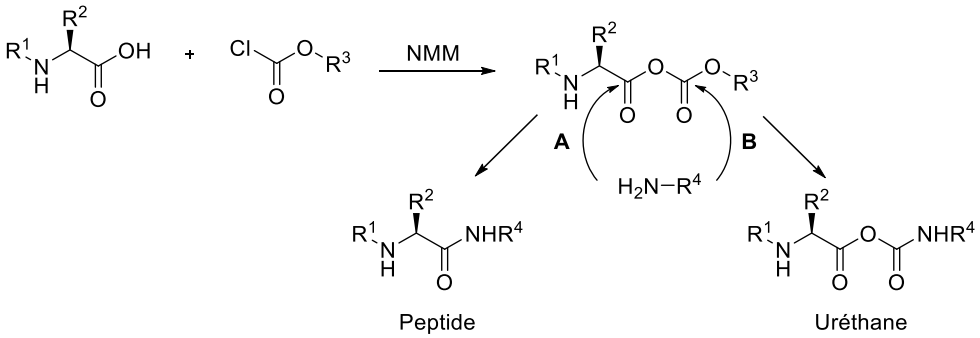


Schéma 34

D'autres types d'anhydride mixte peuvent être employés comme les anhydrides carboxyliques ou phosphoniques qui permettent de contrôler la régiosélectivité. Pour un nucléophile azoté, comme un acide aminé, la réaction à lieu préférentiellement sur le site carboxylique. De nombreux réactifs organophosphorés ont été développés pour former ce type d'anhydride. Le composé de cette famille le plus utilisé est le chlorure de bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphorodiamidique (BOP-Cl) (Figure 28).

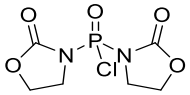
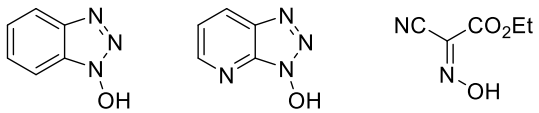


Figure 28 : chlorure de bis(2-oxo-3- oxazolidinyl)phosphorodiamidique (BOP-Cl)

2.1.2. Les carbodiimides et esters activés

On parle d' « ester activé » lorsque le groupe OR' d'un ester RCOOR' est un bon groupement partant. Ces espèces réactives étant les plus couramment utilisées pour réaliser un couplage peptidique, il existe une gamme très étendue de réactifs permettant leur formation. On peut notamment distinguer deux grandes familles telles que les carbodiimides[91] ou les dérivés de benzotriazoles.[92,93,94,95] Les carbodiimides sont couramment utilisés du fait de leur faible coût, et de la possibilité de réaliser l'activation *in situ* de manière efficace en limitant l'épimérisation. Il se forme, pendant le couplage, une urée, issue du carbodiimide de départ, qui doit pouvoir être facilement éliminée du milieu. Ainsi, le dicyclohexylcarbodiimide (DCC)[96] est choisi pour la faible solubilité de son urée (DCU) dans les solvants organiques, permettant une élimination par filtration, tandis que le 1-éthyl-3-(3-diméthylamino)carbodiimide (EDC) est choisi pour son urée hydrosoluble, pouvant être éliminée par lavages.

L'utilisation des carbodiimides requiert souvent la présence d'additifs de type *N*-hydroxyde comme les *N*-hydroxybenzotriazoles (HOXt). Ces composés agissent en protonant la *O*-acylisourée, empêchant ainsi les réactions secondaires intramoléculaires (formation de la *N*-acylurée et de l'oxazolone). Ils conduisent ainsi à la formation d'un ester activé. Leur emploi améliore considérablement les rendements et réduit le taux d'épimérisation. Des additifs comme le 1- hydroxybenzotriazole (HOBt) ou le 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) sont couramment utilisés mais de nombreuses alternatives existent comme par exemple l'éthyle 2-cyano-2-(hydroxyimino)acétate (Oxyma Pure) qui présente des risques d'explosions moins importants (Figure 28).[97,98]



HOBt **HOAt** **Oxyma Pure**

Figure 29 : Structures de quelques *N*-hydroxybenzotriazoles réactifs

[91] Sheehan, J. C.; Boshart, G. L.; Cruickshank, P. A. *J. Org. Chem*. **1961**, *26*, 2525-2525.
[92] Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
[93] Marder, O.; Shvo, Y.; Albericio, F. *Chim. Oggi*. **2002**, *20*, 37-41.
[94] Coste, J.; Lenguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett*. **1990**, *31*, 205-208.
[95] Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. *Tetrahedron Lett*. **1997**, *38*, 4853-4856.
[96] Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc*. **1955**, *77*, 1067-1068.
[97] Subiros-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Eur. J*. **2009**, *15*, 9394- 9403.
[98] El-Faham, A.; Albericio, F. *Eur. J. Org. Chem*. **2009**, 1499-1501.

Les dérivés de benzotriazoles, sous forme de sels d'uronium ou de phosphonium, ont été découverts à partir des années 70, et sont aujourd'hui largement utilisés car ils permettent d'obtenir de très bons rendements de couplage et de faibles taux d'épimérisation. Parmi les sels d'uronium, on peut notamment citer le dérivé HBTU (O-Benzotriazole- *N,N,N',N'*-tetraméthyluronium-hexafluorophosphate)[99] et le HATU (2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate méthanaminium) qui permet d'obtenir des couplages plus rapides et encore moins d'épimérisation.[100] Le HCTU (2-(6- Chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate) a quant à lui une efficacité comparable à celle de HATU, tout en étant de moindre coût.[101] La réactivité accrue de ces agents de couplage est en partie due au benzotriazole, dont les atomes d'azote permettent de rendre plus rapide l'attaque de l'amine sur l'espèce activée, par une catalyse acido-basique appelée assistance anchimérique. Cet effet est en outre augmenté par la présence de l'azote ou du chlore sur le cycle benzotriazole des HATU et HCTU.

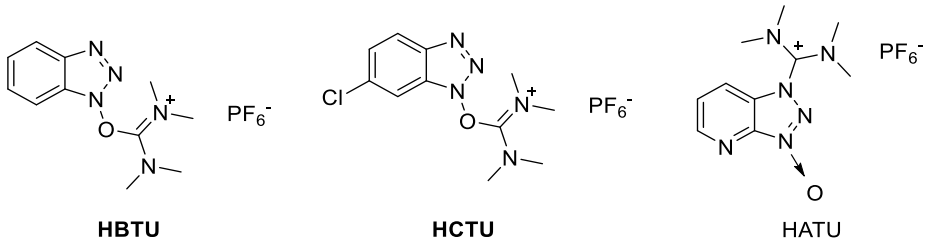


Figure 30 : Structures de quelques *N*-hydroxybenzotriazoles sels d'uronium

Parmi les dérivés de benzotriazoles de la famille des sels de phosphonium, le PyBOP[102] ((benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) et PyAOP[95] ((7-azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) dérivés du BOP, sont aujourd'hui très utilisés notamment pour les couplages difficiles (Figure 31).

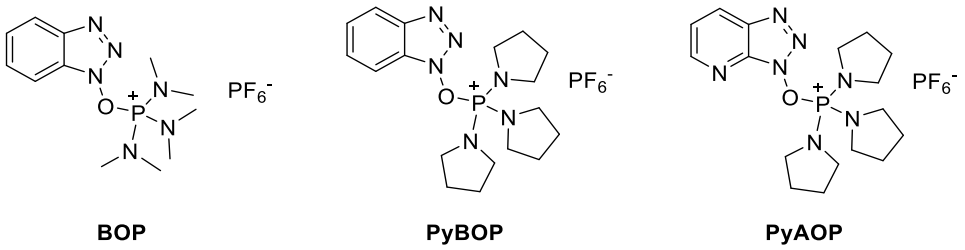


Figure 31 : Structures de quelques *N*-hydroxybenzotriazoles sels de phosphonium

[99] Dourtoglou, V.; Ziegler, J. C.; Gross, B. *Tetrahedron Lett*. **1978**, 1269-1272.
[100] Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc*. **1993**, *115*, 4397-4398.
[101] Marder, O.; Shvo, Y.; Albericio, F. *Chim. Oggi*. **2002**, *20*, 37-41.
[102] Coste, J.; Lenguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett*. **1990**, *31*, 205-208.

2.1.3. Les halogénures d'acyle

A première vue, la simplicité des halogénures d'acide, leur haute réactivité et leur caractère peu encombré en font des composés tout indiqués pour la formation de la liaison amide. En réalité, cette méthode n'est que très rarement utilisée car la haute réactivité des halogénures d'acyles entraine des nombreuses réactions secondaires, incluant l'épimérisation des aminoacides. Cependant, la nécessité grandissante de synthétiser des peptides incorporant des acides aminés très encombrés tels que les acides aminés *N*-méthylés ou α,α-disubstitués a incité les peptidistes à s'intéresser de nouveau à ces méthodes.

Un des inconvénients limitant le plus l'utilisation des chlorures d'acides est historiquement associé à la chimie des groupements protecteurs de la fonction amine. Ainsi, Fisher est le premier à décrire l'utilisation d'halogénure d'acyle pour la réalisation de couplages peptidiques en solution à partir d'acides aminés protégés par un groupement *N*-éthoxycarbonyle en 1903.[103] Or, ce groupement ne peut être clivé sans détruire la liaison amide. Les carbamates utilisés plus tard, *N*-*tert*-butyloxycarbonyle (Boc) et *N*-carboxybenzoyle (Cbz), étaient quant à eux responsables de la formation très rapide d'une oxazolone issue du réarrangement du chlorure d'acyle correspondant, avec départ d'isobutène ou de chlorure de benzyle pour former l'anhydride de Leuchs ou *N*-carboxyanhydride (NCA) correspondant (Schéma 35).[104,105]

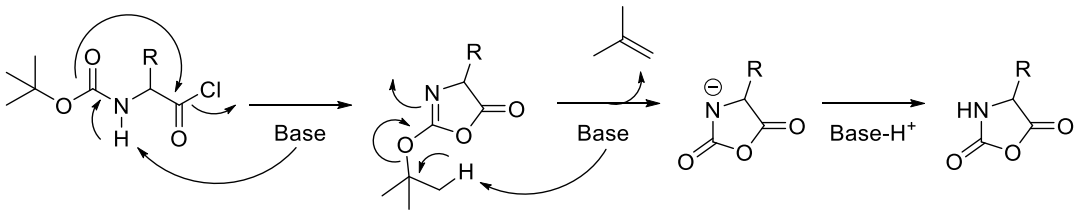


Schéma 35

Le développement du groupement 9-fluorenylméthoxycarbonyle (Fmoc) a permis la synthèse de chlorures d'acyle stables et l'utilisation de conditions de déprotection douces.[106] Les chlorures d'acyle sont facilement obtenus en faisant réagir l'acide aminé avec un agent de chloration comme par exemple le chlorure de thionyle ($SOCl_2$) (Schéma 36).

[103] Fischer, E.; Otto, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1903**, *36*, 2106-2116.
[104] Kricheldorf, H. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **2006**, *45*, 5752-5784.
[105] Leuchs, H. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1906**, *39*, 857-861.
[106] Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Org. Chem*. **1972**, *37*, 3404-3409.

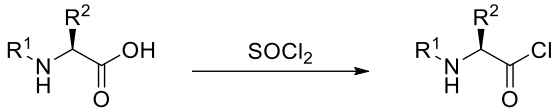


Schéma 36

Une autre limitation de cette méthode est l'impossibilité d'utiliser des groupements protecteurs labiles dans des conditions acides comme le groupe *tert*-butyle (*t*Bu). Malgré ces limitations, l'utilisation de chlorures d'acyle est particulièrement efficace pour réaliser des couplages d'acides aminés encombrés et/ou faiblement nucléophiles.

Afin de réaliser des couplages plus difficiles, le recours aux fluorures d'acyle est une bonne alternative aux chlorures d'acyles. Un avantage de leur utilisation est d'être compatible avec la présence de groupements labiles en milieu acide. Les fluorures d'acyle sont généralement préparés en faisant réagir la trifluorotriazine, toxique, avec l'acide aminé (Schéma 37).

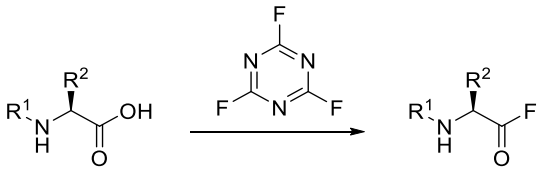


Schéma 37

Par ailleurs, l'atome de fluor étant de plus petite taille par rapport à l'atome de chlore, l'approche des aminoacides encombrés lors de l'étape de couplage est facilitée. Ces fluorures d'acyles présentent également l'avantage d'être très peu convertis en oxazolone lors de l'utilisation conjointe de bases tertiaires. Des études mécanistiques[107] ont montré que leur réactivité se rapproche plus de celle des esters activés que de celle de leurs analogues chlorés, ce qui s'explique par les valeurs de pKa dans l'eau des acides HF (3,2) contre HCl (-8).

Le Tableau 4 résume les différentes classes d'agents de couplage présentés ci-dessus, les cas dans lesquels ils sont principalement utilisés, ainsi que les avantages et inconvénients qui les caractérisent le plus. Ce tableau non exhaustif permet d'observer l'immense diversité des agents disponibles.

[107] Jedrzejczak, M.; Motie, R. E.; Satchell, D. P. N.; Satchell, R. S.; Wassef, W. N. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 1471-1479.

Famille d'agent de couplage	Cas d'utilisation typique	Principaux avantages	Principaux inconvénients
Chloroformiates	Couplage en solution d'aminoacides peu encombrés	Purification facile Peu coûteux	Nécessite des températures basses Pas de couplages *in situ* possibles
Carbodiimides	Couplage sur support solide ou en solution	Peu coûteux Couplages *in situ* possibles	Elimination de l'urée formée au cours du couplage parfois difficile
Uroniums et phosphoniums	Couplage sur support solide ou en solution Couplage d'aminoacides encombrés	Couplages *in situ* possibles Réaction rapide Faible taux d'épimérisation	Assez chers (HATU, PyAOP)
Halogénures d'acyles	Couplage en solution d'aminoacides Fmoc même très encombrés	Grande réactivité permettant le couplage d'aminoacides encombrés	Sensibles à la présence d'eau ou d'alcools Formation d'oxazolones dans le cas des chlorures d'acyles

Tableau 4 : Différentes familles d'agents de couplage fréquemment utilisés pour la synthèse peptidique en solution et sur support

2.2. Couplages de la position *C*-terminale de divers aminoacides α-trifluorométhylés

En 1992, Schierlinger *et al.* décrivent le couplage de *N*-Cbz-α-Tfm-aminoacides à chaîne latérale carbonée sous forme de mélanges racémiques.[108] Alors que les méthodes d'activation classiques des acides carboxyliques sous forme d'esters activés ont échoué, ceux-ci optent pour une activation de la fonction acide sous forme de chlorures d'acyle. Dans ces conditions, l'intermédiaire instable se réarrange et un anhydride cyclique trifluorométhylé dit de Leuchs se forme avec déprotection du groupement Cbz sous forme de chlorure de benzyle. Cet intermédiaire réactif est alors mis en réaction avec un aminoacide aliphatique dans du chloroforme pour fournir les dipeptides correspondants avec de très bons rendements (Schéma 38).

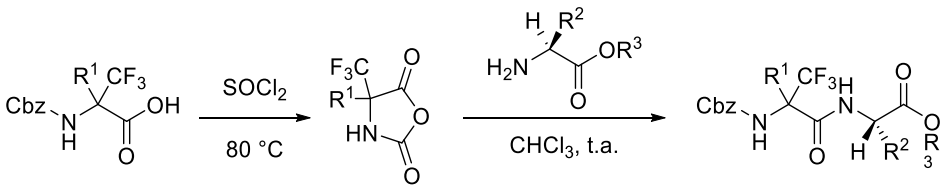


Schéma 38

[108] Schierlinger, C.; Burger, K. Tetrahedron Lett. **1992**, *33*, 193-194.

Quelques années plus tard, les synthèses de deux tétrapeptides mimes du tripeptide Arg-Gly-Asp ou RGD souvent retrouvé dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire, et incorporant une Tfm-Arginine en position *N*-terminale ont été décrites par l'équipe de Dal Pozzo.[109] La particularité de cette synthèse réside dans le fait que la chaîne latérale de l'arginine est formée après couplage de la *N*-Cbz-α-Tfm-ornithine protégée par un groupement Boc sur sa chaîne latérale. A nouveau, l'activation de la fonction acide carboxylique de cette Tfm-Ornithine s'effectue *via* la formation intramoléculaire d'une oxazolone intermédiaire réactive, à l'aide de DCC. L'addition *in situ* du tripeptide H-Gly-Asp(O*t*Bu)-Phe-NH_2 permet la formation du tétrapeptide protégé, avec un rendement de 60%.

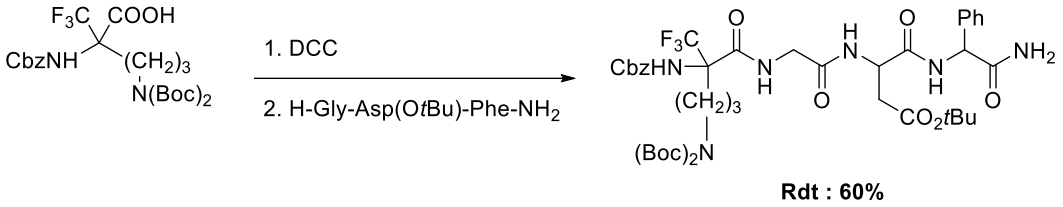


Schéma 39

Afin d'étudier la résistance métabolique d'un analogue trifluorométhylé de l'hormone TRH, l'équipe de Koksch a envisagé la synthèse du tripeptide H-α-Tfm-*p*Glu-His-Pro-NH_2.[110] Celle-ci a été effectuée par synthèse peptidique sur support solide (SPPS) en utilisant du DIC avec du HOBt. L'incorporation de l'acide α-Tfm-*p*glutamique en position *N*-terminale ne nécessite pas de conditions particulières si ce n'est un temps de couplage légèrement allongé afin de coupler entièrement cet acide aminé modifié.

Ainsi, les difficultés d'incorporation d'aminoacides α-trifluorométhylés en leur position *C*-terminale peuvent facilement être surmontées notamment par l'utilisation de DCC et le passage par une oxazolone réactive. En revanche, l'allongement de chaînes peptidiques possédant un aminoacide α-trifluorométhylé en position *N*-terminale est beaucoup plus délicat. En effet, dans ce cas, aucune des méthodes classiques d'activation sous forme d'ester activés n'est efficace.

[109] Dal Pozzo, A.; Muzi, L.; Moroni, M.; Rondanin, R.; de Castiglione, R.; Bravo, P.; Zanda, M. Tetrahedron **1998**, *54*, 6019-6028.
[110] Koksch, B.; Ullmann, D.; Jakubke, H.-D.; Burger, K. *J. Fluorine Chem*. **1996**, *80*, 53-57.

2.3. Couplages de la position *N*-terminale de divers aminoacides α-trifluorométhylés

En 1998, l'équipe de Koksch décrit le couplage de divers aminoacides α-trifluorométhylés en position *N*-terminale.[111] Le couplage d'aminoacide à chaîne courte comme l' α-Tfm-Gly ou l' α-Tfm-Ala par des méthodes d'activation classiques s'effectue avec des rendements corrects. En revanche, dès que la chaîne devient plus longue ou plus encombrée comme dans le cas d'une leucine ou phénylalanine α-trifluorométhylée, ces méthodes échouent. Dans leur publication, ils exploitent une méthode particulière qui consiste à convertir l'amine de l'aminoacide fluoré sous forme d'isocyanate. Le couplage avec divers aminoacides naturels peut ainsi s'effectuer avec succès et passe par un anhydride mixte intermédiaire (Schéma 40).

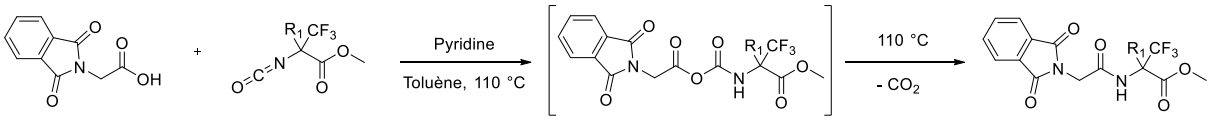


Schéma 40

Koksch ne fut pas la seule à exploiter l'activation de l'amine d'un aminoacide trifluorométhylé sous forme d'isocyanate. Dal Pozzo et al. investiguent le potentiel de cette méthode afin de coupler une glycine sur la fonction amine d'un acide α-Tfm-Aspartique.[112] Or, la réaction directe d'une *N*-Fmoc-Glycine sur l'isocyanate ne permet pas, dans leur cas, de coupler cet acide aminé. Pour ce faire, l'isocyanate est converti en 2-triméthylsilylethoxycarbonyle (Teoc) sur lequel la *N*-Fmoc-Glycine préalablement activée sous forme de fluorure d'acide vient former la liaison peptidique désirée avec un rendement de 30%.

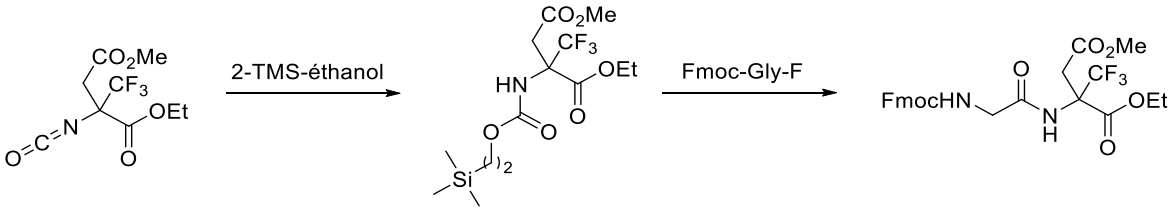


Schéma 41

L'utilisation des halogénures d'acyle comme forme d'activation de la fonction acide pour les couplages peptidiques est connu depuis les débuts de la synthèse peptidique, en particulier celle des chlorures d'acyle.[113] Ces derniers possèdent l'avantage d'être des composés hautement réactifs

[111] Burger, K.; Mutze, K.; Hollweck, W.; Koksch, B. Tetrahedron **1998**, *54*, 5915-5928.
[112] Dal Pozzo, A.; Dikovskaya, K.; Moroni, M.; Fagnoni, M.; Vanini, L.; Bergonzi, R.; de Castiglione, R.; Bravo, P.; Zanda, M. *J. Chem. Res*. (S) **1999**, 468-469.
[113] Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E.; Yahya Sadat-Aalaee, Jr., S.; Tien, J.-H.; Langridge, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3732-3734.

donc efficaces pour la formation de liaisons peptidiques, mais également stables, pouvant être conservés en milieu anhydre et inerte. Cependant, l'impossibilité d'obtenir des chlorures d'aminoacides fonctionnalisés *N*-protégés par un groupement Fmoc portant sur leur chaîne latérale des protections de fonctions acides comme des esters de *tert*-butyle, limite considérablement leur utilité. Par exemple, si l'on essaie d'obtenir le chlorure d'acyle de l'acide *N*-Fmoc-Aspartique en présence de $SOCl_2$, seul l'anhydride cyclique est isolé (Figure 32).[114]

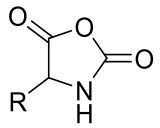


Figure 32 : Anhydride de Leuchs

Les bromures d'acyle peuvent également être utilisés pour réaliser des couplages très délicats. Cette méthode est cependant limitée car du fait de leur très grande réactivité, les bromures d'acyle ne supportent que peu de groupements protecteurs sur l'amine. Ainsi, l'utilisation du groupement Fmoc n'est pas appropriée à cause de la décomposition rapide de l'acide aminé en anhydride de Leuchs (Figure 32).

La stabilité connue des fluoroformates de *tert*-butyle comparativement aux analogues chlorés font des fluorures d'acyle une alternative intéressante à leurs homologues chlorés comme méthode d'activation des fonctions acides des aminoacides.[114]

C'est pourquoi Dal Pozzo *et al*. utilisent ce mode d'activation pour coupler une glycine sur l'amine de l'acide-α-Tfm-Aspartique. Leur stratégie s'inspire de celle de Sewald *et al*. qui rapportent une stratégie efficace d'activation de l'amine sous forme de groupement Teoc.[115] Le groupement protecteur Teoc est en effet connu pour être sensible vis-à-vis des ions fluorure. Un ion intermédiaire carbamate se forme en présence d'une quantité catalytique d'ions F^-. Celui-ci peut alors réagir avec un fluorure d'aminoacide *N*-protégé par un groupement Fmoc pour donner les dipeptides désirés.

[114] Carpino, L. A.; Sadat-Aalaee, D.; Chao, H. G.; DeSelms, R. H. *J. Am. Chem. Soc*. **1990**, *112*, 9651-9652.
[115] Sewald, N.; Hollweck, W.; Michel, T.; Burger, K. *Liebigs Ann. Chem*., **1997**, 2549-2551.

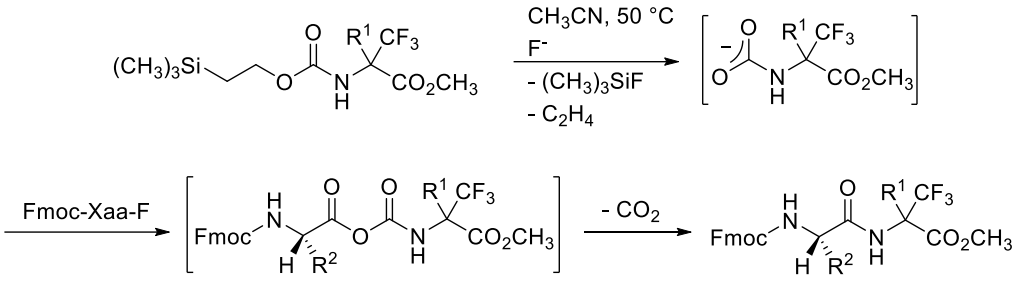


Schéma 42

Cependant, lorsqu'il s'agit de coupler des aminoacides plus encombrés sur la fonction *N*-terminale de résidus α-trifluorométhylés, même une forte activation sous forme de chlorure ou même de fluorures d'acyle peuvent échouer en raison de la forte désactivation de l'amine. Une alternative à ces méthodes d'activation est le recours aux réactions multicomposants de Passerini et de Ugi.

Dans leur publication de 1998, Burger *et al*. exploitent ainsi leur potentiel pour la formation de liaison peptidique engageant un aminoacide trifluorométhylé.[116]

La réaction de Passerini découverte en 1921 à Florence, met enjeu un isonitrile, un aldéhyde ou une cétone et un acide carboxylique et aboutit à la formation d'une liaison α-acyloxyamide (Schéma 43).

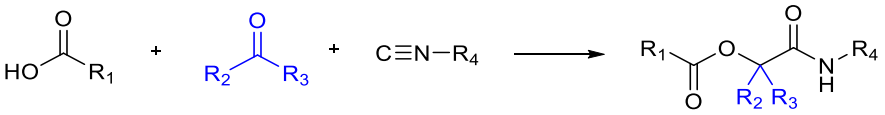


Schéma 43

Ainsi, Burger et al. font intervenir différents acides, aldéhydes et isonitriles, en quantités équimolaires, et obtiennent les dipeptides suivants (Schéma 52), diversement substitués en mélanges diastéréoisomériques séparables par chromatographie.

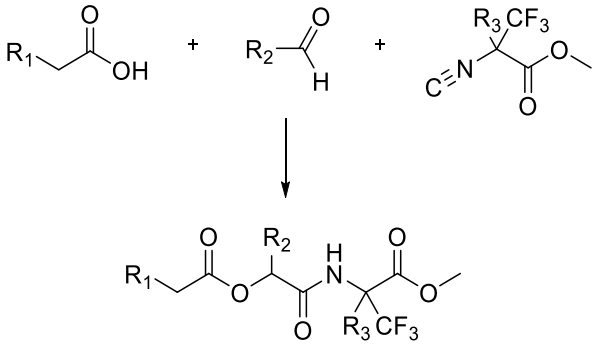


Schéma 44

[116] Burger, K.; Mutze, K.; Hollweck, W.; Koksch, B. Tetrahedron **1998**, *54*, 5915-5928.

Une autre méthode investiguée par le groupe de Koksch est la réaction de Ugi. Pour rappel, la réaction de Ugi fait intervenir un aldéhyde ou une cétone, une amine, un isonitrile et un acide carboxylique pour former un bis-amide (Schéma 45).

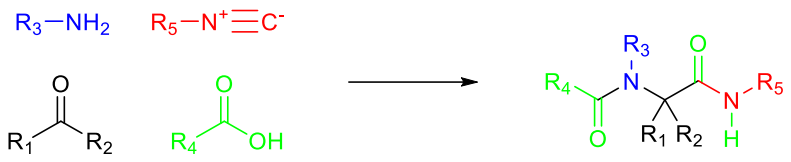


Schéma 45

Ces conditions classiques ne permettant pas d'obtenir les peptides désirés avec des rendements satisfaisants, une imine est préalablement préparée à l'aide d'isobutyraldéhyde et de la cyclohexyl- ou benzylamine. Sa réaction avec la phtaloglycine et le 3,3,3-trifluoropropionate de 2-isocyanure fournit les tripeptides désirés (Schéma 46).

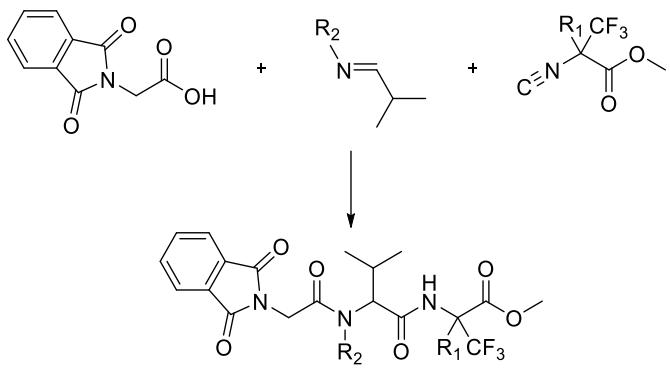


Schéma 46

Enfin, une méthode d'activation particulièrement efficace pour le couplage de la position *N*-terminale des aminoacides α-trifluorométhylés est l'utilisation d'anhydrides mixtes. L'équipe de Koksch en fait ainsi sa méthode de choix pour le couplage d'une *N*-Cbz-Phénylalanine ou d'une *N*-Cbz-Leucine en position *N*-terminale d'une α-Tfm-Alanine dont la fonction carboxylique est amidifiée (Schéma 47).[9]

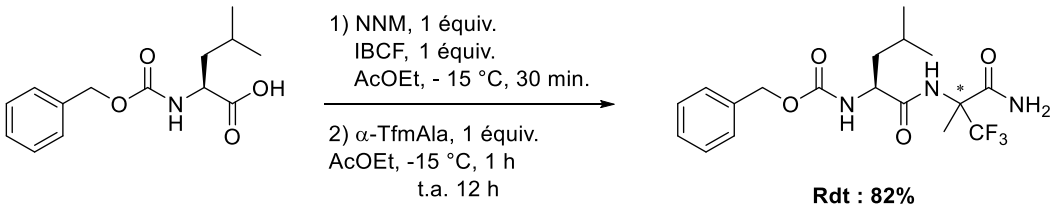


Schéma 47

Malgré un rendement de couplage tout à fait satisfaisant, ce dipeptide n'est alors obtenu que sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères puisque l'α-Tfm-Alanine utilisée est un mélange racémique des deux énantiomères.

Cette même équipe utilise quelques années plus tard le même système d'activation pour le couplage d'aminoacides *N*-protégés par un groupement Boc.[65] Ainsi, ils réalisent cette fois le couplage d'une *N*-Boc-Méthionine en position *N*-terminale de l'énantiomère (*S*) de l'α-Tfm-Alanine incorporée dans un peptide en cours d'élongation (Schéma 48).

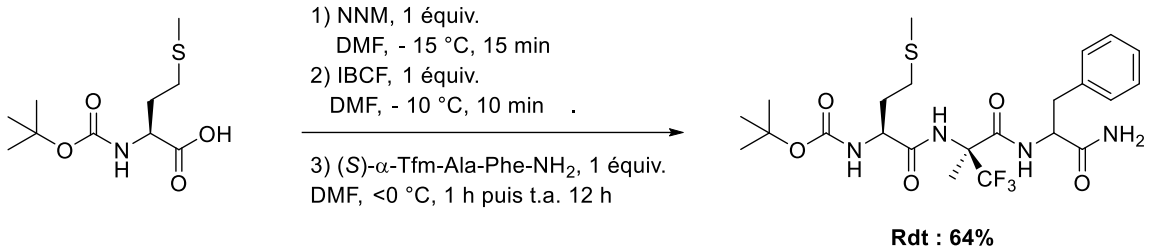


Schéma 48

II) Application à l'incorporation d'aminoacides fluorés dans de petits peptides

1) Travaux antérieurs du laboratoire

Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé mes travaux de thèse est spécialisé dans la synthèse d'aminoacides α-trifluorométhylés de manière énantiosélective. La voie de synthèse développée met en jeu une réaction de type Strecker, au cours de laquelle un groupement nitrile est introduit sur une oxazolidine trifluorométhylée. Après hydrolyse et coupure de la copule chirale, différents aminoacides α-trifluorométhylés ont pu être obtenus (Figure 33).

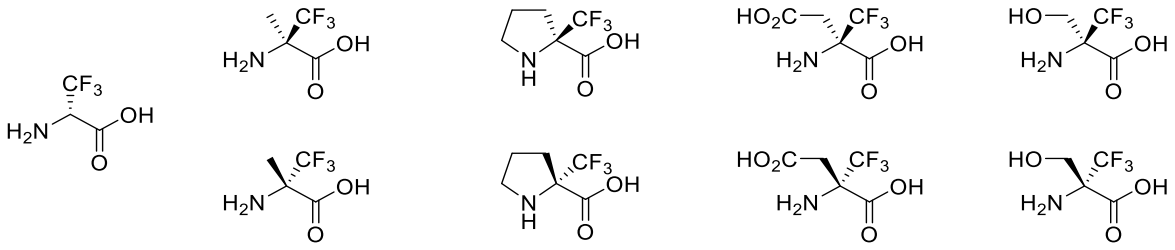


Figure 33 : Différents aminoacides α-trifluorométhylés synthétisés au laboratoire

Certains de ces aminoacides α-trifluorométhylés ont fait l'objet de couplages peptidiques sur leur position *C*- ou *N*-terminale et ont ainsi été incorporés dans une chaîne peptidique. Il s'agit de l'α-Tfm-Proline et l'α-Tfm-Alanine.

1.1. Couplages de la position *C*-terminale de l' α-Tfm-Proline

La réactivité de la fonction amine étant supposée diminuée par la présence du groupement trifluorométhyle en position α et ne disposant pas de dérivés *N*-protégés de l'α-Tfm-Proline, des essais de couplage de cet acide aminé totalement non protégé ont été entrepris par le laboratoire. En effet, à cause de cette réactivité amoindrie, les risques d'homocouplages sont nettement diminués. Ainsi, un premier essai de couplage de la (*S*)-α-Tfm-Proline activée par du DIC sur la fonction amine d'une alanine protégée sous forme d'ester benzylique, a été entrepris (Schéma 49).[8] Malheureusement, le dipeptide désiré n'a alors pu être obtenu qu'avec un très faible rendement de 6%, le produit majoritaire de la réaction étant une dicétopipérazine.

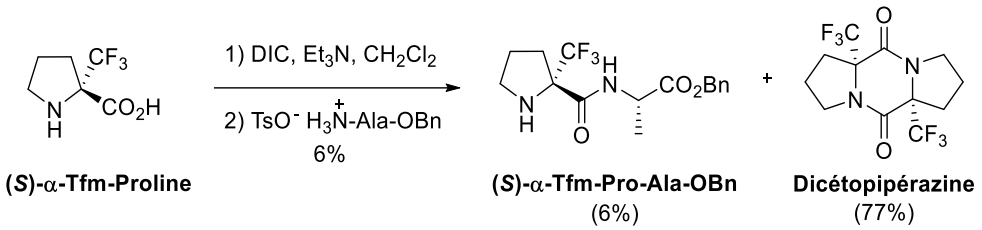


Schéma 49

Le rendement en dipeptide est alors nettement amélioré par la réaction de 2 équivalents d'alanine, en présence du système d'activation HOBt/EDCI. Aucune trace de dicétopipérazine n'est alors observée. Ces conditions optimisées ont alors été employées pour le couplage de la (*S*)-α-Tfm-Proline avec plusieurs aminoacides naturels aliphatiques diversement substitués (Schéma 50).[8]

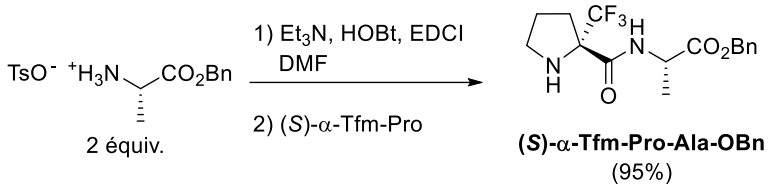


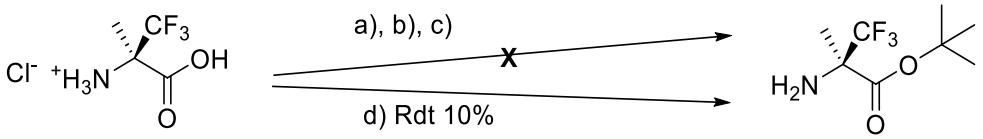
Schéma 50

Ainsi, le couplage de la position *C*-terminale ne semble pas être empêchée par la présence d'un groupement α-trifluorométhyle et des conditions classiques peuvent être employées avec succès pour son couplage.

1.2. Couplages de la position *C*-terminale de l'α-Tfm-Alanine

1.2.1. Essais de protection de la position *C*-terminale

Avant d'avoir envisagé le couplage de l'α-Tfm-Alanine non protégée, des essais de protections de sa fonction acide sous forme d'acide ont été réalisés. De nombreux essais de formation d'un ester *tert*-butylique dans les conditions classiques d'estérification (en présence d'un alcool en milieu acide) ont été entrepris. Seul le recours à une solution d'acide perchlorique à 70% dans le tert-butanol permet d'obtenir à hauteur d'un faible rendement de 10% l'ester *tert*-butylique de la (*R*)-α-Tfm-Alanine (Schéma 51).



a) CH_3COCl, *t*BuOH, 0 °C puis 24 h, 35 °C
b) *t*BuBr, 48 équiv., K_2CO_3, 26 équiv., TEBAC, 1 équiv., 24 h, 55 °C
c) isobutène (excès), H_2SO_4, 7 équiv., dioxane ou CH_2Cl_2, 96 h, t.a.
d) $HClO_4$ / *t*BuOH 70%

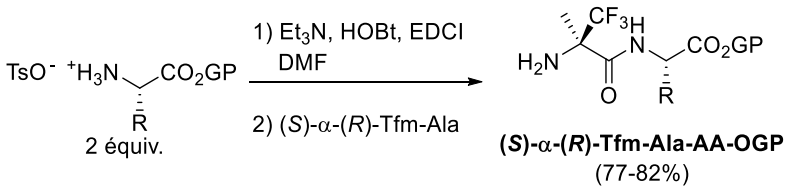
Schéma 51

L'hypothèse avancée pour expliquer ce faible rendement est la forte volatilité de l'ester attendu. Un nouveau produit fluoré est observée en RMN ^{19}F dans le brut réactionnel mais aucun produit n'est isolé après traitement basique.

1.2.2. Couplages de l'α-Tfm-Alanine non protégée

1.2.2.1. Couplage de la position *C*-terminale

Face à ces nombreux échecs de protections et grâce au couplage de la (*S*)-α-Tfm-Proline non protégée réalisé avec succès en présence du système d'activation HOBt/EDCI, ces conditions optimisées ont été appliquées au couplage de la (*R*)-α-Tfm-Alanine non protégée (Schéma 52).[8]



(*S*)-α-(*R*)-Tfm-Ala-AA-OGP
(77-82%)

Schéma 52

Ces conditions ont ainsi permis l'obtention de dipeptides avec de très bons rendements allant de 77% à 82%.

1.2.2.2. Couplage en position *N*-terminale

A cause de la forte désactivation de la fonction amine et de l'encombrement stérique généré par la présence du groupement trifluorométhyle en position α, une méthode d'activation spécifique et plus puissante que la formation d'un ester activé est nécessaire pour coupler un aminoacide sur la fonction amine de tels aminoacides fluorés. En accord avec les travaux de Koksch *et al.*[117] et Dal Pozzo *et al.*[118,119] l'utilisation d'halogénures d'acyles et, dans ce cas, de chlorures d'acides pour l'activation des aminoacides à coupler en position *N*-terminale, a été envisagée. Préalablement, la préparation du chlorure d'acyle de la *N*-Fmoc-Alanine s'effectue dans les conditions décrites par le groupe de Babu,[120] par agitation, sous ultrasons, de la *N*-Fmoc-Alanine en présence d'un large excès de chlorure de thionyle dans le DCM pendant 1 heure.

Ainsi, l'utilisation du chlorure d'acyle de la *N*-Fmoc-Alanine a permis son couplage au dipeptide H-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn avec un rendement de 74% (Schéma 53).[8]

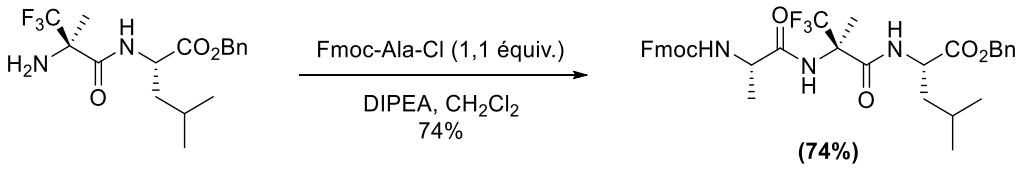


Schéma 53

1.3. Conclusion

Les couplages de ces deux aminoacides α-trifluorométhylés énantiopures, réalisés précédemment au laboratoire ont prouvé que la réactivité de la fonction amine était fortement diminuée et nécessitait des conditions d'activation relativement puissantes. Comparativement, l'emploi de méthodes classiques de couplage suffit à coupler des aminoacides naturels sur la fonction acide de ces aminoacides particuliers. Néanmoins, des temps de réactions allongés et un

[117] Koksch, B.; Quaedflieg, P. J. L. M.; Michel, T.; Burger, K.; Broxterman, Q. B.; Schoemaker, H. E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1401-1407.
[118] Dal Pozzo, A.; Ni, M.; Muzi, L.; Caporale, A.; de Castiglione, R.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Formaggio, F. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6372-6375.
[119] Dal Pozzo, A.; Ni, M.; Muzi, L.; de Castiglione, R.; Mondelli, R.; Mazzini, S.; Penco, S.; Pisano, C.; Castorina, M.; Giannini, G. *J. Med. Chem*. **2006**, *49*, 1808-1818.
[120] Kantharaju Patil, B. S.; Babu, V.V. S. *Letters in Peptide Science* **2002**, 227-229.

nombre d'équivalents plus important en aminoacide sont nécessaires pour obtenir des rendements satisfaisants.

Les couplages en position *N*-terminale de ces aminoacides α-trifluorométhylés avaient jusqu'alors été réalisés à l'aide d'halogénures d'acyle, et en particulier, de chlorures d'acyle d'aminoacides *N*-protégés par un groupement Fmoc. Or, l'emploi de ce groupe protecteur de la fonction amine possède de nombreux inconvénients pour la synthèse en solution, notamment sa sensibilité aux conditions basiques de couplage. Les chlorures d'acyle n'étant stables qu'en présence de ce groupement protecteur (voir paragraphe 2.1.3. du I) du chapitre II), d'autres méthodes d'activation de la fonction acide des acides aminés à coupler du côté *N*-terminal de l'α-Tfm-Alanine ont dû être envisagées. L'optimisation des méthodes de couplage de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine a ainsi fait l'objet d'une première partie de mes travaux de thèse.

2) Travaux personnels

Mes travaux de thèse ont fait suite à ces premiers résultats encourageants. Ils ont consisté à optimiser les conditions de couplage d'un aminoacide α-trifluorométhylé : l'α-trifluorométhylalanine. L'objectif de cette première partie de thèse était de pouvoir protéger puis incorporer cet acide aminé dans n'importe quel type de chaîne peptidique de manière efficace et reproductible, dans un premier temps en solution, puis de manière automatisée en synthèse peptidique en phase solide (SPPS).

Effectivement, à notre connaissance, aucun exemple d'incorporation directe d'aminoacides α-trifluorométhylé par SPPS n'a été décrit. La réactivité fortement diminuée des fonctions terminales de ces acides aminés mais aussi l'incompatibilité des conditions requises pour leur couplage avec les méthodes classiques de couplage en SPPS en sont les grandes raisons. Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne la position *N*-terminale qui, jusqu'alors, nécessitait l'emploi des chlorures d'acyle pour être couplée de manière satisfaisante. Ces conditions acides ne peuvent être employées en SPPS en stratégie classique (Fmoc/*tert*-butyle) raison de la sensibilité de la résine ou des groupes protecteurs des chaînes latérales fonctionnalisées. Nous avons donc envisagé dans un premier temps de protéger sélectivement les deux positions de l'α-Tfm-Alanine par différents groupes protecteurs, labiles dans différentes conditions acido-basiques, afin de s'adapter au mieux à la diversité des stratégies de couplage existantes. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'incorporation de l'α-Tfm-Alanine correctement protégée dans un peptide, d'abord en solution, puis en synthèse supportée, pour l'accès à des peptides plus

longs. Nous verrons, à ce titre, la stratégie d'incorporation par SPPS de l'α-Tfm-Alanine que nous avons développée, consistant à synthétiser préalablement, en solution, des blocs di- ou tripeptidiques incorporant l'α-Tfm-Alanine et immédiatement utilisables en SPPS.

2.1. Synthèse de chaque énantiomère de l'α-trifluorométhylalanine sous forme énantiopure

Les deux énantiomères (*R)* et (*S)* de l'α-trifluorométhylalanine sont obtenus de manière énantiopure d'après une voie de synthèse mise au point au laboratoire (Schéma 54).[69]

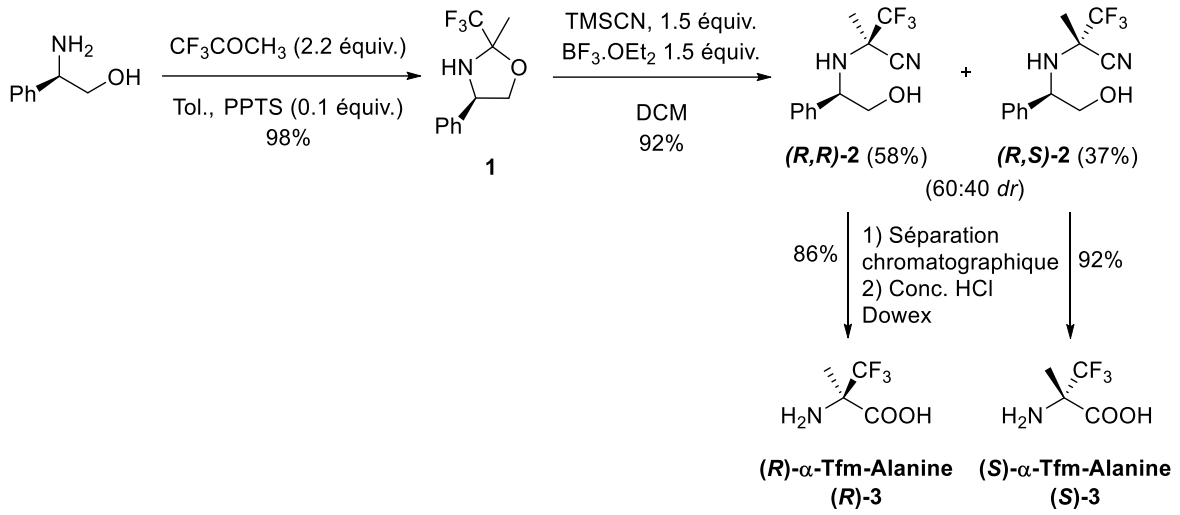


Schéma 54

La condensation du (*R*)-phénylglycinol avec la trifluorométhylcétone s'effectue en présence d'un acide de Lewis, le *para*-toluènesulfonate de pyridinium (PPTS), à reflux du toluène à l'aide d'un appareil de Dean Stark permettant l'élimination azéotropique de l'eau formée en cour de la réaction. Un mélange des deux oxazolidines diastéréoisomères **1** est alors obtenu. Ce mélange subit alors une réaction de type Strecker, avec attaque nucléophile d'ions cyanures apportés par le TMSCN. Cette réaction fournit à nouveau un mélange de deux nitriles diastéréoisomères **(*R,R*)-2** et **(*R,S*)-2**. Ces deux diastéréoisomères sont séparables par chromatographie. Néanmoins, le diastéréoisomère **(*R,S*)-2** est préalablement précipité du mélange de diastéréoisomères par ajout de pentane. Cela permet la création de deux fractions enrichies chacune en un des deux diastéréoisomères. Les purifications par chromatographie des deux nitriles de chaque fraction enrichie sont alors facilitées et permettent l'obtention de **(*R,R*)-2** et **(*R,S*)-2** avec des rendements respectifs de 58% et 37%. Enfin, chaque nitrile est hydrolysé en présence d'acide chlorhydrique

concentré à reflux, entrainant de plus le clivage de la chaîne phénylglycinol portée par la fonction amine. Après passage sur résine acide échangeuse d'ions de type Dowex, les deux énantiomères (*R*)-Tfm-Alanine **(*R*)-3** et (*S*)-Tfm-Alanine **(*S*)-3** sont obtenus de manière énantiopure, avec des rendements respectifs de 86% et 92%.

L'optimisation de cette synthèse a permis d'obtenir les (*R*)-Tfm-Alanine (*R*)-**3** et (*S*)-Tfm-Alanine (*S*)-**3** de manière énantiopure et à l'échelle de la dizaine de grammes, avec des quantités respectives de l'ordre de 15 grammes et 10 grammes. Ceci en fait une matière première de choix pour l'incorporation de ces deux énantiomères dans des structures peptidiques. La fonction amine étant particulièrement désactivée par la présence du groupement trifluorométhyle en position α, mon travail de thèse a premièrement consisté à trouver une méthode de couplage efficace de la fonction amine des deux énantiomères de l'α-Tfm-Alanine avec divers aminoacides afin de pouvoir l'incorporer au sein d'une chaîne peptidique.

2.2. Couplage de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine non protégée

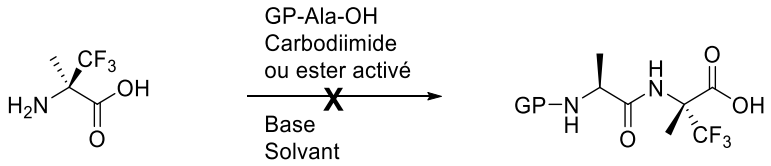
Les essais de couplage de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine avaient jusqu'alors été entrepris sur un peptide *C*-protégé incorporant une (*R*)-α-Tfm-Alanine en position *N*-terminale (Schéma 53). Les conditions employées étaient l'activation d'une *N*-Fmoc-Alanine sous forme de chlorure d'acyle dans du dichlorométhane en présence de diisopropyléthylamine (DIPEA).

Afin d'étudier la réactivité de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine, dans diverses conditions de couplage, l'α-Tfm-Alanine a, dans un premier temps, été utilisée sans protection. De plus, l'utilisation de la forme libre, plus simple et plus rapide à mettre en place n'encourt pas le risque d'homocouplage. En effet, la faible réactivité de la fonction amine, associée à l'encombrement stérique généré par la présence du groupement trifluorométhyle, évitent le couplage de l'α-Tfm-Alanine sur elle-même.

Différents systèmes d'activation ont ainsi été testés, en présence de diverses protections de l'aminoacide couplé. Ces essais ont été réalisés sur l'énantiomère **(*R*)-3** majoritaire de l'α-Tfm-Alanine.

2.2.1. Utilisation des carbodiimides et esters activés

Avant de revenir à des conditions d'activation plus puissantes comme les halogénures d'acyle qui ont montré auparavant de bons résultats pour coupler la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine, l'utilisation de systèmes plus classiques comme celle de carbodiimides ou d'esters activés a été étudiée. Ainsi, plusieurs essais utilisant du DCC ou un ester activé en présence de différents types de bases, dans différents solvants et dans différentes conditions de temps de réaction et de température ont été réalisés. Le Tableau 5 résume les résultats négatifs obtenus.



Entrée	Groupement protecteur de l'alanine GP	Activation de la fonction acide carboxylique	Base	Temps	Solvant	T°
1	Fmoc	DCC	Et_3N	16 h	CH_2Cl_2	t.a.
2	Fmoc	DCC	Et_3N	16 h	CH_2Cl_2	Reflux
3	Cbz	DCC	Et_3N	16 h	CH_2Cl_2	reflux
4	Fmoc	EDCI/ HOBt	Et_3N	15 h	CH_2Cl_2	t.a.
5	Fmoc	EDCI/ HOBt	DIPEA	15 h	CH_2Cl_2	t.a.
6	Fmoc	EDCI/ HOBt	DIPEA	5 h	CH_2Cl_2	reflux
7	Cbz	EDCI/ HOBt	Et_3N	15 h	CH_2Cl_2	t.a.
8	Cbz	EDCI/ HOBt	DIPEA	15 h	CH_2Cl_2	t.a.
9	Cbz	EDCI/ HOBt	DIPEA	5 h	CH_2Cl_2	reflux
10	Fmoc	PFP	/	10 min	THF	ultrasons
11	Fmoc	PFP	/	40 min	THF	mW

Tableau 5 : Conditions de couplage de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine non protégée en présence de carbodiimides ou d'hydroxybenzotriazoles

Concernant l'emploi de carbodiimides, l'utilisation de DCC en présence de triéthylamine pour le couplage d'une alanine *N*-protégée par un groupement 9-fluorénylméthyloxycarbonyle (Fmoc) (entrées 1et 2), ne permet pas d'observer la formation d'un produit de couplage par RMN

de ^{19}F après 16 h de temps de couplage, que ce soit à température ambiante comme à reflux du CH_2Cl_2. Après filtration de la *N,N'*-dicyclohexylurée (DCU) qui est précipitée à froid, traitement acide et extraction du milieu réactionnel à l'aide d'acétate d'éthyle, aucun produit fluoré n'est isolé. De plus, une déprotection partielle du groupement Fmoc en milieu basique est observée. Un nouvel essai, mettant en jeu une alanine protégée sous forme de benzyloxycarbonyle (Cbz) (entrée 3), groupement plus approprié à la synthèse en solution a été effectué mais n'a pas permis de coupler la position *N*-terminale de la (*R*)-α-Tfm-Alanine, même par l'utilisation de 4 équivalents d'aminoacide.

Le recours à un autre mode d'activation sous forme d'ester activé à l'aide du système HOBt/EDCI a donc été envisagé (entrées 4 à 9). Utilisé sur une alanine protégée par un groupement Fmoc, ce système ne permet pas le couplage en position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine, quelle que soit la base, le temps ou la température réactionnelle. Après acidification et extraction du milieu, seule la Fmoc-Ala-OH de départ est isolée en phase organique, accompagnée de HOBt. La phase aqueuse contient quant à elle l'α-Tfm-Alanine inchangée, en mélange avec de l'EDCI. L'emploi d'un nombre d'équivalents d'aminoacide naturel plus important ne permet pas la moindre conversion de l'α-Tfm-Alanine en dipeptide. Les résultats sont similaires en utilisant une alanine protégée sous forme de Cbz (entrées 7 à 9).

Un autre type d'ester activé a alors été envisagé : l'ester de pentafluorophényle (entrées 10 et 11). Habituellement très réactifs et pouvant être isolés, à la différence des autres types d'esters, leur synthèse s'effectue par action de pentafluorophénol sur le chlorure d'acyle d'un acide aminé protégé par un groupement protecteur Fmoc.[121]La synthèse préalable du chlorure d'acyle d'une Fmoc-Alanine s'effectue dans les conditions de Babu[120] par action d'un large excès de chlorure de thionyle (50 équivalents) dans le dichlorométhane et sous ultrasons. Après évaporation du solvant et du chlorure de thionyle, le composé est directement dissout dans du THF et porté à 4°C en présence de pentafluorophénol (Schéma 55). Après ajout de pyridine, l'ester de pentafluorophényle **(*S*)-4** désiré est recristallisé dans le pentane et obtenu avec un rendement de 88%.

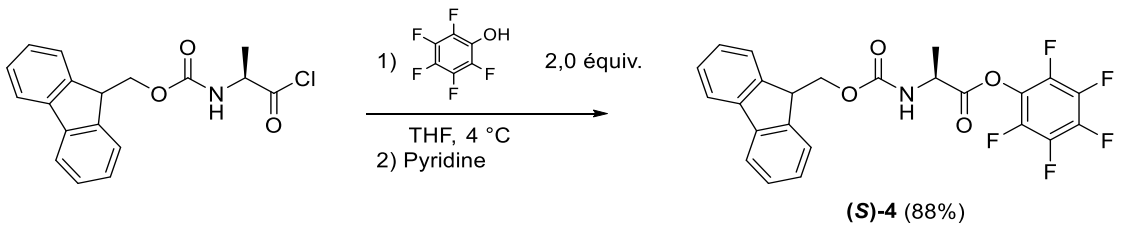


Schéma 55

[121] Jakobsen, M. H.; Buchardt, O.; Engdahl, T.; Holm, A. *Tetrahedron Lett*. **1991**, *32*, 6199-6202.

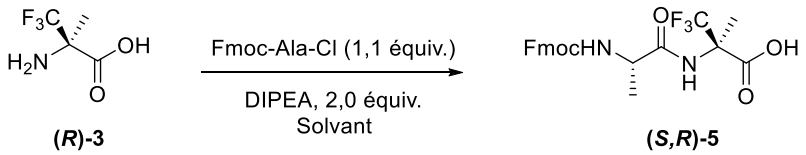
Cependant, l'emploi d'un léger excès d'ester **4** en présence d'α-Tfm-Alanine dans du THF et sous ultrasons ne permet de distinguer aucune trace de dipeptide après 10 minutes d'agitation (entrée 10). Une activation par micro-ondes est alors envisagée. Après 40 minutes au micro-ondes à 100 watts, aucune trace d'un nouveau produit fluoré n'est observée par analyse RMN ^{19}F (entrée 11).

Ces premiers échecs confirment donc la faible réactivité de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine. Le retour à une méthode d'activation plus puissante, qui s'est montré efficace par le passé pour coupler la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine (Schéma 53) a alors été envisagé. Différents essais de couplages de l'α-Tfm-Alanine en présence d'aminoacides protégés par un groupement Fmoc et activés sous forme de chlorures d'acyle ont été réalisés.

2.2.2. Utilisation des chlorures d'acyle

Les chlorures d'acyle de divers aminoacides ont été préparés selon la méthode Babu *et coll.*[120] et utilisés pour leur couplage avec l'énantiomère (*R*) majoritaire de l'α-Tfm-Alanine non protégée. Dans un premier temps, nous nous sommes placés dans les conditions précédemment décrites par notre laboratoire ayant permis le couplage du chlorure de *N*-Fmoc-Alanine sur le dipeptide H-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn, pour former le tripeptide correspondant avec un rendement de 74% (Schéma 53).

Dans ces conditions, les premiers essais de couplage de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine ont été réalisés sur de petites quantités de matières et suivis par RMN du fluor afin d'observer le taux de conversion de l'α-Tfm-Alanine (Tableau 6). Ces taux de conversion représentent les intensités relatives des signaux en RMN ^{19}F du produit de couplage par rapport à celui de l'α-Tfm-Alanine de départ.



	Solvant	Taux de conversion
1	CH_3CN	0%
2	CH_2Cl_2	35%
3	THF	70%

Tableau 6 : Optimisation des conditions de couplage de la fonction amine de la (*R*)-α-Tfm-Alanine en présence des chlorures d'acyle

A température ambiante, dans l'acétonitrile, en présence de DIPEA, aucune conversion de l'α-Tfm-Alanine en dipeptide Fmoc-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*S,R*)-5** n'est observée en RMN du ^{19}F (entrée 1). Si du CH_2Cl_2 est utilisé comme solvant pour la réaction de couplage (entrée 2), l'α-Tfm-Alanine est convertie à hauteur de 35% en un deuxième produit fluoré. Ce taux de conversion est même augmenté à 70% si le solvant de réaction utilisé est le THF anhydre (entrée 3). Après acidification et extraction du milieu réactionnel, la présence d'α-Tfm-Alanine de départ est toujours observable en phase aqueuse. En phase organique, la RMN du proton montre la présence du produit de couplage désiré mais accompagné de plusieurs autres produits secondaires. La purification de ces mélanges bruts réactionnels par chromatographie sur gel de silice, à l'aide d'un système éluant DCM / MeOH dans un rapport 98/2 ne permet cependant pas d'isoler pur le dipeptide désiré. En effet, même après plusieurs passages successifs sur colonne chromatographique, réalisés manuellement ou sur un appareil automatique de type BUCCHI plus performant en terme de séparation, le dipeptide est toujours élué en même temps que la Fmoc-Alanine résultant de l'hydrolyse du chlorure d'acyle.

Afin de convertir complètement l'α-Tfm-Alanine, quatre équivalents de chlorure de *N*-Fmoc-Alanine sont mis en jeu dans la réaction de couplage, dans les conditions précédentes (Schéma 56).

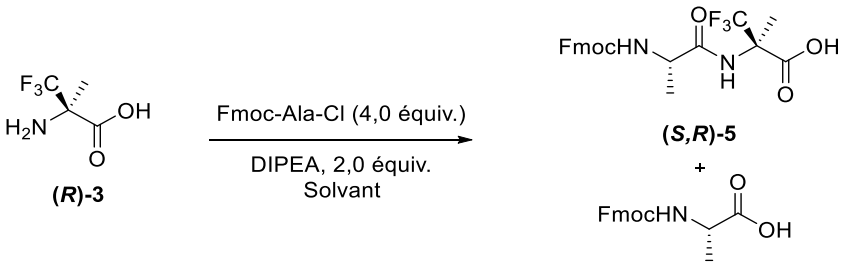
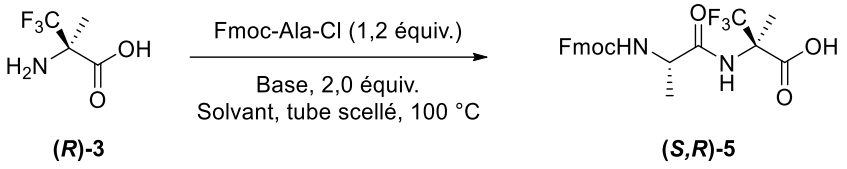


Schéma 56

Même si une conversion totale de l'α-Tfm-Alanine est observée en RMN du fluor, sa purification sur colonne de silice est impossible et le dipeptide attendu est toujours obtenu en mélange avec la Fmoc-Alanine résultant de l'hydrolyse du chlorure d'aminoacide de départ.

Ainsi, augmenter la quantité de réactif de départ dans le but de convertir totalement l'α-Tfm-Alanine entraine en contrepartie des problèmes de purification récurrents. Nous avons alors décidé de revenir à un nombre d'équivalents d'aminoacide raisonnable (1,2 équivalents). Ces nouveaux essais ont également été réalisés sur une petite quantité de produit de départ avec un temps de couplage de trois heures. Le chlorure de la *N*-Fmoc-Alanine préparé dans les conditions de Babu[120] est alors placé avec l'α-Tfm-Alanine dans un tube scellé à 100°C. Différentes conditions basiques et de solvants ont alors été testées. Après 3 heures de réaction sous pression à

100°C, la réaction est stoppée par ajout d'une solution d'HCl 1M et la conversion de l'α-Tfm-Alanine en dipeptide **(*S,R*)-5** correspondant est évaluée (Tableau 7).



	Base	Solvant	Taux de conversion
1	Et_3N	CH_3CN	11%
2	Et_3N	THF	15%
3	DIPEA	CH_3CN	24%
4	DIPEA	THF	29%
5	-	THF	35%
6	K_2CO_3	THF	90%

Tableau 7 : Optimisation des conditions de couplage de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine sous pression en présence de chlorures d'acyle

L'utilisation de THF ou d'acétonitrile modifie faiblement le taux de conversion de l'α-Tfm-Alanine en dipeptide Fmoc-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH (entrées 1-2 et 3-4). L'emploi de bases tertiaires organiques comme la triéthylamine (Et_3N) ou la diisopropyléthylamine (DIPEA), entraine la formation de nombreux produits de dégradation observés par chromatographie sur couche mince (CCM), notamment l'alanine résultant de la déprotection du groupement Fmoc. Ceci explique les faibles taux de conversion de l'α-Tfm-Alanine obtenus dans le cas de leur utilisation (entrées 1, 2, 3 et 4). En effet, l'absence de base pendant la réaction de couplage ne nuit pas à ce dernier, au contraire, le taux de conversion est même légèrement amélioré et aucune trace d'aminoacide déprotégé n'est observée par CCM (entrée 5). Il semblerait donc que l'emploi de bases tertiaires organiques comme Et_3N ou DIPEA soit délétère au couplage de la fonction amine l'α-Tfm-Alanine à un aminoacide *N*-protégé par un groupement protecteur Fmoc. Afin d'améliorer ce taux de couplage, il a alors été envisagé d'utiliser une base minérale qui agirait comme simple « pompe à protons » au cours de la réaction de couplage (entrée 6). L'emploi de 2 équivalents de K_2CO_3 dans du THF permet ainsi d'augmenter la conversion de l'α-Tfm-Alanine en dipeptide désiré à hauteur de 90%.

Un avantage supplémentaire que possède l'utilisation de K_2CO_3 comme base dans la réaction de couplage, est son insolubilité dans les milieux organiques. Après complétion de la réaction, le traitement du milieu réactionnel consiste simplement à filtrer le K_2CO_3 insoluble du

milieu réactionnel sur coton ou papier filtre. L'analyse du filtrat en RMN du proton montre la présence du dipeptide désiré en mélange avec de la Fmoc-alanine résultant de l'hydrolyse du chlorure de *N*-Fmoc-Alanine n'ayant pas réagi. Or, comme nous l'avons vu, la séparation du dipeptide de cette Fmoc-Alanine résiduelle est particulièrement difficile sur colonne de silice.

Comme ces premières réactions d'optimisation avaient été réalisées sur de petites quantités de matières de départ, nous les avons réitérées sur plus grande échelle en utilisant les conditions optimisées de l'entrée 6 du Tableau 7, afin de disposer de suffisamment de matière à purifier manuellement (Schéma 57).

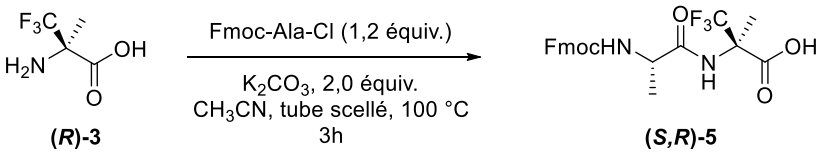


Schéma 57

Notre laboratoire disposant d'une chromatographie liquide à haute pression (HPLC) semi préparative de type Waters, la purification de ce dipeptide **(*S,R*)-5** a alors pu être réalisée sur colonne de silice inverse de type C_8, particulièrement adaptée à la séparation de petits peptides. Un mélange eau/acétonitrile en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA), en utilisant un gradient d'acétonitrile s'étendant de 10% à 30% permet la séparation des deux acides. Le rendement de couplage après purification est alors de 85 % (Schéma 58).

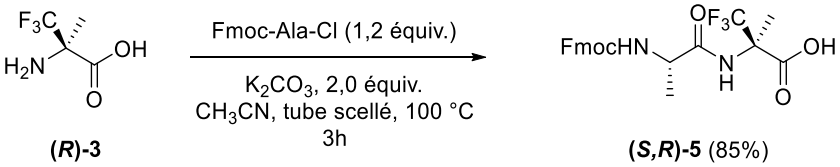


Schéma 58

Ce bon rendement de couplage nous a alors confirmé que les chlorures d'acyle sont une méthode d'activation efficace pour le couplage de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine. Différents aminoacides activés sous cette forme ont alors été couplés dans les conditions optimisées précédemment et purifiés par HPLC semi-préparative en phase inverse sur colonne de silice de type C_8 (Schéma 59 et Schéma 60).

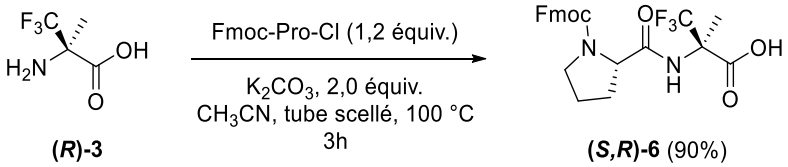


Schéma 59

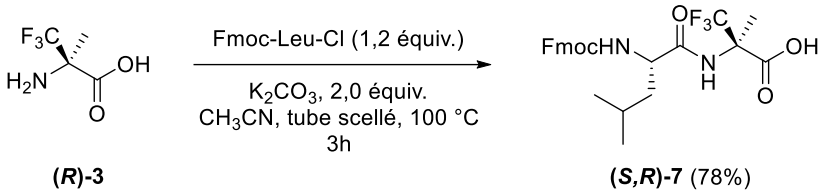


Schéma 60

Cependant, le recours à une HPLC semi préparative comme outil de purification ne nous permet pas d'obtenir de grosses quantités de dipeptides purifiés. Les masses obtenues sont de l'ordre de la dizaine, éventuellement de la centaine de milligrammes. Or, le but de la première partie de mes travaux de thèse était de développer une méthode efficace, rapide et donnant accès à de grandes quantités de dipeptides incorporant une α-Tfm-Alanine en position *C*-terminale. L'utilisation de l'α-Tfm-Alanine non protégée dans les réactions de couplage génère la formation de dipeptides dont la fonction acide carboxylique *C*-terminale est libre, ce qui ne permet par leur purification sur colonne de silice en phase normale. Pour parvenir à purifier ces dipeptides par chromatographie en phase normale, la protection des fonctions amine et acide carboxylique de l'α-Tfm-Alanine a été envisagée.

2.3. Protections sélectives de l'α-Tfm-Alanine

Une grande partie de mes travaux de thèse a consisté à trouver et optimiser des méthodes de protection des fonctions *N*- et *C*-terminales de l'α-Tfm-Alanine. Les essais préliminaires effectués au laboratoire dans le but de former l'ester *tert*-butylique à partir de l'α-Tfm-Alanine totalement déprotégée n'ont jamais permis l'obtention de cet ester (voir paragraphe 1.2.1.). Nous avons alors envisagé de commencer par protéger la position *N*-terminale de cet acide aminé.

2.3.1. Protections de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine

2.3.1.1. Protection par un groupement *N*-Carboxybenzyle

Dans le but de protéger l'amine de la (*R*)-α-Tfm-Alanine sous forme de N-carboxybenzyle, cette dernière est soumise à l'action de de 1,1 équivalents de chlorure de carboxybenzyloxycarbonyle (CbzCl) en présence de 3,0 équivalents de carbonate de potassium dans un mélange eau/THF selon des conditions classiques.[122] Dans un premier temps, l'α-Tfm-

[122] Lai, M. Y. H.; Brimble, M. A.; Callis, D. J.; Harris, P. W. R.; Levi, M. S.; Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem*. **2005**, *13*, 533-548.

Alanine et le K_2CO_3 sont dissouts dans l'eau et portés à 0 °C. Une solution de CbzCl dans du dioxane anhydre est ajoutée goutte à goutte. Après 30 min à 0 °C, le milieu réactionnel est laissé remonter à température ambiante et l'avancement de la réaction est suivi par RMN du fluor. Après 16 heures d'agitation, un faible taux de conversion de 20% de l'α-Tfm-Alanine en *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Alanine est observé par RMN ^{19}F (Schéma 61). Cependant, le traitement de cette réaction par acidification du milieu réactionnel par une solution aqueuse d'HCl à 10% ne permet pas d'isoler la *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Alanine **(*R*)-8**.

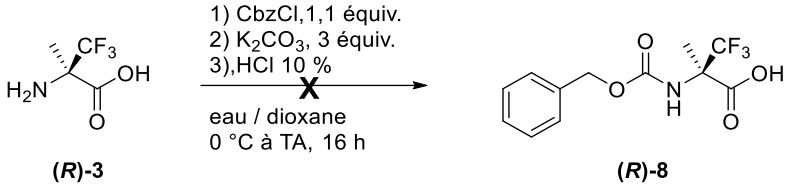


Schéma 61

L'utilisation d'un nombre d'équivalents initial de CbzCl plus important (6,0 équivalents) ne permet pas non plus d'augmenter le taux de conversion de l'α-Tfm-Alanine (Schéma 62). De plus, le milieu réactionnel se retrouve saturé en alcool benzylique résultant de l'hydrolyse du chloroformiate.

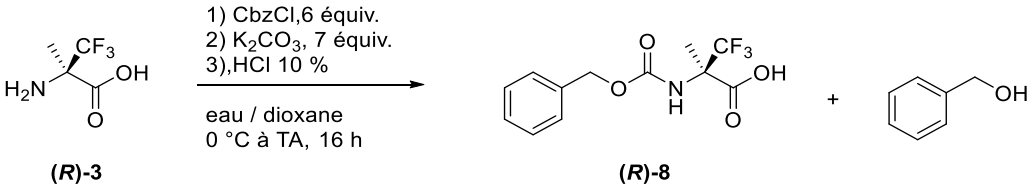


Schéma 62

Un essai de protection sous pression en tube scellé à 100°C, en présence de 1,2 équivalents de CbzCl et de 3,0 équivalents de K_2CO_3 dans du THF anhydre ne permet pas non plus la protection de l'α-Tfm-Alanine par un groupement *N*-Carboxybenzoyle (Schéma 63). L'analyse du brut réactionnel par RMN ^{1}H montre que le milieu réactionnel est saturé en alcool benzylique provenant de la dégradation du chloroformiate dans ces conditions de température et de pression élevées. L'emploi des chloroformiates n'est donc pas adapté à ce type de conditions.

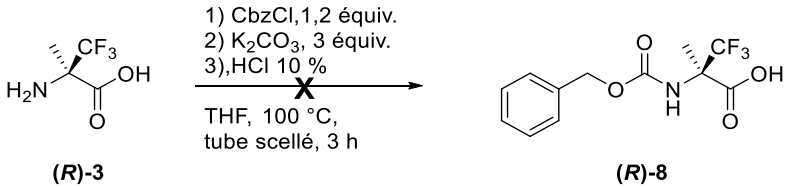


Schéma 63

L'hypothèse avancée pour expliquer ce taux de conversion faible est, qu'une fois ajouté au milieu réactionnel aqueux initial, le CbzCl s'hydrolyse progressivement en alccol benzylique et ne

peut donc plus réagir avec la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine. Nous avons alors envisagé de procéder par ajouts lents successifs de plus petites quantités de CbzCl.

Ainsi, l'ajout de 1,1 équivalents de CbzCl au goutte à goutte sur une durée de 30 minutes permet d'augmenter le taux de conversion en RMN ^{19}F de la (*R*)-α-Tfm-Alanine en *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Alanine **(*R*)-8** à 52%. Il semblerait donc que l'hydrolyse rapide du chloroformiate de carboxybenzyloxy en milieu réactionnel aqueux soit le facteur limitant de cette réaction de protection.

L'utilisation de 5,0 équivalents de CbzCl répartis en 2 ajouts lents de 2,5 équivalents à 3 heures d'intervalles, permet, après plusieurs lavages au dichlorométhane et acidification du milieu réactionnel par une solution aqueuse d'HCl à 10 %, de convertir l'α-Tfm-Alanine en *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Alanine avec un rendement de 92% (Schéma 64).

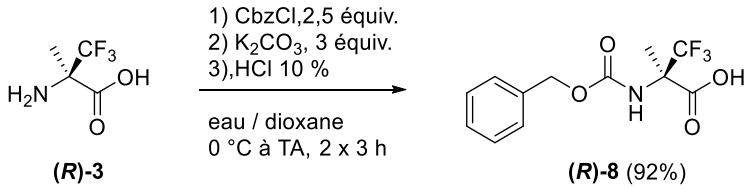


Schéma 64

Ces conditions optimisées ont alors été appliquées à la protection de la fonction amine de l'énantiomère (*S*) minoritaire de l'α-Tfm-Alanine, permettant sa protection avec un rendement équivalent de 94% (Schéma 65).

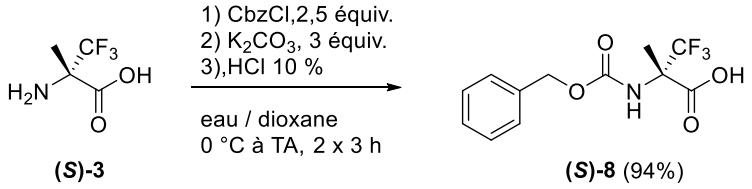


Schéma 65

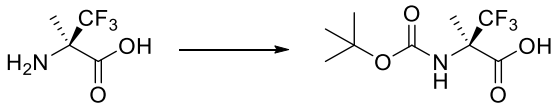
Ces premiers essais de protection de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine sous forme de *N*-Carboxybenzyle (Cbz) ont permis de confirmer sa faible réactivité. Pour un même nombre d'équivalents de chloroformiate utilisé, son addition goutte à goutte doit être ralentie pour garantir la protection de l'amine. L'obtention de ce premier type de *N*-protection de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine s'est montrée encourageante quant à sa réactivité, qui, certes fortement diminuée, peut être maitrisée. L'avantage du groupement Cbz pour les couplages en solution est sa grande stabilité aux conditions basiques de couplage peptidique. C'est le groupement de choix pour réaliser les couplages en solution. Il est orthogonal aux groupements labiles en milieu acide comme les esters méthyliques ou éthyliques souvent employés comme protections des fonctions acides carboxyliques en solution. Cependant, afin de diversifier les types de groupement protecteur

de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine, nous avons ensuite envisagé sa protection sous forme de *N*-*tert*-butyloxycarbonyle.

2.3.1.2. *N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-α-Tfm-Alanine

L'avantage d'un groupement *tert*-butyloxycarbonyle (Boc) comme groupe protecteur d'une fonction amine est, au même titre que le groupement Cbz, son orthogonalité aux groupes protecteurs sensibles aux conditions acides. Cependant, celui-ci se révèle également compatible avec des groupements protecteurs clivés par hydrogénation comme les esters benzyliques, ce qui n'est pas le cas d'un Cbz qui lui-même est sensible à ce mode de déprotection. La stratégie Boc/benzyle est ainsi l'une des plus répandues pour les couplages en solution.

Les conditions classiques de formation de ce groupe protecteur nécessitent l'emploi du dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc_2O) en présence d'une base qui est généralement un carbonate de sodium dans le THF ou dans l'eau. Ainsi, l'emploi de Boc_2O en présence de différentes bases et dans différents solvants a été étudié pour la protection de l'amine de la (*R*)-α-Tfm-Alanine (Tableau 8).



(*R*)-3 (*R*)-9

	Boc_2O	Base (équiv.)	Solvant	T° / tps	Rdt
1	1.5	Et_3N (2.5)	DCM	TA /1 nuit	0%
2	1.5	Et_3N (2.5)	MeOH	TA / 1 nuit	0%
3	3	Et_3N (6.0)	MeOH	TA / 1 nuit	0%
4	1.5	KOH (2.5)	THF/H_2O[a]	TA / 1 nuit	0%
5	2	K_2CO_3 (2.5)	Eau/dioxane[b]	TA / 6h	0%
6	1.2	DMAP (0.1)	THF	TA / 6h	69 %
7	1.2	DMAP (0.1)	THF	TA / 30 min	95 %

a proportions 40/60
b proportions 50/50

Tableau 8 : Optimisation des conditions de protection de la fonction amine de lα-Tfm-Alanine par un groupement Boc

Ainsi, le recours à des conditions classiques de protection à l'aide de Boc_2O, en présence de triéthylamine à température ambiante pendant une nuit ne permet pas la protection de la (*R*)-α-TfmAlanine en Boc-(*R*)-α-Tfm-Alanine **(*R*)-9** (entrées 1, 2 et 3), quel que soit le solvant utilisé.

En effet, l'analyse des spectres RMN ^{19}F des différents bruts réactionnels ne montrent pas de conversion de l'α-Tfm-Alanine en un quelconque produit fluoré. Celle-ci reste inchangée tout au long de la réaction. De même, l'utilisation de KOH (2,5 équivalents) dans un mélange THF/H_2O (entrée 4) ou de K_2CO_3 (2,5 équivalents dans un mélange H_2O/dioxane (entrée 5) ne permettent pas la formation de la Boc-(*R*)-α-Tfm-Alanine. Nous avons donc envisagé le recours à une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine (DMAP). L'avantage de l'utilisation de cette base est son mécanisme catalytique (Schéma 66). Après réaction avec un équivalent d'anhydride pour former une espèce hautement réactive, la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine vient réagir sur celle-ci. Au cours de cette réaction, la DMAP est régénérée et peut alors réagir à nouveau avec un nouvel équivalent d'anhydride.

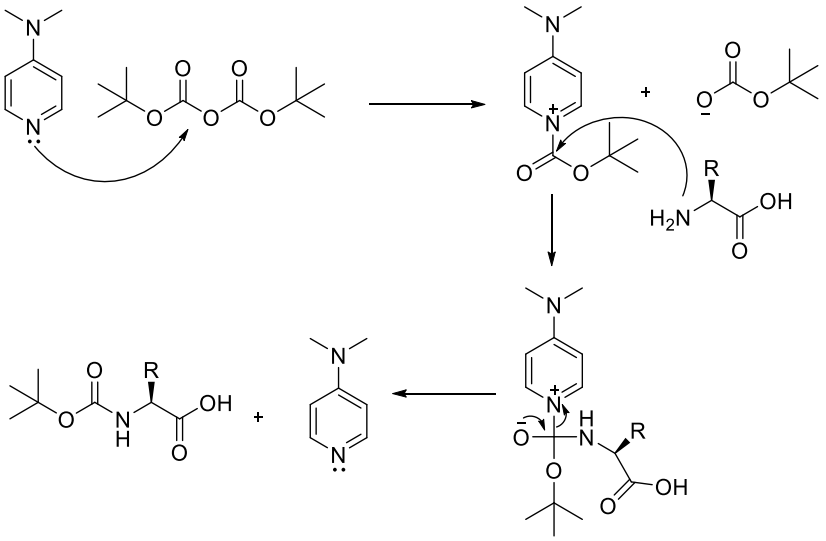


Schéma 66

L'addition lente d'un léger excès de Boc_2O (1,2 équivalents) à une solution de (*R*)-α-Tfm-Alanine dans du THF anhydre en présence de 0,1 équivalent de DMAP à température ambiante pendant 6 heures permet, après acidification du milieu et extraction par de l'AcOEt, d'obtenir la Boc-(*R*)-α-Tfm-Alanine **(*R*)-9** avec un rendement non optimisé de 69 % (entrée 6). Au cours des dix premières minutes de réaction un dégagement gazeux de CO_2 peut être observé prouvant l'avancement de la réaction de protection.

Un deuxième essai, en présence d'une quantité plus importante de DMAP (0,3 équivalents) permet, après 30 minutes de réaction, de former la *N*-Boc-(*R*)-α-Tfm-Alanine **(*R*)-9** avec un excellent rendement de 95% (entrée 7 du Tableau 8, Schéma 67).

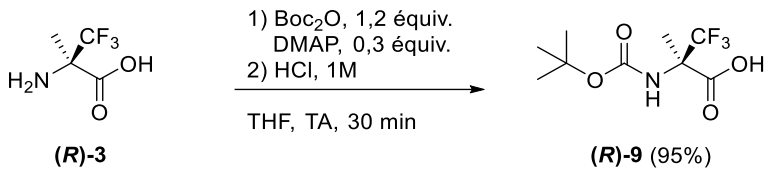


Schéma 67

Ces conditions optimisées de protection sous forme de *N*-(*tert*-butyloxycarbonyle ont été appliquées à l'énantiomère *S* minoritaire de l'α-Tfm-Alanine et permettent sa protection avec un rendement équivalent de 94% (Schéma 68).

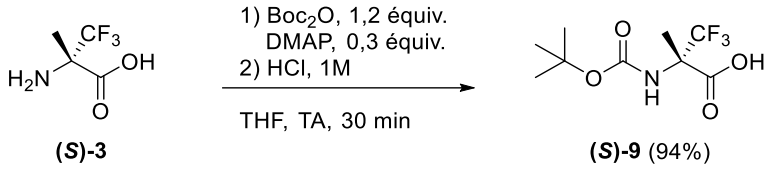


Schéma 68

Ces deux types de *N*-protections, sous forme de groupement Cbz et de groupement Boc, conviennent parfaitement à la synthèse en solution car sont stables aux conditions basiques de couplages. Or, afin de pourvoir greffer l'α-Tfm-Alanine dans une séquence peptidique en croissance par synthèse peptidique sur support solide (SPPS), il serait intéressant de pouvoir obtenir la *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-α-Tfm-Alanine. En effet, comme nous le verrons au paragraphe 2.5.1., la stratégie conventionnelle de protection des fonctions terminales des aminoacides en SPPS consiste à protéger les fonctions amines sous forme de groupement Fmoc qui nécessite des conditions de déprotection basiques douces et les fonctions acides sous forme d'esters *tert*-butyliques.

2.3.1.3. *N*-(9-Fluorénylméthoxycarbonyl)-α-Tfm-Alanine

Différents essais de protection de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine sous forme de groupement Fmoc ont été réalisés en présence de chlorure de fluorénylméthyloxycarbonyle (Schéma 69et Schéma 70).

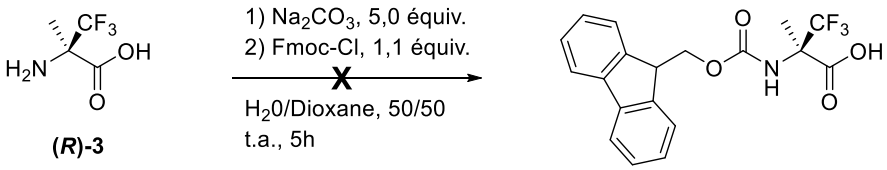


Schéma 69

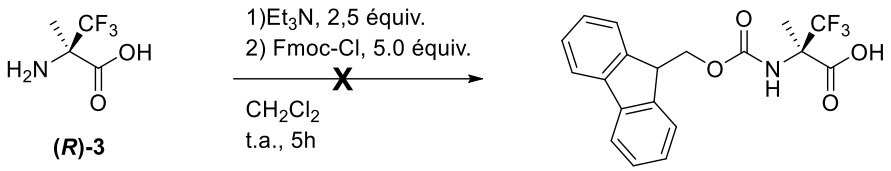


Schéma 70

Or, l'utilisation de chlorure de *N*-Fmoc en présence de carbonate de sodium dans un mélange eau/dioxane ne permet pas d'obtenir la N-Fmoc-(*R*)-α-Tfm-Alanine. Après 5 heures de réaction un prélèvement est réalisé et est directement analysé par RMN ^{19}F qui ne montre pas la présence d'un nouveau produit fluoré. La (*R*)-α-Tfm-Alanine est retrouvée inchangée. De même, le recours à une base organique, la triéthylamine dans du dichlorométhane ne fournit pas le produit attendu. La fonction amine de l'α-Tfm-Alanine étant particulièrement désactivée par la présence du groupement trifluorométhyle en position α, sa protection par un groupement encombrant comme le groupement Fmoc est rendue très difficile. Nous n'avons pas pu obtenir *N*-Fmoc-α-Tfm-Alanine de configuration (*R*) ou (*S*).

2.3.1.4. Conclusion

Les essais de protection de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine, et notamment l'échec de l'obtention de la Fmoc-α-Tfm-Ala, ont révélé la faible réactivité de sa fonction amine et notamment une vitesse de réaction ralentie par rapport aux analogues non fluorés. Il est nécessaire d'adapter les conditions classiques de protection. Néanmoins, le succès de l'obtention de deux types de *N*-protection des deux énantiomères de l'α-Tfm-Alanine, sous forme de *N*-Carboxybenzoyle et de *N*-*tert*-butyloxycarbonyle, est très encourageant et montre que cette fonction est à même de réagir (Figure 34).

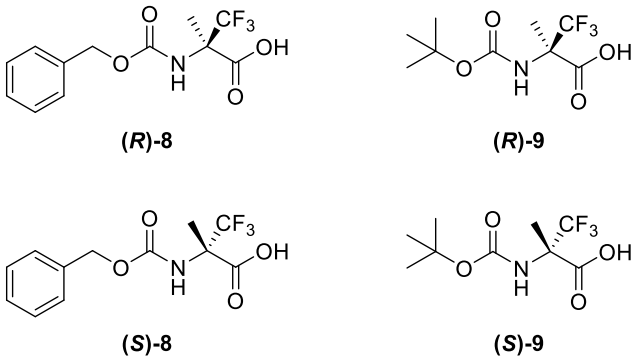


Figure 34 : *N*-protections de l'α-Tfm-Alanine

Pouvant être obtenues à l'échelle du gramme, ces quatre α-Tfm-Alanine *N*-protégées sont une matière première facilement utilisable en vue de leur incorporation dans des peptides. Par ailleurs, elles sont à présent le point de départ pour l'obtention de l'α-Tfm-Alanine diversement *C*-protégée. Pouvoir fabriquer en grande quantité l'α-Tfm-Alanine avec le choix de la protection portée par la fonction amine était une étape nécessaire pour maitriser sa réactivité et utiliser cet acide aminé fluoré comme synthon efficace dans des réactions de protection ou de couplage.

2.3.2. Protections de la position *C*-terminale de l'α-Tfm-Alanine

Dans le but d'obtenir des dipeptides intégrant une α-Tfm-Alanine en position *C*-terminale, et surtout de pouvoir les purifier plus facilement qu'au cours des premiers essais de couplages mettant en jeu l'α-Tfm-Alanine non protégée, la protection de sa fonction acide carboxylique est nécessaire. Les premiers essais de protection de la fonction acide carboxylique de l'α-Tfm-Alanine partant de l'aminoacide totalement déprotégé n'ont jamais permis de la protéger (Schéma 51). C'est pourquoi de nouvelles expériences ont été menées sur l'α-Tfm-Alanine avec une fonction amine diversement protégée.

2.3.2.1. Ester méthylique de l'α-Tfm-Alanine

Afin d'obtenir l'ester méthylique de l'α-Tfm-Alanine, différents essais d'estérification en conditions acides ont été réalisés à l'aide de méthanol et de divers acides sur la (*R*)-α-Tfm-Alanine **(*R*)-3** non protégée (Schéma 71).

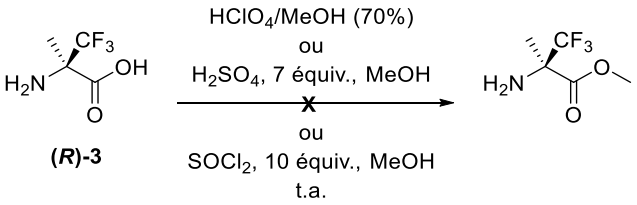


Schéma 71

Cependant, ni l'utilisation de chlorure de thionyle ($SOCl_2$), d'acide chlorhydrique (HCl) ou d'acide sulfurique (H_2SO_4) dans le méthanol à température ambiante ne permettent la formation de l'ester méthylique de l'α-Tfm-Alanine non protégée.

Ces mêmes conditions ont alors été employées pour l'estérification de la *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Alanine. Ces deux groupements, Cbz et ester méthylique, étant orthogonaux, ils pourront être

déprotégés sélectivement par la suite. Cependant, à nouveau, l'ester désiré n'a pu être obtenu (Schéma 72).

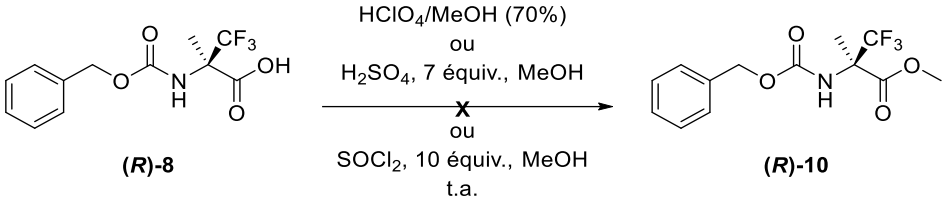


Schéma 72

Plusieurs hypothèses face à ce manque de réactivité de la fonction acide carboxylique peuvent être avancées. D'une part, le fort caractère électroattracteur du groupement trifluorométhyle diminuerait la basicité de l'atome d'oxygène du carbonyle du groupement carboxylique si bien que la protonation de ce carbonyle serait empêchée au cours de la réaction d'estérification en conditions acides. D'autre part, la présence de ce groupement encombrement en position α ne facilite pas l'attaque du carbonyle. C'est pourquoi il a été envisagé une estérification en conditions basiques. L'agent méthylant choisi est l'iodure de méthyle, utilisé en présence de carbonate de potassium. L'utilisation de 1,2 équivalent d'iodure de méthyle conduit à l'obtention de l'aminoacide di-protégé **(*R*)-10** avec un rendement de 92% (Schéma 73).

Schéma 73

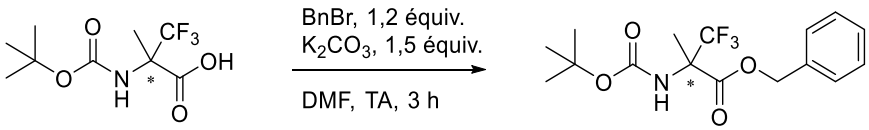
L'α-Tfm-Alanine monoprotégée est obtenue par déprotection de sa fonction amine par l'action d'une solution d'acide bromhydrique à 33% dans l'acide acétique. Après deux heures à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé et l'ester méthylique de l'α-Tfm-Alanine est obtenu sous forme de sel de bromhydrate par recristallisation dans le toluène avec un rendement de 86 % pour l'énantiomères (*R*) de l'α-Tfm-Alanine (Schéma 74).

Schéma 74

Ce type de protection de la fonction acide de l'α-Tfm-Alanine sous forme d'ester méthylique est particulièrement intéressant pour les couplages réalisés en solution et décrits au paragraphe 2.4. Sa résistance aux conditions acides mais aussi basiques douces utilisées généralement pour les couplages, s'avèrera un atout important pour les travaux décrits par la suite.

2.3.2.2. Ester benzylique de l'α-Tfm-Alanine

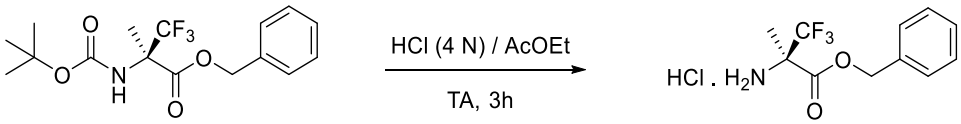
Dans le but de diversifier l'éventail de protections de la fonction acide disponibles pour l'α-Tfm-Alanine, nous avons décidé de synthétiser l'ester benzylique de l'α-Tfm-Alanine. Afin d'obtenir un intermédiaire diprotégé de manière orthogonale, les essais d'estérification ont été entrepris sur chaque énantiomère de la Boc-α-Tfm-Alanine **(*R*)-9** et **(*S*)-9**. L'emploi de conditions basiques d'estérification, en présence d'un halogénure de méthyle ayant conduit avec succès à la formation de l'ester méthylique de l'α-Tfm-Alanine, nous nous sommes inspirés de celles-ci pour l'obtention de l'ester benzylique. Ainsi, l'utilisation de 1,2 équivalents de bromure de benzyle BnBr et de 1,5 équivalent de K_2CO_3 dans du DMF, selon un mode opératoire comparable à celui de la formation de l'ester méthylique **(*R*)-10** et **(*S*)-10**, permet d'obtenir l'intermédiaire diprotégé **(*R*)-12** avec un rendement de 89% (Schéma 75). La synthèse du dérivé diprotégé **(*S*)-12** de l'énantiomère (*S)* de l'α-Tfm-Alanine s'effectue de la même manière avec un rendement de 86%.



(*R*)-9 ou (*S*)-9 (*R*)-12 (89%) ou (*S*)-12 (86%)

Schéma 75

La déprotection sélective du groupe protecteur Boc de l'amine de l'α-Tfm-Alanine s'effectue par l'action d'une solution d'acide chlorhydrique 4N dans l'AcOEt, à température ambiante, pendant 3 heures. Après évaporation du milieu, l'ester benzylique de l'énantiomère (*R*) de l'α-Tfm-Alanine ***(R)*-13** est obtenu sous forme de sel de chlorhydrate avec un rendement de 90% (Schéma 76).



(*R*)-12 (*R*)-13 (90%)

Schéma 76

Ce type de protection de la fonction acide d'un aminoacide sous forme d'ester benzylique est, au même titre que l'ester méthylique obtenu précédemment, intéressant pour les couplages réalisés en solution. En effet, il peut être utilisé dans les cas de couplage avec des aminoacides *N*-protégés par un groupement Boc. La stratégie Boc/benzyle étant actuellement la mieux adaptée à la synthèse de peptides en solution, l'obtention de **(*R*)-13** est donc d'un grand intérêt.

2.3.2.3. Ester *tert*-butylique de l'α-Tfm-Alanine

Dans le but de pouvoir obtenir une protection de la fonction acide carboxylique de l'α-Tfm-Alanine orthogonale au groupement Fmoc, nous avons souhaité synthétiser son ester *tert*-butylique. En effet, pouvoir synthétiser des peptides protégés de type Fmoc/*t*Bu s'avère être une stratégie de choix pour l'incorporation de l'α-Tfm-Alanine dans une séquence peptidique par SPPS comme nous le verrons plus loin au paragraphe 2.5.3..

Les essais d'estérification ont été réalisés sur l'énantiomère (*R*) de la *N*-CBz-(*R*)-α-Tfm-Alanine **(*R*)-8**. Le succès des conditions basiques d'estérification en présence d'un agent alkylant de type halogénure d'alkyle pour la formation des esters de méthyle et de benzyle nous a encouragés à utiliser un halogénure de *tert*-butyle : le bromure de *tert*-butyle, commercialement disponible.

Un premier essai s'inspirant des conditions décrites précédemment, au moyen de bromure de *tert*-butyle et de K_2CO_3 dans du DMF n'a cependant pas permis d'obtenir le produit diprotégé désiré (Schéma 77).

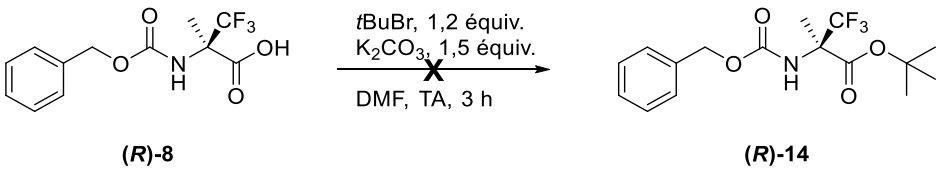


Schéma 77

Après étude approfondie de la littérature, il semblerait que ce type d'estérification par le bromure de tertiobutyle *t*BuBr nécessite, en plus du carbonate de potassium, la présence d'un composé utilisé habituellement comme agent de transfert de phase : le chlorure de triéthylbenzylammonium (TEBAC).[123] Son rôle dans ce type de réaction d'estérification serait de former une paire d'ions plus lâche qu'un sel de potassium pour faciliter ensuite l'attaque

[123] Ginisty, M.; Gravier-Pelletier, C. ; Le Merrer, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 142-150.

nucléophile du carboxylate sur l'ion *tert*-butyle très encombré. Un large excès de base et de *t*BuBr est généralement employé pour ces estérifications.

Ainsi, l'utilisation de 48 équivalents de *t*BuBr et de 26 équivalents de K_2CO_3 en présence d'un équivalent de TEBAC permet d'obtenir l'ester *tert*-butylique **(*R*)-14** de la *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Alanine avec un rendement de 74% (Schéma 78).

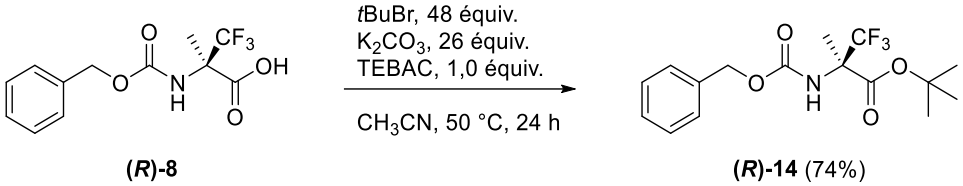


Schéma 78

Les conditions réactionnelles ont ensuite été optimisées dans le but de diminuer les quantités de *t*BuBr et TEBAC employées. Ainsi, l'utilisation de 35 équivalents de *t*BuBr et de 20 équivalents de K_2CO_3, en présence d'un équivalent de TEBAC dans l'acétonitrile à 50°C pendant 16 heures permet d'obtenir les *N*-Cbz-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*R*)-14** et **(*S*)-14** avec des rendements respectifs de 94% et 92% et à l'échelle du gramme (Schéma 79).

Schéma 79

La déprotection du groupement CBz s'effectue enfin par hydrogénolyse des dérivés intermédiaires **(*R*)-14** et **(*S*)-14** sous 3 bars d'hydrogène à l'aide Pd/C (10 %) dans l'acétate d'éthyle à température ambiante pendant 2 heures (Schéma 80). Après complétion de la réaction, le palladium est filtré et du HCl gazeux est mis à buller dans le filtrat afin de former le sel de chlorhydrate de l'α-Tfm-Alanine-O*t*Bu avec des rendements respectifs de 99% et 97%. Ces composés sont immédiatement engagés dans les réactions de couplage ultérieures (paragraphe 2.5.3.).

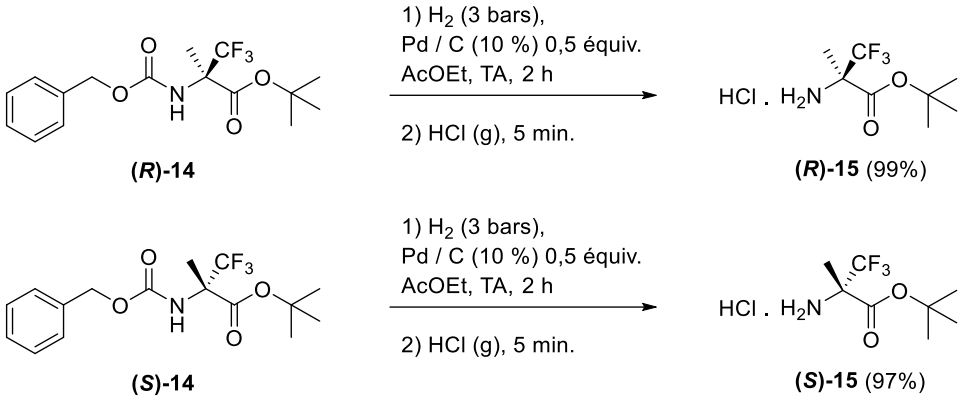


Schéma 80

2.3.2.4. Conclusion

Les conditions classiques d'estérification par catalyse acide ne fonctionnant pas en présence de l'α-Tfm-Alanine. Le fort caractère électroattracteur diminuant la basicité du carbonyle du groupement carboxylique, ainsi que l'encombrement stérique généré par la présence du groupement trifluorométhyle en position α ne permettent pas d'effectuer la réaction d'estérification en conditions acides. C'est pourquoi nous avons envisagé l'approche inverse, en conditions basiques, d'estérification par attaque nucléophile du carboxylate sur un halogénure d'alkyle. Cette méthode a permis l'obtention avec succès de trois esters de l'α-Tfm-Alanine (Figure 35).

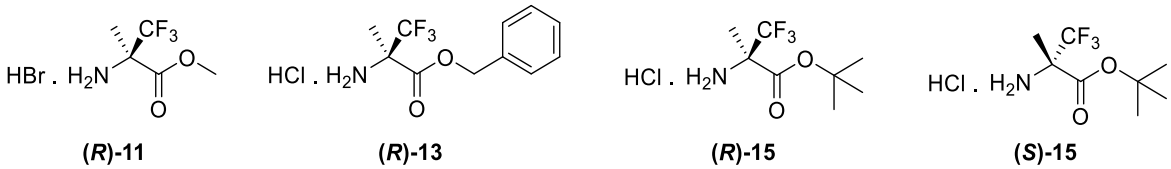


Figure 35

Le succès des protections sélectives de l'α-Tfm-Alanine et en particulier de sa fonction acide sous forme de divers esters, était un enjeu considérable et un prérequis indispensable à la synthèse et la purification de dipeptides possédant une α-Tfm-Alanine en position *C*-terminale. Cette première phase a donc ouvert la voie à de nouveaux essais de couplages en solution.

2.4. Couplage de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine protégée

Disposant à présent de l'α-Tfm-Alanine diversement *C*-protégée, de nouveaux essais de couplages de sa fonction amine ont pu avoir lieu. Précédemment, les couplages d'une α-Tfm-Alanine non protégée réalisés sur cette position ont révélé que sa réactivité étant considérablement

diminuée, les conditions d'activations choisies devaient être plus puissantes. D'autre part, les dipeptides déprotégés incorporant une α-Tfm-Alanine en position *C*-terminale se sont montrés particulièrement difficiles à purifier sur phase normale, l'utilisation de méthodes semi-préparatives étant nécessaire. Ceci n'autorisait l'obtention que de faibles quantités de produits purs. La possibilité de pouvoir à présent obtenir des dipeptides *C*-protégés pourrait faciliter cette étape de purification importante. Par ailleurs l'utilisation d'esters de l'α-Tfm-Alanine permettrait d'empêcher des réactions secondaires de sa fonction acide. Il convient donc d'étudier à nouveau différents stratégies de couplages.

2.4.1. Utilisation des chlorures d'aminoacides

Les premiers couplages en solution de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine non protégée ont été réalisés avec divers aminoacides *N*-protégés par un groupement Fmoc. En effet, la présence de ce groupement protecteur de la fonction amine est imposée par l'utilisation de cette méthode d'activation puissante que sont les chlorures d'acyles. Jusqu'alors, les chlorures d'acyle ne sont stables qu'en présence de ce groupement ou entrainent, comme dans le cas de Cbz, une dégradation du chlorure obtenu en anhydride de Leuchs (Figure 32).

Afin de se replacer dans les conditions préalablement appliquées avec succès par lelaboratoire au couplage de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine,[8] nous avons réalisés le couplage de la Fmoc-Alanine avec le bromhydrate de l'ester méthylique de la (*R*)-α-Tfm-Alanine dans ces mêmes conditions (Schéma 81).

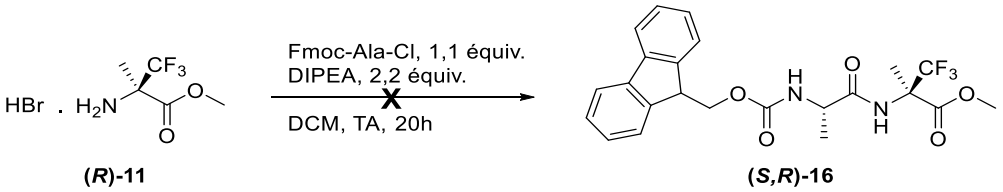


Schéma 81

Or, l'utilisation de 1,1 équivalent de chlorure de *N*-Fmoc-Alanine en présence de DIPEA dans le dichlorométhane ne permet pas d'obtenir le dipeptide désiré. Après acidification et extraction du mélange brut réactionnel, l'analyse de la fraction aqueuse révèle que le chlorure d'acyle de la Fmoc-Alanine s'est hydrolysé et qu'une proportion importante de Fmoc-Alanine est déprotégée. La fraction organique ne montre pas quant à elle la présence de dipeptide **(*S,R*)-16** et contient beaucoup de sous-produit de déprotection du groupement Fmoc dibenzofulvène (Figure 36).

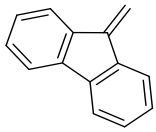


Figure 36

L'étude de la littérature, concernant les couplages d'aminoacides *N*-protégés sous forme de Fmoc et activés sous forme de chlorure d'acyle avec des esters méthyliques a révélé que l'utilisation de zinc préactivé comme chélatant des ions chlorures, était une alternative intéressante à l'utilisation de base qui risque de déprotéger le groupement Fmoc labile en milieu basique.[124] Un essai de couplage en présence de 2 équivalents de zinc préactivé en conditions acides a été mis en œuvre lors d'un couplage entre l'ester méthylique de la (*R*)-α-Tfm-Alanine et 1,2 équivalent de chlorure de *N*-Fmoc-Alanine (Schéma 82).

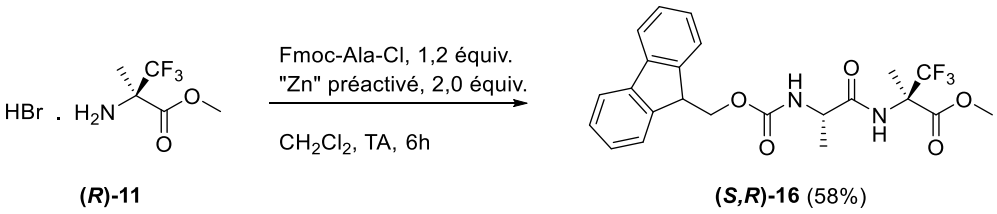


Schéma 82

Après traitement et purification par chromatographie sur gel de silice, le dipeptide **(*S,R*)-16** est obtenu avec un rendement de 58%.

Les chlorures d'acyles sont donc effectivement une méthode d'activation efficace pour le couplage de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine. Le groupement Fmoc n'étant pas compatible avec les conditions basiques classiques de synthèse peptidique en solution, le recours à du zinc préactivé en milieu acide permet d'éviter sa déprotection. Or, le rendement de couplage obtenu de 58 % peut être encore optimisé. Pour cela, il conviendrait de pouvoir coupler des aminoacides protégés par un groupement adapté aux conditions de synthèse en solution et ne risquant pas de se déprotéger.

2.4.2. Utilisation des anhydrides mixtes

Jusqu'à présent, la méthode qui a montré le plus d'efficacité pour le couplage d'aminoacides α-trifluorométhylés protégés sur leur fonction acide, a été décrite par l'équipe de Koksch.[9] Elle consiste à activer l'acide d'un aminoacide *N*-protégé par un groupement Cbz, sous forme d'anhydrides mixtes. Ainsi, disposant dorénavant de divers esters de l'α-Tfm-Alanine, nous

[124] Tantry, S. J.; Rao, R. V. R.; Babu, V. V. S. *Arkivoc*, **2006**, 21-30.

avons appliqué ces conditions au couplage d'une *N*-Cbz-Alanine avec la fonction amine libre de l'ester méthylique de la (*R*)-α-Tfm-Alanine **(*R*)-11** (Schéma 83).

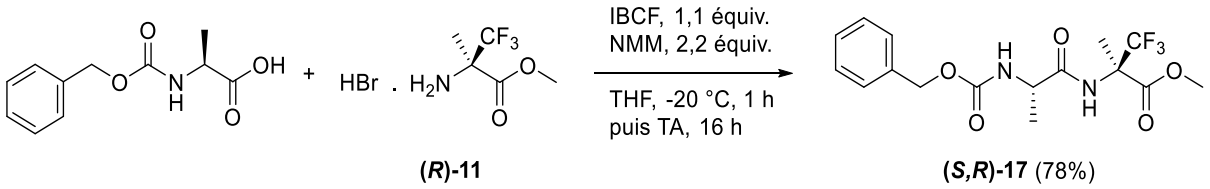


Schéma 83

Une première phase d'activation de l'acide de la *N*-Cbz-Alanine consiste à porter cette dernière à -20 °C dans le THF, en présence de chloroformiate d'isobutyle (IBCF) et de *N*-méthylmorpholine (NMM) afin de former l'anhydride mixte, réactif intermédiaire. Après 1 heure à cette température, l'ester méthylique de la (*R*)-α-Tfm-Alanine **(*R*)-11** est rajouté ainsi qu'un nouvel équivalent de NMM. La réaction se poursuit alors à température ambiante pendant 16 h pour former le dipeptide **(*S,R*)-17** attendu avec un rendement de 78%.

Il semblerait donc que les anhydrides mixtes représentent une méthode de choix pour le couplage en solution de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine et, en général, d'aminoacides α-trifluorométhylés. Cependant, la synthèse de peptides en solution se limite à la synthèse de peptides courts car les nombreuses étapes et les purifications requises à chacune d'entre elles deviennent des facteurs limitants. Pour faciliter l'incorporation de l'α-Tfm-Alanine dans une séquence peptidique plus longue, il convient d'avoir recours à une autre stratégie de synthèse : la synthèse peptidique sur support solide (SPPS).

2.5. Couplage de l'α-Tfm-Alanine sur support solide

2.5.1. Principe de la SPPS

L'introduction de la synthèse peptidique sur support solide (SPPS pour Solid-Phase Peptide Synthesis), par Robert Bruce Merrifield en 1963,[125] a représenté une véritable révolution. La SPPS repose sur l'utilisation de billes de polymères, insolubles mais poreuses, sur lesquelles est lié da manière covalente le peptide en croissance. L'élongation de la chaîne peptidique utilise un processus itératif de cycles de déprotections, d'activations et de couplages, entre lesquels tous les réactifs et sous-produits réactionnels sont éliminés par simple lavage. Un large excès de réactifs peut donc être utilisé (entre 2 et 10 équivalents). Par ailleurs, ce processus répétitif peut être

[125] Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc*. **1963**, 85, 2149-2154.

programmé et réalisé par un séquenceur automatique, facilitant ainsi l'accès rapide à de plus longues séquences que ne le permet la synthèse en solution. La synthèse s'effectue toujours du résidu *C*-terminal vers le résidu *N*-terminal, en faisant réagir à chaque étape l'amine de l'acide aminé lié à la résine sur la fonction acide préalablement activée du résidu précédent dans la séquence (Schéma 84).

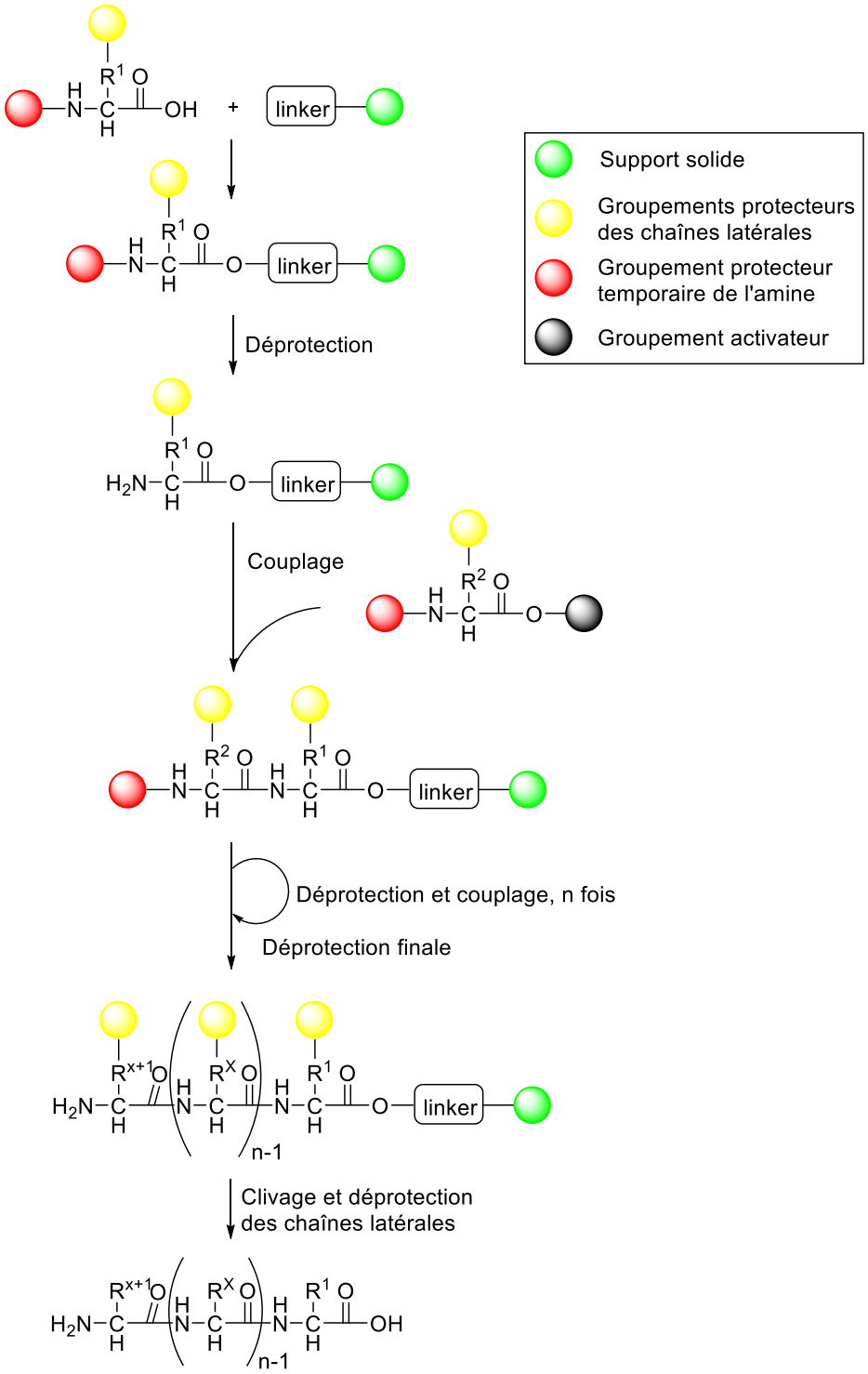


Schéma 84

Deux stratégies principales, dépendant du groupement protecteur utilisé pour protéger l'amine lors du couplage, coexistent en SPPS : la stratégie Boc et la stratégie Fmoc. Le choix de l'une ou l'autre dépend du lien chimique reliant le peptide en croissance à la résine ainsi que celui des groupements protecteurs des chaînes latérales qui doivent résister aux conditions de déprotection.

2.5.1.1. Stratégie Boc

La première stratégie rencontrée utilise le groupement *tert*-butyloxycarbonyle (Boc) comme protection de la fonction amine. Déprotégé en présence d'un acide fort tel que l'acide trifluoroacétique (TFA), il libère l'extrémité *N*-terminale du peptide en croissance sous la forme du sel de trifluoroacétate correspondant, qui est souvent neutralisé *in situ* lors du couplage suivant.[126] Les fonctions réactives des chaînes latérales sont en général protégées sous forme de groupements benzyles ou assimilés.

Afin de résister aux traitements répétés à l'acide trifluoroacétique, les résines ont été améliorées au fil des années. A l'heure actuelle, les résines les plus fréquemment utilisées en stratégie Boc sont de type hydroxyméthylphénylacétamidométhyle (PAM).[127] Après clivage, le peptide est libéré sous forme d'acide carboxylique. Pour l'obtention des peptides synthétisés sous forme amide $CONH_2$, une résine para-méthylbenzhydrylamine[128] (pMBHA) est utilisée (Figure 37).

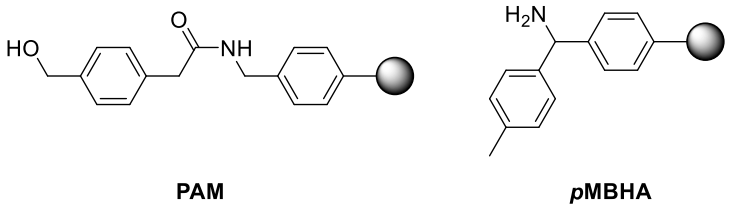


Figure 37 : Résines les plus couramment utilisées en stratégie Boc

Lors de l'étape de clivage de la résine par l'acide fluorhydrique, les groupements protecteurs de type benzyle des chaînes latérales sont également déprotégés. Des « scavengers » de type crésol et diméthylsulfure sont ajoutés dans le milieu réactionnel pour piéger les carbocations très réactifs formés lors de la réaction. En effet, leur présence engendre des réactions secondaires avec le peptide. L'inconvénient principal de la stratégie Boc réside dans cette dernière

[126] Schnolzer, M.; Alewood, P.; Jones, A.; Alewood, D.; Kent, S. B. *Int. J. Pept. Protein. Res*. **1992**, *40*, 180-193.
[127] Mitchell, A. R.; Kent, S.B.H.; Engelhard, M.; Merrifield, R.B. *J. Org. Chem*. **1978**, *43*, 2845-2852.
[128] Matsueda, G. R.; Stewart, J. M. *Peptides* **1981**, *2*, 45-50.

étape qui nécessite de manipuler l'acide fluorhydrique, nécessitant des précautions particulières d'utilisation. C'est pourquoi une nouvelle stratégie, apparue plus récemment, a révolutionné la synthèse peptidique en solution par la simplicité de sa mise en œuvre et de ses méthodes de déprotection plus douce : il s'agit de la stratégie Fmoc.[129]

2.5.1.2. Stratégie Fmoc

Développée plus récemment, l'utilisation du groupement protecteur temporaire de la fonction amine terminale 9-fluorénylméthyloxycarbonyle ou Fmoc est une alternative plus douce.[129] Sa déprotection, entre deux étapes de couplage, a cette fois-ci lieu en milieu basique, le plus souvent à l'aide de pipéridine en solution dans du diméthylformamide (DMF) ou de la *N*-méthylpyrrolidinone (NMP). Ainsi, l'amine terminale libre du peptide en croissance est obtenue sous forme non protonée, et ne nécessite donc pas d'étape de neutralisation supplémentaire. Néanmoins, elle en est d'autant plus nucléophile et est donc possiblement sujette à des réactions secondaires. Par ailleurs, dans le cas de la synthèse d'un peptide hydrophobe, l'absence de charges répulsives sur cette extrémité N-terminale peut faciliter l'agrégation du peptide en croissance.

De même que pour la stratégie Boc, deux résines sont principalement utilisées en stratégie Fmoc : la résine de Wang, qui permet d'obtenir le peptide sous forme d'acide carboxylique, et la résine Rink-amide, sous forme amide (Figure 38).[130] Dans cette stratégie, la réaction finale de clivage est effectuée par traitement au TFA, en présence de « scavengers » comme dans le cas précédent, les silanes tels que le tri-isopropylsilane (TIS) étant les plus utilisés. Les groupements protecteurs permanents utilisés pour protéger les chaînes latérales des acides aminés sont donc ici des groupements clivables en milieu acide, en général des groupements de type *tert*-butyliques.

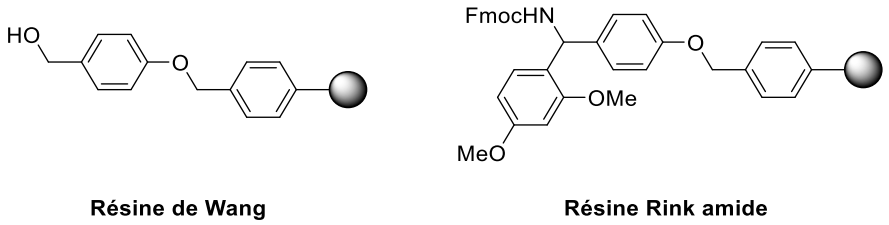


Figure 38 : Résines les plus couramment utilisées en stratégie Fmoc

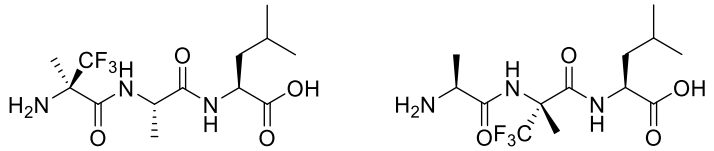
[129] Albericio, F. *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide, In Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide; CRC Press; Boca Raton*, 2000, p 848.
[130] Wang, S. S. *J. Am. Chem. Soc*. **1973**, *95*, 1328-1333.

Contrairement à la stratégie Boc, la stratégie Fmoc est réellement orthogonale, puisqu'elle fait intervenir des mécanismes opposés lors des étapes de déprotection et de clivage. Ce n'est pas le cas en stratégie Boc, dans laquelle les mécanismes de clivage et de déprotection reposent tous les deux sur l'action d'un acide, et où la différence entre déprotection et clivage ne se trouve que dans la vitesse relative des deux réactions.

2.5.2. Incorporation de l'α-Tfm-Alanine sur support solide

Afin de pouvoir intégrer l'α-Tfm-Alanine dans une séquence peptidique plus longue de manière rapide et automatisable, le recours à la synthèse peptidique sur support solide est nécessaire. Jusqu'alors, de par les profondes modifications de la réactivité des fonctions de l'α-Tfm-Alanine engendrées par la présence du groupement trifluorométhyle en position α, ainsi que par les quantités importantes de réactifs habituellement utilisées en SPPS, ce mode d'incorporation dans des peptides n'avait pas encore été envisagé.

Dans le cadre d'une étude de l'hydrophobie de petits peptides trifluorométhylés détaillée dans le chapitre III, nous devions synthétiser deux tripeptides incorporant une α-Tfm-Alanine en position *N*-terminale **(*R,S,S*)-18** ou centrale **(*S,R,S*)-19** (Figure 39).



(*R,S,S*)-18

Figure 39 : Tripeptides incorporant une α-Tfm-Alanine en positions *N*-terminale et centrale synthétisés pour l'étude de leur hydrophobie

La synthèse de ces peptides a alors été envisagée par synthèse peptidique supportée. Les fonctions acides carboxyliques terminales étant non protégées, la résine sélectionnée est une résine de Wang (Figure 38).

2.5.2.1. Couplage de la position *C*-terminale de l'α-Tfm-Alanine en SPPS

La synthèse du peptide **(*R,S,S*)-18** a ainsi été réalisée par SPPS. La fonction acide terminale étant libre, nous avons utilisé une résine de type Wang permettant, après clivage, de libérer les peptides sous forme acide libre. Le premier résidu de leucine est prégreffé sur la résine. Ainsi, la séquence réactionnelle suivie est la suivante (Schéma 85).

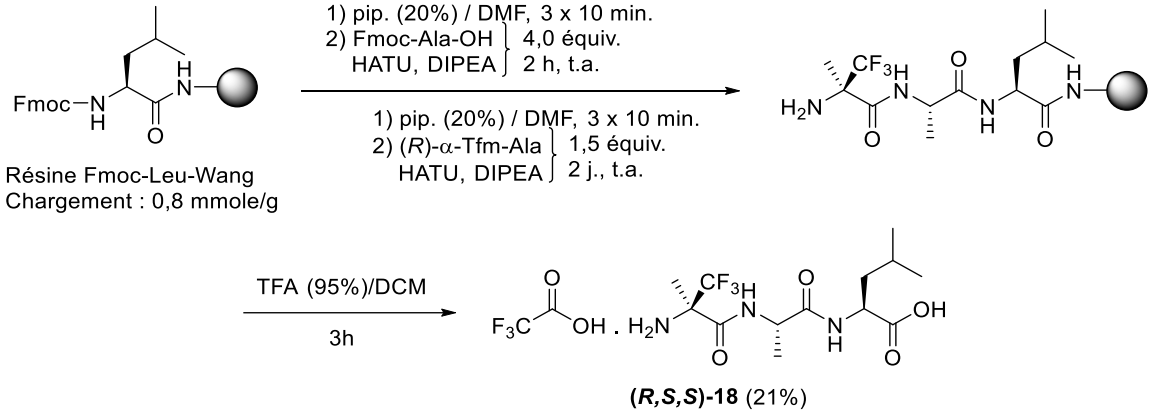


Schéma 85

La première étape consiste à régénérer la fonction amine libre par une solution de pipéridine à 20% dans le DMF, en trois fois 10 minutes, filtrations et ajout à chaque reprise d'une solution neuve de pipéridine. Le couplage d'un grand excès de Fmoc-Alanine s'effectue alors par activation préalable de l'aminoacide sous forme d'ester activé à l'aide de HATU et de DIPEA. Après déprotection de la position N-terminale, le couplage de la (*R*)-α-Tfm-Alanine peut alors s'opérer de la même manière pour un temps de couplage de deux jours. La fonction amine de la (*R*)-α-Tfm-Alanine n'étant pas protégée, le clivage de la résine est immédiatement réalisé pour donner, après purification semi-préparative, le peptide désiré **(*R,S,S*)-18** avec un rendement de 21%.

Les premiers couplages en solution de l'α-Tfm-Alanine ont révélé qu'une activation classique sous forme d'ester activé suffisait pour réaliser avec succès et de bons rendements le couplage de la fonction acide terminale de l'α-Tfm-Alanine (Schéma 52). Par ailleurs, ces premiers essais ont montré qu'il n'était pas nécessaire de protéger l'amine de cet aminoacide fluoré pour réaliser le couplage. En effet, celle-ci est tellement désactivée par le caractère électroattracteur du fluor en position α, qu'il n'y a pas de risque de double couplage de l'α-Tfm-Alanine sur elle-même. Ne possédant pas de protection de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine par un groupement Fmoc, stratégie utilisée en SPPS, nous avons donc tenté son couplage sous forme libre à la séquence peptidique en croissance. Seuls deux équivalents de (*R*)-α-Tfm-Alanine sont engagés à cette étape

mais le temps de réaction est allongé à 16 heures. Après microclivage à l'aide d'une solution acide de TFA/TIS et eau, et analyse du brut réactionnel, la présence du tripeptide désiré **(*R,S,S*)-18** est vérifiée ainsi que l'absence de dérivé résultant d'un double couplage de l'α-Tfm-Alanine. Le clivage final de la résine a alors été réalisé dans les mêmes conditions pendant 3 heures. Après purification par HPLC semi-préparative sur colonne Jupiter® avec un mélange eau/acétonitrile en gradient de 10% à 30 % en présence de 0,1 % de TFA, le tripeptide **(*R,S,S*)-18** est obtenu avec un rendement de 68%.

Ainsi, l'incorporation de l'α-Tfm-Alanine non protégée, en position *N*-terminale d'un peptide synthétisé par SPPS est possible sans modifier les conditions habituelles de couplage. Ces résultats sont en accord avec les observations préalablement faites lors des couplages effectués en solution.

2.5.2.2. Couplage de la position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine en SPPS

Dans le cadre de la synthèse du tripeptide H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OH, le couplage de la fonction amine de la (*R*)-α-Tfm-Alanine par SPPS a alors été envisagé. Le début de la synthèse s'effectue de la même manière que celle du tripeptide **(*R,S,S*)-18** par incorporation de 2 équivalents de (*R*)-α-Tfm-Alanine à l'aide de HATU et de DIPEA. L'utilisation de l'α-Tfm-Alanine non protégée s'est alors révélée intéressante car cela évite une étape de déprotection supplémentaire (Schéma 86).

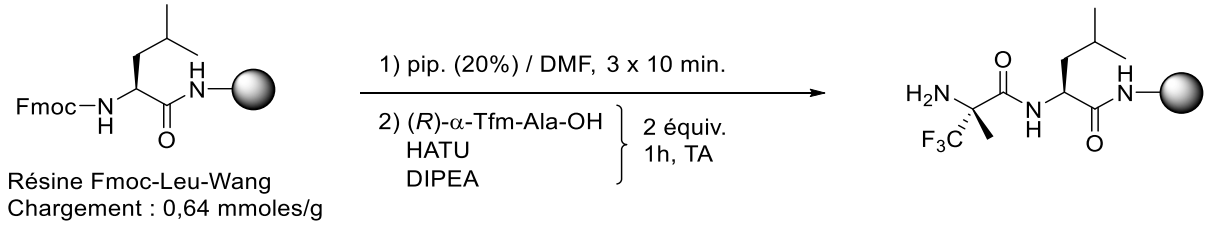


Schéma 86

L'addition du dernier résidu de Fmoc-Alanine a alors été tentée dans les mêmes conditions. Cependant, même après 16 heures de temps de couplage, les microclivages réalisés à intervalles réguliers ne montrent pas la présence du tripeptide H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OH désiré dans le brut réactionnel (Schéma 87).

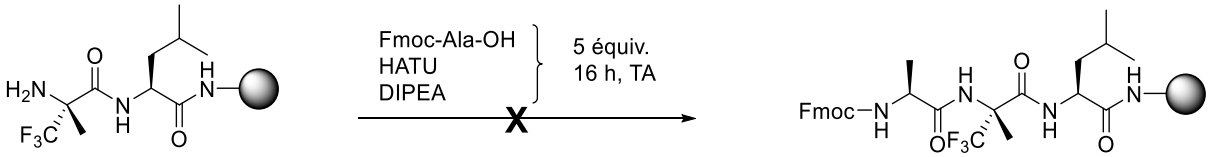


Schéma 87

Effectivement, les premiers essais de couplage de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine en solution ont montré que la réactivité de cette fonction est particulièrement diminuée par la présence du groupement trifluorométhyle en position α. Son couplage à un aminoacide activé sous forme d'ester ne peut avoir lieu même en ayant recours au HATU, l'un des benzotriazioles les plus réactifs. Nous avions alors montré que l'utilisation des chlorures d'acyle permettait de coupler cette position avec succès. Nous avons alors envisagé l'utilisation du chlorure de *N*-Fmoc-Alanine synthétisé dans les conditions de Babu,[120] en présence de DIPEA (Schéma 88).

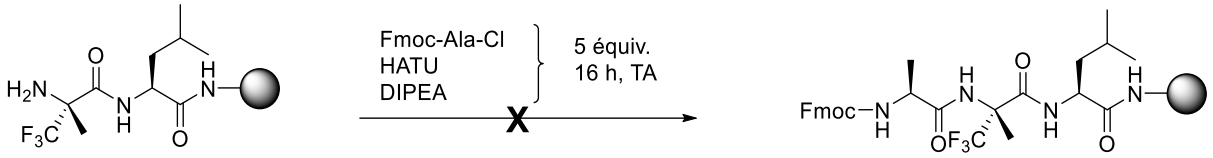


Schéma 88

Or, même l'utilisation de 10 équivalents de chlorure de *N*- Fmoc-Alanine, ne permet pas le couplage en position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine.

2.5.3. Stratégie d'incorporation de l'α-Tfm-Alanine sous forme de dipeptides Fmoc/*t*Bu

L'impossibilité de pouvoir greffer un aminoacide en position *N*-terminale de l'α-Tfm-Alanine par SPPS, nous a alors obligés à changer la stratégie d'incorporation par ajout successif d'aminoacides. Or, le couplage de l'amine de l'α-Tfm-Alanine à la fonction acide d'un aminoacide *N*-protégé par un groupement Cbz a été réalisé avec succès, en solution, par activation de son acide sous forme d'anhydrides mixtes. Nous avons alors envisagé une nouvelle stratégie d'incorporation de l'α-Tfm-Alanine en SPPS, consistant à synthétiser préalablement, en solution, un dipeptide de type Fmoc-AA- α-Tfm-Ala-O*t*Bu (Schéma 89). Ce bloc dipeptidique serait alors prêt à être intégré dans une séquence peptidique en cours de croissance en SPPS, après déprotection de sa fonction acide.

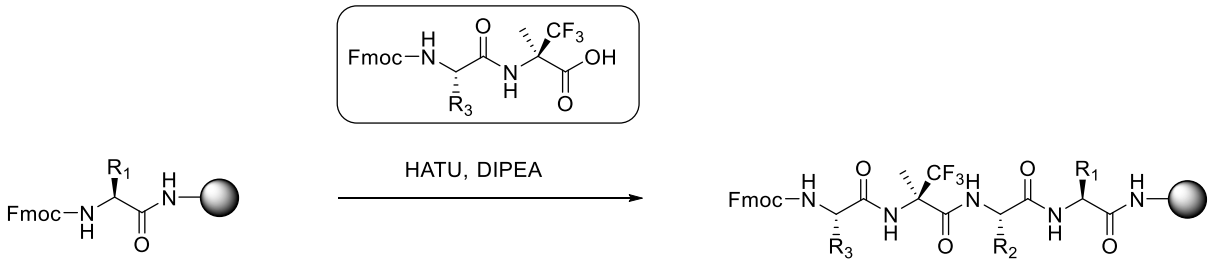


Schéma 89

2.5.3.1. Synthèse de blocs dipeptidiques pour l'incorporation de l'α-Tfm-Alanine en SPPS

La synthèse de ces blocs dipeptidiques a été réalisée dans les conditions de couplage de l'amine de l'α-Tfm-Alanine optimisées précédemment, par activation de la fonction acide d'un aminoacide *N*-protégé par un groupement Fmoc sous forme d'anhydride mixte. Ce type de couplage a été décrit par Adams *et al.*[131] prouvant que l'utilisation de *N*-méthylmorpholine est compatible avec ce groupement protecteur labile en conditions basiques.

L'ester de l'α-Tfm-Alanine choisi pour son orthogonalité avec le groupement Fmoc est l'ester *tert*-butylique de l'α-Tfm-Alanine. Ainsi, après 10 minutes d'activation à -10 °C, de la fonction acide des aminoacides protégés par un groupement Fmoc, par du chloroformate d'isobutyle (IBCF) en présence de *N*-méthylmorpholine (NMM), l'ester *tert*-butylique de l'α-Tfm-Alanine ainsi qu'un équivalent supplémentaire de NMM sont ajoutés en solution dans du THF (Schéma 90).

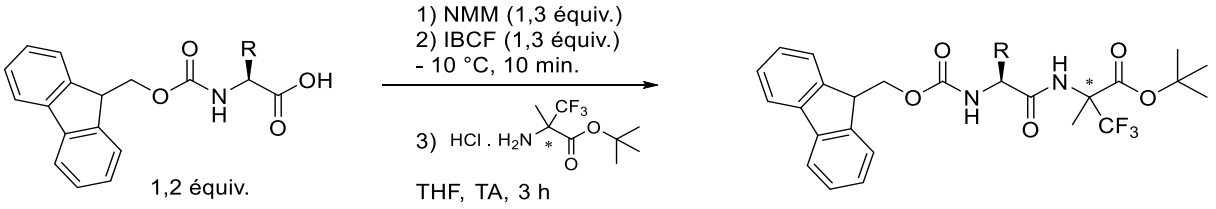


Schéma 90

Différents blocks dipeptidiques **(*S*,*R*)-19**, **(*S*,*S*)-19**, **(*S*,*R*)-20**, **(*S*,*R*)-21**, **(*S*,*R*)-22**, **(*S*,*S*)-22** et **(*S*,*R*)-23** incorporant l'α-Tfm-Alanine de configuration (*R*) ou (*S*) ont ainsi été synthétisés avec de bons rendements (Tableau 9).

[131] Adams, D. J., Butler, M. F., Frith, W. J., Kirkland, M., Mullen, L., Sanderson, P., *Soft Matter*, **2009**, *5*, 1856-1862.

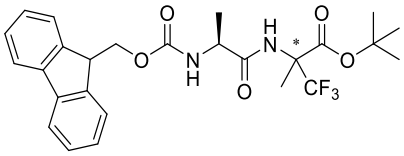
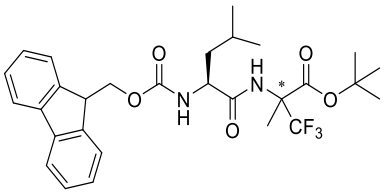
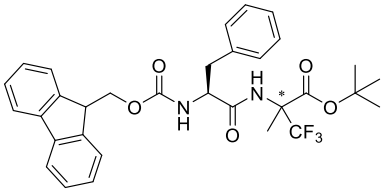
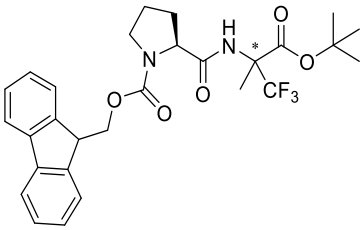
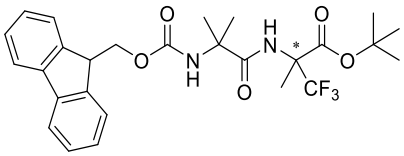
Bloc dipeptidique	Configuration de l'α-Tfm-Alanine *R*	Configuration de l'α-Tfm-Alanine *S*
	**(*S*,*R*)-19** Rdt : 67%	**(*S*,*S*)-19** Rdt : 69%
	**(*S*,*R*)-20** Rdt : 81%	
	**(*S*,*R*)-21** Rdt : 76%	
	**(*S*,*R*)-22** Rdt : 62%	**(*S*,*S*)-22** Rdt : 64%
	**(*S*,*R*)-23** Rdt : 43%	

Tableau 9 : Blocs dipeptidiques synthétisés prêts à être intégrés par SPPS

Ces dipeptides *N*-protégés par un groupement Fmoc et *C*-protégés par un ester *tert*-butylique peuvent être obtenus à l'échelle du gramme et avec d'excellents rendements. Ils représentent ainsi un outil très intéressant pour l'incorporation de l'α-Tfm-Alanine dans une séquence peptidique par SPPS. Effectivement, après incorporation du dipeptide dans une chaîne peptidique en croissance par SPPS, la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine étant déjà couplée à l'aminoacide suivant, la synthèse pourra continuer sans problème. Un exemple d'incorporation de ce type de didpeptide a été réalisé pour la synthèse du tétrapeptide **(*S*,*S*,*R*,*S*)-24** inclus dans une étude de résistance protéolytique décrite au chapitre IV.

2.5.3.2. Exemple d'incorporation de blocs dipeptidique incorporant une α-Tfm-Alanine par SPPS

Dans le cadre d'une étude de résistance protéolytique à la pepsine décrite au chapitre IV, nous avions besoin de synthétiser le tétrapeptide Ac-Ala-Phe-(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-NH_2 **(*S,S,R,S*)-25**, incluant une (*R*)-α-Tfm-Alanine en milieu de séquence. Pour réaliser cette synthèse, nous avons alors envisagé l'approche par intégration du bloc dipeptidique Fmoc-Phe-(*R*)-α-Tfm-Ala-OtBu **(*S,R*)-22**. La première étape consiste à déprotéger la fonction acide carboxylique par une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) dans du dichlorométhane (Schéma 91).

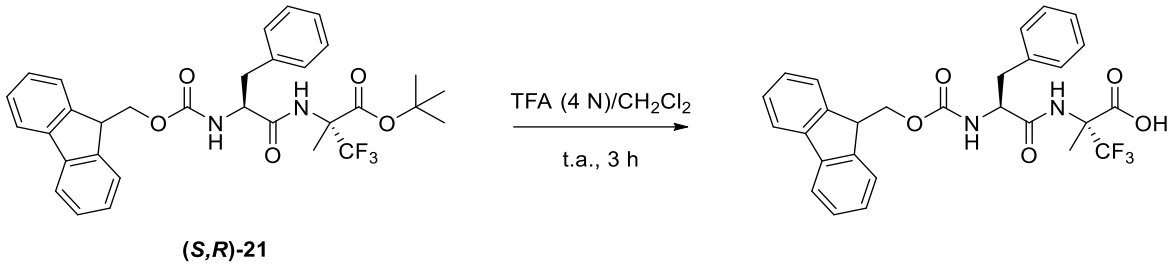


Schéma 91

Le dipeptide déprotégé est alors immédiatement engagé sans purification préalable dans une réaction de couplage au sein de la chaîne peptidique en cours de croissance sur une résine de type Rink-amide (Schéma 92). Seuls deux équivalents de dipeptide sont engagés à cette étape.

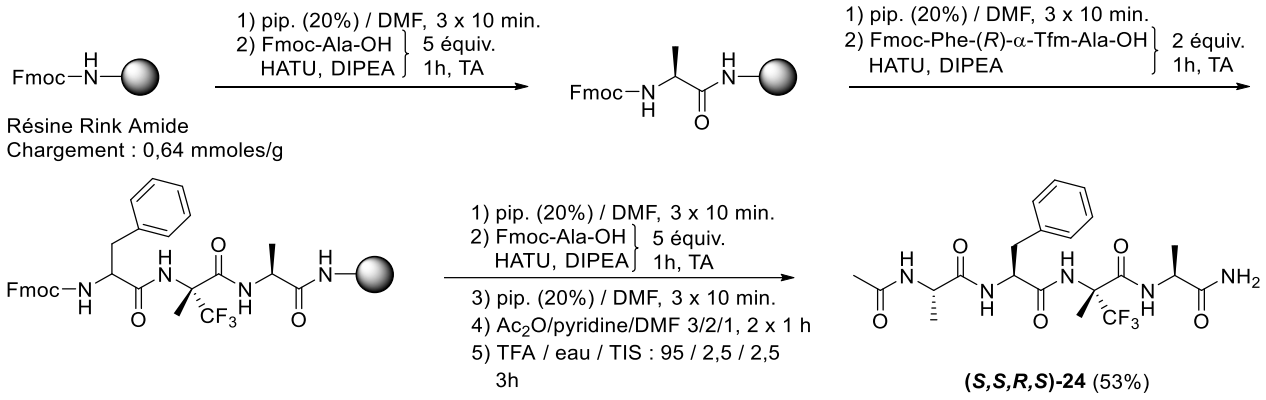


Schéma 92

Après addition d'un dernier résidu Alanine, acétylation et clivage de la résine, le tétrapeptide **(*S,S,R,S*)-24** est purifié par HPLC semi préparative et est obtenu avec un rendement de 53%.

2.5.4. Conclusion

L'intégration de l'α-Tfm-Alanine par synthèse supportée permet à présent l'accès à des peptides plus longs et de manière plus rapide que ne le permet la synthèse en solution. Incorporée en position *N*-terminale de peptides, l'α-Tfm-Alanine peut être incorporée sans protection préalable du fait de la faible réactivité de sa fonction amine qui empêche tout risque d'homocouplage. Ceci évite de plus une étape de déprotection supplémentaire.

Pour son incorporation en milieu de chaîne peptidique, la méthode classique de synthèse peptidique supportée par incorporation successive des différents aminoacides n'est pas applicable car le couplage d'un nouvel aminoacide sur la fonction amine fortement désactivée de l'α-Tfm-Alanine ne fonctionne pas dans les conditions classiques de SPPS. Le recours à la synthèse préalable, en solution, d'un dipeptide qui réalise le couplage de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine permet de résoudre le problème. Immédiatement utilisables, ces blocs dipeptidiques respectent la stratégie classique de protection Fmoc/*t*Bu utilisée en SPPS et peuvent être obtenus à grande échelle avec de bons rendements. Ils représentent donc un outil de synthèse peptidique particulièrement intéressant.

III) Conclusion du chapitre

Cette première partie de mes travaux de thèse avait pour objectifs de mettre au point une méthode de couplage efficace et reproductible à grande échelle de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine afin de permettre son incorporation au sein de chaînes peptidiques, en solution ou en synthèse supportée. La première phase de mise au point des conditions de couplage de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine a permis de révéler sa réactivité grandement diminuée, nécessitant le recours à des méthodes d'activation puissantes comme les chlorures d'acyles ou les anhydrides mixtes. La protection de sa fonction acide carboxylique s'est montrée alors nécessaire pour la synthèse de peptides à grande échelle. Quatre protections différentes des fonctions acide et amine ont ainsi été obtenues avec succès.

En solution, le couplage de la fonction amine des esters de l'α-Tfm-Alanine s'effectue, après optimisation des conditions de couplage, par activation de la fonction acide carboxylique d'un aminoacide convenablement *N*-protégé, sous forme d'anhydride mixte. Cela permet ainsi l'obtention des dipeptides avec de très rendements (Schéma 93).

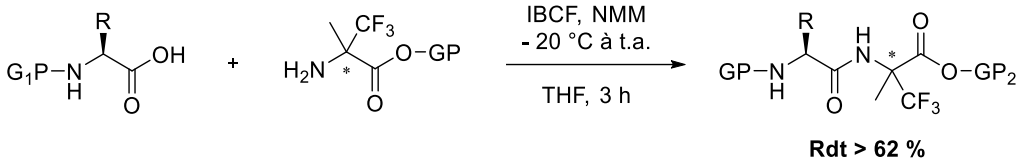


Schéma 93

Afin de pouvoir accéder à des peptides plus longs, la synthèse en solution se voit rapidement limitée et il convient d'avoir recours à la SPPS. Or, l'incorporation de l'α-Tfm-Alanine, dans les conditions classiques de synthèse supportée, par incorporation itérative des différents aminoacides ne fonctionne pas due à la forte désactivation de l'azote. Si le couplage de la fonction acide de l'α-Tfm-Alanine reste possible, la synthèse est ensuite bloquée. Nous avons alors mis au point une stratégie d'incorporation de l'α-Tfm-Alanine en SPPS, par synthèse préalable, en solution, de synthons dipeptidiques prêts à être directement intégrés dans une synthèse supportée automatisée (Schéma 94).

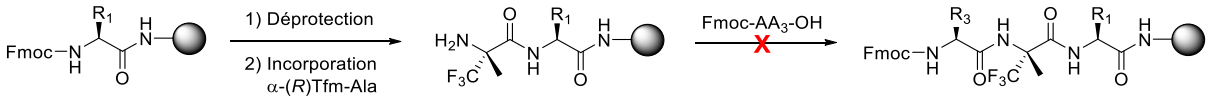


Schéma 94

Ces didpeptides, correctement *N*-protégés par un groupement Fmoc et *C*-protégés sous forme d'ester *tert*-butylique pour respecter la stratégie Fmoc/*t*Bu sont synthétiser en solution par activation da l'aminoacide non fluoré sous forme d'anhydride mixte. Cette méthode de couplage permet l'obtention, à l'échelle du gramme de dipeptides fluorés, avec d'excellents rendements et de manière reproductible. Une simple étape de déprotection de leur fonction acide permettra alors leur incorporation directe dans une séquence peptidique en cours de croissance sur une résine par SPPS.

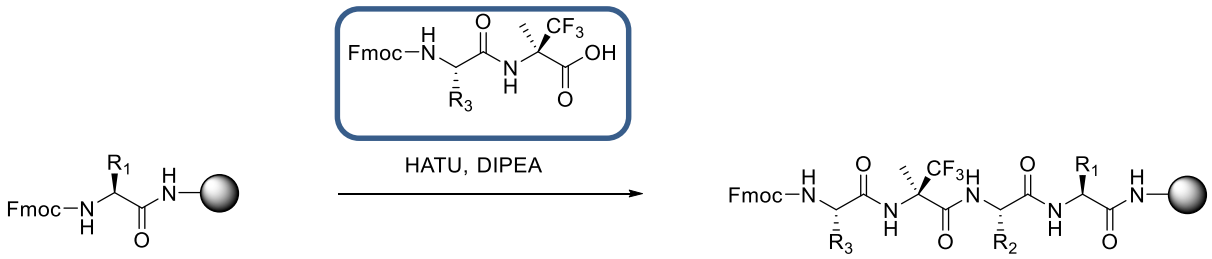


Schéma 95

Dans la cadre d'une autre thèse en cours au laboratoire, cette stratégie a permis l'incorporation de l'α-Tfm-Alanine dans des peptides antimicrobiens, l'harzianine et l'alaméthicine.

CHAPITRE III

ETUDE DE L'HYDROPHOBIE DE PETITS PEPTIDES FLUORES

L'un des phénomènes à l'origine du repliement des protéines et des interactions protéines-protéines est le caractère hydrophobe de certaines de leurs régions. Lors du repliement d'une protéine, quatre grands types d'interactions rentrent en jeu : les interactions hydrophobes, électrostatiques, les liaisons hydrogène et les interactions de Van der Walls. Kauzmann a été le premier à affirmer que les interactions hydrophobes étaient prédominantes dans le phénomène de repliement,[2] suivi par Tanford en 1962[3] et réaffirmé par Dill[4] en 1990 et Honig *et al*.[5] en 1995. Pouvoir appréhender le concept d'hydrophobie de peptides en mesurant localement l'hydrophobie de fragments peptidiques permettrait de comprendre les interactions d'un peptide pour sa cible biologique. La mesure de l'hydrophobie de segments peptidiques pourrait également permettre de rationaliser leur interaction avec des sites actifs de protéines.

Ces dernières décennies, l'étude de l'hydrophobie de biomolécules, et en particulier des aminoacides, a abouti au développement d'une grande variété d'échelles d'hydrophobie.[132] Ces échelles utilisent pour la plupart les propriétés physiques des aminoacides, peptides ou molécules organiques ou dérivent de méthodes de calcul. En général, l'hydrophobie est définie comme le partage d'un composé apolaire entre une phase huileuse et l'eau. Durant ce processus, une diminution de l'entropie concomitante avec une augmentation de la capacité thermique sont observées. Ces deux caractéristiques thermodynamiques, sont à l'origine de ce que l'on nomme l'«effet hydrophobe ».

Généralement, deux types de solutés sont étudiés pour apprécier l'hydrophobie d'un aminoacide : d'une part les aminoacides eux-mêmes[133] ou leurs analogues modifiés sur les chaînes latérales, d'autre part, les peptides et protéines. La majorité des échelles utilisent plutôt la deuxième catégorie.[134]

Concernant les méthodes utilisées, elles se répartissent en général entre cinq grandes catégories : la partition entre deux solvants non miscibles, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et les techniques chromatographiques en général, le calcul des aires de surface accessible, la mutagénèse dirigée et les mesures des propriétés physiques des peptides et protéines. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement aux méthodes expérimentales de mesures du partage d'un aminoacide ou d'un peptide entre une phase polaire et une phase apolaire, solides ou liquides. L'état de l'art de ce domaine sera présenté en première partie de ce chapitre.

[132] Nozaki, Y.; Tanford, C. *J. Biol. Chem*. **1971**, *246*, 2211-2217.
[133] Silva, M. F.; Chipre, L. F.; Raba, J.; Luco, J. M. *Chromatographia* **2001**, *53*, 392-400.
[134] Biswas, K. M.; DeVido, D. R.; Dorsey, J. G. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 637-655.

Au cours de cette thèse, l'objectif était de mettre au point une méthode analytique permettant de mesurer et comparer au sein d'un court peptide, l'apport du groupement trifluorométhyle de l'α-Tfm-Alanine sur l'augmentation de l'hydrophobie de ces peptides par rapport aux analogues non fluorés, comportant un acide α-aminoisobutyrique (Aib) ou une alanine. Pour cela, un indice d'hydrophobie φ_0 a été déduit des temps de rétention de divers peptides obtenus par élution sur une colonne de silice de type C_{18} par une méthode de chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC). Le détail des synthèses des peptides de cette étude et la mise en œuvre de la méthode de mesure seront décrits dans la deuxième partie de ce chapitre.

I) Etat de l'art sur les méthodes de mesure de l'hydrophobie des aminoacides et des peptides

1) Partage entre deux phases liquides

Le partage entre deux phases liquides non miscibles est la méthode la plus communément employée pour mesurer l'hydrophobie d'une molécule. Généralement, il s'agit d'étudier la partition d'un composé entre l'eau et un solvant organique non miscible (très souvent l'octanol) et de mesurer les concentrations du produit dans les deux phases après agitation du mélange. Cette mesure mène alors à la détermination d'un indice, le log*P* (coefficient de partage) ou le log*D* (coefficient de distribution) dont les valeurs reflètent l'hydrophobie du composé. Ces dernières sont le rapport des concentrations des solutés étudiés en phase organique sur leur concentration en phase aqueuse (Équation 1).

$$logP_{oct/eau} = \log\left(\frac{(soluté)_{octanol}}{(soluté)_{eau}^{non\ ionisé}}\right)$$

$$logD_{oct/eau} = \log\left(\frac{(soluté)_{octanol}}{(soluté)_{eau}^{non\ ionisé} + (soluté)_{eau}^{neutre}}\right)$$

Équation 1 : Calculs des log*P* et log*D*

Le log*P* n'est valable que pour un composé non ionisé et représente le logarithme du rapport de la concentration du soluté étudié dans l'octanol sur sa concentration dans l'eau après partage. Le log*D* est l'équivalent du log*P*, pour un composé ionisable. Ainsi, il est généralement donné pour un pH donné, où le soluté étudié est présent en phase aqueuse sous ses deux formes

ionisée et non ionisée, dont les proportions dépendent du pKa des fonctions concernées. Il représente donc le logarithme du rapport de la concentration du soluté non ionisé dans l'octanol sur la somme des concentrations dans l'eau du composé sous sa forme neutre et sous sa forme non ionisée.

La valeur du log*P* d'un composé est un critère important en chimie médicinale pour apprécier s'il possède la capacité à devenir un bon médicament. En effet, il permet notamment de prédire si le composé pourra interagir facilement avec les membranes et les traverser ou combien de temps il restera dans l'organisme sous forme active. Ainsi, si le log*P* est positif et très élevé, la molécule considérée est plus soluble dans l'octanol que dans l'eau ce qui reflète son caractère hydrophobe. Typiquement, pour un médicament, le log*P* représente sa capacité à être absorbé par le corps humain :

Absorption orale : 1,8
Pénétration dans le cerveau : 2,0
Absorption percutanée : 2,6
Absorption sub-linguale : 5,5

Une grande majorité des échelles qui découlent de ce principe de partage liquide-liquide implique l'utilisation de divers solvants organiques choisis pour mimer l'intérieur d'une protéine et l'eau. Néanmoins, le problème souvent rencontré est que la plupart de ces solvants sont partiellement solubles dans l'eau ce qui ne permet pas d'obtenir des valeurs représentant réellement l'hydrophobie.

La première échelle majeure d'hydrophobie répertoriée et qui est la plus citée est sans aucun doute celle mise en place par Nozaki et Tanford en 1971.[132] Leur théorie repose sur l'observation de la capacité de certains solvants organiques à dénaturer une protéine. En effet, si, en présence d'un solvant organique, les parties d'une protéine présente dans l'eau et jusqu'alors repliées à l' « intérieur » s'exposent au solvant et interagissent plus facilement avec lui, celui-ci dénaturera la protéine. Pour expliquer ce phénomène, les auteurs mesurent la solubilité de divers aminoacides dans deux solvants organiques : l'éthanol et le dioxane à des pourcentages de 0 % à 100 % en proportion par rapport à l'eau. De ces mesures ont été calculées les énergies libres de transfert Δ*ft* de l'eau vers le solvant de quelques aminoacides d'après l'équation suivante (Équation 2).

$$\Delta ft = \mu_i^0 - \mu_{i,eau}^0 = RTln\left(\frac{N_{i,eau}}{N_i}\right) + RTln(\frac{\gamma_{i,eau}}{\gamma_i})$$

Équation 2 : Calcul des énergies de transfert des aminoacides de l'eau vers un solvant organique

où $\mu_{i,eau}^{0}$ et μ_{i}^{0} sont les potentiels chimiques standards dans l'eau et dans le solvant de transfert du soluté i étudié.

$N_{i,eau}$ et N_i sont les solubilités du produit i dans l'eau et le solvant de transfert

et $\gamma_{i,eau}$ et γ_i sont les coefficients d'activité à saturation du produit i dans l'eau ou le solvant de transfert

Cette grandeur représente donc la variation du potentiel chimique des aminoacides étudiés en passant d'un solvant organique (éthanol ou dioxane) à l'eau. Le Tableau 10 résume les mesures effectuées par les auteurs ainsi que d'autres extraites de la littérature en classant les aminoacides étudiés en fonction des énergies de transfert calculées.

Chaînes latérales des aminoacides	**Δ*f*t (cal/mole)**
Tryptophane	3400
Norleucine	2600
Phénylalanine	2500
Tyrosine	2300
Dihydroxyphénylalanine	1800
Leucine	1800
Valine	1500
Méthionine	1300
Histidine	500
Alanine	500
Thréonine	400
Sérine	-300

Tableau 10 : Echelle de Tanford

Les auteurs montrent ainsi que les aminoacides aromatiques sont les plus hydrophobes (tryptophane, phénylalanine, tyrosine). Ils expliquent cela par la taille globale du groupement aromatique de la chaîne latérale, plus grande que pour les autres aminoacides. L'effet d'un groupement polaire sur la diminution de l'hydrophobie des acides aminés peut aussi être constaté. En effet, la présence du groupe hydroxyle aliphatique de la sérine en comparaison avec la chaîne non polarisée de l'alanine, entraine une diminution de l'énergie de transfert de 800 calories par mole. Cette différence est moins marquée cependant entre résidus de tyrosine et de phénylalanine où la présence du groupe hydroxyle sur le noyau aromatique de la tyrosine engendre une diminution de l'énergie de transfert plus faible (200 cal/mole).

Afin de mimer au mieux l'intérieur du cœur des protéines, Lawson *et al*. utilisent quant à eux comme solvant de partition la *N*-cyclohexyl-2-pyrrolidone (CHP) (Figure 40).[135] Selon les auteurs, la présence d'une partie globalement apolaire et d'une liaison amide fait du CHP une bonne approximation du potentiel électrostatique général trouvé à l'intérieur des matrices de protéines. De plus, plusieurs de ses propriétés physiques comme sa constante diélectrique, sa viscosité, sa tension de surface ou sa chaleur de vaporisation ainsi que son volume spécifique partiel représentent mieux le cœur d'une protéine que celles de solvants organiques comme l'éthanol utilisé par Tanford.[132]

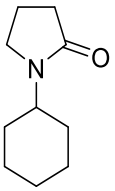


Figure 40 : formule du *N*-cyclohexyl-2-pyrrolidone (CHP)

Ainsi, en s'inspirant de la méthode décrite par Nozaki et Tanford,[132] l'équipe de Lawson calcule les énergies de transfert des 21 acides aminés naturels. Le Tableau 11 résume leur mesure en classant les acides aminés selon les valeurs d'énergie de transfert calculées et comparant ces dernières à celles trouvées par Jones dans un système éthanol/eau.[136]

Chaînes latérales des aminoacides	**Δ*Gt* (CHP-> H_2O) kcal/mole**	**Δ*Gt* (EtOH-> H_2O) kcal/mole**
Alanine	-0,48 ± 0,06	0,87
Arginine	-0,06 ± 0,08	0,85
Acide aspartique	-0,75 ± 0,09	0,66
Asparagine	-0,87 ± 0,06	0,09
Cystéine	-0,32 ± 0,07	1,52
Acide glutamique	-0,71 ± 0,07	0,67
Glutamine	-0,32 ± 0,06	0,00
Glycine	0,00	0,10
Histidine	-0,51 ± 0,06	0,87
Hydroxyproline	0,24 ± 0,07	NC
Leucine	1,02 ± 0,09	2,17
Isoleucine	0,81 ± 0,07	3,15
Lysine	- 0,09 ± 0,06	1,64
Méthionine	0,81 ± 0,06	1,67
Phénylalanine	1,03 ± 0,06	2,87
Proline	2,03 ± 0,06	2,77
Sérine	0,05 ± 0,04	0,07
Thréonine	-0,35 ± 0,07	0,07
Tryptophane	0,66 ± 0,06	3,77

[135] Lawson, E. Q.; Sadler, A. J.; Harmatz, D.; Brandau, D. T.; Micanovic, R.; MacElroy, R. D.; Middaugh, C. R. *J. Biol. Chem*. **1984**, *259*, 2910-2912.
[136] Jones, D. D. *J. Theor. Biol*. **1975**, *50*, 167-183.

Tyrosine	1,24 ± 0,08	2,67
Valine	0,56 ± 0,08	1,87

NC : non communiqué

Tableau 11 : Energies de transfert du CHP vers l'eau des 21 aminoacides naturels calculées par Lawson

Ainsi, il n'est pas évident de trouver un système liquide-liquide reflétant parfaitement les milieux biologiques. La solubilité partielle des solvants organiques dans l'eau et leurs propriétés physiques ne permettent pas de dégager des valeurs reflétant purement l'hydrophobie d'un peptide. De plus, ces méthodes nécessitent souvent des quantités de solutés importantes pour avoir une marge d'erreurs minimale. La majorité de ces échelles a donc été obtenue à partir de mesures effectuées sur les aminoacides eux-mêmes car disponibles en quantité suffisante. Or, ces valeurs obtenues pour les aminoacides seuls et non protégés, ne représentent pas leur contribution au sein d'une chaîne peptidique, car, leurs fonctions terminales n'étant pas protégées, leur influence sur le partage n'est pas négligeable. C'est pourquoi, de nouvelles études ont vu le jour avec des aminoacides protégés ou *N*-acétylés. Ainsi, quelques années plus tard, Fauchere et Pliska[137] mesurent l'hydrophobie d'aminoacides *N*-acétylés afin de s'affranchir de l'effet des charges terminales. Ils sont parmi les premiers à fournir une échelle quasiment complète des aminoacides ainsi que quelques-uns de leurs dérivés, et à employer l'octanol comme solvant organique de partage.

Or, ces différentes échelles ne concernent que les aminoacides seuls. Au sein d'un peptide, néanmoins, de nouvelles contraintes peuvent apparaître et modifier l'hydrophobie générale du peptide comme les contraintes stériques entre chaînes latérales des aminoacides de la séquence ou le repliement du peptide. Cependant, les méthodes de partage liquide-liquide, coûteuses en quantités de produit nécessaires et en temps d'expérience, sont peu adaptées à l'étude de l'hydrophobie de peptides. Une excellente alternative à ces premières méthodes de partage est l'utilisation de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse. Nécessitant de faibles quantités de produits, elle permet de réaliser des mesures précises et automatisables d'indices dérivés des temps de rétention des peptides sur les phases stationnaires apolaires utilisées. Elle représente donc un outil particulièrement apprécié pour la mesure d'indices d'hydrophobie.

[137] Fauchere, J. L.; Pliska, V. *Eur. J. Med. Chem*. **1983**, *18*, 369-375.

2) Partage entre une phase stationnaire et une phase liquide : utilisation de la chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC)

L'intérêt que représente la HPLC et plus particulièrement la RP-HPLC pour Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography, comme méthode d'étude de l'hydrophobie de petits peptides réside dans la nature apolaire de la phase stationnaire utilisée. Le principe de cette méthode repose sur la mesure des temps de rétention, plus ou moins importants, des molécules étudiées, en l'occurrence des peptides, sur cette phase stationnaire.. Hodges *et al*.[138] expliquent que ces phases représentent mieux les systèmes biologiques que les solvants organiques et sont de bons mimes de membranes biologiques. Ainsi, les interactions des chaînes latérales avec ces phases peuvent bien refléter les interactions présentes entre chaînes latérales apolaires d'aminoacides au sein de peptides. Le plus souvent, ces techniques chromatographiques sont appliquées à l'étude de l'hydrophobie de petits peptides de moins de 15 résidus afin d'éviter la formation de structures secondaires comme les hélices α ou les feuillets β qui peuvent avoir un impact important et délétère sur la rétention.[134] Individuellement, les aminoacides libres sont rarement utilisés et des dérivatisations sont souvent nécessaires pour pouvoir les employer dans ce type d'étude par RPLC à cause de leur manque d'affinité pour les phases apolaires inverses dû à la présence de charges terminales.[134]

2.1. Prémices de l'utilisation de la HPLC pour la mesure de l'hydrophobie de peptides naturels

Meek est le premier à avoir montré l'intérêt de la RPLC pour la mesure de l'hydrophobie de peptides.[139] Ce dernier se base sur la capacité des phases stationnaires apolaires C_{18} à séparer des peptides contenus dans des mélanges et permettre leur purification. Pour son étude, il utilise un gradient eau/acétonitrile tamponné à deux pH (pH 2,1 et pH 7,4) et dont les proportions s'étendent de 0% à 100% d'acétonitrile, pour éluer un mélange de 26 peptides naturels de tailles et compositions en aminoacides différentes. La Figure 41 représente le chromatogramme obtenu à pH 2,1.

[138] Hodges, R. S.; Zhu, B.-Y.; Zhou, N. E.; Mant, C. T. *J. Chromatogr. A* **1994**, 676, 3-15.
[139] Meek, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **1980**, *77*, 1632-1636.

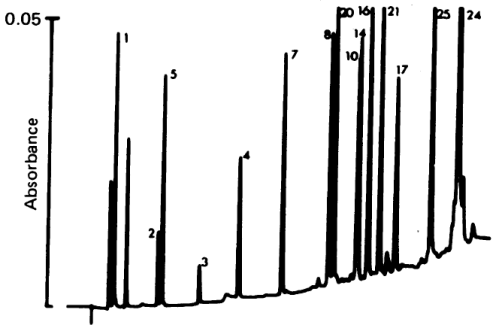


Figure 41 : Chromatogramme de l'élution du mélange de 26 peptides à pH 2,1[139]

Il remarque alors que les peptides de courte taille et neutres sont les moins retenus par la colonne et sont élués en premier (triglycine, pentaalanine). Les petits peptides incorporant des aminoacides à chaînes latérales hydrophobes (triphénylalanine) ainsi que les peptides de taille supérieurs nécessitent une proportion en acétonitrile dans la phase mobile plus importante pour être élués. Des temps de rétention obtenus pour ces peptides, il déduit alors par régressions informatiques répétitives, la contribution de chaque aminoacide sur la rétention des peptides étudiés. Le Graphe 2 suivant corrèle ainsi les temps de rétention mesurés aux sommes respectives des temps de rétention de chaque aminoacide des chaînes peptidiques, obtenus par calcul. Il remarque ainsi que ceux-ci corrèlent parfaitement.

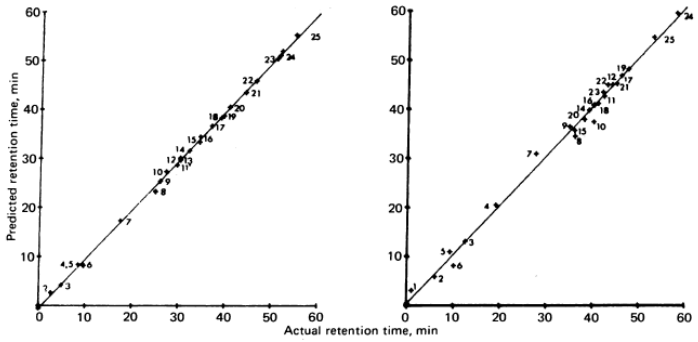
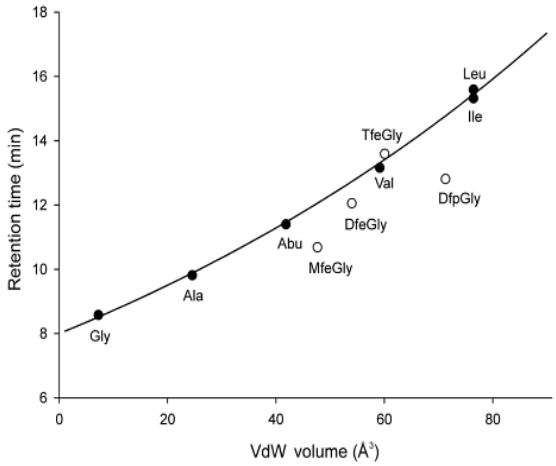


FIG. 3. Correlation of actual retention times vs. times predicted by summing retention coefficients for the amino acids and end groups. Numbers adjacent to the data points indicate the peptides listed in Table 1. (*Left*) pH 7.4; correlation = 0.9996. (*Right*) pH 2.1; correlation = 0.9970.

Graphe 2[139]

Cette première étude a montré qu'il est possible de déduire la contribution d'aminoacides sur l'hydrophobie de peptides par HPLC. Cependant, la composition en aminoacides ne permet pas à elle seule de prédire la rétention, donc l'hydrophobie, des peptides. En effet, la taille et plus particulièrement la capacité des peptides à se replier est susceptible de masquer les chaînes latérales des aminoacides et donc de modifier leur rétention. De même, la présence de charges terminales ou sur les chaînes latérales fonctionnalisées, ionisables à différents pH selon leur pKa perturbe leur élution en fonction du pH de la phase mobile utilisée.

Dans le cas de composés fluorés, l'équipe de Koksch a également utilisé la HPLC en phase inverse pour l'étude de l'hydrophobie d'aminoacides *N*-protégés par un groupement Fmoc.[140] Pour cela, elle compare les temps de rétention, ainsi que les volumes de Van der Walls calculés de divers aminoacides à ceux de dérivés *N*-Fmoc-Glycine, mono-, di- ou trifluorométhylés en position β (Graphe 3).



Graphe 3[140]

Ainsi, concernant les dérivés non fluorés, l'augmentation des temps de rétention varie bien en fonction du volume de leur chaîne latérale. Le Graphe 3 montre la parfaite corrélation entre les temps de rétention et les volumes de Van der Walls des aminoacides non fluorés. Cependant, concernant les aminoacides fluorés, la variation de leur temps de rétention ne corrèle pas parfaitement avec les volumes de leurs chaînes latérales. Même si l'apport d'atomes de fluor augmente la taille de la chaîne, cette caractéristique ne permet pas à elle seule d'expliquer l'hydrophobie des aminoacides fluorés. Pour comprendre les variations observées, l'équipe de Koksch évoque l'effet de polarisation importante engendrée par la présence d'atomes de fluor, ce qui rend la chaîne latérale plus polaire et donc, moins hydrophobe. Pour un même aminoacide, l'ajout progressif d'atomes de fluor sur sa chaîne latérale augmente l'hydrophobie jusqu'à ce que l'effet de polarisation vienne compenser cette augmentation.

Au sein d'une chaîne peptidique, la contribution d'un aminoacide sur l'hydrophobie générale du peptide ne pourra, à ce titre, pas être interprétée de manière unilatérale par simple augmentation ou diminution de la taille de sa chaîne latérale. Les repliements, les éventuelles interactions entre chaînes latérales sont à prendre en considération pour l'interprétation des résultats.C'est pourquoi, si l'on désire mesurer la contribution d'un aminoacide en général, il est nécessaire d'adapter les séquences peptidiques choisies et de mesurer ce que l'on appelle l' « hydrophobie intrinsèque » de la chaîne latérale de cet aminoacide.

[140] Samsonov, S. A.; Salwiczek, M.; Anders, G.; Koksch, B.; Pisabarro, M. T. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 16400–16408.

2.2. Détermination de l'hydrophobie intrinsèque des chaînes latérales des aminoacides au sein d'une chaîne peptidique

Notre étude ayant pour objectif d'étudier la contribution de l'α-Tfm-Alanine sur l'hydrophobie de petits peptides, seule sa chaîne latérale trifluorométhylée doit influencer la rétention du peptide. C'est ce que Kovacs nomme l'hydrophobie intrinsèque d'une chaîne latérale d'un aminoacide dans un peptide.[141] Plus précisément, il s'agit d'isoler la contribution à l'hydrophobie de la chaîne latérale étudiée. Pour cela, il convient de sélectionner des séquences d'intérêt, permettant de s'affranchir de toute contrainte d'ordre stérique, conformationnelle, ou d'ionisation des charges terminales ou des chaînes latérales. Ainsi, en 2006, Kovacs *et al.*[141] sont parmi les premiers à fournir une échelle comparant l'hydrophobie intrinsèque des aminoacides d'une chaîne peptidique. Ils mettent alors en place une étude robuste qui servira de base à notre étude de l'hydrophobie de petits peptides fluorés que nous détaillerons dans le chapitre suivant. Le principe général de cette étude est de comparer la rétention de petits peptides de séquences identiques, ne variant que par la nature de l'aminoacide étudié, celui-ci étant toujours placé dans la même position. Or, préalablement, pour mesurer l'hydrophobie intrinsèque d'un seul aminoacide au sein d'un peptide et donc, la contribution unique de sa chaîne latérale, à l'hydrophobie du peptide, plusieurs précautions doivent être prises concernant la séquence choisie mais aussi les conditions d'élution.[142] La séquence « fixe », ainsi que les conditions d'élution doivent être choisies précautionneusement pour isoler l'effet hydrophobe de la chaîne latérale étudiée.

2.2.1. Choix des séquences étudiées

Pour déterminer l'hydrophobie intrinsèque d'une chaîne latérale, il convient préalablement de s'assurer que la chaîne peptidique ne peut pas former de structures secondaires particulières comme des hélices α, des feuillets ou des coudes β pouvant masquer la chaîne latérale d'intérêt ou favoriser son interaction avec la phase stationnaire durant l'élution.

Ainsi, tout gêne stérique provenant des chaînes latérales des aminoacides voisins i - 1 et i + 1 doit être éliminée pour permettre une libre rotation autour des liaisons peptidiques adjacentes au résidu étudié (angles Ψ et ϕ de la Figure 42).[142] C'est pourquoi, les résidus adjacents au site de

[141] Kovacs, J. M.; Mant, C. T.; Hodges, R. S. *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2006**, *84*, 283-297.
[142] Mant, C. T.; Kovacs, J. M.; Kim, H.-M.; Pollock, D. D.; Hodges, R. S. *Biopolymers (Pept. Sci)* **2009**, *92*, 573-595.

substitution **X** seront de préférence des glycines qui assurent cette libre rotation autour de la liaison peptidique.

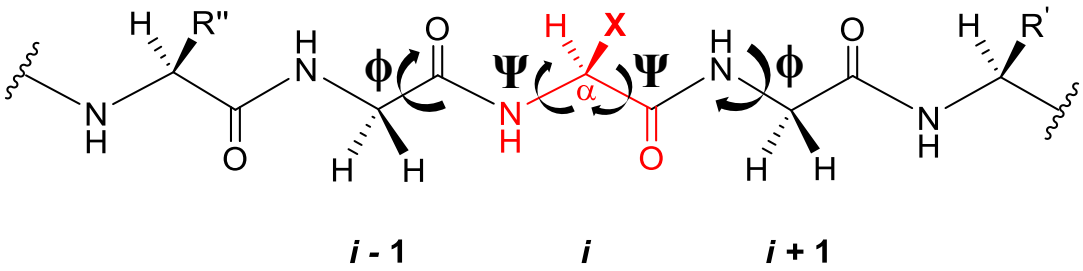


Figure 42 : Angles Ψ et ϕ[142]

Afin d'exposer la chaîne latérale de l'aminoacide variant **X** à la phase stationnaire apolaire de la colonne chromatographique, la position *N*-terminale pourra être adoptée comme site de substitution (Figure 43). De plus, afin d'éliminer l'effet d'ionisation des charges terminales sur la rétention des peptides étudiés ou sur leur solubilité, la position *N*-terminale sera acétylée et la position *C*-terminale amidifiée. C'est ainsi que l'équipe de Kovacs sélectionne comme séquence modèle pour leur étude de l'hydrophobie intrinsèque d'aminoacides, la séquence suivante (Figure 43).

Ac-**X**-G-A-K-G-A-G-V-G-L-amide

Figure 43 : Séquences peptidiques modèles choisies pour l'étude de Kovacs

Au sein de cette séquence, quatre résidus glycine ont été disséminés périodiquement afin d'éviter que le peptide ait tendance à former des structures secondaires. De même, quatre aminoacides hydrophobes (deux alanines, une valine et une leucine) ont été répartis le long de la séquence et alternés avec les résidus de glycine afin de ne pas former de zones hydrophobes susceptibles de former des structurations ponctuelles par interactions hydrophobes. La présence d'un résidu lysine favorise la solubilité du peptide dans une large gamme de pH. La position **X** a été substituée par les 20 aminoacides naturels ainsi que la norvaline, la norleucine et l'ornithine.

2.2.2. Choix des conditions d'élution

De même que la séquence peptidique choisie, la nature et les proportions des différents solvants du mélange d'élution de la phase mobile ainsi que son pH ont une importance considérable et devront être choisis avec précaution.[142]

2.2.2.1. Composition de la phase mobile

La nature des solvants d'élution utilisés ainsi que le pH de la solution ont une influence considérable sur la rétention des chaînes peptidiques sur une phase stationnaire apolaire. Plusieurs approches utilisant des systèmes eau/octanol comme éluants de phase mobile du système chromatographique ont été décrits. Or, ces systèmes ont en général peu d'efficacité pour les séparations et ne permettent de mesurer que d'étroites gammes de valeurs d'hydrophobie.[143] D'après Valko *et al*.,[143] le meilleur mélange d'élution permettant une bonne dispersion des temps de rétention est un mélange hydro-organique eau/acétonitrile.

Par ailleurs, le pH de la phase mobile du système chromatographique employé ainsi que la nature du tampon utilisé sont susceptibles d'influencer le partage et la rétention des peptides élués. Ainsi, pour un même pH, l'équipe de Kovacs[141] observe une augmentation généralisée des temps de rétention des 23 peptides étudiés à pH 2 lorsque le tampon utilisé pour maintenir ce pH est de l'acide trifluoroacétique (TFA) plutôt que de l'acide phoshorique (H_3PO_4). Kovacs explique ce phénomène par la capacité de l'anion (phosphate ou trifluoroacétate) à former des paires d'ions plus ou moins compactes avec les charges positives des aminoacides basiques ionisés à pH 2 et présents dans la partie invariante de la chaîne peptidique.

Le passage d'un pH acide à un pH neutre engendre également des conséquences sur les temps de rétention des peptides étudiés, en particulier, pour ceux dont la position **X** présente une chaîne latérale polaire ou ionisable. En effet, leur état de protonation est différent selon le pH, ce qui influence la solubilité du peptide dans la phase mobile et ses interactions avec la phase stationnaire. Ainsi, Kovacs corrèle les temps de rétention des peptides étudiés obtenus à pH 2 (tampon H_3PO_4) avec ceux obtenus à pH 7 (tampon NaH_2PO_4) et constate que, si ceux-ci varient linéairement pour les peptides comportant un acide aminé à chaîne latérale non ionisée, leur comportement s'éloigne de la normale s'ils possèdent un aminoacide fonctionnalisé.

Pour les aminoacides à chaîne latérale acide (Asp, Glu), on observe donc une augmentation relative des temps de rétention en passant à pH acide et une diminution pour les résidus basiques comme l'ornithine. Ces différences s'expliquent facilement en considérant les pKa des fonctions des chaînes latérales (Asp : pKa 3,9 ; Glu : pKa 4,2). A pH 2, les chaînes acides sont protonées rendant le peptide globalement plus hydrophobe et favorisant sa rétention sur les chaînes C_{18} de la phase stationnaire qu'à pH 7 où elles se retrouvent déprotonées. Concernant les aminoacides basiques, l'ammonium se retrouve plus ou moins déprotoné en fonction du pH considéré. Le

[143] Valko, K.; Bevan, C.; Reynolds, D. *Anal. Chem*. **1997**, *69*, 2022-2029.

passage d'un pH 2 à un pH 7 conduit à une déprotonation : de partielle pour les résidus ornithine, lysine et arginine, à complète pour l'histidine. La charge positive présente sur ces chaînes latérales basiques est donc diminuée ou complètement neutralisée selon l'aminoacide considéré.

Pour prouver que ces perturbations proviennent bien des pKa des chaînes latérales étudiées et donc de leur état d'ionisation, Valko compare les temps de rétention de ses peptides modèles à pH 5 et à pH 7. Pour les aminoacides à chaînes latérales acides, quel que soit le pH considéré, l'état d'ionisation des carboxylates ne devrait pas changer et les temps de rétention correspondants ne devraient pas varier de la normale. Ainsi, il corrèle les temps de rétention des peptides à pH 5 à ceux obtenus à pH 7 et constate effectivement que les temps de rétention des peptides incluant un résidu acide varient linéairement et se comportent comme ceux possédant un résidu à chaîne latérale neutre aliphatique.

En conclusion, le choix de la composition de la phase mobile et en particulier de son pH se révèle crucial pour obtenir des résultats aisément comparables et interprétables. Incorporer des aminoacides à chaîne latérale fonctionnalisée est intéressant pour résoudre certains problèmes de solubilité parfois rencontrés mais peut aboutir à des différences dans les temps de rétention observés en fonction du pH utilisé. Lorsqu'il s'agit de l'aminoacide d'intérêt étudié, de nettes différences sont observées et aboutissent à des variations d'indices d'hydrophobie conséquentes. Il convient donc toujours de se placer dans des conditions strictement identiques pour l'étude de l'hydrophobie intrinsèque des aminoacides dans des chaînes peptidiques et de s'assurer que les chaînes latérales possèdent le même état d'ionisation au pH choisi.

2.2.2.2. Choix du mode d'élution et de l'indice de rétention utilisé pour mesurer l'hydrophobie de composés

Afin de pouvoir mesurer l'hydrophobie de peptides et la quantifier, différents modes d'élution peuvent être envisagés. L'élution peut être réalisée grâce à une concentration en acétonitrile croissante (gradient d'élution) ou à l'aide d'une concentration fixe en acétonitrile durant toute l'analyse du peptide (élution isocratique). Du mode d'élution choisi découleront alors différents référentiels représentant le caractère hydrophobe d'un composé.

Si l'on considère une élution isocratique des peptides, l'utilisation de leurs temps de rétention comme valeurs mesurant et comparant leur hydrophobie n'est pas judicieuse. En effet, celles-ci ne corrèlent généralement pas bien avec les valeurs de log*P* connues. Il faut alors préalablement introduire la notion de facteur de capacité k'. Cet indice caractérise la rétention d'un

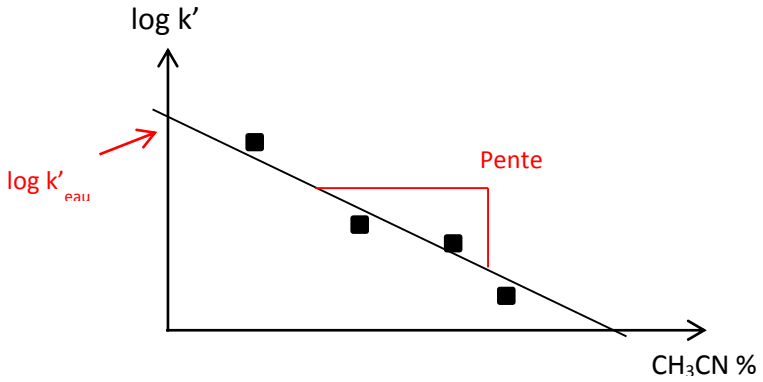
composé pour une phase stationnaire donnée. Il varie avec les conditions opératoires (température, composition de la phase mobile, de la colonne) et est le rapport du temps de rétention réduit du composé, par le temps mort du système chromatographique utilisé, pondérée par ce dernier (Équation 3).

$$k' = \frac{t_x - t_0}{t_0}$$

Équation 3 : Calcul du facteur de capacité k' d'un composé pour un système chromatographique donné

En corrélant les logarithmes des valeurs de k' (logk') mesurées à différentes concentrations en acétonitrile de la phase mobile utilisée, avec le pourcentage en acétonitrile de celle-ci, il est alors possible, par extrapolation à une proportion nulle en acétonitrile, de relever une valeur de logk' notée $\log k'_{eau}$. Cette valeur, contrairement aux temps de rétention, corrèle mieux avec les valeurs de log*P* connues d'après Harnisch *et al.*[144] Cette relation n'est cependant valable que pour des composés dont les structures sont comparables et prédire le log*P* d'un composé de structure différente à partir de valeurs de références n'est pas possible.

La meilleure approche rapportée jusqu'alors permettant de corréler au mieux les valeurs de $\log k'_{eau}$ mesurées avec les valeurs de log*P* de référence et ce, pour des composés de structures variées, est de calculer un nouvel indice d'hydrophobie φ_0.[143] Cet indice est défini comme le pourcentage (en volume) d'acétonitrile nécessaire pour partager de manière égale un composé entre la phase mobile et la phase stationnaire d'un système chromatographique, soit pour une valeur de logk' de 0. L'obtention de cette valeur implique donc au préalable la mesure des valeurs de logk' à différentes concentrations en acétonitrile de la phase mobile (de préférence proches de celle pour laquelle logk' = 0). En corrélant ces différentes valeurs à leur pourcentage respectif en acétonitrile, la valeur de φ_0 se calcule par l'équation suivante (Schéma 96).



$$\varphi_0 = -\frac{\log k'_{eau}}{Pente}$$

Schéma 96

[144] Harnisch, M.; Möckel, H. J.; Schulze, G. *J. Chromatogr.* **1983**, *282*, 315-332.

L'équipe de Valko a ainsi corrélé les valeurs de φ_0 obtenues pour plus de 140 composés de structures variées, à leur valeur de log*P* connues et a remarqué qu'elles variaient linéairement.[145] L'indice φ_0 semble donc bien refléter l'hydrophobie d'un composé et, dans notre cas d'un peptide.

Ainsi, la détermination de l'indice d'hydrophobie φ_0 basée sur la mesure des temps de rétention obtenus grâce à différentes concentrations d'acétonitrile de la phase mobile d'un système chromatographique apparait comme une stratégie intéressante pour comparer l'hydrophobie intrinsèque de chaînes latérales de peptides. Cependant, cette méthode peut sembler longue à mettre en œuvre car nécessite, pour un même composé, la détermination de plusieurs temps de rétention à différentes compositions en acétonitrile. Lorsque de grandes librairies de composés doivent être étudiées, cette méthode voit apparaitre ses limites.

Afin de remédier à ce problème, l'équipe de Valko propose de réaliser un gradient rapide d'acétonitrile et d'évaluer s'il est possible d'obtenir des indices d'hydrophobie cohérents. Il se base sur plusieurs études ayant démontré que l'utilisation d'un gradient lent d'acétonitrile permettait une bonne séparation des composés élués.[146] En théorie, en appliquant un gradient linéaire de la concentration en acétonitrile de la phase mobile, chaque moment t d'une analyse correspond à une certaine composition en phase mobile. En connaissant les débits et temps mort du système, il est donc possible d'estimer le pourcentage d'acétonitrile au moment où le composé est élué. En appliquant un gradient rapide, le paramètre de pente ne devrait avoir qu'une faible influence sur le temps de rétention du composé élué et ce dernier peut être considéré comme constant pour chaque composé. Ainsi, les temps de rétention dans ce type de système faisant intervenir un gradient rapide devraient varier de manière linéaire avec les indices d'hydrophobie φ_0 de référence. La corrélation des indices d'hydrophobie φ_0 précédemment calculés d'après l'étude réalisée à l'aide de différents isocratiques, aux temps de rétention obtenus en utilisant un gradient rapide croissant de 0 % à 100 % d'acétonitrile est représentée sur le Graphe 4. Cette corrélation linéaire obtenue apporte alors la confirmation expérimentale qu'un gradient linéaire peut être employé pour la détermination de l'hydrophobie de composés.

[145] Valko, K.; Slegel, P. *J. Chromatogr*. **1993**, *631*, 49-61.
[146] Mutton, I. M. *J. Chromatogr. A*. **1995**, *697*, 191-201.

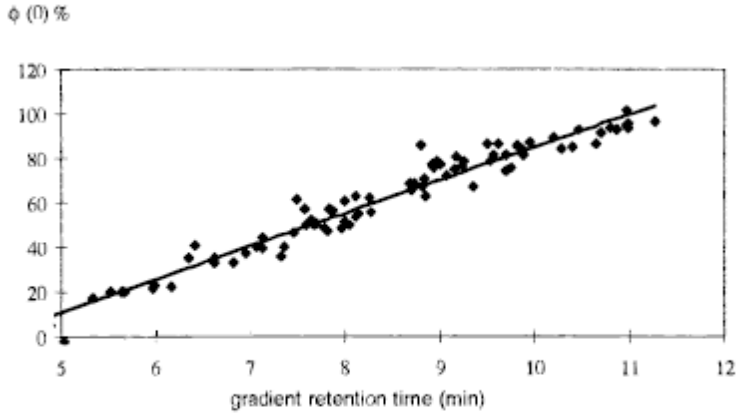


Figure 2. φ_0 values (obtained from isocratic retention measurements) as a function of gradient retention times (t_R).

Graphe 4[143]

De cette nouvelle corrélation, peut être dégagée une nouvelle grandeur, le CHI (pour « Chromatographic Hydrophobicity Index ») calculé cette fois-ci à partir des constantes de la régression linéaire obtenue ci-dessus. Le CHI est un indice qui dépend du type stationnaire utilisée mais également de la composition de la phase mobile et, en fonction de la présence de composés acides ou basiques, du pH de cette phase. Afin de rendre la méthode plus facile à appliquer, Valko sélectionne parmi les composés étudiés, dix molécules représentatives du pool et s'en sert pour fournir des valeurs de φ_0, S, $\log k'_{eau}$ et CHI permettant à tout utilisateur désirant rapidement mesurer l'hydrophobie d'un composé nouveau de calibrer son système chromatographique quel qu'il soit.[143]

3) Conclusion

La HPLC est donc une méthode de mesure de l'hydrophobie de molécules fiable et robuste. Rapide à mettre en œuvre, elle est particulièrement adaptée à l'étude de peptides et représente une alternative de choix à la mesure de valeurs de log*P* qui, si elles restent les valeurs de référence en termes d'hydrophobie, sont difficilement mesurables dans le cas de peptides. Notre étude consistant à déterminer l'influence du groupement trifluorométhyle sur l'hydrophobie de petits peptides, nous nous sommes tournés vers cette technique d'analyse.

II) Application à l'étude de l'hydrophobie de petits peptides fluorés

Incorporer des aminoacides fluorés dans des peptides a souvent pour conséquence la stabilisation de leurs structures secondaires ou leur auto-assemblage par interactions de type hydrophobe (chapitre I).[11] Dans le cas des interactions peptide-protéine, la présence d'un aminoacide fluoré dans un peptide permettrait d'augmenter localement l'hydrophobie de la chaîne peptidique et de favoriser sa reconnaissance par une protéine cible par l'intermédiaire d'interactions dans des poches hydrophobes. Or, à notre connaissance, aucune mesure expérimentale d'indices d'hydrophobie relatifs à des peptides ou protéines fluorées n'a été rapportée dans la littérature.

Notre laboratoire s'intéresse à l'étude physico-chimique et structurale de petits peptides fluorés α-trifluorométhylés. L'étude de l'influence d'un tel groupement sur l'augmentation de l'hydrophobie de peptides a fait l'objet d'une deuxième partie de mes travaux de thèse. Ils ont consisté à établir une méthode analytique permettant de mesurer et comparer l'hydrophobie de courts peptides incorporant des aminoacides α-trifluorométhylés à leurs analogues non fluorés. Afin d'obtenir des valeurs expérimentales d'hydrophobie, les méthodes de partage entre deux phases liquides ou entre une phase stationnaire et une phase liquide ont donc été envisagées. Cependant, face aux faibles quantités disponibles d'aminoacides α-trifluorométhylés, cette méthode n'a pas été retenue. Notre choix s'est donc porté sur une méthode de mesure des temps de rétention par analyse HPLC.

1) Elaboration et mise en œuvre d'une méthode analytique de mesure d'indice d'hydrophobie par RPLC

Afin d'obtenir une valeur expérimentale quantifiable de l'hydrophobie de nos aminoacides α-trifluorométhylés par chromatographie liquide en phase inverse, la première phase de l'étude a concerné les aminoacides libres non protégés. Sachant que les indices d'hydrophobie décrits plus hauts (φ_0 ou CHI) corrèlent relativement bien avec les valeurs de log*P* correspondantes, ceci permettrait de dégager rapidement une valeur de φ_0 ou de CHI et d'en déduire directement le log*P* des aminoacides α-trifluorométhylés d'intérêt.

1.1. Etude préliminaire : aminoacides libres

A l'heure actuelle, peu d'études d'hydrophobie d'aminoacides par HPLC concerne les aminoacides totalement déprotégés.[133,134] Cet état de fait est en grande majorité du à leur incapacité à se lier à une phase stationnaire apolaire de type C_{18} à cause de la présence de charges terminales. Dans ce type d'étude, les aminoacides ont ainsi tendance à être élués immédiatement sans séparation possible. Souvent, les mesures d'hydrophobie d'aminoacides libres sont réalisées par d'autres techniques chromatographiques, se distinguant de la HPLC par la nature de la phase stationnaire employée. Ainsi, quelques exemples de rétention sur des gels hydrophiles[147] ou sur plaques de chromatographie sur couche mince (CCM)[148] ont été rapportés.

Luco *et coll*. ont été parmi les rares à décrire l'analyse d'aminoacides non protégés par HPLC.[133,134] Leur étude ayant montré une bonne corrélation entre les valeurs des temps de rétention obtenues sur une phase stationnaire de type C_{18} et différents indices d'hydrophobie (log*P*) donnés par diverses échelles d'hydrophobie disponibles dans la littérature, notre choix s'est donc naturellement porté vers l'emploi d'un protocole similaire pour l'élution de nos aminoacides fluorés. La détermination des conditions optimales d'élution a ainsi été réalisée à l'aide de mélanges d'aminoacides naturels, dans le but d'obtenir une séparation correcte de tous les types d'aminoacides présents dans les mélanges. La phase mobile sélectionnée est un mélange hydro-organique composé d'eau et d'acétonitrile en diverses proportions et tamponnée à pH 2 à l'aide d'acide trifluoroacétique (TFA). La phase stationnaire apolaire est une colonne analytique C_{18} Zorbax RX.

Dans un premier temps, un mélange composé de seize acides aminés dont l'α-Tfm-Alanine a été étudié. Le chromatogramme de l'élution de ce mélange est représenté sur la Figure 44 A.

[147] Aboderin, A. A. *Int. J. Biochem*. **1971**, *2*, 537-544.
[148] Pliska, V.; Schmidt, M.; Fauchere, J. L. *J. Chromatogr*. **1981**, *216*, 79-92.

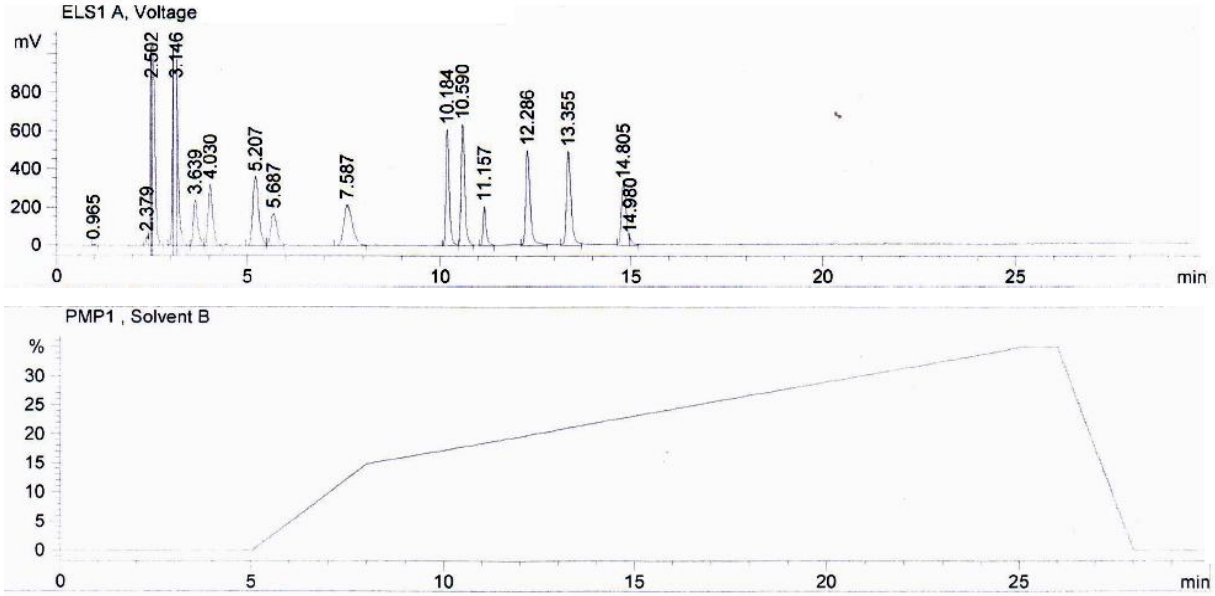


Figure 44 : Chromatogramme de l'élution du mélange préliminaire des seize aminoacides. A) Chromatogramme du mélange des seize aminoacides par détection par ELSD. B) Gradient d'acétonitrile utilisé pour l'élution du mélange.

La phase mobile utilisée est un mélange d'eau et d'acétonitrile en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique. Le temps d'analyse est de 25 min et le gradient utilisé est le suivant :

- de 0 à 5 min, isocratique à 100% d'eau,
- de 5 à 8 min, augmentation progressive de la proportion d'acétonitrile de 0 à 15%,
- de 8 à 25 min, ralentissement du gradient d'acétonitrile de 15% à 35% (Figure 44 B).

Afin d'attribuer chaque signal à la nature de l'acide aminé concerné, tous les aminoacides de ce mélange ont été élués seuls. Le chromatogramme montre clairement la présence de deux groupes d'aminoacides distincts : entre 0 et 5 minutes d'analyse puis de 10 à 15 minutes. Si le deuxième groupe semble bien résolu, certains aminoacides du premier groupe ne sont pas bien séparés, en particulier, l'alanine, l'Aib et l'α-Tfm-Alanine qui possèdent le même temps de rétention (2,4 min.), soit le temps mort du système chromatographique. Ces aminoacides ne sont donc pas retenus par la phase stationnaire Or, notre étude a pour objectif de déterminer, par mesures HPLC, la contribution du groupement trifluorométhyle de l'α-Tfm-Alanine sur l'augmentation de l'hydrophobie de petits peptides. Pour cela, il est nécessaire de pouvoir séparer et différencier l'α-Tfm-Alanine de ses analogues non fluorés, l'acide α-aminoisobutyrique et l'alanine. L'utilisation d'aminoacides non protégés pour la détermination d'indices d'hydrophobie n'étant donc pas adaptée, nous nous sommes alors tournés vers la synthèse et l'étude de différentes séries structurales de tripeptides incluant une α-Tfm-Alanine.

1.2. Peptides

L'utilisation de peptides pour la détermination de l'hydrophobie intrinsèque d'une chaîne latérale au sein d'une séquence a été longuement décrite précédemment et s'avère une méthode de choix. En s'inspirant des protocoles décrits par Valko et Mant,[141,142,143] nous avons donc opté pour la synthèse et l'étude par HPLC en phase inverse de tripeptides incorporant une α-Tfm-Alanine et comparé leur rétention à celles des peptides comportant, ses analogues structuraux non fluorés : l'acide α-aminoisobutyrique et l'alanine.

1.2.1. Détermination des séquences peptidiques choisies pour l'étude d'hydrophobie

Afin de mesurer l'hydrophobie de la chaîne latérale d'aminoacides fluorés et de la comparer à celles d'aminoacides naturels de caractéristiques structurales voisines, il convient de synthétiser des peptides de séquences identiques, ne variant que par la nature de l'aminoacide à étudier comme l'a proposé Valko.[142] Les séquences de ces peptides ne doivent pas permettre la formation des structures secondaires particulières comme des hélices α, des feuillets ou des coudes β pouvant masquer la chaîne latérale d'intérêt. L'aminoacide à étudier sera incorporé en position *N*-terminale favorisant l'interaction de la chaîne latérale d'intérêt avec la phase stationnaire mais aussi en milieu de chaîne peptidique pour évaluer l'impact de la position de l'aminoacide étudié. Enfin, pour que la solubilité dans la phase mobile ainsi que les interactions avec la phase stationnaire des peptides étudiés ne soient pas perturbés par l'effet des charges terminales, les peptides pourront être acétylés en position *N*-terminale et amidifiés en position *C*-terminale. Nous avons ainsi opté pour la synthèse d'une première famille de tripeptides de type Ac-**X**-Ala-Leu-NH_2. L'aminoacide fluoré concerné par notre étude étant l'α-trifluorométhylalanine de configuration (*R*) et (*S*), les aminoacides non fluorés choisis comme points de comparaison sont ses analogues structuraux aliphatiques à savoir son analogue hydrogéné l'acide aminoisobutyrique (Aib), l'alanine ou bien l'isoleucine, considérée par plusieurs échelles comme la plus hydrophobe des aminoacides naturels aliphatiques.

Afin d'étudier l'effet des charges terminales sur la rétention de peptides non protégés, deux autres séries de tripeptides déprotégés ont également été synthétisées. La première série, de type H-Ala-**X**-Leu-OH, inclut les aminoacides variants **X** (α-Tfm-Ala, Aib, Ala et Ile) en position centrale. La deuxième série, de type H-**X**-Ala-Leu-OH, positionne l'aminoacide variant du côté *N*-terminal de façon à observer un éventuel effet du groupement trifluorométhyle sur l'ionisation de la fonction amine.

La Figure 45 résume les différentes séries proposées et aminoacide concernés.

Série protégée acétyle/amide	Série déprotégée centrale	Série déprotégée *N*-terminale
Ac-(*R*)-Tfm-Ala-Ala-Leu-NH_2 (*R*,*S*,*S*)-29	H-Ala-(*R*)-Tfm-Ala-Leu-OH (*S*,*R*,*S*)-33	H-(*R*)-Tfm-Ala-Ala-Leu-OH (*R*,*S*,*S*)-18
Ac-(*S*)-Tfm-Ala-Ala-Leu-NH_2 (*S*,*S*,*S*)-29	H-Ala-Ile-Leu-OH (*S*,*S*,*S*)-30	H-Ile-Ala-Leu-OH (*S*,*S*,*S*)-34
Ac-Ile-Ala-Leu-NH_2 (*S*,*S*,*S*)-25	H-Ala-Aib-Leu-OH (*S*,*S*)-31	H-Aib-Ala-Leu-OH (*S*,*S*)-35
Ac-Aib-Ala-Leu-NH_2 (*S*,*S*)-26	H-Ala-Ala-Leu-OH (*S*,*S*,*S*)-32	H-Ala-Ala-Leu-OH (*S*,*S*,*S*)-32
Ac-Ala-Ala-Leu-NH_2 (*S*,*S*,*S*)-27		

Figure 45 : Différentes familles de tripeptides synhétisées pour l'étude d'hydrophobie

1.2.2. Synthèse des peptides et purification

1.2.2.1. Série *N*-acétyle/amide

La série de tripeptides *N*-acétyle/amide comportant cinq peptides de séquences identiques (sauf pour la position *N*-terminale variante), leur synthèse a été envisagée sur support solide (SPPS) (Figure 45). Ces peptides possédant leur extrémité *C*-terminale amidifiée, la résine choisie comme support est une résine de type Rink (Schéma 97). En effet, après synthèse des peptides, son clivage, réalisé en milieu acide, généralement par de l'acide trifluoroacétique, permet de libérer la fonction acide carboxylique amidifiée.

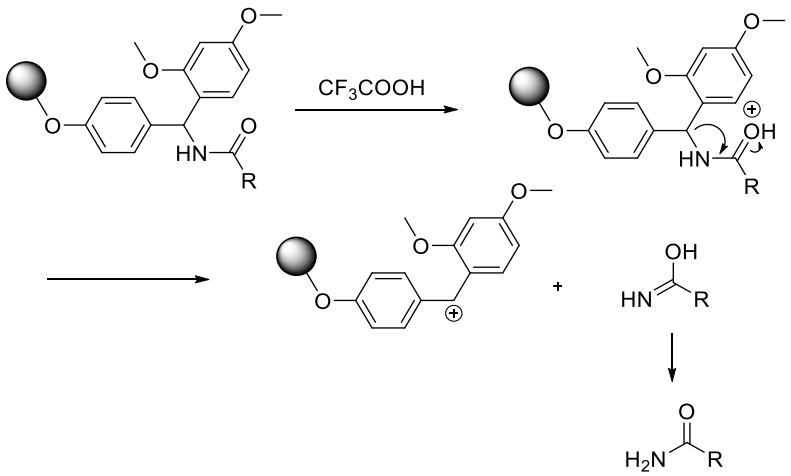


Schéma 97

- *Synthèse des peptides non fluorés*

La synthèse des peptides acétyle/amides non fluorés a été réalisée manuellement, selon une stratégie de type Fmoc sur une résine Rink (Schéma 98). Le greffage des trois acides aminés s'effectue par activation de 5 équivalents de Fmoc-Leucine puis de Fmoc-Alanine par du HATU en présence de DIPEA. Après chaque phase de couplage d'une durée de 1 heure, la fonction amine *N*-terminale du peptide en croissance est déprotégée de son groupement Fmoc par traitement à la pipéridine (20% dans du DMF). L'efficacité des différentes étapes de couplage et de déprotection est vérifiée par test Kaiser,[149] microclivage et analyse par masse couplée à un appareil d'UPLC afin de s'assurer de la présence du peptide en cours de synthèse. La dernière étape d'acétylation est réalisée à l'aide d'anhydride d'acétique et de pyridine dans du DMF.[150] Le clivage des peptides, réalisé au moyen de TFA à 95 %, de triisopropylsilane (TIS) à 2,5 % et d'eau à 2,5 % fournit les tripeptides non fluorés désirés après purification par HPLC semi-préparative.

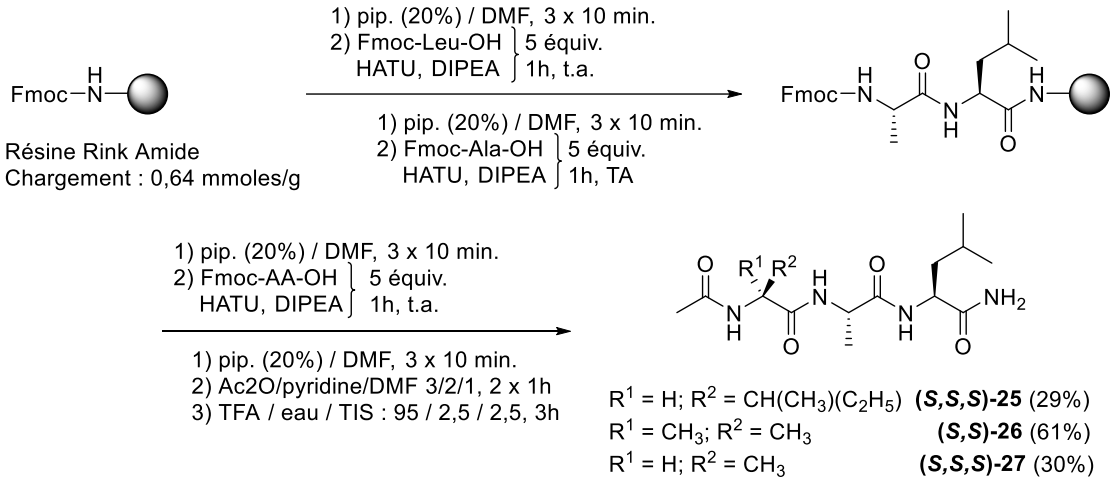


Schéma 98

- *Synthèse des peptides fluorés*

L'acétylation finale de peptides incorporant en position *N*-terminale une α-Tfm-Alanine, dans les mêmes conditions que précédemment (Schéma 98) ne fonctionnant pas, il a été envisagé de synthétiser préalablement l'α-Tfm-Alanine acétylée. Ce produit serait ensuite directement incorporé dans la séquence peptidique en cours de croissance.

[149] Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem*. **1970**, *34*, 595-598.
[150] Bantan-Polak; T., Grant, K. B. *Chem. Commun*. **2002**, 1444-1445 (supplementary Material).

Acétylation de l'α-Tfm-Alanine

L'acétylation de l'α-Tfm-Alanine s'effectue à l'aide de chlorure d'acétyle préalablement distillé sur pentachlorure de phosphore (PCl_5). En présence de K_2CO_3, à 100 °C sous pression, les *N*-acétyles (*R*) ou (*S*) α-Tfm-Alanine sont obtenues avec d'excellents rendements et sont engagées dans l'étape de couplage sans purification (Schéma 99).

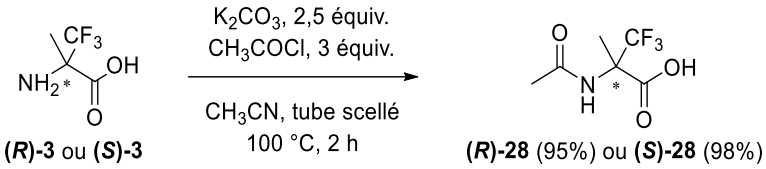


Schéma 99

Synthèse des peptides (*R,S,S*)-26 et (*S,S,S*)-26 par synthèse sur support solide

La synthèse des deux tripeptides fluorés **(*R,S,S*)-29 et (*S,S,S*)-29** a également été réalisée par SPPS en partant d'une résine Rink, le début de la synthèse ne différant pas de celle des peptides non fluorés présentée plus haut. L'incorporation des alanines trifluorométhylées s'effectue alors par couplage direct des (*R*) ou (*S*) α-Tfm-Alanine préalablement acétylées, par activation de leur fonction acide par du HATU en présence de DIPEA (Schéma 100). Seuls 2 équivalents d'aminoacides fluorés sont engagés dans ce couplage particulier dont le temps est allongé à 5 heures. Les deux tripeptides **(*R,S,S*)-29 et (*S,S,S*)-29** sont ainsi obtenus après clivage de la résine au moyen d'un mélange TFA / TIS / H20 : 95%/2,5% 2,5% et purification par HPLC semi-préparative avec des rendements de 40% et 52% respectivement.

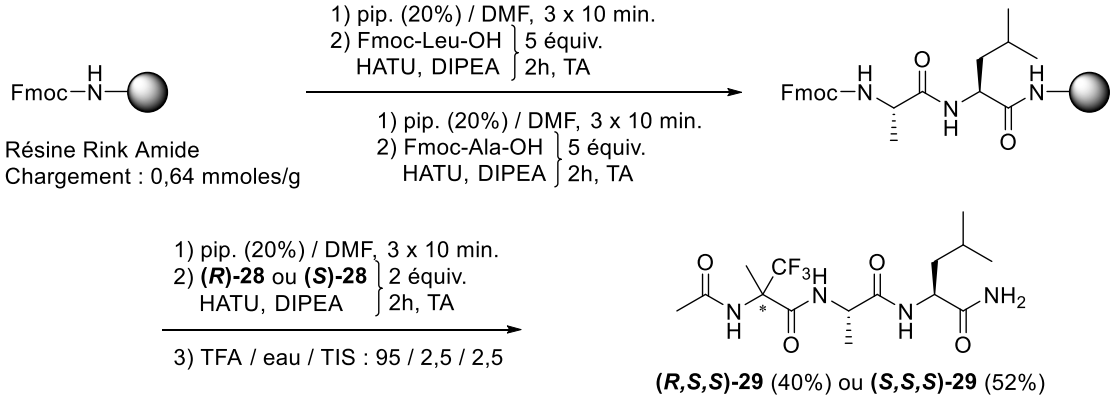


Schéma 100

1.2.2.2. Série déprotégée variant en position centrale

- *Synthèse des peptides non fluorés*

La synthèse des peptides déprotégés non fluorés variant par la nature de l'aminoacide en position centrale a été envisagée de la même manière que celle des peptides non fluorés variant en position *N*-terminale. Elle a donc été réalisée par SPPS manuelle, selon une stratégie de type Fmoc, sur une résine Wang prégreffée par un résidu de *N*-Fmoc-leucine et permettant, après clivage, de libérer le peptide sous forme acide libre (Figure 46).

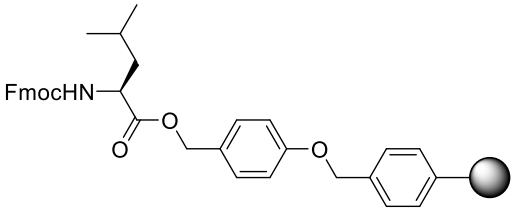


Figure 46 : Structure de la résine Wang greffée par un résidu *N*-Fmoc-leucine

La synthèse s'effectue ensuite de la même manière que pour les peptides de la famille acétyle/amide. Après déprotection finale, les peptides sont clivés de la résine à l'aide d'un mélange TFA/eau/TIS et purifiés par HPLC semi-préparative (Schéma 101).

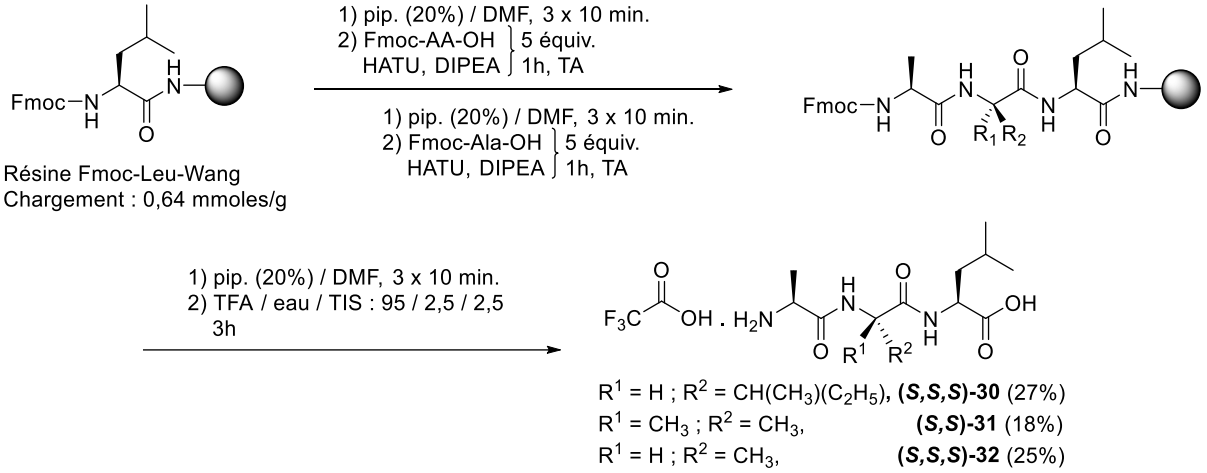


Schéma 101

La synthèse du peptide **(*S,S,S*)-30** a été réalisée par Nathalie SARAIVA ROSA, étudiante en Master et celle des peptides **(*S,S*)-31** et **(*S,S,S*)-32** par Vincent GASPARIK, ATER au laboratoire.

- *Synthèse du peptide fluoré **(S,R,S)-33***

L'incorporation d'un aminoacide α-trifluorométhylé en milieu de peptide n'est pas envisageable par les méthodes classiques de SPPS basées sur l'addition successive d'acides aminés de la position *C*-terminale jusqu'à la position *N*-terminale. En effet, le couplage sur la position *N*-

terminale étant relativement difficile, il convient, comme nous l'avons vu au chapitre II, de synthétiser préalablement en solution un bloc di- ou tripeptidique qui sera ensuite incorporé plus facilement sur un peptide greffé en cours de croissance.

Les peptides choisis pour l'étude d'hydrophobie ne comportant que trois résidus d'aminoacides, la synthèse du peptide fluoré ***(S,R,S)*-33** par SPPS en utilisant la technique d'introduction de blocks s'est avérée inutile. Celle-ci a donc été entièrement réalisée en solution. La synthèse du précurseur protégé *N*-Fmoc-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn a été effectuée précédemment au laboratoire par couplage du chlorure de *N*-Fmoc-Alanine sur la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine du dipeptide H-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn (Schéma 53).[8] La déprotection finale de ce tripeptide est réalisée par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon à 10 %, sous 2 bars d'hydrogène dans du méthanol. Le dipeptide déprotégé **(*S,R,S*)-33** est alors obtenu avec un rendement de 77% après purification par HPLC semi-préparative (Schéma 105).

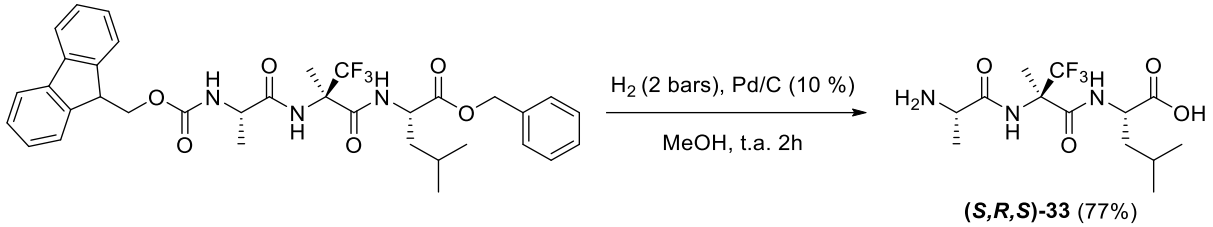


Schéma 102

1.2.2.3. Série déprotégée variant en position *N*-terminale

Le couplage de la fonction acide des aminoacides α-trifluométhylés et en particulier de l'α-Tfm-Alanine n'étant relativement pas affecté par la présence en position α du groupement trifluorométhyle, son incorporation en position *N*-terminale d'un peptide peut *à priori* être réalisée par synthèse supportée. De ce fait, l'intégralité des peptides de cette série a pu elle-aussi être préparée de cette manière. Sachant que ces peptides doivent tous posséder leur fonction acide terminale libre, nous avons eu recours à une résine de type Wang prégreffée par un résidu de *N*-Fmoc-Leucine (Figure 46).

- *Synthèse des peptides non fluorés*

La synthèse des peptides déprotégés non fluorés variant par la nature de l'aminoacide en position *N*-terminale a été réalisée par SPPS manuelle (Schéma 103). L'incorporation des deux derniers acides aminés s'effectue par activation des fonctions acides de 5 équivalents d'aminoacides par du HATU en présence de DIPEA quelle que soit la nature de l'aminoacide.

Après chaque phase de couplage d'une durée de 30 minutes, l'amine *N*-terminale du peptide en croissance est déprotégée de son groupement Fmoc par traitement à la pipéridine (20% dans du DMF). La dernière étape de clivage s'effectue à l'aide d'une solution de TFA à 95% dans l'eau et fournit les tripeptides non fluorés **(*S,S,S*)-34** et **(*S,S*)-35** avec des rendements respectifs de 95% et 15%, après purification par HPLC semi-préparative.

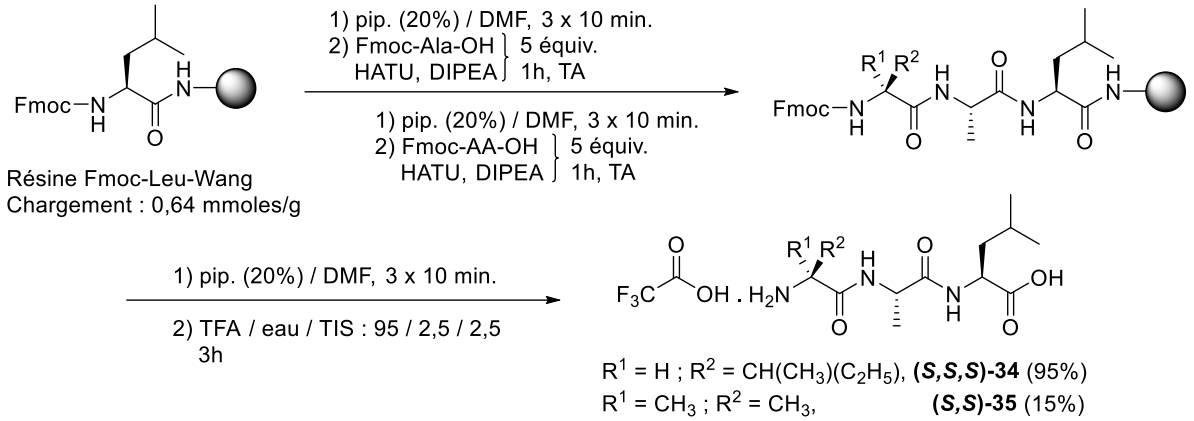


Schéma 103

- *Synthèse du peptide fluoré* **(*R,S,S*)-18**

Les conditions d'incorporation de la (*R*)-α-Tfm-Alanine en position *N*-terminale de peptides par SPPS ne diffèrent pas de celles des ses analogues non fluorés. Le risque d'homocouplage étant fortement diminué par la faible réactivité de la fonction amine, la (*R*)-α-Tfm-Alanine peut être employée non protégée, ce qui évite de plus une étape de déprotection supplémentaire. Pour ce dernier couplage, seuls deux équivalents d'aminoacides sont engagés et le temps de réaction est augmenté à 6 heures. Un miniclivage et une analyse par masse couplée à un appareil UPLC permet de vérifier la présence du tripeptide. Le clivage de la résine Wang par une solution de TFA 95% et une purification du brut obtenu par HPLC semi-préparative permet l'obtention du tripeptide **(*R,S,S*)-18** avec un rendement de 21% (Schéma 104).

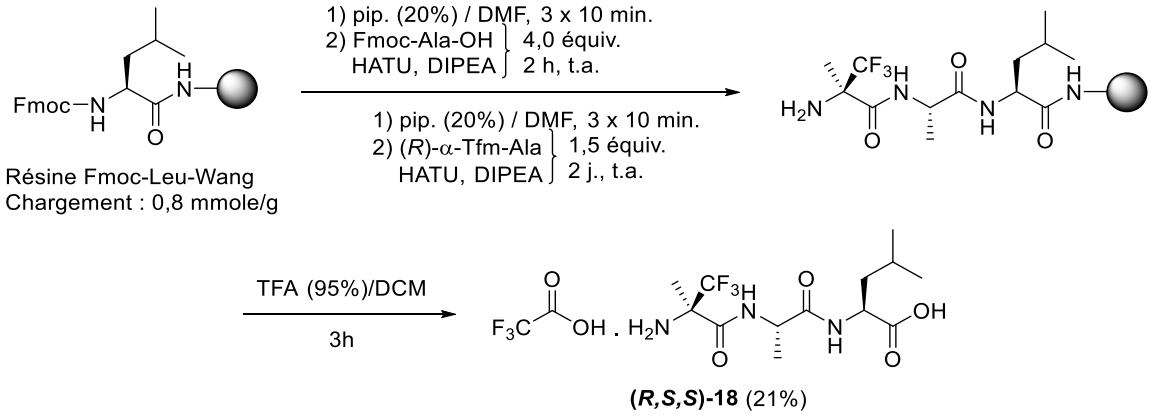


Schéma 104

1.2.3. Conclusion sur les séquences synthétisées

Les rétentions des peptides de ces trois familles ont donc été comparées une à une au sein de chaque famille sur une phase stationnaire de type C_{18}. Dans son protocole, Valko[145] affirme qu'il est possible d'utiliser un gradient rapide d'acétonitrile pour la détermination de valeurs de φ_0 inconnues en corrélant leur temps de rétention avec des valeurs connues de φ_0 pour des composés similaires. Or, les composés utilisés par Valko pour la calibration de sa méthode n'étant pas de nature peptidique, nous avons préféré mesurer nos propres valeurs de φ_0 à partir de temps de rétention obtenus après plusieurs élutions isocratiques à différentes concentrations en acétonitrile.

2) Résultats de l'étude d'hydrophobie

2.1. Principe et conditions de la méthode utilisée

2.1.1. Principe général de la méthode

Afin de comparer l'hydrophobie des peptides fluorés à celles de leurs analogues non fluorés, chacun d'entre eux est élué de manière isocratique, à 4 ou 5 concentrations d'acétonitrile différentes. Pour chaque expérience, les pourcentages d'acétonitrile ainsi que les débits, sont choisis de sorte à ce que les temps de rétention obtenus soient au minimum le double du temps mort du système chromatographique. Plus la concentration en acétonitrile est élevée, plus le peptide sera élué rapidement. Pour retarder son élution, le débit du système pourra être ralenti. La pondération des temps de rétention par le temps mort du système permet alors de calculer, pour chaque expérience, le facteur de capacité k'. Cette pondération permet de s'affranchir du débit de la colonne.

Le principe de la détermination de l'indice d'hydrophobie est alors le suivant : pour chaque peptide, les logk' relatifs à chaque temps de rétention mesuré sont corrélés à la valeur du pourcentage d'acétonitrile utilisé dans la phase mobile (Schéma 96). L'équation des droites obtenues est alors la suivante.

$$logk' = P \times x + logk'_{eau}$$

Équation 4 : Equation des droites de corrélation entre les logk'et les concentrations en acétonitrile

Les valeurs de la pente P et de l'ordonnée à l'origine $logk'_{eau}$ permettent alors le calcul des valeurs de φ_0, pour chaque peptide, selon l'équation suivante.

$$\varphi_0 = -P/logk'_{eau}$$

Équation 5 : Calcul de l'indice d'hydrophobie φ_0

Plus la valeur d'indice d'hydrophobie φ_0 est élevée, plus le composé étudié sera hydrophobe. Krokhin *et al*. ont étudié l'hydrophobie de peptides comportant entre sept et onze aminoacides et mesuré dans les conditions de Valko des valeurs d'indice d'hydrophobie φ_0 compris entre 0 et 30.[151]

2.1.2. Conditions opératoires

Les peptides de notre étude d'hydrophobie ont tous été élués sur une phase stationnaire apolaire de type C_{18} Zorbax®. Les mesures ont été réalisées à deux pH différents, pH 2 et pH 7, pour un temps d'expérience de 15 minutes. Pour la série de peptides protégés, cette différence de pH ne devrait pas avoir d'influence sur le calcul des φ_0. En revanche, l'état de protonation des fonctions *N*- et *C*-terminales des peptides déprotégés devraient être différents suivant le pH utilisé. La variation de pH pourrait influencer la rétention des peptides sur la phase stationnaire apolaire.

Concernant les phases mobiles, la préparation des phases à pH 2 s'effectue par l'addition de 0,1 % d'acide trifluoroacétique aux fractions aqueuse et organique. La valeur du pH a été contrôlée par mesure à l'aide d'un pH-mètre. Le pH 7 a quant à lui été atteint par addition d'acétate d'ammonium à la concentration de 50 nM dans la phase aqueuse uniquement. De même, le pH de la fraction aqueuse a été vérifié à l'aide d'un pH-mètre.

La détection des peptides est effectuée à l'aide de deux détecteurs : un détecteur UV réglé à 215 nm ainsi qu'un ELSD. Les temps de rétention pris comme références pour le calcul des différents indices d'hydrophobie sont ceux mesurés par l'ELSD.

Enfin, les échantillons de peptides ont été préparés à la concentration de 1 mg/mL dans de l'eau mQ et, afin d'estimer le temps mort du système chromatographique (t_0), qui varie en fonction du débit utilisé, du nitrate de sodium a été ajouté à chaque échantillon à la concentration de 0,01 mg/mL. Ce sel, non retenu par la phase stationnaire, n'entrave pas l'élution des peptides étudiés et est révélé par les deux détecteurs utilisés.

2.2. Résultats

Quelle que soit la famille de composés étudiée, les pourcentages d'acétonitrile choisis pour les analyses isocratiques ainsi que les débits devront permettre l'élution des peptides dans une fenêtre de temps de rétention allant du double du temps mort du système pour la limite basse, à 15

[151] Krokhin, O. V.; Spicer, V. *Anal. Chem*. **2009**, *81*, 9522-9530.

min d'expérience maximum. Dans le but de remplir ces conditions, des analyses préliminaires de chaque peptide permettent de définir ces limites haute et basse de concentration en acétonitrile. Afin d'étendre au maximum la gamme de concentration, le débit de la phase mobile est ajusté dans la limite des conditions supportées par la colonne et les pompes (débit maximum autorisé : 1 mL /min ; débit minimum autorisé : 0,1 mL / min). Une fois les limites en concentration d'acétonitrile déterminées, chaque peptide sera alors analysé à quatre concentrations en acétonitrile au minimum, afin de permettre une régression linéaire.

2.2.1. Série protégée acétyle/amide

Les peptides de cette première série (Figure 47) ont tous été acétylés sur leur position *N*-terminale et amidifiés en position *C*-terminale afin de bloquer l'effet des charges sur la partition entre la phase mobile et la phase stationnaire. Ainsi, seules les chaînes latérales des aminoacides variant sont susceptibles de modifier la rétention et donc, l'hydrophobie, des peptides. Ils ont néanmoins été, tout comme pour les autres familles de peptides, étudiés à deux pH différents : pH 2 et pH 7.

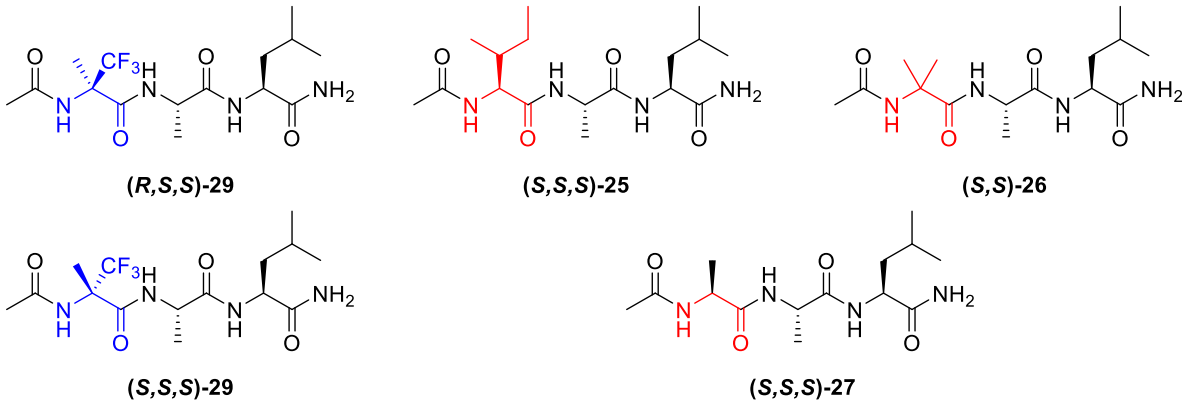


Figure 47 : Tripeptides de la famille acétyle/amide

2.2.1.1. Valeurs obtenues

Les **Tableau 12**Tableaux 12 et 13 suivants résument respectivement à pH 2 et à pH 7, pour chaque peptide de la famille, les valeurs de temps de rétention obtenus pour chaque concentration en acétonitrile utilisée, ainsi que les valeurs de k' et de logk'.

	Ac-(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-Leu-NH_2			Ac-(*S*)-α-Tfm-Ala-Ala-Leu-NH_2			Ac-Aib-Ala-Leu-NH_2			Ac-Ala-Ala-Leu-NH_2			Ac-Ile-Ala-Leu-NH_2		
CH_3CN %	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')
12										9,889	1,632	0,213			
15							10,866	2,373	0,375	8,585	0,937	-0,028			
18	9,98	3,479	0,541	9,711	3,422	0,534				11,636	0,618	-0,209			
20	10,954	2,562	0,409	10,853	2,577	0,411	8,938	1,049	0,021	10,492	0,48	-0,318	9,538	2,514	0,4
22							7,995	0,847	-0,072						
23	9,532	1,742	0,241	9,519	1,737	0,24							7,881	1,631	0,213
25	9,869	1,315	0,119	9,649	1,301	0,114	6,715	0,574	-0,241						
27							10,674	0,522	-0,282				7,91	0,934	-0,03
30	9,387	0,809	-0,092	10,634	0,814	-0,089									
32													6,293	0,569	-0,245
35															
φ_0	**27,82**			**27,84**			**21,09**			**14,87**			**27,06**		

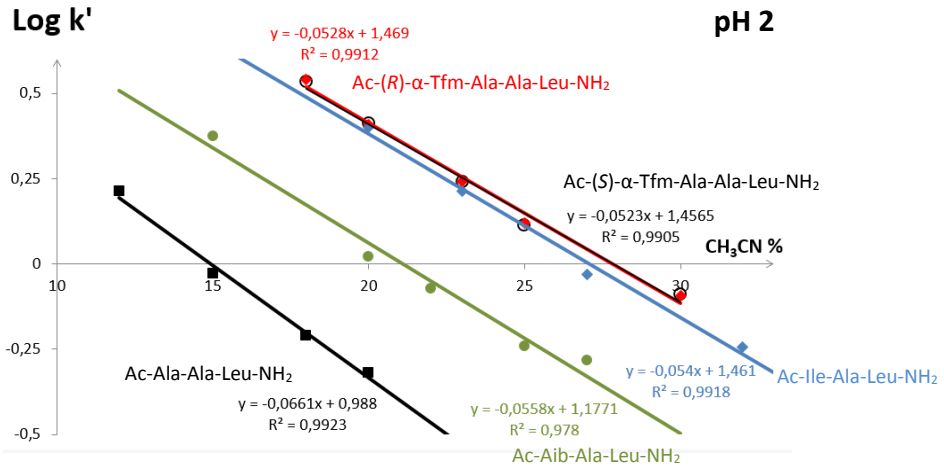
Tableau 12 : Résultats de l'étude d'hydrophobie à pH 2 pour la série de tripeptides acétyle/amide

	Ac-(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-Leu-NH_2			Ac-(*S*)-α-Tfm-Ala-Ala-Leu-NH_2			Ac-Aib-Ala-Leu-NH_2			Ac-Ala-Ala-Leu-NH_2			Ac-Ile-Ala-Leu-NH_2		
CH_3CN %	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')
10										10,687	2,756	0,44			
12										9,286	1,868	0,271			
15							9,756	2,694	0,43	8,546	1,081	0,034			
17										12,215	0,826	-0,083			
18							10,854	1,656	0,219						
20	7,514	2,472	0,393	7,67	2,553	0,407	8,912	1,197	0,078						
22	6,207	1,878	0,274	6,27	1,926	0,285	12,793	0,938	-0,028				7,158	1,757	0,245
25	6,47	1,312	0,118	6,443	1,318	0,12							8,827	1,213	0,084
26													8,303	1,094	0,039
28	8,099	0,987	-0,005	8,071	0,981	-0,008									
φ_0	**27,64**			**27,59**			**19,83**			**15,68**			**26,67**		

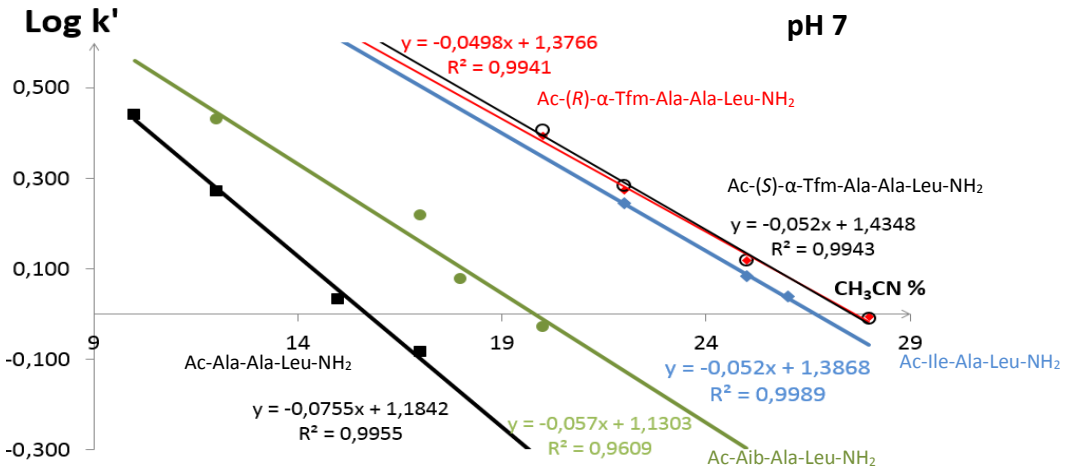
Tableau 13 : Résultats de l'étude d'hydrophobie à pH 7 pour la série de tripeptides acétyle/amide

Les proportions d'acétonitrile utilisées pour cette première étude s'étendent d'une valeur de 12% pour les peptides les moins retenus, à 32% pour les plus hydrophobes. Nous pouvons dès à présent constater que le peptide substitué par une alanine est le plus rapidement élué. En revanche, le peptide possédant une isoleucine est encore retenu pour une proportion d'acétonitrile de 32% : il fait donc partie des plus hydrophobes.

Le calcul du facteur de capacité k' permet, pour chaque mesure, de s'affranchir du débit de la phase mobile. Afin de pouvoir calculer l'indice d'hydrophobie φ_0 de chaque peptide de la famille, nous avons corrélé les valeurs de logk' obtenues pour chaque peptide, à pH 2 puis pH 7, en fonction des proportions en acétonitrile utilisées pour chaque analyse. Les Graphes 5 et 6 suivants rassemblent ces données, respectivement à pH 2 et à pH 7.



Graphe 5



Graphe 6

Les régressions linéaires effectuées par traitement informatique permettent de constater, par les valeurs des indices de corrélation r^2 que les données s'ajustent bien selon un modèle linéaire. En effet, plus la valeur de r^2 s'approche de 1 et plus la corrélation est linéaire. L'Équation 4 permet de calculer à pH 2 et pH 7, les valeurs de P et $\log k'_{eau}$, qui, d'après l'Équation 5, donnent les indices d'hydrophobie φ_0. Les valeurs de ces indices figurent dans le Tableau 14 suivant.

	φ_0 (pH 2)	φ_0 (pH 7)
Ac-(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-Leu-NH_2 **(*R,S,S*)-29**	27,82	27,64
Ac-(*S*)-α-Tfm-Ala-Ala-Leu-NH_2 **(*S,S,S*)-29**	27,84	27,59
Ac-Ile-Ala-Leu-NH_2 **(*S,S,S*)-25**	27,06	26,67
Ac-Aib-Ala-Leu-NH_2 **(*S,S*)-26**	21,09	19,83
Ac-Ala-Ala-Leu-NH_2 **(*S,S,S*)-27**	14,87	15,68

Tableau 14 : Valeurs des indices d'hydrophobie φ_0 pour chaque peptide de la série acétyle/amide à pH 2 et pH 7

2.2.1.2. Conclusion

A pH 2 comme à pH 7, les valeurs d'indice d'hydrophobie φ0 obtenues pour un même peptide sont pratiquement identiques. Ceci s'explique, d'une part par la présence de l'acétyle en position *N*-terminale qui permet d'éviter l'ionisation de l'amine terminale en fonction du pH de l'étude. D'autre part, la position C-terminale étant amidifiée, elle ne peut, pour les mêmes raisons, se retrouver dans un état d'ionisation différent selon le pH. Ceci garantit donc un état d'ionisation constant et une rétention sur la phase stationnaire identique selon le pH de l'étude.

Concernant les peptides acetylés non fluorés **(*S,S,S*)-25**, **(*S,S*)-26** et **(*S,S,S*)-27**, leur indice d'hydrophobie est croissant en fonction de l'hydrophobie de la chaîne latérale de l'aminoacide variant : alanine puis acide α-aminoisobutyrique puis isoleucine, le plus hydrophobe.

Les peptides fluorés **(*R,S,S*)-29** et **(*S,S,S*)-29** possèdent, pour un même pH, des indices d'hydrophobie strictement identiques. La configuration n'influence pas la conformation du peptide et donc, la manière dont ce dernier expose ses chaînes latérales à la phase stationnaire. Néanmoins, la présence du groupement trifluorométhyle influence considérablement la rétention du peptide par rapport à ses analogues non fluorés et en particulier son analogue structural direct comportant un acide α-aminoisobutyrique, puisque les indices d'hydrophobie des tripeptides fluorés sont

nettement supérieurs avec une différence de presque 8 unités. En outre, ces indices sont mêmes légèrement supérieurs à ceux obtenus pour le peptide comportant une isoleucine.

Cette première étude jusqu'alors rapportée concernant la mesure d'indices d'hydrophobie d'aminoacides ou peptides fluorés a permis de fournir des valeurs, obtenues expérimentalement, d'indices représentant l'hydrophobie de peptides comportant un groupement trifluorométhyle. Ces valeurs permettent de constater que la présence du groupement trifluorométhyle augmente en effet drastiquement l'hydrophobie des peptides.

2.2.2. Série déprotégée variant en position centrale

De même qu'en série protégée, les peptides de cette deuxième famille, non protégés, ont été étudiés à pH 2 et à pH 7 (Figure 48).

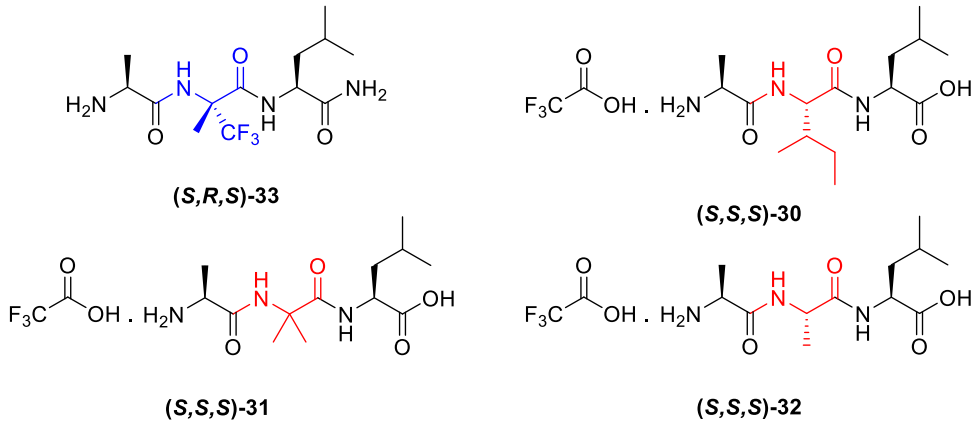


Figure 48 : Tripeptides de la série déprotégée variant en position centrale

Les charges terminales n'étant cette fois-ci pas masquées, la variation de pH va avoir une influence considérable sur la solubilité des peptides dans la phase mobile ainsi que leur rétention sur la phase stationnaire. En particulier, la différence de leur état d'ionisation selon le pH influencera ces paramètres. Tous les peptides variant, dans cette série, par la nature de l'aminoacide central, celui-ci ne peut intervenir sur l'état d'ionisation. Comme dans le cas de la série protégée, seule sa chaîne latérale est susceptible de modifier la rétention et donc, l'hydrophobie du peptide.

2.2.2.1. Valeurs obtenues

A pH 2 acide, tous les peptides, y compris les peptides fluorés, seront sous forme protonée du côté acide et ammonium de trifluoroacétate du côté *N*-terminal (Figure 49). En effet, le pKa d'un acide terminal de peptide est rarement inférieur à 2.

A pH 7 neutre, les fonctions acides terminales seront cette fois sous forme déprotonée, leur pKa étant largement inférieur à 7. Les amines terminales quant à elles, seront également protonées, sous forme de sels d'acétate (Figure 49).

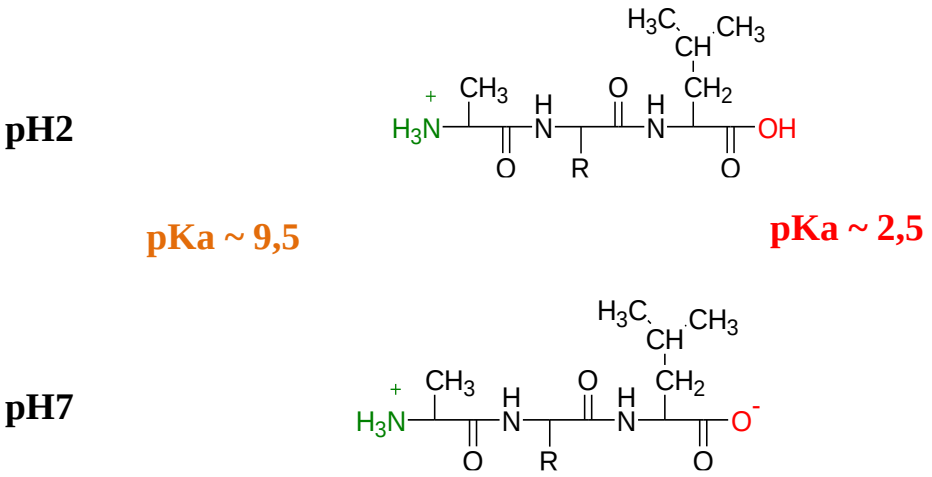


Figure 49 : Etat d'ionisation des fonctions terminales de peptides à pH 2 et pH 7 en fonction de leur pKa

Chaque peptide de cette série a préalablement été analysé pour déterminer les valeurs limites minimale et maximale de la concentration en acétonitrile pouvant être utilisées dans les limites du système. Les Tableaux 15 et 16 suivants résument les valeurs de temps de rétention obtenus pour chaque peptide et pour chaque concentration en acétonitrile utilisée, à pH 2 et à pH 7 respectivement.

	H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OH			H-Ala-Aib-Leu-OH			H-Ala-Ala-Leu-OH			H-Ala-Ile-Leu-OH		
CH_3CN %	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')
12												
13							9,32	1,418	0,152			
15				9,791	2,03	0,308	9,026	0,996	-0,002			
16										10,837	3,827	0,583
17				10,551	1,387	0,142	7,612	0,708	-0,15			
18	10,202	3,147	0,498							9,915	2,619	0,418
20	10,451	2,37	0,375	7,854	0,796	-0,099	10,361	0,444	-0,352	11,701	1,777	0,25
22	11,454	1,715	0,234	8,484	0,58	-0,236						
25	8,554	1,005	0,002									
φ_0	**25,16**			**18,87**			**15,04**			**23,01**		

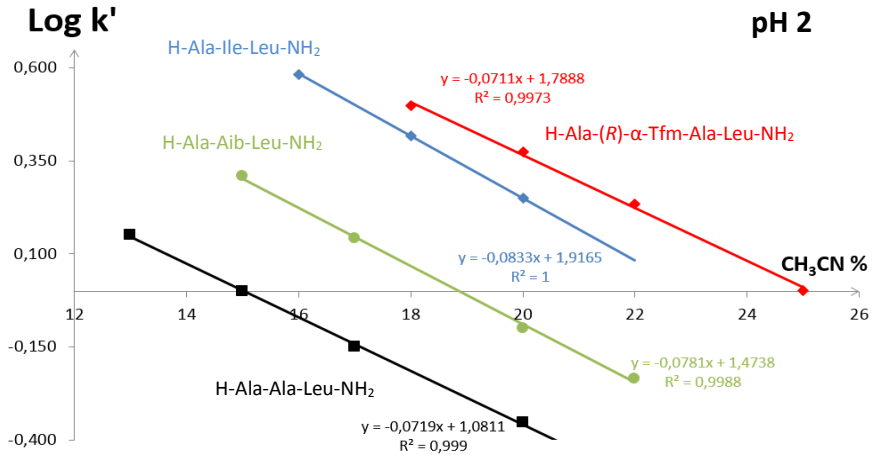
Tableau 15 : Résultats de l'étude d'hydrophobie à pH 2 pour la série de tripeptides déprotégés variant en position centrale

	H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OH			H-Ala-Aib-Leu-OH			H-Ala-Ala-Leu-OH			H-Ala-Ile-Leu-OH		
CH_3CN %	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')
4							8,773	1,011	0,005			
5				13,67	3,457	0,539	7,819	0,789	-0,103			
6							11,285	0,627	-0,203			
6,5												
7				11,741	1,797	0,255	10,175	0,476	-0,323	14,538	5,614	0,749
8				9,199	1,207	0,082				11,188	4,067	0,609
10	12,07	3,395	0,531	11,897	0,761	-0,119				9,276	2,444	0,388
12	13,403	2,154	0,333							10,761	1,601	0,204
13												
14												
15	8,849	1,1	0,042									
17												
18	11,019	0,6	-0,222									
φ_0	**15,56**			**8,92**			**4,06**			**13,76**		

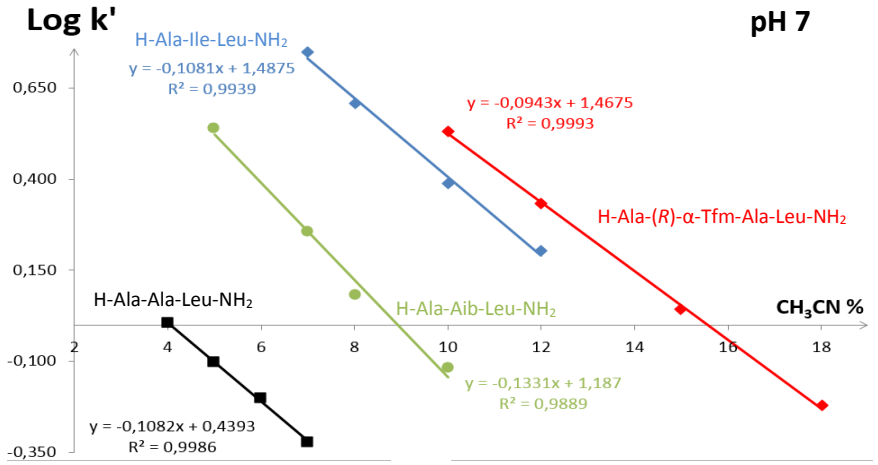
Tableau 16 : Résultats de l'étude d'hydrophobie à pH 7 pour la série de tripeptides déprotégés variant en position centrale

Les valeurs des proportions en acétonitrile utilisées pour cette nouvelle étude, sont considérablement abaissées par rapport à celles employées en série protégée. En effet, alors que la gamme de proportion en acétonitrile s'étendait de 12% à 32%, elle se réduit dans ce cas de 13% à 25% à pH 2 et même de 4% à 18% à pH 7. L'effet des charges terminales a donc bien une influence sur la solubilité et la rétention des peptides.

Tout comme en série protégée acétyle/amide, les temps de rétention sont convertis en leur facteur de capacité k' et logk' respectifs permettant la réalisation de corrélations linéaires avec les proportions en acétonitrile utilisées. Les Graphes 7 et 8 montrent les corrélations des logk' en fonction de la proportion en acétonitrile, pour chaque peptide, aux deux pH étudiés.



Graphe 7



Graphe 8

La corrélation des logk' avec les proportions en acétonitrile utilisées à chaque analyse sont à nouveau linéaires. Les régressions effectuées par traitement informatique permettent de calculer les indices φ_0 de chaque peptide aux deux pH. Ces valeurs figurent dans le Tableau 17 suivant.

	φ_0 (pH 2)	φ_0 (pH 7)	$\Delta\varphi_0$
H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OH **(*S*,*R*,*S*)-33**	25,16	15,56	9,60
H-Ala-Ile-Leu-OH **(*S*,*S*,*S*)-30**	23,01	13,76	9,25
H-Ala-Aib-Leu-OH **(*S*,*S*)-31**	18,87	8,92	9,95
H-Ala-Ala-Leu-OH **(*S*,*S*,*S*)-32**	15,04	4,06	10,98

Tableau 17 : Valeurs des indices d'hydrophobie φ_0 pour chaque peptide de la série de peptides déprotégés variant en position centrale à pH 2 et pH 7

Comparativement à la série de peptides acétylés, les valeurs d'indices d'hydrophobie obtenues à pH 2 et à pH 7 sont cette fois différentes, plus faibles à pH 7. Un écart de 10 unités de valeurs de φ_0 est ainsi observé. Cette variation est due à l'état d'ionisation des peptides qui, déprotégés, ne sont pas protonés de la même manière à pH 2 et à pH 7. En effet, à pH 2, les fonctions amines terminales sont ionisées mais pas les fonctions acides terminales. En revanche, à pH 7, les fonctions *C* et *N*-terminales sont toutes deux ionisées. Ainsi, dans ce dernier cas, la présence de ces deux charges diminue la rétention des peptides par la phase stationnaire apolaire de type C_{18}, ils sont plus rapidement élués et possèdent donc un indice d'hydrophobie φ_0 plus faible. Cependant, tout comme en série acétyle/amide (paragraphe 2.2.1.), les peptides non fluorés **(*S*,*S*,*S*)-30, (*S*,*S*)-31** et **(*S*,*S*,*S*)-32**, possèdent des indices d'hydrophobie croissants en fonction de l'hydrophobie de la chaîne latérale de l'aminoacide variant : alanine puis acide α-aminoisobutyrique puis isoleucine, le plus hydrophobe. La présence du groupement trifluorométhyle influence donc également considérablement la rétention du peptide par rapport à ses analogues non fluorés et en particulier son analogue structural direct comportant un acide α-aminoisobutyrique, puisque les indices d'hydrophobie des tripeptides fluorés sont nettement supérieurs avec une différence de plus de 6 unités. Par ailleurs, ces indices sont à nouveau légèrement supérieurs à ceux obtenus pour le peptide comportant une isoleucine.

2.2.2.2. Conclusion

Cette deuxième étude de mesure de l'hydrophobie de peptides fluorés, réalisée sur une série de peptides dont les positions terminales ne sont pas protégées, révèle à nouveau l'effet important du fluor sur l'augmentation de l'hydrophobie. Le peptide incorporant une α-Tfm-Alanine en position centrale est le plus hydrophobe de la série, y compris plus hydrophobe que le peptide comportant une isoleucine. Comparativement à son analogue structural incorporant un Aib, l'indice d'hydrophobie est supérieur de 6 unités. L'effet hydrophobe du groupement trifluorométhyle s'opère donc également lorsque l'aminoacide fluoré est à l'intérieur de la chaîne peptidique.

2.2.3. Série déprotégée variant en position *N*-terminale

Une dernière série de tripeptides déprotégés a été étudiée (Figure 50). Elle diffère de la précédente par la position de l'aminoacide variant qui se trouve cette fois-ci en position *N*-terminale. Ainsi, l'effet du groupement trifluorométhyle aura non seulement une influence sur l'hydrophobie des peptides mais il est également susceptible de modifier l'état d'ionisation de la fonction terminale par rapport aux peptides non fluorés pour un même pH.

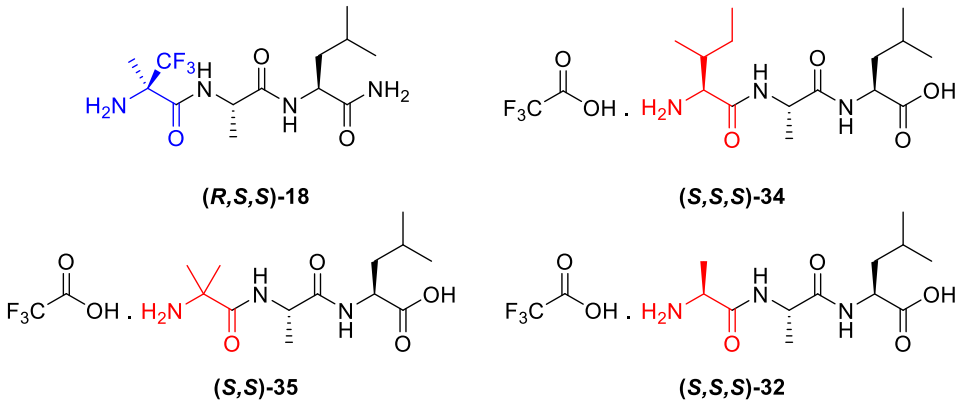


Figure 50 : Tripeptides de la série déprotégée variant en position *N*-terminale

En effet, la présence de trois atomes de fluor en position α d'un aminoacide libre entraine, dans le cas de l'α-Tfm-Alanine une baisse de 4,5 unités de pKa de l'ammonium et de 1,1 unité de pKa pour la fonction acide comparativement à un résidu alanine (cf chapitre I, Tableau 1).[23] Ainsi, l'α-Tfm-Alanine étant dans le cas de cette dernière série, placée en position *N*-terminale de peptides, l'état d'ionisation de sa fonction amine devrait également influer sur sa rétention. De manière similaire aux deux séries précédentes, les peptides de cette dernière famille, non protégés, ont été étudiés à pH 2 et à pH 7.

2.2.3.1. Valeurs obtenues

Les Tableaux 18 et 19 suivants rassemblent les valeurs de temps de rétention mesurées obtenues suivant le mode opératoire déjà utilisé. Préalablement, chaque composé a fait l'objet d'une étude préliminaire permettant de déterminer les pourcentages d'acétonitrile de la phase mobile minimal et maximal permettant l'élution des peptides dans les limites des conditions de débit et de temps d'analyse sélectionnées.

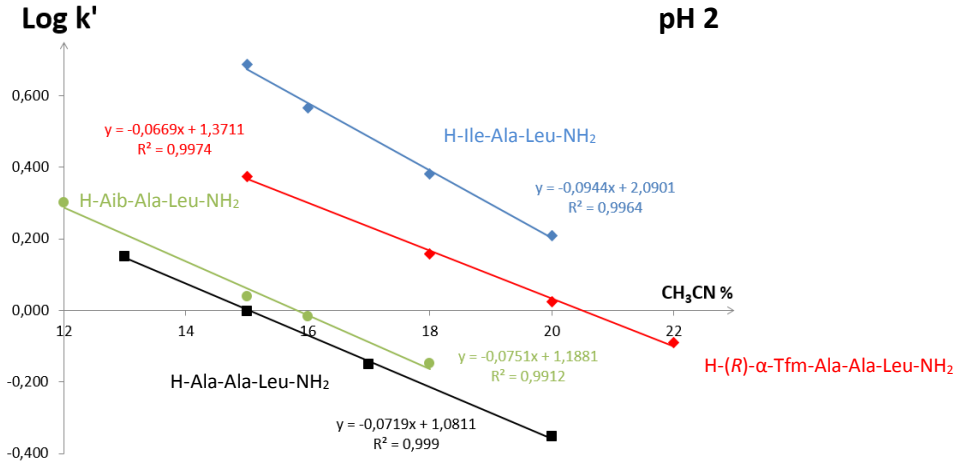
	H-(*R*)-α-Tfm-Ala-ala-Leu-OH			H-Aib-Ala-ala-Leu-OH			H-Ala-Ala-Leu-OH			H-Ile-Ala-Leu-OH		
CH_3CN %	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')
12				13,103	1,996	0,3						
13							9,32	1,418	0,152			
15	7,673	2,371	0,375	8,995	1,091	0,038	9,026	0,996	-0,002	13,188	4,864	0,687
16				10,433	0,964	-0,016				10,525	3,688	0,567
17							7,612	0,708	-0,15			
18	7,582	1,436	0,157	11,865	0,709	-0,149				9,271	2,407	0,382
20	8,706	1,058	0,024				10,361	0,444	-0,352	10,988	1,619	0,209
22	12,365	0,81	-0,091									
25												
φ_0	**20,49**			**15,82**			**15,04**			**22,14**		

Tableau 18 : Résultats de l'étude d'hydrophobie à pH 2 pour la série de tripeptides déprotégés variant en position *N*-terminale

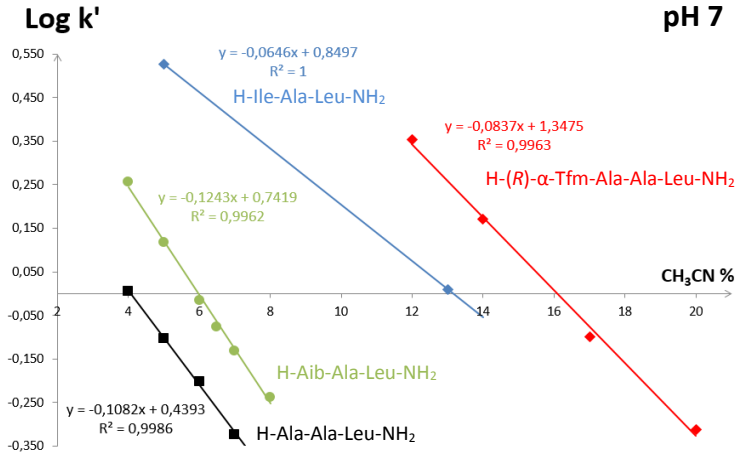
	H-(*R*)-α-Tfm-Ala-ala-Leu-OH			H-Aib-Ala-Leu-OH			H-Ala-Ala-Leu-OH			H-Ile-Ala-Leu-OH		
CH_3CN %	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')	t_r	k'	log(k')
4				10,871	1,805	0,257	8,773	1,011	0,005			
5				9,865	1,313	0,118	7,819	0,789	-0,103	13,297	3,361	0,526
6				8,321	0,964	-0,016	11,285	0,627	-0,203			
6,5				12,763	0,84	-0,076						
7				11,993	0,739	-0,131	10,175	0,476	-0,323			
8				6,623	0,578	-0,238						
12	9,832	2,26	0,354									
13										8,35	1,022	0,009
14	10,255	1,485	0,172									
15												
17	7,325	0,795	-0,1									
18												
20	6,058	0,488	-0,312									
φ_0	**16,1**			**5,97**			**4,06**			**13,15**		

Tableau 19 : Résultats de l'étude d'hydrophobie à pH 7 pour la série de tripeptides déprotégés variant en position *N*-terminale

Les valeurs des proportions en acétonitrile utilisées pour cette dernière étude, sont comparables à celles utilisées pour l'élution des peptides de la série déprotégée précédente. Ainsi, la gamme de proportion d'acétonitrile s'étendait de 12% à 22%, à pH 2 et de 4% à 20% à pH 7. Comparativement à la première série de peptides protégés, ces valeurs sont donc nettement inférieures (cf 2.1.1.) ce qui confirme l'effet des charges sur la solubilité et la rétention des peptides de manière générale. Les temps de rétention sont ensuite convertis en leur facteur de capacité k' et logk' respectifs permettant la réalisation de corrélations linéaires avec les proportions en acétonitrile utilisées. Les Graphes 9 et 10 montrent les corrélations des logk' en fonction de la proportion en acétonitrile, pour chaque peptide, aux deux pH étudiés.



Graphe 9



Graphe 10

Les corrélations des logk' avec les proportions en acétonitrile utilisées pour chaque analyse sont à nouveau linéaires. Les régressions effectuées par traitement informatique permettent de calculer les indices φ_0 de chaque peptide aux deux pH. Ces valeurs figurent dans le Tableau 20 suivant.

	φ_0 (pH 2)	φ_0 (pH 7)	$\Delta\varphi_0$
H-(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-Leu-OH **(*R,S,S*)-18**	20,49	16,10	4,39
H-Ile-Ala-Leu-OH **(*S,S,S*)-34**	22,14	13,15	8,99
H-Aib-Ala-Leu-OH **(*S,S*)-35**	15,82	5,97	9,85
H-Ala-Ala-Leu-OH **(*S,S,S*)-32**	15,04	4,06	10,98

Tableau 20 : Valeurs des indices d'hydrophobie φ_0 pour chaque peptide de la série de peptides déprotégés variant en position N-terminale à pH 2 et pH 7

De manière similaire à la série de peptides déprotégés précédente, les valeurs d'indices d'hydrophobie obtenues à pH 2 et à pH 7 sont à nouveau respectivement différentes, plus faibles à pH 7. Un écart de 10 unités de valeurs de φ_0 entre ces deux pH est ainsi observé pour les peptides non fluorés. Cette variation est due à l'état d'ionisation des peptides qui, déprotégés, ne seront pas protonés de la même manière à pH 2 et à pH 7.

Cependant, une nette différence, en comparaison avec les deux séries de peptides précédentes, protégées ou non, est à relever concernant la valeur d'indice d'hydrophobie du peptide fluoré **(*R,S,S*)-18** à pH 2. En effet, si à pH 7 ce dernier possède de nouveau l'indice d'hydrophobie le plus élevé de la série (φ_0 = 16,1), ce n'est pas le cas à pH 2, comme cela était observable dans le cas des autres séries. Dans ce cas, son indice d'hydrophobie est légèrement inférieur à celui de **(*S,S,S*)-34** incorporant un résidu isoleucine et le plus hydrophobe de cette série. Néanmoins, cette valeur reste nettement supérieure à celle du peptide **(*S,S*)-34** incorporant un Aib.

L'hypothèse selon laquelle le groupement trifluorométhyle positionné en α de l'α-Tfm-Alanine influencerait l'état d'ionisation de la fonction *N*-terminale de ce peptide fluoré permettrait d'expliquer cette baisse de φ_0. A pH 2, le caractère cationique de l'azote de l'α-Tfm-Alanine serait augmenté en présence du groupement trifluorométhyle. Moins retenu par la phase stationnaire apolaire, l'hydrophobie se retrouve diminuée. Cependant, cette diminution de la valeur de φ_0 n'étant pas observable à pH 7, aucune explication rationnelle ne permet à l'heure actuelle d'interpréter objectivement ces résultats.

2.2.3.2. Conclusion

Hormis une légère baisse de la valeur de l'indice d'hydrophobie φ_0 du peptide fluoré à pH 2, la contribution du groupement trifluorométhyle à l'augmentation de l'hydrophobie du peptide est nette. Effectivement, le peptide fluoré compte parmi les plus hydrophobes, avec un indice

d'hydrophobie dont la valeur à pH 7 est presque triplée par rapport au peptide analogue structuralement.

3) Conclusion du chapitre

Les interactions hydrophobes sont, parmi les différents types d'interactions protéine-protéine, celles supposées contribuer le plus au repliement d'une protéine dans l'espace ou à ses interactions avec son environnement, notamment les autres protéines comme les récepteurs. Pouvoir mesurer localement l'hydrophobie de fragments peptidiques de protéines représente donc un enjeu considérable pour appréhender et anticiper ces interactions locales. L'incorporation d'aminoacides fluorés au sein de chaînes peptidiques a déjà été réalisée et a montré favoriser ou stabiliser les structurations secondaires, et ce, par interactions hydrophobes.

Or, jusqu'à présent, aucune étude d'hydrophobie de ces dérivés fluorés n'est venue corréler les résultats obtenus à des valeurs concrètes, mesurées d'hydrophobie. Notre étude, réalisée sur des tripeptides incorporant une α-Tfm-Alanine en différentes positions, a permis de démontrer, pour la première fois, par mesure par HPLC en phase inverse d'indices dérivés des temps de rétention, que l'incorporation d'un groupement trifluorométhyle en position α augmente considérablement l'hydrophobie de peptides fluorés. Par comparaison avec les peptides analogues comportant un acide α-aminoisobutyrique, une alanine ou une isoleucine, les valeurs de φ_0 obtenues indiquent clairement l'influence de ce groupement. Une échelle des valeurs de φ_0 permet ainsi de visualiser l'influence du groupement trifluorométhyle par rapport aux autres aminoacides naturels (Figure 51).

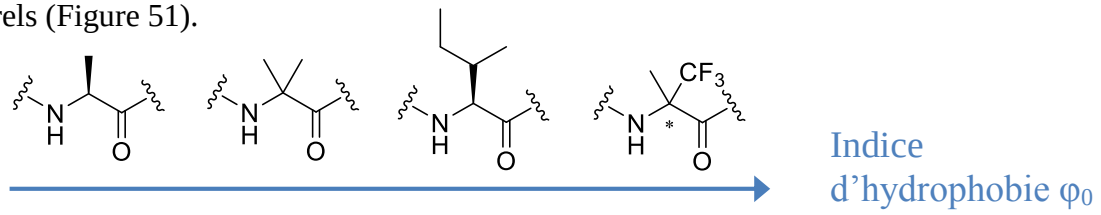


Figure 51 : Echelle des valeurs de φ_0 pour les trois séries de tripeptides synthétisées

Dans toutes les séries de peptides étudiées, les peptides trifluorométhylés possèdent un indice d'hydrophobie supérieur à ceux des dérivés non fluorés (hormis pour la série de tripeptides déprotégés variant en position *N*-terminale à pH 2) y compris supérieurs aux peptides incorporant une isoleucine, qui est l'aminoacide aliphatique le plus hydrophobe.

CHAPITRE IV

CONSÉQUENCES DES INTERACTIONS PEPTIDES FLUORÉS-PROTÉINES SUR L'INHIBITION DE PROCESSUS BIOLOGIQUES

Plus d'une vingtaine de pathologies graves sont causées par l'agrégation de peptides ou protéines sous forme de dépôts amyloïdes insolubles.[152,153,154] Le terme amyloïde se réfère ainsi, à des dépôts extra ou intra cellulaires principalement composés de protéines assemblées en fibres. Ces fibres présentent la particularité structurale d'être composées de feuillets β croisés (feuillets β intermoléculaires perpendiculaires à l'axe de la fibre).[155]

Parmi ces maladies, on retrouve la maladie d'Alzheimer, de Creutzfeldt-Jakob, de Parkinson ou le diabète de type II. La formation des fibres amyloïdes est associée à une mortalité cellulaire et une perte de fonction du tissu affecté. L'un des enjeux majeurs de la biologie moderne est de comprendre les bases moléculaires des processus conduisant au mauvais repliement des protéines et à leur agrégation. Jusqu'à présent, aucun médicament n'existe pour soigner ces maladies dues au mauvais repliement protéique. L'objectif de ce projet a été d'étudier l'interaction entre les peptides amyloïdes et de nouvelles molécules organiques capables d'agir sur la cinétique de formation des fibres amyloïdes. Il s'agissait principalement d'analyser l'effet de l'incorporation d'acides aminés α-trifluorométhylés énantiopurs de configuration (*R*) ou (*S*) dans des chaînes peptidiques, notamment sur la capacité à interagir avec des structures en feuillets β. Ces études d'interactions ont été réalisées à l'Université Pierre et Marie Curie par Alexandra Botz sous la direction du Dr. Lucie Khemtemourian (UMR 7203 Université Pierre et Marie Curie). Les diverses techniques biophysiques utilisées pour ce projet ont permis de suivre la cinétique de formation des fibres amyloïdes par fluorescence de la Thioflavine-T, d'étudier la structure secondaire du peptide par dichroïsme circulaire (DC), de caractériser les stades d'agrégation par RMN et enfin d'observer la morphologie électronique à transmission (TEM).

Par ailleurs, afin d'étudier la stabilité métabolique de petits peptides fluorés, des expériences de digestion enzymatique ont été réalisées en présence de deux enzymes : la pepsine porcine et la trypsine.

La pepsine est une endoprotéase peu spécifique clivant de préférence les liaisons peptidiques à proximité d'aminoacide aromatiques hydrophobes. Les séquences peptidiques envisagées pour l'étude incluent donc une α-Tfm-Alanine à proximité de ce type d'aminoacides. Les expériences de digestion ont été réalisées en comparaison avec un peptide analogue incorporant à sa place un résidu Alanine. Le suivi de ces expériences a été réalisé par l'observation

[152] Chiti, F.; Dobson, C. M. *Annu. Rev. Biochem*. **2006**, *75,* 333-366.
[153] Aguzzi, A.; O'Connor, T. *Nature Rev. Drug. Discov*. **2010**, *9*, 237–248.
[154] Bartolini, M.; Andrisano, V. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1018–1035.
[155] Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A. Ø.; Riekel, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D. *Nature* **2005**, *435*, 773–778.

par UPLC de la disparition des substrats et de l'apparition de fragments de digestion avec détermination de leur séquence.

Concernant la trypsine, qui est enzyme clivant les liaisons peptidiques dans lesquelles un aminoacide basique engage sa fonction acide, deux peptides incorporant une α-Tfm-Alanine du côté *N*-terminal d'une arginine ont été synthétisés. L'analyse de leur digestion par la trypsine a été réalisée par le Dr. Dalvit de l'Université de Neuchâtel par une technique de RMN ^{19}F développée récemment et appelée 3-FABS.[156]

I) La maladie d'Alzheimer, une maladie de mauvais repliement protéique

1) Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer, est l'un des troubles neurodégénératifs les plus répandus affectant 30 millions de personnes dans le monde.[157,158] Cette maladie possède une incidence croissante en Europe à cause du vieillissement de la population et représente un fléau majeur pour les systèmes de santé. Elle est la quatrième cause de mortalité en Europe et le nombre de personnes affectées pourrait tripler d'ici 2050.

La maladie d'Alzheimer altère la mémoire et les fonctions cognitives des malades et conduit progressivement à une démence, une déchéance physique et une perte d'autonomie, puis à la mort de l'individu atteint. Au niveau physiopathologique, la maladie d'Alzheimer est associée à l'accumulation progressive de deux protéines dans le cerveau, la protéine β-amyloïde (Aβ), présente sous forme d'agrégats extraneuronaux formant des amas couramment appelés « plaques séniles », et la protéine tau sous une forme anormalement hyperphosphorylée produisant des enchevêtrements neurofibrillaires intraneuronaux (NFT pour neurofibrillary tangles), qui vont mener progressivement à des dégâts neuronaux, axonaux et synaptiques.

Ces changements neurologiques sont présents dans le cerveau plusieurs années avant l'apparition des symptômes cliniques de la maladie. Les NFT sont initialement localisés dans le lobe temporal moyen (cortex entorhinal et hippocampe) puis s'étendent dans les régions corticales associatives puis dans l'ensemble du cortex cérébral, alors que les plaques séniles sont plus disséminées dans le cortex. Le délai entre les lésions neurologiques de la maladie et l'apparition

[156] Dalvit, C. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc*. **2007**, *51*, 243-271.
[157] Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H. *Lancet* **2006**, *368*, 387-403
[158] Abbott, A. *Nature* **2011**, *475*, S2-S4.

des troubles cognitifs suggère que les effets toxiques de la protéine Aβ et/ou des NFT érodent progressivement le cerveau jusqu'à ce qu'un seuil clinique soit dépassé et qu'apparaissent les premiers symptômes amnésiques.

1.1. Les fibres amyloïdes

Les dépôts amyloïdes nommés fibres amyloïdes ou plaques amyloïdes ont été les premières décrites. Il s'agit de dépôts extracellulaires que l'on retrouve entre les neurones et qui apparaissent comme des masses sphériques d'un diamètre de 5 à 100 micromètres. Ces fibres sont des solides non cristallins et non solubles, ce qui les rend incompatibles avec les techniques de détermination structurale habituellement utilisées telles que la cristallographie par rayons X ou la RMN en phase liquide. D'après les études de diffraction des rayons X et les mesures de RMN en phase solide (couplage ^{13}C-^{13}C et ^{15}N-^{13}C), les fibres amyloïdes auraient une structure en feuillets β croisés dans laquelle les segments tressés sont perpendiculaires et les liaisons hydrogènes intermoléculaires parallèles à l'axe de la fibre (Figure 52).[159,160] Ces structures en feuillets β seraient essentiellement stabilisées par des interactions hydrophobes.

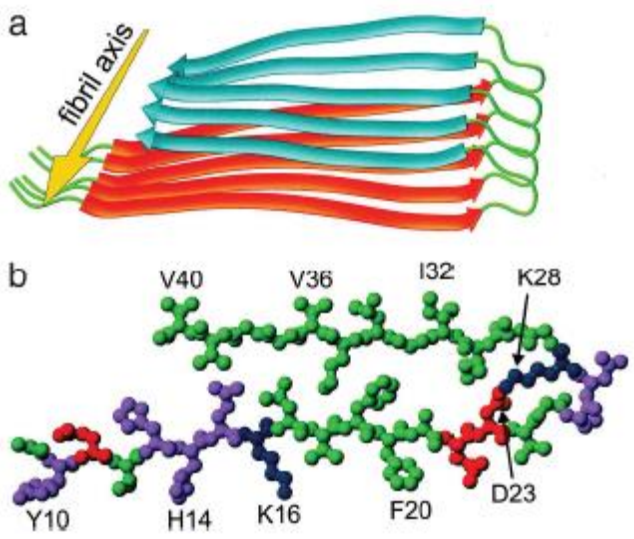


Figure 52 : Modèle structural des feuillets β croisés parallèles formés par le peptide Aβ40. a) Modèle ruban b) Modèle atomique (vert : hydrophobe ; magenta : polaire ; rouge : chargé négativement ; bleu : chargé positivement) (d'après Petkova et al.[160])

Le constituant principal de ces fibres est un peptide de 40 à 42 acides aminés, appelé peptide amyloïde Aβ. Celui-ci est formé après clivage séquentiel par diverses sécrétases, du peptide précurseur amyloïde (APP) qui est une protéine transmembranaire de fonction

[159] Miller, Y.; Ma, B.; Nussinov, R. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4820-4838.
[160] Petkova, A. T.; Ishii, Y.; Balbach, J. J.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Delaglio, F.; Tycko, R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 16742-16747.

indéterminée et dont le gène est situé sur le chromosome 21.[161] Plusieurs isoformes de ce peptide existent, les plus retrouvées sont les protéines Aβ 40 et Aβ42, de 40 et 42 aminoacides respectivement.[162] La forme courte Aβ40 est produite dans le système *trans*-golgien alors que la forme plus longue Aβ42 est formée par clivage par les enzymes β- et γ-sécrétases (Figure 53) dans le réticulum endoplasmique des cellules.

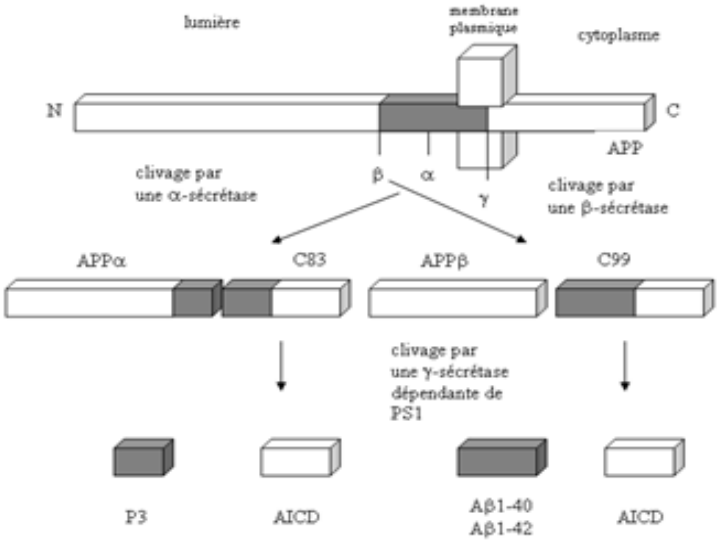


Figure 53 : Processus protéolytique de l'AAP

Ces peptides circulent naturellement dans le plasma, le fluide cérébrospinal et le liquide interstitiel du cerveau, le plus souvent sous forme soluble Aβ 40. Les dépôts de fibres amyloïdes retrouvées dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer sont eux constitués d'un mélange de peptides Aβ40 et Aβ42. Bien qu'Aβ40 soit plus abondant dans le cerveau qu'à Aβ42, il est moins toxique, en partie parce que sa cinétique d'agrégation est plus lente *in vivo* pour conduire à la formation de plaques amyloïdes. Les plaques sont composées (Figure 54):

- Au centre : de peptides Aβ qui s'agrègent entre eux (du fait de leur structure et leur insolubilité) et forment des faisceaux de filaments droits d'un diamètre de 6 à 9 nanomètres. Ce cœur amyloïde est aussi en contact avec des cellules microgliales responsables d'une réaction inflammatoire modérée.

- En périphérie : des prolongements nerveux (surtout axones) qui s'enroulent autour du cœur interne.

Elles apparaissent d'abord dans les cortex préfrontal et temporal, et envahissent rapidement le néocortex, puis atteignent les noyaux sous corticaux, le tronc cérébral et le cervelet.

[161] Mori, H.; Takio, K.; Ogawara, M.; Selkoe, D. J. *J. Biol. Chem*. **1992**, *267*, 17082-17086.
[162] Yin, Y. I.; Bassit, B.; Zhu, L.; Yang, X.; Wang, C.; Li, Y.-M. *J. Biol. Chem*. **2007**, *282*, 23639-23644

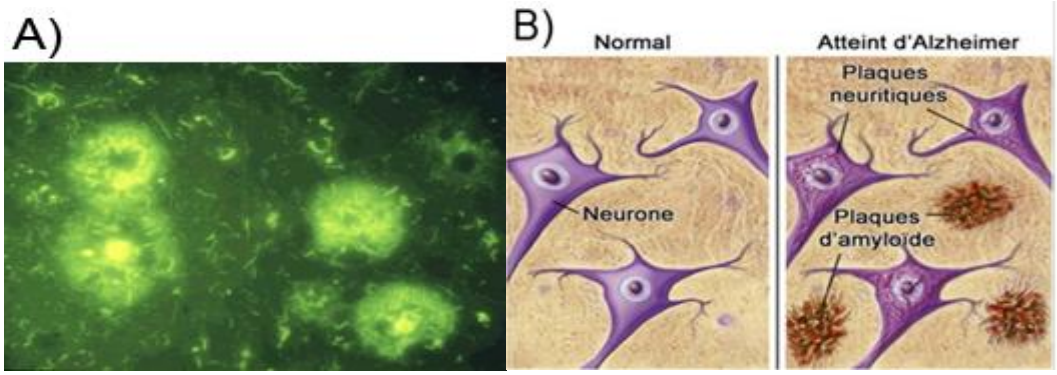


Figure 54 : A) Coloration des plaques amyloïdes à la thioflavine, B) Localisation et schématisation des plaques amyloïdes.

1.2. Les dégénérescences neurofibrillaires

Les **dégénérescences neurofibrillaires** ou écheveaux ou enchevêtrements neurofibrillaires, sont aussi dûs à l'agrégation anormale d'une protéine, la protéine Tau, mais à l'intérieur des neurones cette fois. Ce sont des amas de paires de filaments hélicoïdaux de microtubules associés à la protéine Tau sous une forme anormalement hyperphosphorylée.

La protéine Tau est normalement associée perpendiculairement aux microtubules, filaments du cytosquelette jouant un rôle prépondérant dans les mécanismes de transport intraneuronal du corps cellulaire vers les dendrites et les terminaisons de l'axone. Normalement, des protéines Tau se détachent périodiquement des microtubules, mais sont remplacées et rapidement dégradées chez le sujet sain. La maladie d'Alzheimer est caractérisée par des protéines Tau se détachant des microtubules et restant dans le milieu intracellulaire. Elles ne sont pas toutes dégradées et finissent par s'agréger et former les neurofibrilles. Trop de neurofibrilles bloquent le fonctionnement du neurone car elles ne permettent pas le transport axonal nécessaire à son activité. Les neurofibrilles compriment le neurone et provoquent une mort neuronale par apoptose.

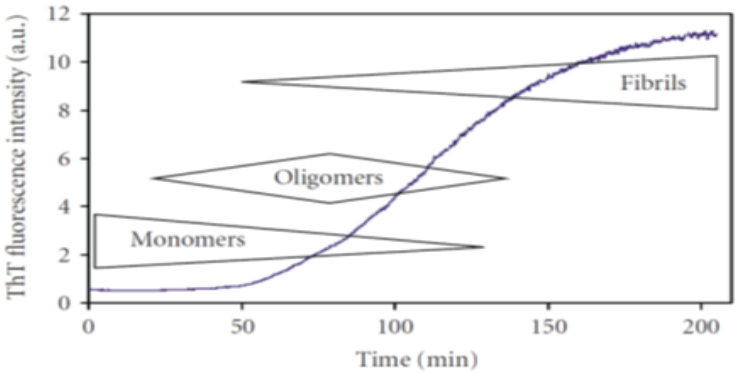
Les enchevêtrements neurofibrillaires sont révélés par des imprégnations argentiques ou avec des anticorps anti-tau. Ces enchevêtrements sont également observés, comme nous l'avons vu, dans les neurites dystrophiques qui forment une couronne autour des plaques amyloïdes.

2) Au niveau moléculaire

2.1. Mécanisme de l'agrégation

Les peptides amyloïdes forment des dépôts protéiques extracellulaires en feuillets β. Les peptides amyloïdes possèdent la caractéristique de s'auto-associer pour former des fibres amyloïdes. Ce processus comprend trois étapes : la première étape correspond à une phase de

latence, durant laquelle le peptide, présent sous forme monomérique, s'auto-associe pour former des espèces oligomériques ; la seconde étape est une phase d'élongation, les oligomères continuent à recruter du peptide monomérique pour conduire à la formation de fibres amyloïdes ; enfin un plateau est atteint lorsque la fibrillation du peptide est parvenue à un état d'équilibre, et que la quantité de fibres est constante (Graphe 11).



Graphe 11 : Différentes phases de la formation des fibres amyloïdes observables par fluorescence de la ThT

Bien que ce processus de formation de ces fibres amyloïdes n'ait pas encore été complètement élucidé, il est admis que ce processus implique un état de transition en solution passant de structures aléatoires non ordonnées à des conformations en feuillet β croisés qui s'associent entre eux perpendiculairement à l'axe de la fibre. De récentes études suggèrent que la toxicité de ces peptides amyloïdes vient de la formation des fibres plutôt que des oligomères.[163,164]

Luhrs *et al*. ont présenté une structure tridimensionnelle des fibrilles d'Aβ1-42 obtenue à partir d'une étude RMN basée sur des échanges hydrogène-deutérium en solution.[165] Alors que les résidus 1-17 ne sont pas structurés, les résidus 18-42 forment un motif constitué de deux feuillets β parallèles, de type : feuillet β1 (résidus 18-26) – boucle – feuillet β2 (résidus 31-42). Au moins deux molécules d'Aβ42 sont nécessaires pour construire la structure répétitive du profilament. Le contact intermoléculaire entre les chaînes secondaires est réalisé entre les résidus impairs du feuillet β1 de la n-ième molécule (résidus L17, F19 et A21) et les résidus pairs du feuillet β2 de la molécule (n-1) d'Aβ1-42 (résidus L34, V36 et V40) grâce à des interactions hydrophobes. La région de la boucle constituée des résidus 27-30 forme des ponts salins. Ce modèle d'interaction

[163] Bucciantini, M. M.; Giannoni, E. E.; Chiti, F. F.; Baroni, F. F.; Formigli, L. L.; Zurdo, J. J.; Taddei, N. N.; Ramponi, G. G.; Dobson, C. M. C.; Stefani, M. M. *Nature* **2002**, *416*, 507-511.
[164] Butterfield, S. M.; Lashuel, H. A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 5628-5654.
[165] Luhrs, T.; Ritter, C.; Adrian, M.; Riek-Loher, D.; Bohrmann, B.; Dobeli, H.; Schubert, D.; Riek, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 17342-17347.

explique la sélectivité de la séquence, la coopérativité et l'axe unidirectionnel de croissance de la fibrille d'Aβ. Le monomère Aβ entrant se lie d'abord à la surface hydrophobe des résidus 17-21 d'une des extrémités désappariée du protofilament puis le complexe formé est davantage stabilisé grâce à la formation d'un pont salin intermoléculaire. Cependant, le monomère nouvellement additionné peut encore se dissocier. Les inhibiteurs des agrégats β-amyloïdes comportant un segment 17-21 d'Aβ se lient probablement à la surface hydrophobe des résidus 17-21 de la fibre et bloquent ainsi l'accès aux sites d'autres molécules d'Aβ nécessaires à son extension.

2.2. Stratégies thérapeutiques

Etudier et moduler le processus de formation des fibres pourraient contribuer à anticiper leur formation et éventuellement empêcher le développement de la maladie d'Alzheimer. Diverses stratégies thérapeutiques ont vu le jour afin de diminuer le niveau de peptide Aβ42 *in vivo*. L'inhibition de sa production, l'augmentation de sa clairance, ou bien dans le domaine de l'immunothérapie avec l'émergence d'anticorps anti Aβ42 ont été exploités. Cependant, ces pistes n'ont pas permis à ce jour le développement de thérapies efficaces. Il serait aussi intéressant de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de la formation des fibres amyloïdes, et de trouver des moyens d'inhiber les interactions protéines-protéines en cause.

Différentes approches visant à empêcher l'agrégation des monomères solubles de Aβ peuvent être envisagées, soit par stabilisation des conformations natives soit en empêchant les interactions intermoléculaires sous forme de feuillets en utilisant des ligands de feuillets β.

Ainsi, un moyen d'étudier les mécanismes à l'origine de la formation de fibres amyloïdes et plus précisément des feuillets β serait de développer des ligands de ces feuillets capables de moduler ou d'inhiber leur formation. Les peptides et peptidomimétiques capables d'adopter une structure en feuillet β ont été rarement étudiés comme ligands de feuillets β et donc comme inhibiteurs de l'agrégation de peptides amyloïdes. Cependant, des résultats prometteurs ont été obtenus avec de tels peptidomimétiques par Teplow *et al.*[166] et Nowick *et al.*[167] qui ont décrit les structures et les propriétés inhibitrices de mimes de feuillets β amyloïdes à réduire l'agrégation de différentes protéines amyloïdes (peptide β amyloïde associé à la maladie d'Alzheimer, β 2-microglobuline associée à l'amylose liée à la dialyse, α-synucléine associée à la maladie de

[166] Yamin, G.; Ruchala, P.; Teplow D. B. *Biochemistry* **2009**, *48*, 11329–11331.
[167] Cheng, P.-N.; Liu, C.; Zhao, M.; Eisenberg D.;. Nowick, J. S. *Nature Chemistry*. **2012**, *4*, 927-933.

Parkinson, polypeptide IAPP (Islet Amyloid Polypeptide) associé au diabète de type II, les protéines prion et Tau qui forment des enchevêtrements neurofibrillaires).[167] Ainsi, pouvoir concevoir des ligands de feuillets β de sorte à ce qu'ils interagissent avec celui-ci et l'empêchent de s'agréger représente une opportunité thérapeutique intéressante.

3) Intérêt potentiel de petits peptides fluorés pour l'inhibition de l'agrégation du peptide Aβ

Dans le cadre d'une collaboration avec les Dr. L. Khemtemourian et O. Lequin de l'Université Pierre et Marie Curie, nous avons alors envisagé de synthétiser des petits peptides fluorés capables d'interagir de la sorte avec cette séquence hydrophobe particulière de Aβ40/42 : KLVFF (Figure 55).

D-A-E-F-R-H-D-S-G-Y-E-V-H-H-Q-K-L-V-F-F-A-E-D-V-G-S-N-K-G-A-I-I-G-L-M-V-G-GV-V-I-A

Figure 55 : Séquence de Aβ42 montrant la séquence particulière hydrophobe d'intérêt KLVFF

. Les propriétés que confère la présence de fluor et, plus particulièrement, un groupement trifluorométhyle en position α d'aminoacides, à la chaîne peptidique au sein de laquelle ils sont incorporés (hydrophobie, augmentation potentielle du caractère donneur de liaison hydrogène des fonctions voisines, contrôle conformationnel, stabilité protéolytique) pourraient favoriser les interactions peptide fluoré/peptide amyloïde. Les peptides et peptidomimétiques fluorés n'ayant, à ce jour, pas encore été étudiés comme modulateurs d'agrégations protéiques, nous avons décidé d'explorer cette voie. Des études récentes concernant le repliement de protéines en présence de composés organofluorés non peptidiques ont cependant été réalisées. Elles ont permis de mettre en évidence le repliement sous forme d'hélices α de monomères de peptides Aβ solubles en présence de surface poly(tétrafluoroéthylène).[168] Des résultats similaires sont obtenus dans des solvants trifluorométhylés.[169] Par ailleurs, des séries de petits composés organofluorés indoliques ont été évalués comme inhibiteurs de fibrillogénèse Aβ40 et ont montré pour certaines d'entre elles une inhibition presque totale de la formation de fibres (Figure 56).[170]

[168] Giacomelli, C. E.; Norde, W. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1719-1726.
[169] Vieira, E. P.; Hermel, H.; Mohwald, H. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1645*, 6-14.
[170] Török, M.; Abid, M.; Mhadgu, S. C.; Török, B. *Biochemistry* **2006**, *45*, 5377-5383.

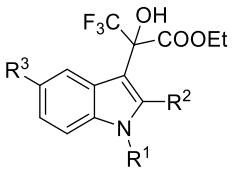


Figure 56 : Inhibiteurs de fibrillogénèse de la famille des esters de l'acide trifluorohydroxyl-indolyl-propionique

En se basant sur l'augmentation d'hydrophobie des petits peptides incorporant des aminoacides trifluorométhylés, nous avons envisagé la synthèse de tels peptides dans le but d'étudier leurs éventuelles interactions avec les peptides amyloïdes. Dans le cas des peptides Aβ40 et Aβ42 ceci permettrait d'empêcher son agrégation sous forme de fibrilles retrouvées dans la maladie d'Alzheimer.

3.1. Séquences peptidiques envisagées

Les peptides envisagés pour l'étude d'inhibition de l'agrégation de Aβ sont des tripeptides incorporant une α-Tfm-Alanine de configuration (*R*) ou (*S*), ainsi que leurs analogues structuraux non fluorés comportant à la place de cet aminoacide fluoré, un acide α-aminoisobutyrique (Aib) ou une alanine (Figure 57).

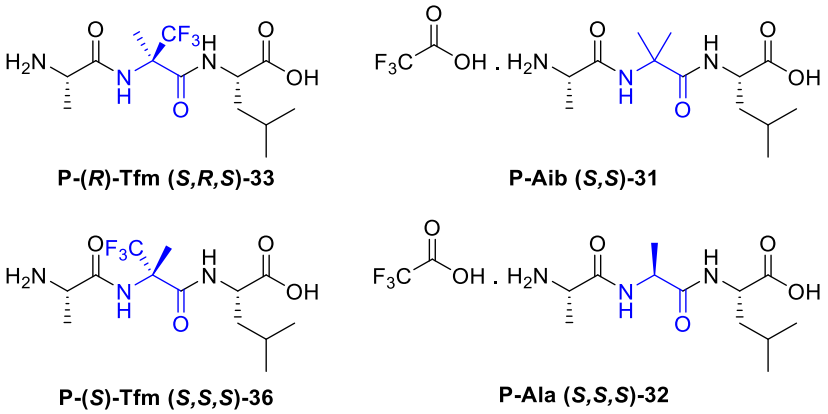


Figure 57 : Tripeptides étudiés dans le cadre de l'inhibition de l'agrégation du peptide Aβ

La capacité de ces peptides fluorés, par rapport à leurs analogues non fluorés, à interagir avec les protéines et à inhiber leur agrégation a été étudiée au moyen de différentes techniques énoncées précédemment (dichroïsme circulaire, la fluorescence à l'aide de thioflavine (ThT) et TEM). Notre objectif est d'observer l'influence des petits peptides fluorés sur l'agrégation de Aβ.

3.2. Synthèse des peptides

3.2.1. Synthèse des peptides fluorés (*S*,*R*,*S*)-33 (P-(*R*)-Tfm) et (*S*,*S*,*S*)-36 (P-(*S*)-Tfm)

La synthèse par SPPS des peptides fluorés **(*S*,*R*,*S*)-33** et **(*S*,*S*,*S*)-36** incorporant une α-Tfm-Alanine de configuration (*R*) ou (*S*) en position centrale du peptide ne peut pas être envisagée. En effet, le couplage de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine étant particulièrement difficile, celui-ci ne peut être effectué qu'en solution. Ainsi, les synthèses des deux peptides fluorés incorporant une α-Tfm-Alanine (*R*) ou (*S*) ont été réalisées en solution, selon deux stratégies différentes. La synthèse du peptide **(*S*,*R*,*S*)-33** a été décrite au paragraphe 1.2.2.2. de la deuxième partie du chapitre III. La déprotection du tripeptide *N*-Fmoc-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn dont nous disposions au laboratoire, par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon permet d'obtenir le tripeptide déprotégé **(*S*,*R*,*S*)-33** désiré avec un rendement de 77% (Schéma 105).

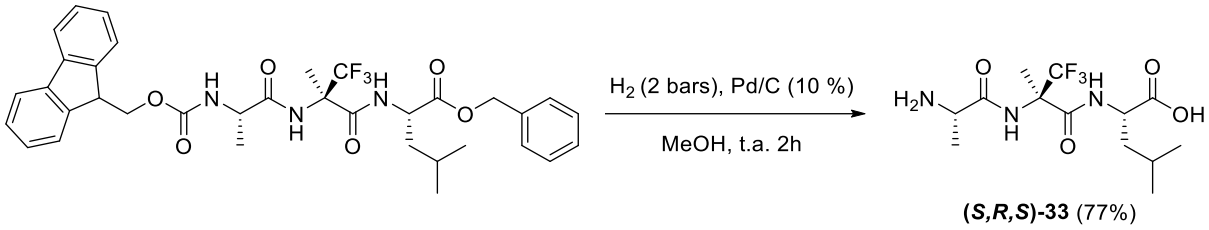


Schéma 105

Le peptide diastéréoisomère **(*S*,*S*,*S*)-36** incorporant une (*S*)-α-Tfm-Alanine a, quant à lui, été synthétisé à partir de la *N*-Boc-(*S*)-α-Tfm-Alanine (Schéma 103). Les deux énantiomères (*R*) et (*S*) de la *N*-Boc-α-Tfm-Alanine **(*R*)-9** et **(*S*)-9** ont dans un premier temps été couplés avec succès à l'ester benzylique de la leucine en présence d'EDCI et de HOBt en milieu basique pour donner les dipeptides **(*R*,*S*)-37** et **(*S*,*S*)-37** avec des rendements de 61% et 56% (Schéma 106).

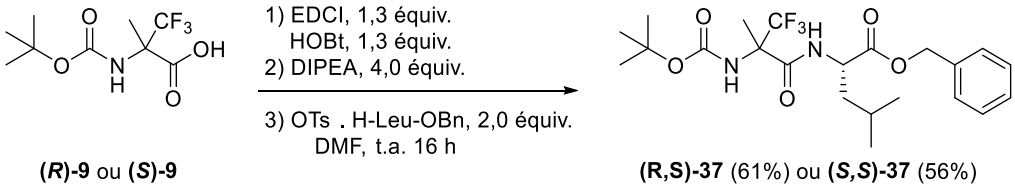


Schéma 106

Le groupement protecteur Boc du dipeptide **(*S*,*S*)-37** est ensuite déprotégé à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 4 M dans l'acétate d'éthyle pour donner le chlorhydrate

intermédiaire HCl . H-(*S*)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn qui est alors immédiatement engagé dans une réaction de couplage avec la *N*-Cbz-Alanine activée sous forme d'anhydride mixte (Schéma 107).

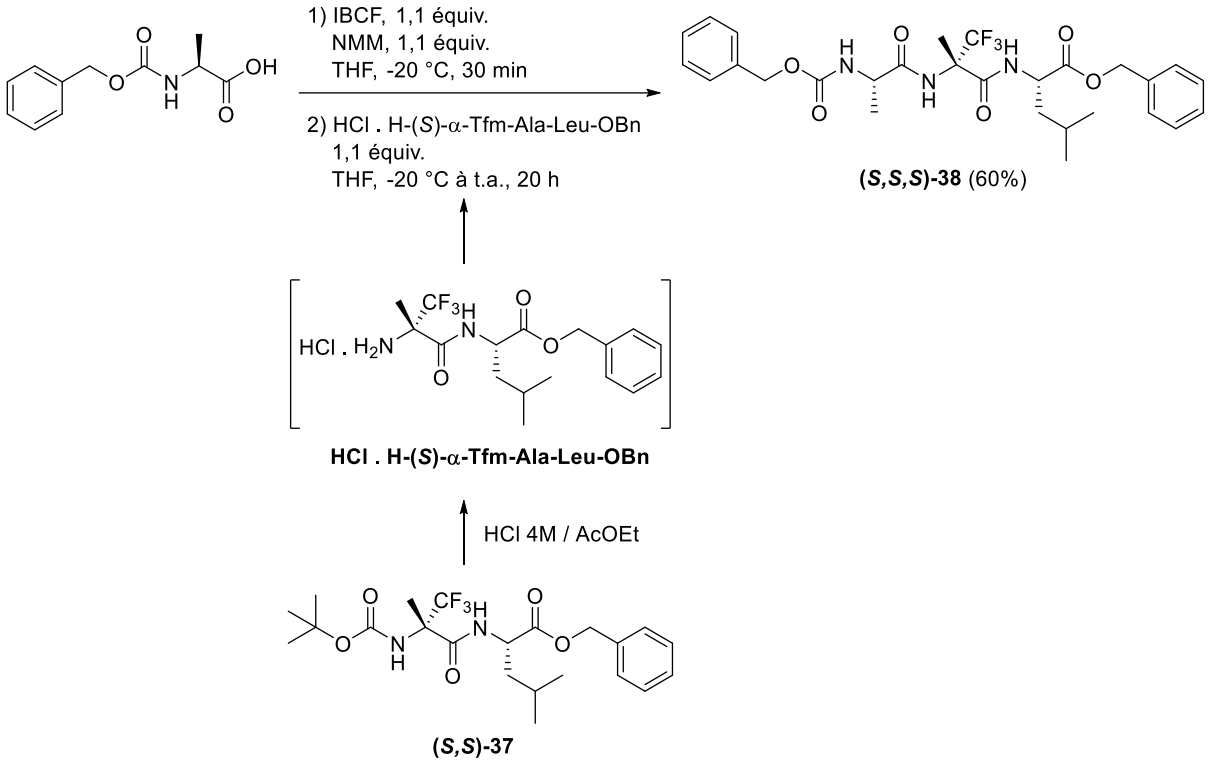


Schéma 107

Le tripeptide protégé **(*S*,*S*,*S*)-38** est enfin déprotégé par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon (Schéma 108).

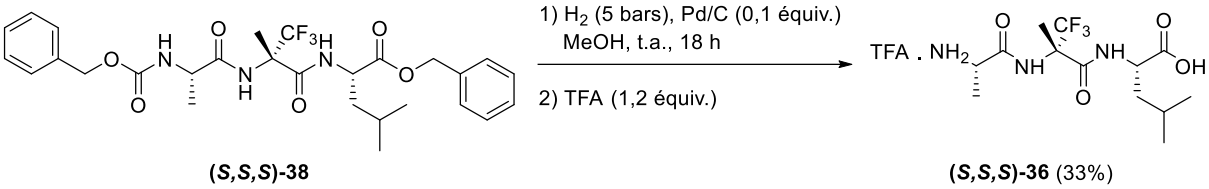


Schéma 108

3.2.2. Synthèse des peptides non fluorés (*S*,*S*)-31 (P-Aib) et (*S*,*S*,*S*)-32 (P-Ala)

Les deux peptides analogues **(*S*,*S*)-31** et **(*S*,*S*,*S*)-32**, incorporant respectivement un acide α-aminoisobutyrique et une alanine ont été synthétisés sur support solide à partir d'une résine de Wang prégreffée par un résidu de *N*-Fmoc-Leucine (Figure 46). La synthèse de ces deux peptides a été préalablement décrite au chapitre III, paragraphe II) 1.2.2.2.. L'emploi de 5 équivalents d'aminoacides permet ainsi d'obtenir **(*S*,*S*)-31** et **(*S*,*S*,*S*)-32** avec des rendements respectifs de 18% et 25% (Schéma 101).

Ces quatre peptides, **P-Ala, P-Aib, P-(*R*)-Tfm** et **P-(*S*)-Tfm** ont ainsi été synthétisés et confiés à l'équipe du Dr. Lucie Khemtemourian afin d'étudier et de comparer leur aptitude à moduler l'agrégation du peptide Aβ42.

3.3. Mesure de l'agrégation

3.3.1. Principe des mesures effectuées

La capacité de nos molécules à inhiber la formation de fibres amyloïdes peut être suivie à l'aide de différents moyens. Ces méthodes biophysiques sont résumées dans le Schéma 109 suivant.

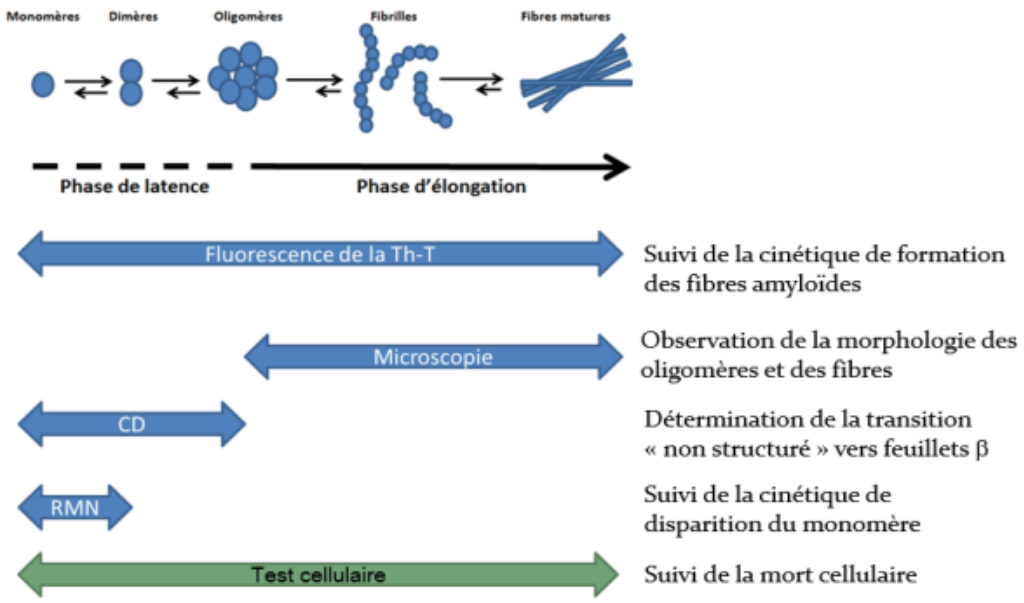


Schéma 109 : Suivi de la cinétique de formation des fibres amyloïdes par différentes techniques biophysiques en fonction du stade de l'agrégation (d'après L. Khemtemourian)

Différentes techniques sont utilisées pour observer l'effet de nos molécules à différents stades de l'agrégation. Ainsi, au cours des phases précoces de formation, dites de latence, des mesures de dichroïsme circulaire permettent de déterminer le moment où le peptide Aβ commence à se structurer en feuillets β. En parallèle, les analyses de RMN permettent de quantifier la disparition du monomère vers les espèces oligomériques.

A la fin de la fibrillation, l'observation par microscopie permet de distinguer la morphologie des protofibres et des fibres formées.

Enfin, tout au long de la formation fibrillaire, que ce soit aux stades précoces comme avancés, un suivi de la cinétique de formation peut être effectué par mesure de la fluorescence en présence d'un marqueur : la thioflavine T (Figure 58).

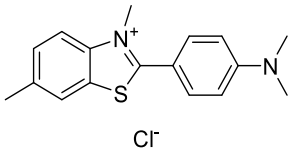


Figure 58 : Structure de la Thioflavine T

Ce dernier montre une fluorescence accrue et un déplacement vers le rouge de son spectre d'émission quand il se lie aux structures riches en feuillets β, comme dans le cas des protéines amyloïdes.[171] En effet, la structure rigide et hautement ordonnée des fibres amyloïdes provoque une perturbation de la distribution de charge de son état excité ce qui se traduit par cette émission dans le rouge. C'est pourquoi ce test est devenu une méthode standard pour suivre la formation des fibrilles et est un outil diagnostic des structures amyloïdes. L'intensité de fluorescence de la ThT est par ailleurs dépendante de la quantité de matériel fibreux, de la constante d'affinité de la ThT pour les fibres et du rendement quantique de colorant lié.

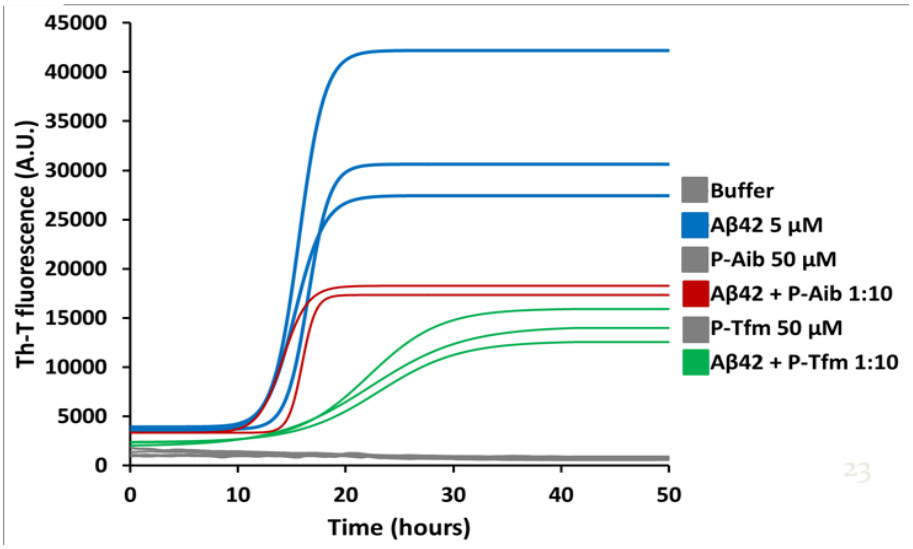
3.3.2. Résultats

- *Tests de fluorescence à la thioflavine T*

La fluorescence à la thioflavine ThT permet de mesurer la cinétique de formation de fibres amyloïdes au cours du temps par mesure de l'intensité de fluorescence émise par le complexe fibre-ThT. Les courbes obtenues ont la forme de sigmoïdes (Graphe 11), caractéristiques des peptides amyloïdes. En effet, on distingue trois étapes dans la cinétique de formation des fibres de Aβ42 : un temps de latence, durant lequel les monomères s'auto-associent pour former des oligomères, la thioflavine n'émet pas dans le rouge et son intensité de fluorescence est nulle. On observe ensuite une augmentation de la fluorescence qui correspond à une augmentation d'espèces fibrillaires. Enfin, un plateau est atteint où la formation de fibres a atteint un maximum illustré par une fluorescence ThT maximale.

[171] LeVine, H. 3rd *Methods Enzymol*. **1999**, *309*, 274-284.

Les peptides **P-Tfm** et leurs analogues non fluorés contenant un Aib (**P-Aib**) ou une alanine (**P-Ala**) ont ainsi été mis en présence du peptide Aβ42 à un ratio de 10:1 et incubés. Le Graphe 12 suivant montre les résultats de cette première étude.



Graphe 12 : Test de fluorescence à la ThT de l'agrégation du peptide Aβ42 en présence de P-(*R*)-Tfm et P-Aib

On observe pour le peptide Aβ42 seul à une concentration de 5 µM, la formation des oligomères vers 16 heures. Ce temps, noté t1/2 représente le temps au bout duquel 50% des fibres sont formées. Au bout de 20 heures, la fluorescence de la ThT atteint son maximum signifiant que tout le peptide est structuré sous forme de fibres amyloïdes.

Les tests de fluorescence ont été réalisés en présence des molécules étudiées et à différentes concentrations. Nous avons calculé pour chaque expérience le rapport du temps de demi-vie des monomères du peptide en présence de la molécules sur le temps de demi-vie des monomères du peptide seul en solution, ainsi que le pourcentage de réduction ou d'augmentation de la hauteur du plateau de la sigmoïde. Ces deux paramètres nous permettent d'évaluer l'efficacité des molécules.

L'ajout du peptide **P-Aib** à un ratio de 10 : 1 (courbe rouge) présente un effet considérable sur l'agrégation du peptide Aβ42. En effet, l'intensité finale de fluorescence diminue de moitié par rapport au peptide Aβ42 seul pour une même concentration. La fluorescence de la ThT étant dépendante de la quantité de fibres présentes, ceci signifie que **P-Aib**, à un ratio de 10 : 1 permet de diminuer de moitié l'agrégation amyloïde. Le deuxième paramètre important à relever est le rapport des temps de demi-vie des monomères en présence et en absence de peptide fluoré. Ainsi, dans le cas de **P-Aib** celui-ci est proche de 1. Il semblerait donc que ce petit peptide puisse se lier aux feuillets β formés par Aβ42 au cours du processus d'oligomérisation pour retarder leur agrégation sous forme de fibres mais pas au stade précoce d'oligomérisation.

Cette même expérience a alors été réalisée en présence de l'analogue fluoré **P-(*R*)-Tfm**. La présence du groupement trifluorométhyle étant susceptible d'augmenter l'hydrophobie des peptides ainsi que leur susceptibilité à former des liaisons hydrogène, la capacité de **P-(*R*)-Tfm** à interagir avec les feuillets β de Aβ42 est évaluée. Pour une même concentration de Aβ42 et un même ratio de peptides incubés, l'effet attendu est en effet vérifié (courbe verte). D'une part, la fluorescence finale observée est trois fois moins importante en présence de **P-(*R*)-Tfm** qu'avec Aβ42 seul, soit 50% plus diminuée qu'en présence de **P-Aib**, signifiant que le peptide fluoré se lie encore plus aux feuillets β et empêche d'autant plus la formation des fibres amyloïdes. D'autre part, ce peptide possède une action supplémentaire sur la phase d'oligomérisation. En effet, en présence de **P-(*R*)-Tfm**, cette phase est prolongée par rapport à l'expérience réalisée en présence de Aβ42 seul ou en association avec **P-Aib**. Ainsi, le rapport des $t_{1/2}$ est ici de plus de 2. **P-(*R*)-Tfm** semble donc agir plus en amont que **P-Aib**, dès la phase d'oligomérisation, pour empêcher ensuite d'autant plus la formation de fibres.

De nouvelles expériences d'inhibition, réalisées en présence d'un lot différent de peptide Aβ42 ne permettent cependant pas de confirmer ces premiers résultats encourageants. Dans ce nouveau cas, **P-(*R*)-Tfm** ralentit faiblement la cinétique d'agrégation.

Par ailleurs, la capacité du peptide **P-(*S*)-Tfm**, incorporant l'énantiomère (*S*) de l'α-Tfm-Ala à inhiber l'agrégation de Aβ42 a également été évaluée sur ce nouveau de peptide Aβ. Les résultats se montrent moins encourageants qu'en présence de **P-(*R*)-Tfm** car **P-(*S*)-Tfm** ne possède aucun effet sur l'agrégation du peptide Aβ42.

<u>Conclusion</u> : cette première étude de suivi de la cinétique d'agrégation de Aβ42 en présence des tripeptides fluorés **P-(*R*)-Tfm** et **P-(*S*)-Tfm** ainsi que de leur analogue non fluoré possédant un Aib, **P-Aib**, a montré dans un premier temps que **P-(*R*)-Tfm** et **P-Aib** étaient capables de reconnaitre et de se lier aux feuillets β formés par Aβ42 au cours de son processus d'agrégation. Néanmoins, **P-(*R*)-Tfm** semble avoir une action plus en amont, dès la phase d'oligomérisation par une meilleure reconnaissance des feuillets. Cependant, ces résultats ne se montrent pas reproductibles d'un lot de peptide Aβ42 à un autre. Testé sur le deuxième lot de peptide Aβ42, **P-(*S*)-Tfm** ne possède quant à lui aucune activité.

- *Observation microscopique des agrégats de Aβ42*

L'observation par microscopie de transmission électronique du premier lot de peptide Aβ42 seul ou en présence de **P-Aib** et **P-(*R*)-Tfm** a été réalisée après 3 jours d'incubation afin de vérifier l'aspect des fibres formées (Figure 59).

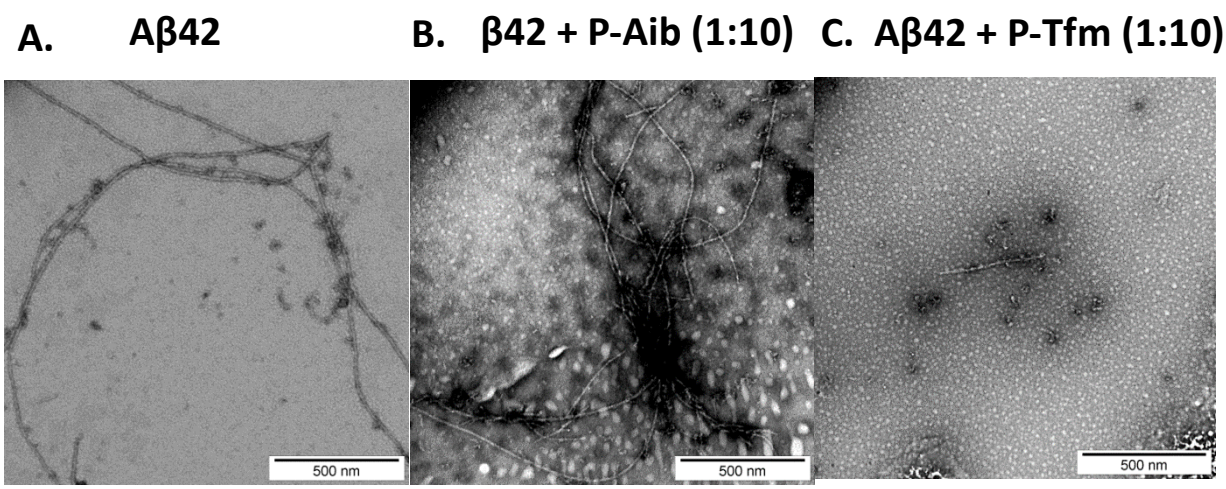


Figure 59 : Observation microscopique de transmission électronique des agrégats de peptide Aβ42 seul (A), en présence de P-Aib (B) et de P-(*R*)-Tfm (C)

Après 3 jours d'incubation Aβ42 montre la présence de très nombreux oligomères de très haut poids moléculaire ainsi que de fibres (Figure 59 A). En présence de **P-Aib**, l'observation est la même. Même si la quantité de fibres est nettement diminuée, la présence des deux structures, oligomères et fibres amyloïdes est toujours observable (Figure 59 B). En revanche, en présence de **P-(*R*)-Tfm**, la présence des deux structures a fortement diminuée avec une proportion d'oligomères plus faible. De plus, ces derniers apparaissent plus petits.

L'observation microscopique des agrégats confirme donc les résultats des tests de fluorescence réalisés en présence de ThT. Le peptide fluoré **P-(*R*)-Tfm** ralentit la formation des oligomères précoces de Aβ42, donc la formation de fibres amyloïdes. **P-Aib**, quant à lui, n'empêche pas cette étape d'oligomérisation mais agit plutôt sur l'agrégation des oligomères sous forme de fibres.

- *Etude par dichroïsme circulaire*

Le dichroïsme circulaire repose sur la capacité d'un échantillon possédant un chromophore chiral d'absorber différemment la lumière polarisée circulaire droite et la lumière polarisée circulaire gauche. La différence d'absorbance entre ces deux types de lumière à chaque longueur d'onde fournit le spectre dichroïque correspondant.

Ainsi, en général, le dichroïsme circulaire apparaît pour toute molécule optiquement active. Cela concerne donc les molécules biologiques du fait de leur chiralité. C'est donc le cas de certains sucres mais aussi des acides aminés. La structure secondaire des protéines joue aussi un rôle sur leur dichroïsme. Les structures en hélice α ou en feuillet β des protéines ou bien une structuration non ordonnée présentent des dichroïsmes circulaires caractéristiques (Figure 60).

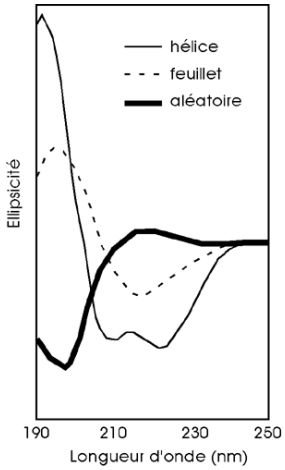


Figure 60 : Formes caractéristiques des spectres de dichroïsme circulaire de trois structures différentes de peptides (D'après Wallace & Janes, *Curr.Opin. Chem Biol.*, 2001, *5*, 567-571)

Par dichroïsme circulaire, il est ainsi possible d'observer la dénaturation d'une protéine par l'augmentation du signal correspondant à la structure aléatoire et la diminution des signaux hélice α et feuillet β, ou bien suivre le repliement de la protéine (processus inverse de la dénaturation) et déterminer quelle structure secondaire elle adopte. Ainsi, l'étude structurale du peptide Aβ42 a été étudiée par dichroïsme circulaire en présence de **P-Aib** et **P-(*R*)-Tfm**. (Figure 61).

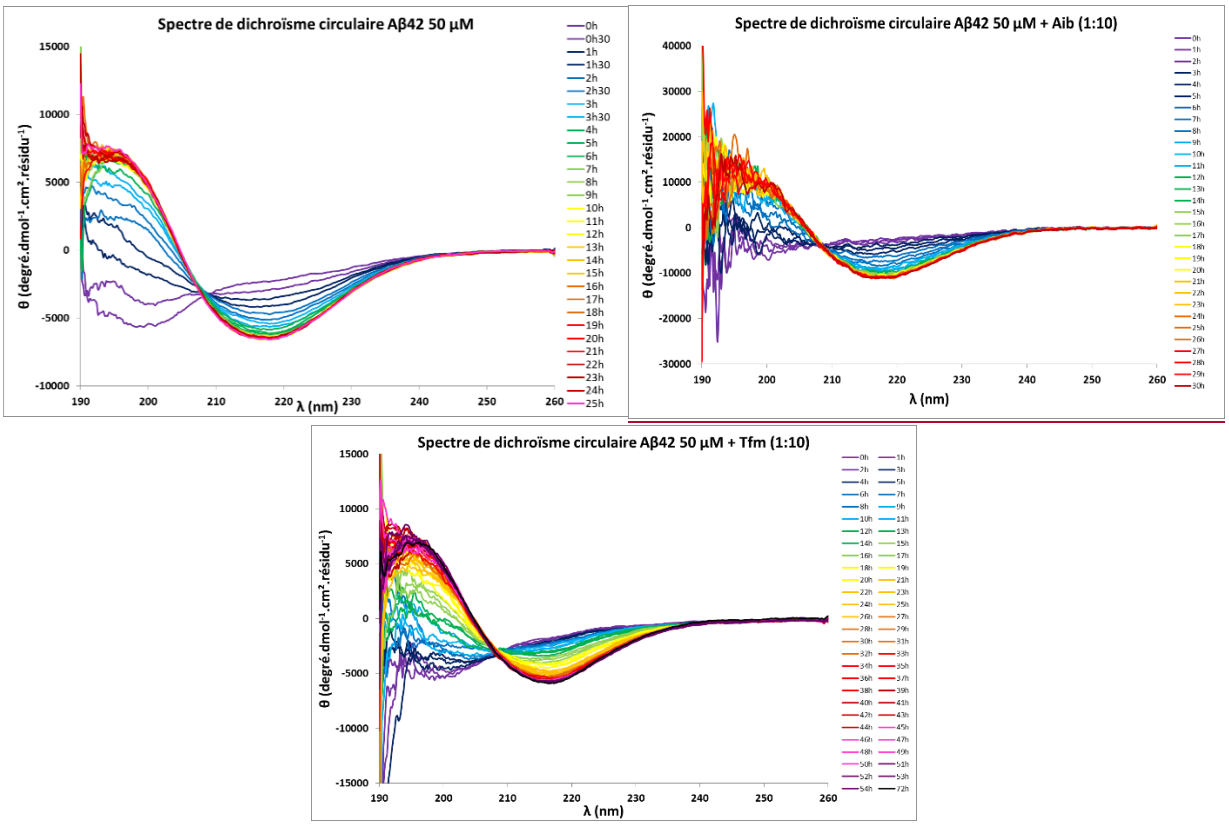
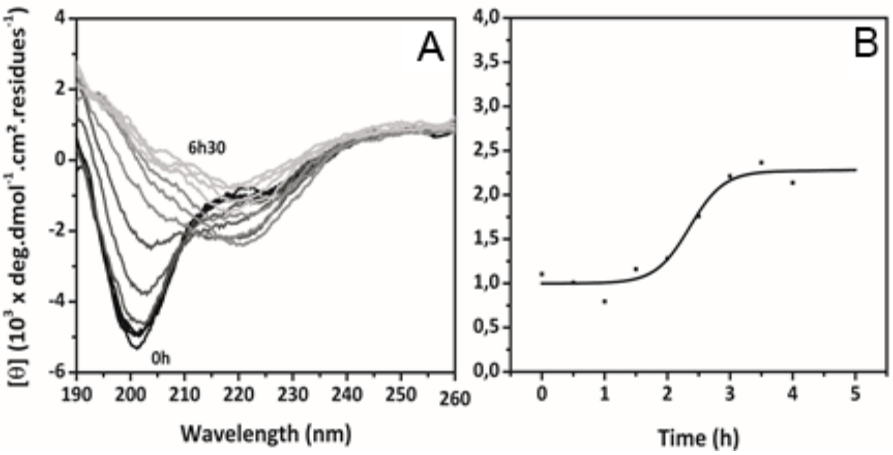


Figure 61 : Spectres de dichroïsme circulaire montrant le changement de conformation au cours du temps A) du peptide Aβ42, B) du peptid e Aβ42en présence de P-Aib à un ratio 1 : 10, C) du peptide Aβ42 en présence de P-(*R*)-Tfm à un ration 1 : 10

On constate qu'en absence de peptide (Figure 61A), en début d'expérience (tracés violets), Aβ42 adopte une conformation non structurée caractéristique des peptides amyloïdes en solution. Puis, à partir de deux heures d'incubation, sa structuration est celle d'un feuillet β.

Ces mêmes expériences ont été réalisées en présence de **P-Aib** (Figure 61B) et **P-(*R*)-Tfm** (Figure 61C) à un ratio de 1 : 10 La représentation graphique de l'ellipticité à 220 nm en fonction du temps est une sigmoïde qu'il est possible d'ajuster par une fonction de Boltzmann, ce qui permet de déterminer des paramètres cinétiques tels que le temps nécessaire pour observer 50% de changement du signal dichroïque $t_{1/2}$ (Figure 62).



C

$$\theta_{220} = \frac{\theta_i - \theta_f}{(1 + e^{(t-t_{0,5})/dt}} + \theta_f$$

Figure 62 : Principe du calcul du $t_{1/2}$ de repliement d'un peptide sous forme de feuillet β. A) Spectres de dichroïsme circulaire enregistrés à différents temps d'un peptide en transition d'une structure non ordonnée à un feuillet β. B) Corrélation des valeurs des ellipticités θ relevées au maximum de 220 nm en fonction du temps. C) Equation de Boltzmann permettant le calcul de $t_{1/2}$ à partir des valeurs de θ à 220 nm et de temps.

Pour chaque spectre de la Figure 61, enregistré à un temps donné, il est possible de corréler l'ellipticité θ au maximum d'intensité caractéristique à 220 nm. En corrélant la valeur de l'ellipticité θ au temps de sa mesure, une courbe du type Boltzmann est obtenue (Figure 62B). Le $t_{1/2}$ de formation des feuillets (temps pour lequel 50% de la transition conformationnelle entre la structure non ordonnée de départ et un feuillet est observée) peut être déduit de l'équation de Boltzmann (Figure 62C). L'expérience a ainsi été réalisée à nouveau, en présence de **P-(*R*)-Tfm** et **P-Aib**, avec un ratio Aβ42/peptide de 1/10, afin d'étudier leur capacité à ralentir la formation de feuillets β. Un récapitulatif des différentes valeurs de $t_{1/2}$ et des temps au bout desquels le plateau de formation des feuillets β est atteint, pour chaque peptide, est donné dans le Tableau 21 suivant.

Echantillon	$t_{1/2}$	plateau
Aβ42	2,5 h	10 h
Aβ42 + **P-Aib** (1:10)	5,5 h	15 h
Aβ42 + **P-(*R*)-Tfm** (1:10)	16 h	35 h

Tableau 21 : Temps de demi-vie et délai d'atteinte du plateau de formation des feuillets β en présence de Aβ seul, de P-Aib et de P-(*R*)-Tfm à des ratios de 1 :10

En absence de peptide, Aβ42 possède un $t_{1/2}$ de formation de feuillets β de 2,5 heures avec une totalité de structures de ce type atteinte en 10 heures. Ce premier temps est plus que doublé en présence du peptide non fluoré **P-Aib** ($t_{1/2}$ = 5,5 h). Par ailleurs, le temps au bout duquel la totalité de Aβ42 est structuré sous forme de feuillet β est augmenté de 50% avec un plateau atteint à partir de 15 heures. Ainsi, **P-Aib** possède une légère action inhibitrice sur la transition random coil vers feuillet β, caractéristiques des fibres amyloïdes.

En présence de **P-(*R*)-Tfm**, $t_{1/2}$ est cette fois multiplié par 6. En effet, la moitié de Aβ42 n'est structurée sous forme de feuillets β qu'au bout de 16 heures d'expérience. La totalité du peptide l'est après 35 heures. Ainsi**, P-(*R*)-Tfm** possède une action très intéressante sur l'inhibition de la formation de fibres.

3.4. Conclusion

Les premières mesures de l'agrégation du peptide Aβ42 sous forme de feuillets β par les différentes techniques décrites ont permis de montrer que la présence des deux peptides **P-Aib** ou **P-(*R*)-Tfm** permet de ralentir la formation de fibrilles. **P-Aib** exerce particulièrement son action sur les phases tardives de l'agrégation avec un ralentissement de l'agrégation des oligomères en fibrilles. L'action de **P-(*R*)-Tfm** est, quant à elle, plus précoce et se fait ressentir dès la phase d'oligomérisation avec une inhibition de la formation d'oligomères précoces.

Cependant, ces premiers résultats encourageants n'ont pas été confirmés par la réalisation de nouvelles mesures de l'agrégation de Aβ42 par fluorescence à la ThT. En effet, ces expériences ont été réalisées sur un lot différent de peptide Aβ42 en présence cette fois du peptide fluoré incorporant l'énantiomère (*S*) de l'α-Tfm-Alanine, **P-(*S*)-Tfm**. Alors que **P-(*R*)-Tfm** ralentit très légèrement la cinétique d'agrégation de Aβ42, **P-(*S*)-Tfm** et **P-Aib** n'ont pas d'effet. Le manque de reproductibilité concernant **P-(*R*)-Tfm** et l'absence d'activité de **P-(*S*)-Tfm** et **P-Aib** suggèrent la nécessité de repenser à de nouvelles molécules. La présence d'un aminoacide quaternaire en position centrale des peptides ne permettant pas l'interaction avec les feuillets β de Aβ42, nous avons envisagé la synthèse d'un peptide fluoré dérivé des précédents incorporant un aminoacide

α-trifluorométhylé non quaternarisé : la (*R*)-α-Tfm-Glycine. La préparation de cet aminoacide fluoré a précédemment été rapportée par notre laboratoire (Schéma 12).[6] La synthèse du peptide H-Ala-(*R*)-Tfm-Gly-Leu-OH a alors été entamée par le Dr. V. Gasparik de l'Université de Cergy-Pontoise. Cependant, dû aux problèmes d'instabilité de la (*R*)-α-Tfm-Glycine qui a tendance à s'épimériser, le peptide n'a pu être isolé.

II) Etude de l'inhibition d'une enzyme peu spécifique, la pepsine par un peptide fluoré l'Ac-Ala-Phe-(*R*)-Tfm-Ala-Ala-NH_2

La présence d'atomes de fluor et, en particulier, du groupement trifluorométhyle, en des positions stratégiques de peptides peut augmenter leur résistance métabolique (voir paragraphe 2.2. du chapitre I). Ceci a ainsi déjà été démontré par l'équipe de Koksch en 1997 dans le cas d'une étude de résistance à l'hydrolyse enzymatique par la chymotrypsine.[9] Les auteurs ont testé et comparé l'hydrolyse d'un panel de peptides comportant différents aminoacides α-trifluorométhylés autour du site de clivage de l'enzyme (positions P1, P2, P3, P1' et P2'). Il s'est alors avéré que l'hydrolyse des peptides substitués en positions P2, P2' et P3 était considérablement diminuée par rapport à leur analogues non fluorés.

Pour notre part, nous souhaitons étudier la résistance métabolique de peptides fluorés vis-à-vis d'une enzyme peu spécifique, la pepsine. L'étude mise en œuvre consiste à mesurer et comparer les vitesses d'hydrolyse d'un peptide comportant une alanine α-trifluorométhylée par rapport à son analogue non fluoré comportant une alanine.

1) La pepsine

La pepsine est une enzyme du suc gastrique découverte par Theodor Schwann en 1833[172] et appartenant à la famille des aspartyle protéases (Figure 63). Elle est stockée sous forme de proenzyme inactive, le pepsinogène, dans les cellules principales de l'estomac.[173] Au moment de

[172] Asimov, I.; *A Short History of Biology*; Conn : Greenwood Press; Westport, **1980**, p.95.
[173] Ramsey, V. G.; Doherty, J. M.; Chen, C. C.; Stappenbeck, T. S.; Konieczny, S. F.; Mills, J. C. *Development (Cambridge, England)* **2007**, *134*, 211-222.

la digestion, le pepsinogène est excrété dans l'estomac où il est hydrolysé en pepsine sous l'action de l'acide chlorhydrique provenant des cellules pariétales de la muqueuse gastrique.

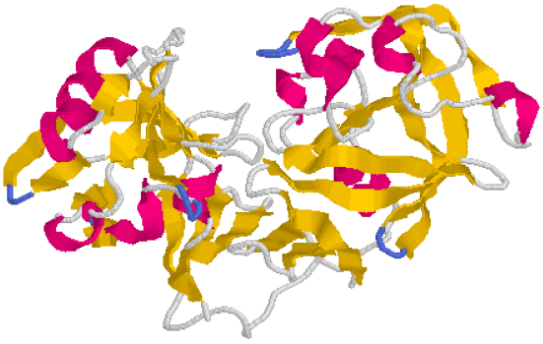


Figure 63 : Structure de la pepsine

La pepsine est une endoprotéase peu spécifique mais qui hydrolyse de préférence les liaisons peptidiques à proximité d'aminoacides à chaînes latérales hydrophobes, plus particulièrement aromatiques (Tyr, Trp, Phe). L'hydrolyse par la pepsine est de plus favorisée si un aminoacide soufré se trouve proche de la liaison peptidique hydrolysée. Son pH optimum d'action se situe entre 1,8 et 4,4 et elle devient inactive à partir d'un pH de 6,5 par l'action des bicarbonates alcalins du suc pancréatique.[174] Comme pour toutes les enzymes de la famille des aspartyle protéases, le mécanisme catalytique de clivage le plus communément admis fait intervenir un mécanisme général de type acide/base impliquant la coordination d'une molécule d'eau entre deux résidus aspartate hautement conservés (Schéma 110).[175,176] Un aspartate active la molécule d'eau qui peut alors réagir sur le carbonyle de la liaison peptidique à hydrolyser. Après protonation, il y a perte de la molécule d'eau ce qui entraine le clivage de la liaison peptidique.

[174] Johnston, N.; Dettmar, P. W.; Bishwokarma, B.; Lively, M. O.; Koufman, J. *Laryngoscope*, **2004**, *114*, 2129-2134.
[175] Suguna, K.; Padlan, E. A.; Smith, C. W.; Carlson, W. D.; Davies, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 7009-7013.
[176] Brik, A.; Wong, C. H. *Org. Biomol. Chem*. **2003**, *1*, 5-14.

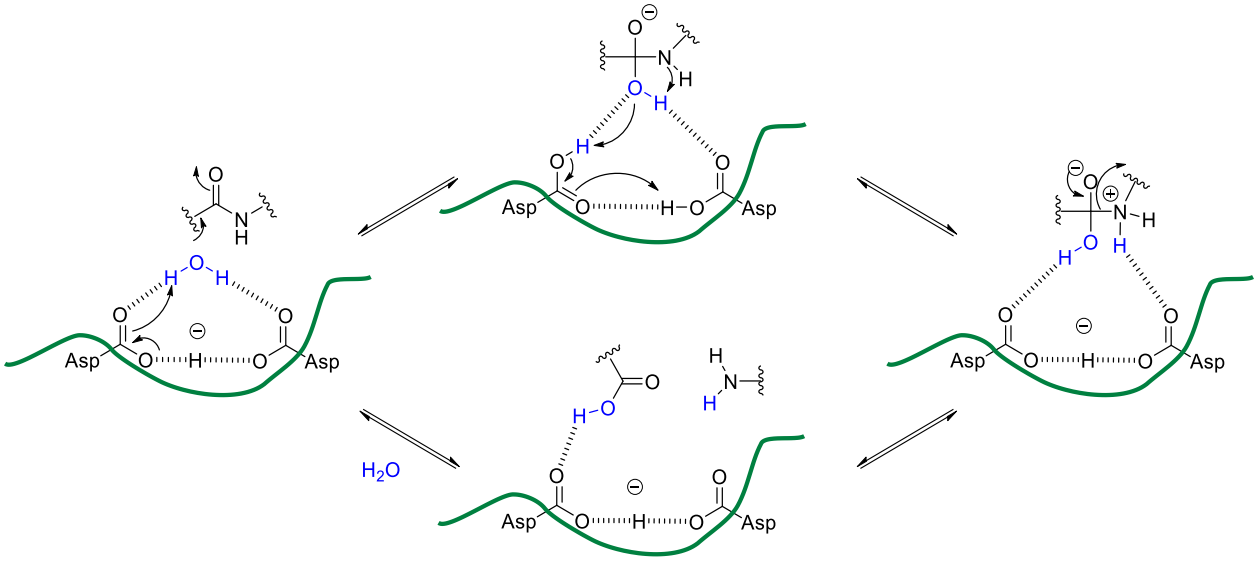
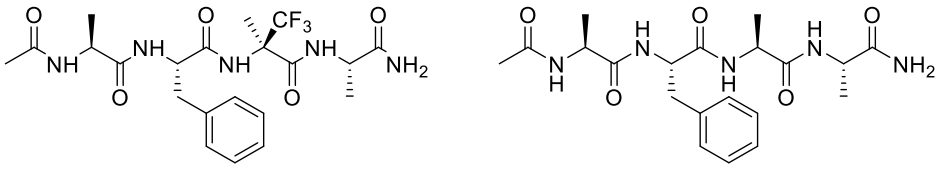


Schéma 110: Hydrolyse d'une liaison peptidique par la pepsine (d'après Suguna *et al.*[175])

La pepsine est donc d'une grande importance au moment de la digestion car elle participe à la dégradation des protéines du bol alimentaire.

2) Digestion enzymatique de peptides fluorés

Afin d'étudier et de comparer l'hydrolyse de peptides α-trifluorométhylés par rapport à un analogue non fluoré, nous avons choisi de synthétiser la séquence Ac-Ala-Phe-(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-NH_2 **(*S,S,R,S*)-24** ainsi que l'analogue non fluoré Ac-Ala-Phe-Ala-Ala-NH_2 **(*S,S,S,S*)-39** qui incorpore une alanine à la place de l'α-Tfm-Alanine (Figure 64). Ces peptides comportent des résidus aliphatiques alanine ainsi qu'une phénylalanine aromatique, susceptibles d'être reconnus par la pepsine. Cette enzyme étant une endoprotéase peu spécifique, chaque position est susceptible d'être clivée. Notre étude consiste alors à analyser et comparer la vitesse d'hydrolyse de ces deux peptides par l'enzyme pepsine porcine, afin d'étudier l'effet qu'engendre la présence du groupement trifluorométhylé sur la digestion du peptide.



(*S,S,R,S*)-24 **(*S,S,S,S*)-39**

Figure 64 : Tétrapeptides synthétisés pour l'étude de resistance enymatique à la pepsine

2.1. Matériel et méthode[177]

La digestion des peptides **(*S*,*S*,*R*,*S*)-24** et **(*S*,*S*,*S*,*S*)-39** est effectuée en bain thermostaté à température fixe de 37 °C par une solution de pepsine issue de muqueuse gastrique d'origine porcine à 4 g/L dans du HCl à pH 2, pH optimal de fonctionnement de la pepsine. La concentration en peptides est de 10 mmol/L dans une solution de HCl à pH 2. Les solutions de pepsine et de peptide sont alors mélangées, la solution résultante étant diluée cinq fois. Afin de mesurer la vitesse d'hydrolyse enzymatique, des échantillons de 20 µL sont prélevés à intervalles de temps réguliers et la réaction enzymatique est stoppée par ajout d'une solution de soude à pH 12, ce qui inhibe le fonctionnement de l'enzyme. Les échantillons sont finalement analysés par UPLC couplée à un détecteur de masse afin d'observer les fragmentations. Ces mesures permettent ainsi d'apprécier la vitesse à laquelle les peptides sont digérés.

2.2. Synthèse des peptides

Les peptides **(*S*,*S*,*R*,*S*)-24** et **(*S*,*S*,*S*,*S*)-39**, acétylés en position *N*-terminale et amidifiés en position *C*-terminale ont été synthétisés manuellement sur support solide en utilisant une résine amide Rink permettant de libérer, après clivage, les peptides sous forme amide (Figure 65).

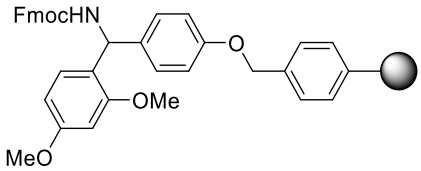


Figure 65 : Résine de Rink

2.2.1. Synthèse du peptide Ac-Ala-Phe- Ala-Ala-NH_2 (*S*,*S*,*S*,*S*)-39

La synthèse du peptide **(*S*,*S*,*S*,*S*)-39** a été réalisée sur support solide à l'aide d'une résine amide de type Rink. Le greffage des différents acides aminés s'effectue par activation des fonctions acides de cinq équivalents d'aminoacides par du HATU en présence de DIPEA. Après chaque phase de couplage d'une durée d'une heure, l'amine *N*-terminale du peptide en croissance est déprotégée de son groupement Fmoc par traitement à la pipéridine (20% dans du DMF). L'efficacité des différentes étapes de couplage et de déprotection est vérifiée par microclivage et

[177] Delaroche, D.; Aussedat, B.; Aubry, S.; Chassaing, G.; Burlina, F.; Clodic, G.; Bolbach, G.; Lavielle, S.; Sagan, S. *Anal. Chem*. **2007**, *79*, 1932-1938.

analysée par masse couplée à un appareil d'UPLC afin de s'assurer de la présence du peptide en cours de synthèse. La dernière étape d'acétylation est réalisée après déprotection du groupement Fmoc à l'aide d'anhydride d'acétique et de pyridine dans du DMF.[150] Le clivage du peptide, réalisé au moyen de TFA à 95%, de triisopropylsilane (TIS) à 2,5% et d'eau à 2,5% fournit le tétrapeptide **(*S*,*S*,*S*,*S*)-39** non fluoré après purification par HPLC semi-préparative avec un rendement de 15% (Schéma 111).

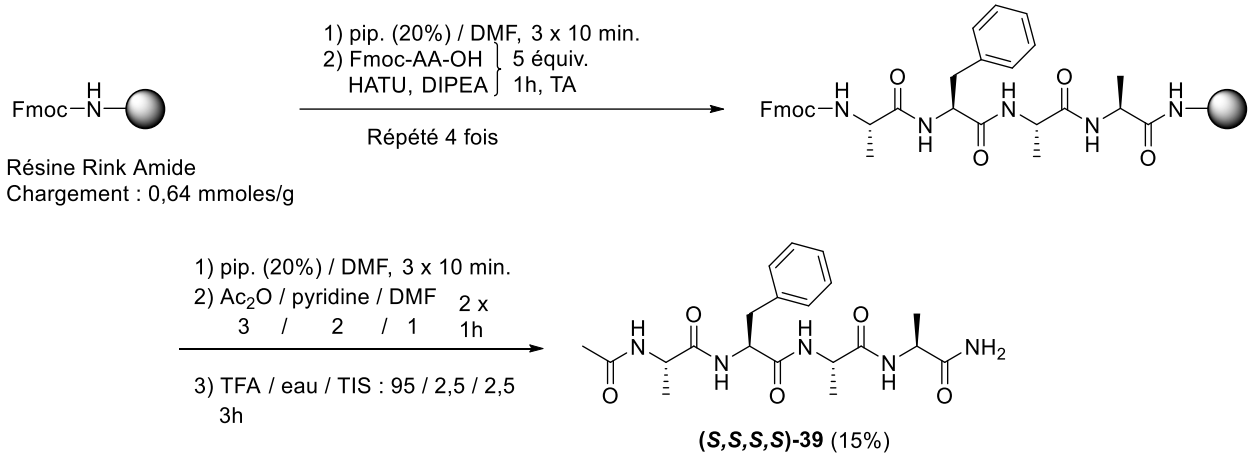


Schéma 111

Ce faible rendement en produit **(*S*,*S*,*S*,*S*)-39** isolé s'explique par des difficultés importantes de solubilité dans le système d'éluants utilisés (eau et acétonitrile en présence d'acide trifluoroacétique à une concentration de 0.1%).

2.2.2. Synthèse du peptide fluoré Ac-Ala-Phe-(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-NH_2 (*S*,*S*,*R*,*S*)-24

La synthèse du peptide **(*S*,*S*,*R*,*S*)-24** a précédemment été décrite au chapitre II (Schéma 92). Ce peptide incorporant une (*R*)-α-Tfm-Alanine en milieu de chaîne, la stratégie classique de couplage peptidique sur phase solide, qui consiste à additionner les différents aminoacides les uns après les autres de l'extrémité *C*-terminale vers l'extrémité *N*-terminale n'était pas envisageable car la réactivité de la fonction amine de l'α-Tfm-Alanine est fortement diminuée. C'est pourquoi un bloc dipeptidique Fmoc-Phe-(*R*)-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*S*,*R*)-21**, a préalablement été synthétisé en solution, dans les conditions de couplage ayant précédemment été optimisées, et incorporé dans la séquence peptidique en cours de croissance (Schéma 92).

L'étude de résistance métabolique à la pepsine de ces deux peptides **(*S*,*S*,*S*,*S*)-39** et **(*S*,*S*,*R*,*S*)-24** a alors été réalisée.

2.3. Digestion

Les peptides sont mis à incuber en présence de l'enzyme à t = 0 min. Des échantillons de 20 µL sont ensuite prélevés à t = 5, 20, 60, 150 min puis après 24 heures d'expériences. Pour chaque prélèvement, la réaction enzymatique est inhibée par ajout d'un volume équivalent d'une solution de soude à pH 12. Une quantité de 10 µL de cet alicot est alors analysée par UPLC couplée à un détecteur UV à 215 nm ainsi qu'à un détecteur de masse.

2.3.1. Résultats

2.3.1.1. Peptide non fluoré ***(S,S,S,S)*-39**

Les spectres UV enregistrés à différents temps de digestion enzymatique par la pepsine du peptide non fluoré ***(S,S,S,S)*-39** figurent ci-dessous (Figure 66). Ils ont été réalisés à l'aide d'une phase mobile composée d'eau et d'acétonitrile à pH 2 par la mise en place d'un gradient continu d'acétonitrile allant de 10% à 30%.

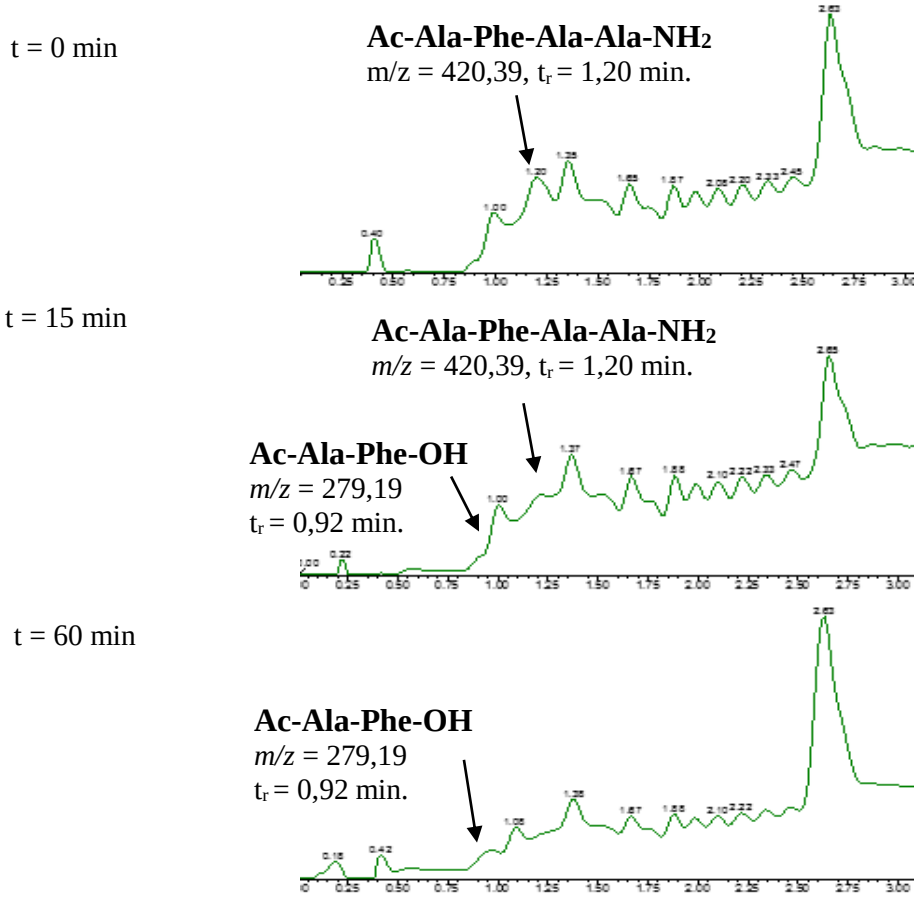


Figure 66 : Chromatogrammes UPLC par détection UV à 215 nm à différents temps de digestion de (S,S,S,S)-39 par la pepsine. A) Chromatogramme réalisé à t = 0 min. B) Chromatogramme réalisé à t = 15 min. C) Chromatogramme réalisé à t = 1 h.

Le signal UV du peptide **(*S,S,S,S*)-39** se retrouve dans une zone d'élution comportant différents signaux appartenant à la pepsine. Par différence avec le chromatogramme de la pepsine seule, il est alors possible de détecter les pics correspondant au peptide **(*S,S,S,S*)-39** non clivé ainsi que ceux d'éventuels produits de digestion par la pepsine. A t = 0 minute, le pic correspondant au peptide non clivé possède un temps de rétention de 1,20 minutes (Figure 66). Après 15 minutes de digestion enzymatique, un nouveau pic est détectable en UV. L'analyse du spectre de masse correspondant indique qu'il s'agit du fragment Ac-Ala-Phe-OH de masse *m/z* = 279,19. Enfin, après 60 minutes d'expérience, la proportion de ce nouveau signal a augmenté et aucune trace de peptide intact **(*S,S,S,S*)-39** n'est détectable. Cependant, sachant que la ligne de base est fortement perturbée par la détection de nombreux signaux appartenant à l'enzyme, il n'est pas possible de calculer le ratio peptide non clivé/produit de digestion. Néanmoins, dès 15 minutes d'expérience, le peptide non fluoré est digéré par la pepsine.

2.3.1.2. Peptide fluoré **(*S,S,R,S*)-24**

Le peptide analogue fluoré **(*S,S,R,S*)-24** possédant une (*R*)-Tfm-Alanine du côté *C*-terminal de la phénylalanine, a été soumis aux mêmes conditions de digestion enzymatique par la pepsine que le peptide non fluoré **(*S,S,S,S*)-39**. Les différents spectres UV et de masses correspondants, enregistrés pour chaque prélèvement, figurent ci-dessous (Figure 67).

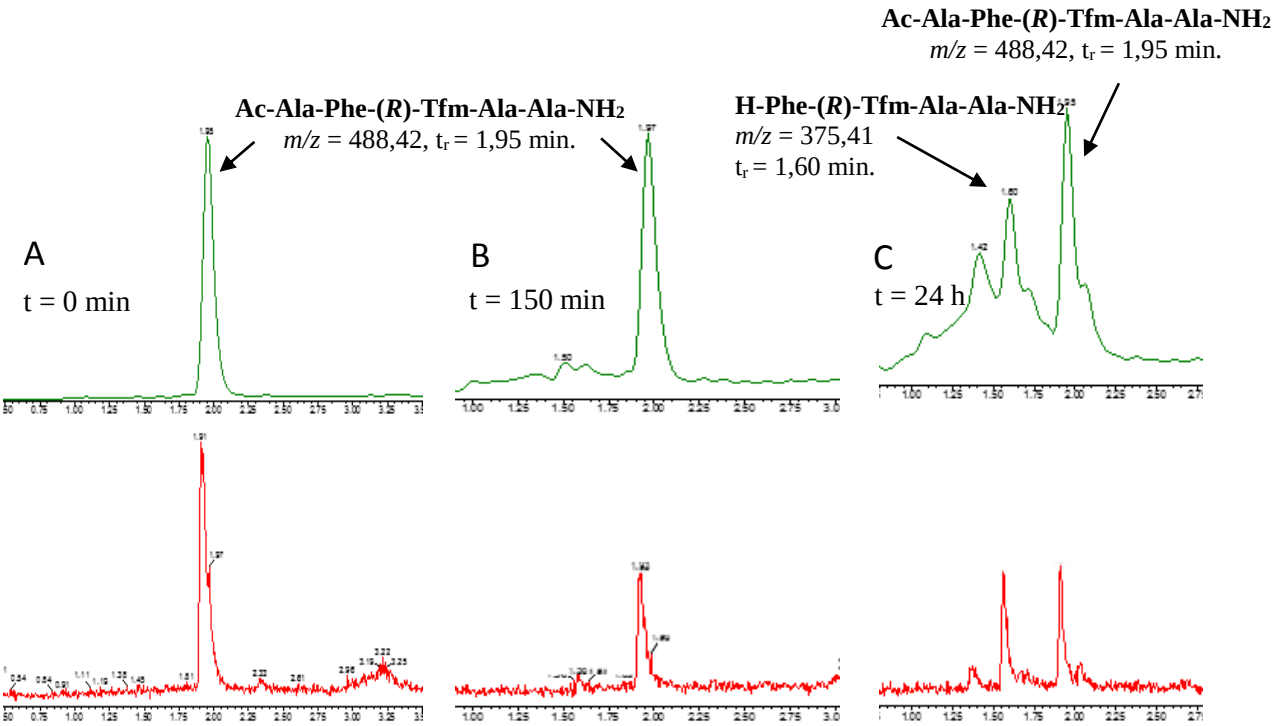


Figure 67 : Chromatogrammes UPLC par détection UV à 215 nm en vert et de la masse (en rouge) à différents temps de digestion de (*S,S,R,S*)-24 par la pepsine. A) Chromatogramme réalisé à t = 0 min. B) Chromatogramme réalisé à t = 150 min. C) Chromatogramme réalisé à t = 24 h.

Dans ce cas, le signal UV de **(*S,S,R,S*)-24** se retrouve dans une zone d'élution ne comportant pas de signaux parasites appartenant à la pepsine. La lecture des spectres UV et de masse est ainsi facilitée. Après 150 minutes d'expérience, les spectres UV et de masses enregistrées sont identiques aux spectres initiaux. En effet, un unique pic, de masse *m/z* = 488,42 correspondant au peptide intact, est relevé et aucune trace d'un produit de digestion n'est observable.

Après 24 heures d'expérience, un nouveau signal est détecté par UV. D'après le spectre de masse correspondant, ce produit de digestion de **(*S,S,R,S*)-24** possède une masse *m/z* = 375,41. Cette masse correspond au fragment H-Phe-(*R*)-Tfm-Ala-Ala-NH_2. Ainsi, comparativement au peptide analogue non fluoré**, (*S,S,R,S*)-24** possède une meilleure résistance protéolytique à la pepsine. Alors que **(*S,S,S,S*)-39** est clivé après 15 minutes d'expérience, le peptide fluoré résiste pendant plus d'une heure et demi. Par ailleurs, le site de clivage est différent d'un peptide à l'autre. Alors que **(*S,S,S,S*)-39** est clivé au niveau de la liaison peptidique centrale, entre la phénylalanine et le deuxième résidu d'alanine, le peptide fluoré est clivé du côté *N*-terminal (Figure 68).

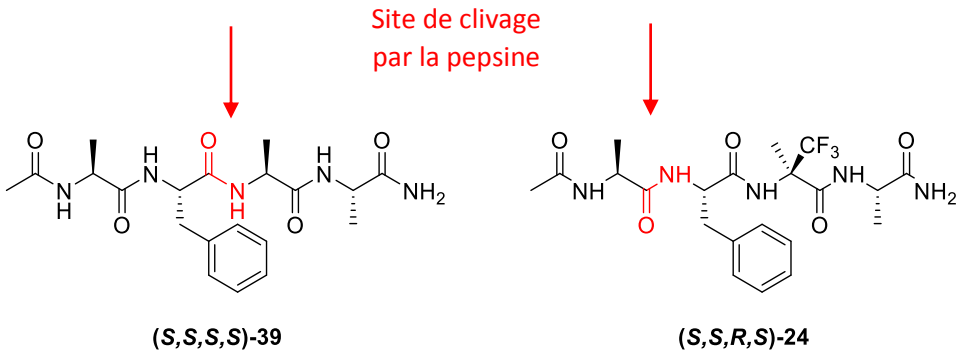


Figure 68 : Sites de clivage des peptides (*S,S,S,S*)-39 et (*S,S,R,S*)-24 après digestion par la pepsine

2.4. Conclusion

Cette étude de résistance protéolytique de peptides fluorés avait pour objectif de déterminer si la présence d'un aminoacide α-trifluorométhylé dans une chaîne peptidique permettait de ralentir, voire inhiber l'hydrolyse par une enzyme généraliste : la pepsine. Pour cela, un tétrapeptide incorporant une (*R*)-Tfm-Alanine en milieu de chaîne a été synthétisé ainsi que son analogue non fluoré. La pepsine clivant de préférence les liaisons peptidiques à proximité d'aminoacides hydrophobes, les séquences choisies comportent des aminoacides aliphatique (Alanine) et aromatique (Phénylalanine) hydrophobes.

Après seulement 15 minutes de digestion, le peptide non fluoré est totalement clivé en milieu de chaîne, entre la phénylalanine et un des résidus alanine alors qu'après plus d'une heure et demi d'expérience, le peptide fluoré est toujours intact. Ce n'est qu'après 24 heures de digestion enzymatique que ce dernier est clivé en position *N*-terminale.

Ainsi, dans notre cas, l'incorporation d'un aminoacide α-trifluorométhylé dans une chaîne peptidique augmente la stabilité métabolique de la liaison peptidique supposée être clivée par la pepsine. Lors de l'étape de clivage d'une liaison peptidique par la pepsine (Schéma 110), qui est une aspartyle protéase, l'azote de la liaison est protoné pour générer un ammonium. Cette protonation est ainsi responsable de la formation d'un bon groupe partant responsable de la coupure de la liaison peptidique considérée. Le groupement trifluorométhyle de l'α-Tfm-Alanine positionnée du côté *C*-terminal de la liaison peptidique supposée être clivée par la pepsine, possède un fort caractère électroattracteur qui empêcherait la protonation de son atome d'azote lors de l'étape de clivage (Schéma 112).

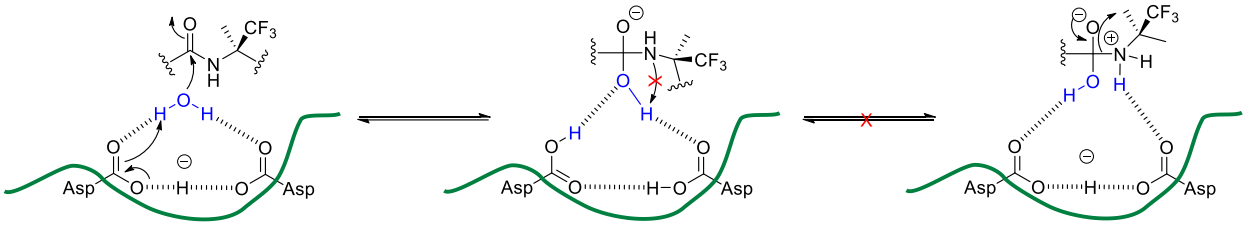


Schéma 112

L'atome d'azote de l'α-Tfm-Alanine ne pouvant pas être protoné ; la liaison peptidique n'est pas clivée. La pepsine étant une endoprotéase peu spécifique mais clivant de préférence les liaisons peptidiques à proximité d'aminoacides à chaînes latérales hydrophobes, la liaison engageant le résidu d'alanine en position *N*-terminale a été clivée à la place. Ainsi, incorporer un aminoacide α-trifluorométhylé dans une séquence peptidique a permis de protéger le site de clivage par la pepsine.

III) Etude de l'interaction de peptides fluorés avec la trypsine par les techniques FABS et FAXs

1) Méthodes de criblage à haut débit (High Throughput Screening – HTS)[61,178]

Le screening de molécules à haut débit (high throughput screening ou HTS) est, de nos jours, l'approche la plus utilisée pour l'identification de candidats médicaments par l'industrie pharmaceutique. Cette technique de criblage rapide rassemble de nombreuses méthodes chimiques, génétiques ou pharmacologiques, visant à étudier et à identifier, dans les chimiothèques, des molécules aux propriétés nouvelles, biologiquement actives, en s'aidant de la robotique, de l'informatique et bio-informatique pour accélérer les phases de tests. Ainsi, il permet de mettre en évidence rapidement, parmi des millions de molécules, de nouveaux ligands pour des récepteurs, des enzymes ou d'autres cibles pharmaceutiques. Les test d'HTS sont réalisés dans des microplaques de 96, 384 ou 1536 puits, dans lesquels chaque candidat est testé à l'aide de dispositifs de manipulation robotisés, de détecteurs hautement sensibles, la méthode de détection la plus utilisée étant la fluorescence. La sensibilité de ces méthodes et la miniaturisation constante des dispositifs de tests permettent d'étudier de grandes quantités de produits. Les résultats de ces expériences sont alors les points de départ pour des études plus précises d'interactions moléculaires ou de processus biologiques mettant en jeu ces molécules identifiées, dans le but d'optimiser et améliorer leur activité.

Cependant, de nombreux inconvénients à l'emploi de ces méthodes de criblage rapide peuvent être remarqués comme la qualité des essais réalisés et même des échantillons utilisés qui n'est pas vérifiée au cours des tests. La complexité des réactions mises en jeu au cours des essais et les fréquentes interférences provenant de la méthode de détection choisie génèrent souvent l'apparition de faux positifs, c'est-à-dire de touches dont les résultats ne sont pas confirmés plus tard, lors de tests plus poussés. Par ailleurs, les tests de détection de potentiels inhibiteurs d'enzymes par exemple, lors d'un processus par HTS peuvent échouer à causes d'erreurs expérimentales inévitables mais qui ne peuvent pas être détectées au cours du test. Ces erreurs concernent par exemple, la concentration des échantillons, la pureté, stabilité ou l'état d'agrégation

[178] Hajduk, P.J.; Burns, D.J. *Comb. Chem. High Throughput Screen*. **2002**, *5*, 613–621

des réactifs. Tous ces détails ne sont pas pris en compte. Il est donc dorénavant accepté que, pour la détection de nouveaux candidats médicament, la qualité est plus importante que la quantité.

Depuis quelques années, la RMN est apparue comme un outil puissant pour l'identification des molécules. Couplée à des méthodes HTS, elle présente l'avantage de pouvoir éliminer, par exemple, les résultats faux positifs. Son potentiel dans ce domaine de recherche commence à être reconnu et, dans certaines industries pharmaceutiques, seules les molécules sélectionnées par HTS et dont la qualité est confirmée par RMN sont retenues en priorité pour les phases suivantes d'analyse. Les méthodes de screening basées sur la RMN ont été principalement utilisées pour identifier des molécules qui interagissent avec un récepteur.

Plus récemment, le champ d'utilisation de la RMN a été étendu au criblage dit « fonctionnel ». Les techniques mises en œuvre identifient, de manière très efficace et robuste, des inhibiteurs d'une réaction enzymatique, en mesurant leur activité inhibitrice. Cependant, les premiers exemples d'application nécessitaient de grandes concentrations de substrat en raison de la faible sensibilité des techniques de RMN mises en jeu. De plus, peu d'applications de cette technique sont retrouvés dans la littérature.[179] Comme l'explique Dalvit, l'une des raisons possibles provient de l'Équation 6.

$$K_I = \frac{IC_{50} + K_{cat}}{1 + (\frac{[S]}{K_M})}$$

Équation 6 : Calcul de la constante d'inhibition K_I d'un inhibiteur pour son enzyme cible

Dans cette équation :

- K_I est la constante d'inhibition d'un inhibiteur pour son enzyme cible. Elle représente la concentration en inhibiteur pour laquelle la moitié des sites enzymatiques sont occupés. Elle illustre donc l'affinité de l'inhibiteur pour son enzyme cible.
- L'IC_{50} ou concentration inhibitrice 50, est la concentration en inhibiteur pour laquelle 50% de l'enzyme est inhibée.
- K_{cat} est la constante catalytique d'un substrat pour son enzyme cible. Elle représente le nombre de molécules de substrat hydrolysé par unité de temps.
- [S] est la concentration en substrat
- K_m est la constante de Michaelis qui caractérise la réaction enzymatique en elle-même et correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de la réaction enzymatique

[179] Chiyoda, T.; Iida, K.; Takatori, K.; Kajiwara, M. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1998**, *46*, 718-720.

est égale à la moitié de la vitesse maximale. Plus Km est petit, plus la concentration en substrat nécessaire pour atteindre la vitesse maximale de réaction est faible. Ceci signifie que le substrat possède dans ce cas une forte affinité pour son enzyme cible.

Cette équation, valable pour un inhibiteur compétitif, définit la constante de dissociation K_I d'un inhibiteur potentiel comme la fonction de la concentration [S] d'un substrat, de la constante de Michaelis K_m et la concentration de l'inhibiteur pour laquelle 50 % d'inhibition de l'enzyme est atteinte (IC_{50}).

Ainsi, Les substrats ont généralement des Km faibles, de l'ordre du micromolaire. Or, les techniques classiques de RMN sont souvent utilisées pour des concentrations d'échantillons d'un minimum de 400 µM pour pouvoir détecter les signaux RMN dans une gamme de temps acceptable. De plus, une molécule est considérée comme d'intérêt si son IC_{50} est inférieure à 10 µM. En rapport avec l'Équation 6, seuls les inhibiteurs forts, avec un K_m inférieur à 50 nM seront détectés. Ce n'est pas envisageable lors de screening précoces dont le but est d'identifier les inhibiteurs faibles ou intermédiaires provenant de familles chimiques variées.

Une alternative très intéressante pour surmonter ces limitations a été proposée par l'équipe de Dalvit en 2003[62] et consiste à utiliser des molécules marquées avec un ou plusieurs atomes de fluor et d'utiliser la RMN du ^{19}F, avec un découplage proton, comme méthode de détection.

2) Stratégies FAXs et 3-FABS

Le principe de la méthode proposée par Dalvit pour le criblage à haut débit de ligands enzymatiques potentiels et nommée FAXs (Fluorine chemical shift Anisotropy and eXchange for Screening) est résumé dans la Figure 69.[61]

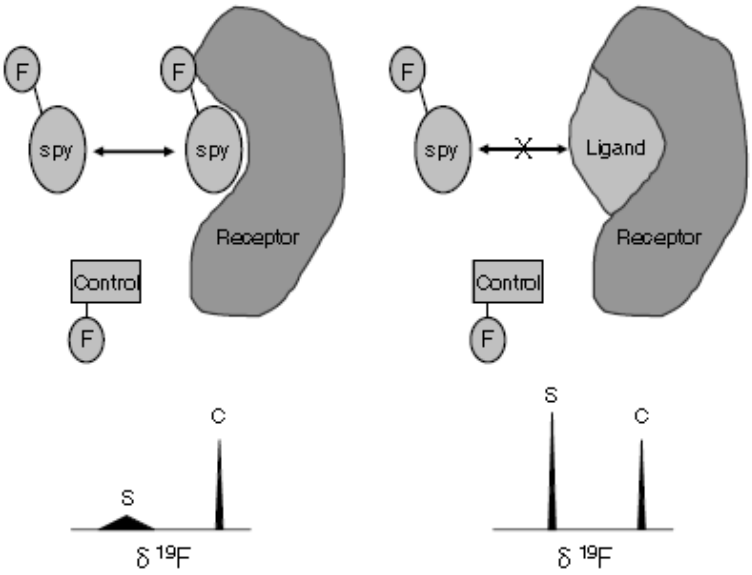


Figure 69 : Principe de la technique FAXs

Cette méthode consiste à mettre en compétition un système composé de l'enzyme ciblée pour les tests d'inhibition et d'une molécule « espion » fluorée dont l'affinité pour l'enzyme a précédemment été évaluée par analyse 3-FABS. Ce principe est décrit dans le paragraphe 3.3. du chapitre I), avec le mélange de molécules à tester. La modification de la vitesse de relaxation transversale R2 du groupement trifluorométhyle de la molécule espion, qui se traduit par un affinement de son signal en RMN indique que celle-ci n'est plus liée à l'enzyme et qu'un ligand plus puissant s'y est fixé. Ce paramètre est très souvent utilisé pour l'étude des interactions protéine-protéine. Cette méthode permet alors l'identification de ligands d'une enzyme cible.

La technique FAXs possède de nombreux avantages par rapport aux techniques de criblage classiques. La forte sensibilité de l'atome de fluor combinée à une abondance isotropique naturelle de 100 % de ^{19}F permet de détecter des signaux à une concentration relativement faible par rapport aux analyses ^{1}H RMN. Les solvants protiques, les solutions tampons ou les détergents n'interfèrent pas avec les mesures réalisées, ce qui permet de réaliser le criblage directement dans les solutions tampons plus appropriées à la stabilité des systèmes protéines étudiés ou à leur solubilité. Enfin, un avantage extrêmement important des analyses FAXS est l'absence de signaux parasites qui seraient susceptibles de recouvrir les signaux d'intérêt puisque seul les signaux de la molécule espion, seul composé fluoré, sont détectés. Ceci permet ainsi le criblage de vastes mélanges de composé de manière automatisée.

2.1. Sélection préalable d'une molécule espion[156]

L'approche par technique FAXS nécessite donc préalablement l'identification d'une molécule fluorée dite « espion » ainsi que d'une molécule témoin, de contrôle, inerte dans la réaction enzymatique. Ces deux molécules fluorées se doivent de posséder certaines propriétés particulières. Dans le but de déterminer si une molécule peut agir en tant qu'espion, deux stratégies différentes peuvent être suivies (Figure 70).

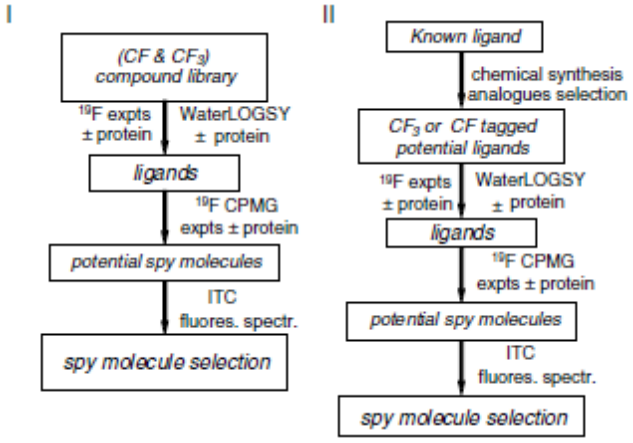


Figure 70 : Stratégies de détermination d'une molécule espion (D'après Dalvit, C.[156])

Elles diffèrent par le mode de sélection des molécules fluorées de départ à tester. En effet, selon la première approche, une librairie préexistante de composés fluorés, porteurs d'un groupement CF ou CF_3 seront testés. Ces molécules sont de natures chimiques différentes. Selon la procédure II, au contraire, les molécules fluorées sont obtenues par modification chimique ou synthèse d'analogues de ligands naturels connus.

Une fois ces composés fluorés déterminés, ils subiront alors une série d'analyses permettant de déterminer leurs capacités à être « espion ». La première analyse effectuée est une expérience RMN appelée WaterLOGSY (Water-Ligand Observed by Gradient SpectroscopY). Cette expérience étudie l'hydratation de la molécule fluorée analysée et est une méthode très sensible pour détecter l'agrégation des composés. Ces spectres ^1H utilisent la technique NOE de transfert de magnétisation, mais plutôt que d'irradier directement la molécule étudiée ou la protéine enzymatique comme dans une expérience NOE classique, l'expérience WaterLOGSY permet d'observer l'excitation indirecte des complexes ligand-enzyme et des molécules libres non complexées par perturbation sélective de la magnétisation des molécules d'eau présentes dans le

système et transfert de cette perturbation aux ligands *via* une série de transferts parallèles (Figure 71).[180]

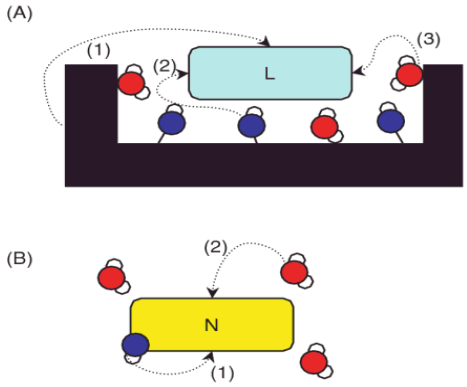


Figure 71 : Principe du transfert de magnétisation au cours d'une expérience de WaterLOGSY. A) Transfert de magnétisation à un ligand lié à une macromolécule par des molécules d'eau excitées, (1) directement par la macromolécule, (2) par les protons échangeables présents dans le site de liaison, (3) par les molécules d'eau présentes dans le site. B) Expérience de transfert de magnétisation par (1) les portons échangeables intramoléculaires, (2) par la sphère d'hydratation moléculaire.[180]

Ainsi, dans le cas de molécules liées à l'enzyme (Figure 71 A)) la magnétisation est transférée directement des molécules d'eau présentes dans le site de liaison, mais aussi indirectement par excitation des molécules d'eau présentes dans la sphère de l'enzyme ou par échange chimique entre le solvant et les protons échangeables de l'enzyme. Dans le cas d'une molécule libre en solution (Figure 71 B)), le transfert de magnétisation ne peut avoir lieu cette fois que *via* les protons échangeables intramoléculaires ou par la sphère d'hydratation moléculaire. Ceci résulte donc en un profil spectral différent : les molécules liées présentent un signal élargi et inversé dû à un temps de relaxation plus long, alors que les molécules libres en solution n'interagissant qu'avec les protons du solvant et possèdent un temps de relaxation plus court et présentent ainsi un signal positif plus fin.

La Figure 72 donne l'exemple d'une telle analyse sur deux composés fluorés A et B dont les capacités à devenir « espion » sont étudiées.[156] Le spectre A) représente le spectre ^{1}H de référence du mélange des deux composés étudiés. Les spectres B) et C) sont les expériences WaterLOGSY, respectivement en absence et en présence de la protéine enzymatique cible. Ainsi, en présence de l'enzyme (Figure 72 C), le signal de la molécule A présente des signaux élargis et inversé par rapport au spectre B) représentant l'expérience en absence d'enzyme. Ceci est caractéristique d'une liaison entre la molécule A et la protéine enzymatique. Au contraire, la

[180]Hubbard, R. E. *Structure-Based Drug Discovery: An Overview*; Royal Society of Chemistry; **2006**, p.111-112.

molécule B) ne montre pas de modification significative de son signal LOGSY en présence ou absence d'enzyme, ce qui la caractérise comme possible molécule contrôle.

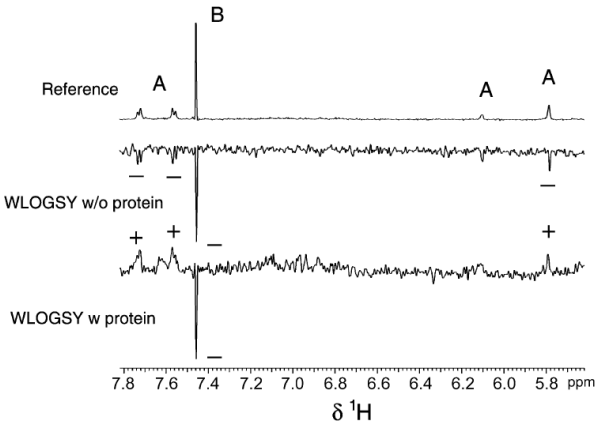


Figure 72 : Spectre RMN 1H et WaterLOGSY d'un mélange de deux composés A et B marquées par un groupement trifluorométhyle. A) Spectre RMN 1H de référence du mélange des produits A) et B). B) Spectres WaterLOGSY en absence de protéine enzymatique cible eIF4B/eIF4G. C) Spectre WaterLOGSY en présence de protéine enzymatique cible eIF4B/eIF4G.[156]

Une fois les molécules capables de se lier à l'enzyme sélectionnées, elles subissent un dernier test d'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) ou de mesure de fluorescence permettant de déterminer leurs constantes d'affinité K_d pour l'enzyme cible ainsi que la stœchiométrie (N) de la réaction enzymatique à savoir le nombre de site de liaison.

En résumé, une molécule sera considérée comme « espion » pour des études de FAXS si elle présente une constante d'affinité K_d faible c'est-à-dire qu'elle est considérée comme ligand de l'enzyme ciblée mais qu'elle pourra facilement être déplacée par de potentiels ligands lors d'études de screening à haut débit. On rappelle que ces études ont but d'identifier parmi les chimiothèques existantes, des ligands d'affinité moyenne lors de phases précoces de screening. Par ailleurs, ces molécules « espion » ne devront posséder de préférence qu'un seul site de liaison à l'enzyme (N=1) pour faciliter leur déplacement par un éventuel autre ligand.

2.2. Mise en œuvre d'un screening par technique FAXs

Le screening à haut débit de molécules diverses peut être réalisé sans que les molécules criblées n'aient besoin de respecter des conditions particulières, celles-ci pouvant même n'être que partiellement solubles dans l'eau. Par ailleurs, l'étude peut être effectuée sur une seule molécule comme sur un mélange de différents composés. Le déplacement de la molécule espion par une molécule compétitrice se traduit alors par une modification du paramètre R2 précédemment décrit

vers les valeurs de la molécule libre. Un exemple typique d'analyse FAXS de dix-huit mélanges de dix composés chacun envers le complexe enzymatique eIF4E/eIF4G est montré dans la Figure 73.[156]

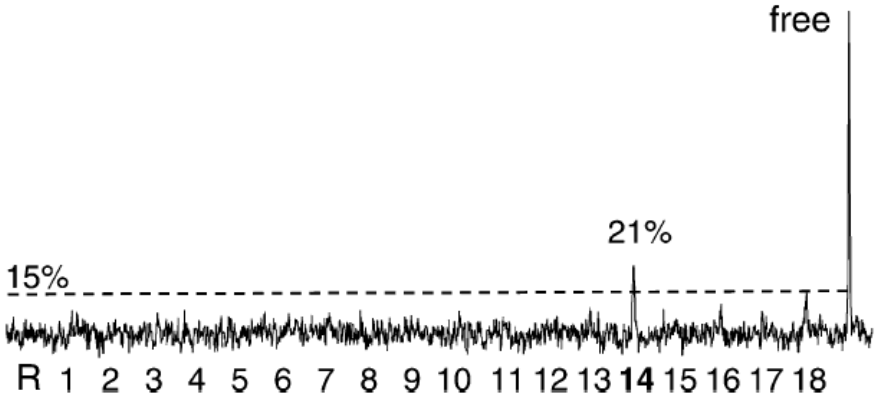


Figure 73 : Expériences FAXS réalisées sur dix-huit mélanges de 10 composés. A gauche figure le spectre RMN ^{19}F de la molécule espion et du complexe enzymatique eIF4E/eIF4G en absence de mélange. A droite est représenté le spectre RMN ^{19}F de la molécule espion et du mélange de composés en absence de complexe enzymatique.[156]

Un seuil correspondant à 15% de molécule espion déplacés, calculé par rapport à l'intensité maximale du signal de la molécule « espion » complètement libre en solution, est choisi comme valeur limite au-delà de laquelle le mélange étudié sera considéré comme comprenant un ligand de l'enzyme. Si tel est le cas, le mélange est considéré comme un « hit » et une étude de déconvolution du mélange permettra de déterminer la molécule ligand parmi le pool testé.

Dans cet exemple, le mélange 14 provoque un déplacement de la molécule « espion » à hauteur de 21%, reflétant la présence d'au moins un composé ligand. Une étude ultérieure par déconvolution permettra de déterminer la ou les molécules d'intérêt parmi ce mélange.

La possibilité de cribler des composés en mélange associée avec la rapidité de l'analyse FAXS rend possible le criblage de larges librairies de composés. De plus, l'analyse des données est rapide et peut être automatisée car ne nécessite que la mesure de deux intensités de signaux : celui de la molécule espion liée sans mélange de composés à tester et celui en présence du mélange.

Enfin, il est également à noter que les expériences FAXS peuvent être réalisées en présence de plusieurs molécules « espion » se liant en des sites différents de l'enzyme. Ces techniques de screening à haut débit par RMN du ^{19}F se révèlent donc être une alternative particulièrement intéressante aux méthodes classiques de criblage HTS. Les différentes industries pharmaceutiques se tournent donc de plus en plus vers ce type de techniques rapides à mettre en œuvre et ne nécessitant qu'une faible quantité de produit.

3) Etude de petits peptides fluorés envers la trypsine

Ainsi, le projet développé en collaboration avec le Dr. Claudio Dalvit de l'Université de Neuchâtel consiste à étudier, par analyse de type 3-FABS, le comportement de peptides d'intérêt trifluorométhylés vis-à-vis d'une endoprotéase : la trypsine. Nous désirons étudier la capacité de ces peptides à agir en tant que substrat, inhibiteur ou à être de bons candidats espion. La trypsine clivant principalement les liaisons peptidiques où un aminoacide basique engage sa fonction acide (lys, Arg), les séquences peptidiques fluorées envisagées pour cette étude de résistance sont donc les suivantes (Figure 74).

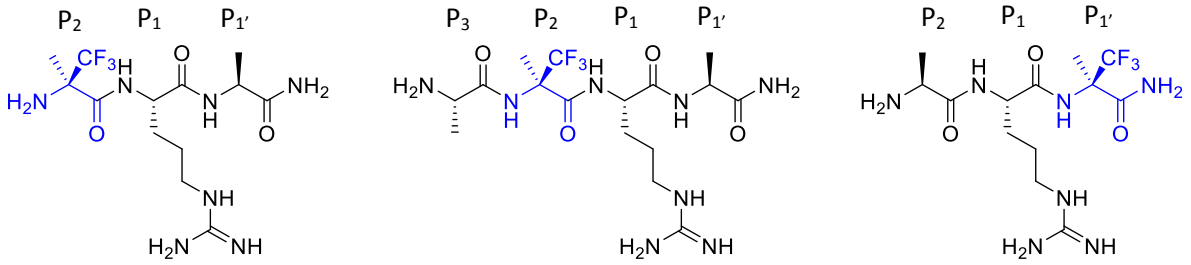


Figure 74 : Peptides synthétisés pour l'étude de résistance à la trypsine

Les peptides H-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 et H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 incorporent tous deux une (*R*)-α-Tfm-Alanine en position *N*-terminale du résidu arginine. Le tripeptide H-Ala-Arg-(*R*)-α-Tfm-Ala-NH_2, quant à lui, comporte l'aminoacide trifluorométhylé en position *C*-terminale du site de clivage de la trypsine. La première phase du projet consiste à synthétiser les séquences peptidiques envisagées. Les expériences FABS réalisées par RMN du ^{19}F seront ensuite effectuées par le Dr. Claudio Dalvit à l'Université de Neuchâtel.

3.1. Trypsine

La trypsine est une enzyme qui appartient à la famille des protéases à sérine qui hydrolyse les liaisons peptidiques principalement du côté *C*-terminal des aminoacides basiques comme la lysine ou l'arginine (Figure 75). Présente dans le suc pancréatique des vertébrés en général, elle permet la dégradation des protéines alimentaires en plus petits peptides. Son action est donc nécessaire à l'absorption de ces protéines, généralement trop grosses pour être absorbées directement par l'intestin.

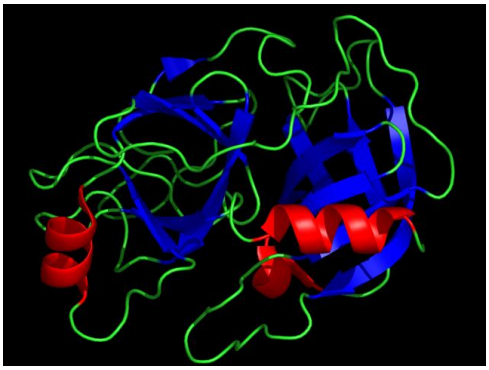


Figure 75 : Structure en trois dimensions de la trypsine (d'après Protein Data Bank)

Ces enzymes à sérine sont caractérisées par la présence d'une triade catalytique composée des chaînes latérales de trois aminoacides : la sérine 195, l'histidine 57 et l'aspartate 102 (Schéma 113). Ces résidus interagissent de manière ionique et forment un relai de charges qui rend la sérine nucléophile. Ainsi, elle peut attaquer le carbonyle de la liaison peptique clivée.

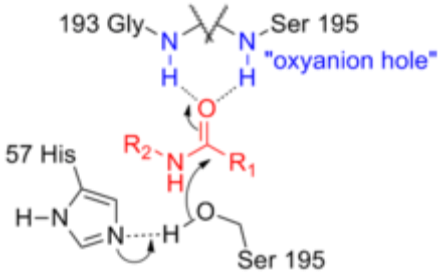


Schéma 113

Le résidu aspartate a pour rôle d'attirer et de stabiliser les charges positives des lysines ou arginines et est donc responsable de la spécificité de l'enzyme.

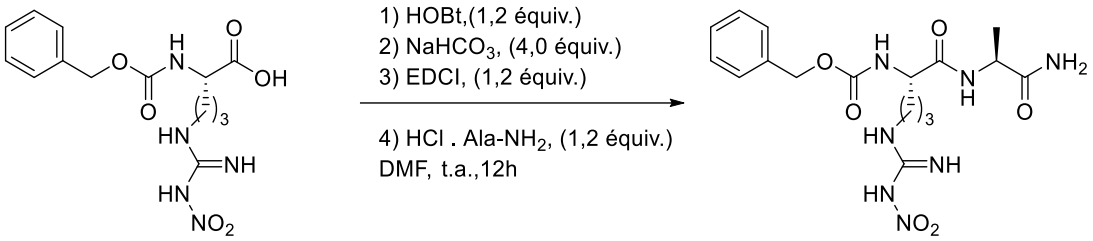
3.2. Etude de l'interaction de petits peptides fluorés avec la trypsine par RMN 3-FABS

Afin de déterminer la résistance de peptides fluorés à la trypsine, les deux peptides H-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 et H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 incorporant une α-Tfm-Ala en position *N*-terminale d'un résidu arginine ont, dans un premier temps, été synthétisés. Les synthèses ont été réalisées manuellement, en solution.

3.2.1. Synthèse des peptides

3.2.1.1. Synthèse en solution du tripeptide H-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg-Ala-NH_2

La synthèse du tripeptide H-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 débute par la formation du dipeptide H-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 **(*S,S*)-40** (Schéma 114).

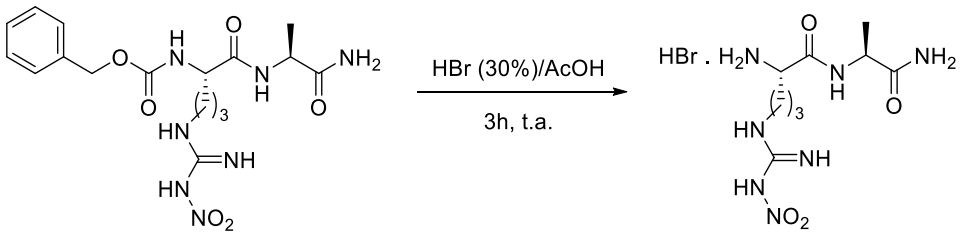


(*S,S*)-40 (97%)

Schéma 114

Le dipeptide protégé *N*-Cbz-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 **(*S,S*)-40** est obtenu par couplage de la *N*-Cbz-Arg(NO_2)-OH et du chlorhydrate de l'Alanine amide primaire tous deux commerciaux, avec un excellent rendement de 97%. Nous avons choisi un groupement nitro comme protection de la chaîne latérale de l'arginine car celui-ci empêche la formation d'un δ-lactame lors de l'activation de la fonction acide de cet acide aminé. Ce groupement, facilement clivable par hydrogénation, présente également l'avantage de permettre une déprotection finale en une unique étape.

Dans le but de coupler la *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-alanine **(*R*)-8** à ce dipeptide, il est ensuite nécessaire de procéder à la déprotection de sa position *N*-terminale. Afin de ne pas risquer de réduire le groupement nitro de la chaîne latérale de l'arginine, l'hydrogénolyse du groupe protecteur Cbz est exclue. Sa déprotection est donc réalisée de manière quantitative par action de l'acide bromhydrique dans l'acide acétique pendant 3 heures à température ambiante (Schéma 115). Le dipeptide déprotégé est obtenu quantitativement sous forme de bromhydrate et utilisé sans purification.



(*S,S*)-40 **(*S,S*)-41** quantitatif

Schéma 115

Le couplage de la *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Alanine **(*R*)-8** au dipeptide déprotégé **(*S,S*)-41** dans des conditions classiques par activation de l'acide sous forme d'ester permet l'obtention du tripeptide *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 **(*R,S,S*)-42** avec un rendement de 83% (Schéma 116).

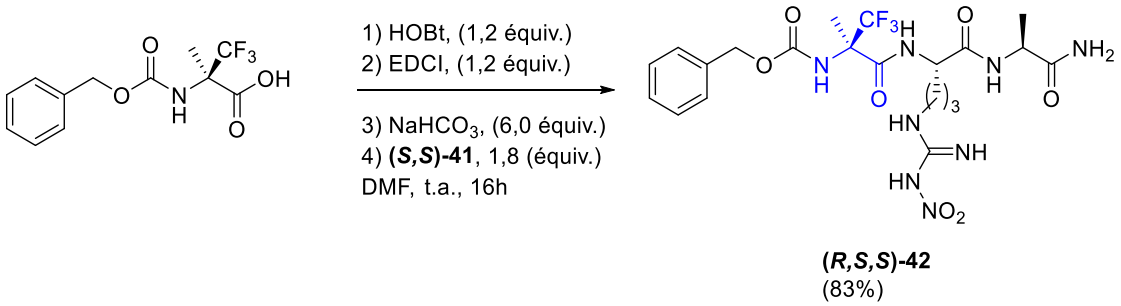


Schéma 116

La déprotection finale du tripeptide protégé s'opère enfin par hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon activé à 10% sous 5 bars d'hydrogène. Cette pression d'hydrogène est nécessaire pour pouvoir déprotéger le groupement nitro de la chaîne latérale de l'arginine. Le tripeptide (R,S,S)-43 est ainsi obtenu avec un rendement de 62% après purification par HPLC semi préparative (Schéma 117).

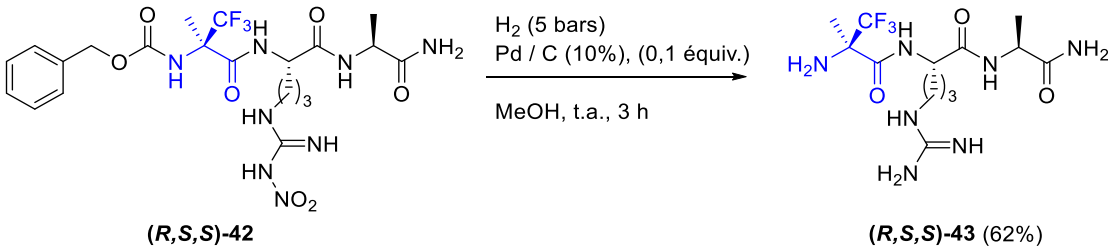


Schéma 117

3.2.1.2. Synthèse du tétrapeptide H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg-Ala-NH_2

Le couplage d'une alanine en position *N*-terminale du tripeptide H-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg-Ala-NH_2 précédent nécessite la déprotection préalable du groupement Cbz de **(*R,S,S*)-42** par action de l'acide bromhydrique dans l'acide acétique pendant 3 heures à température ambiante (Schéma 118). Le tripeptide déprotégé **(*R,S,S*)-44** est ainsi obtenu de manière quantitative et utilisé sans purification.

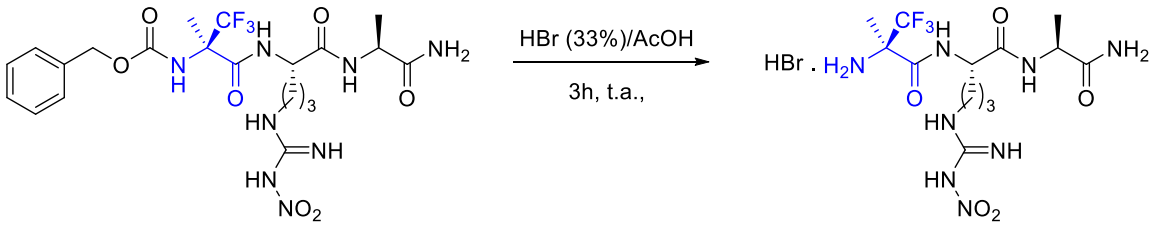


Schéma 118

Le couplage d'une *N*-Cbz-Alanine est alors immédiatement réalisé par activation en présence de chloroformate d'isobutyle et de *N*-méthylmorpholine à -20 °C ce qui permet l'obtention du tétrapeptide protégé **(*S,R,S,S*)-45** avec un rendement purifié de 52% (Schéma 119).

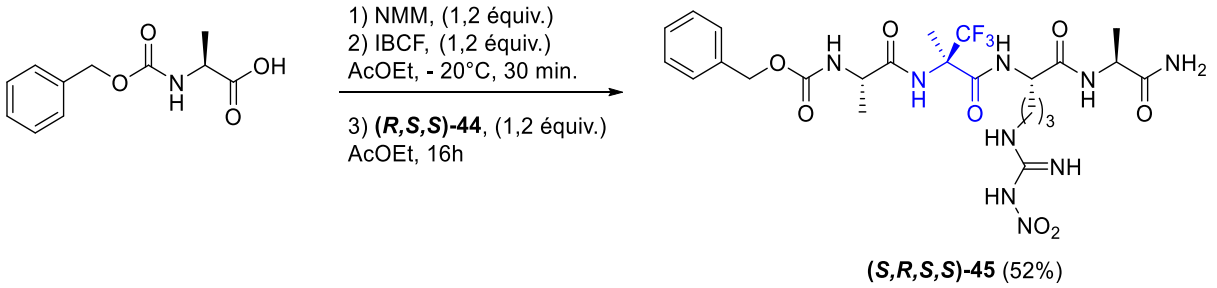


Schéma 119

Le tétrapeptide protégé **(*S,R,S,S*)-45** est enfin déprotégé par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon activé à 10% et sous 5 bars d'hydrogène. **(*S,R,S,S*)-46** est obtenu avec un rendement de 52% après purification semi préparative (Schéma 120).

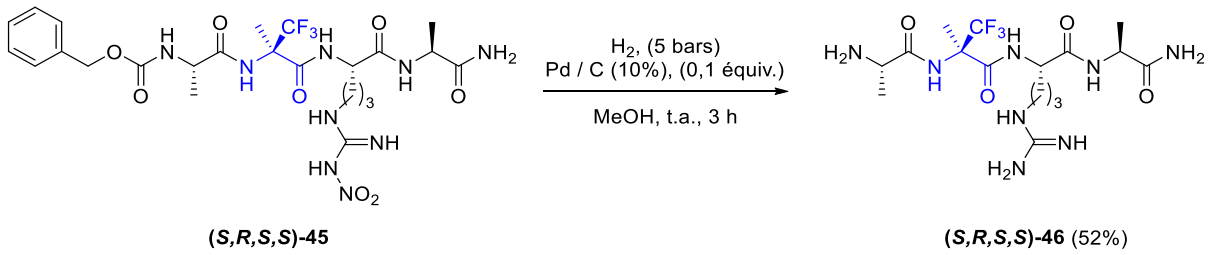


Schéma 120

3.2.1.3. Synthèse du tripeptide H-Ala-Arg-(*R*)-α-Tfm-Ala-NH_2

La synthèse du tétrapeptide H-Ala-Arg-(*R*)-α-Tfm-Ala-NH_2 nécessite dans un premier temps d'amidifier la position *C*-terminale de l'α-Tfm-Alanine. L'emploi d'ammoniac gazeux en présence d'agents de couplage dans le DCM à 0 °C permet ainsi l'obtention de la Boc-(*R*)-α-Tfm-

Ala-NH_2 **(*R*)-47** avec un excellent rendement de 99%. La déprotection du groupement Boc de **(*R*)-47** est ensuite réalisée grâce à une solution d'HCl 4M dans l'acétate d'éthyle, ce qui permet, après évaporation du milieu réactionnel, l'obtention de l'amide de la (*R*)-α-Tfm-Alanine avec un rendement de 89% (Schéma 121).

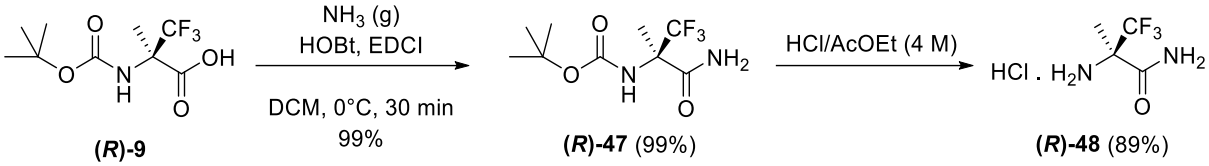


Schéma 121

Le couplage de l'amide primaire **(*R*)-48** avec un résidu *N*-Cbz-Arg(NO_2) s'effectue ensuite par activation sous forme d'anhydrides mixtes à l'aide de *N*-Méthylmorpholine et d'isobutylchloroformiate. Or, cette méthode n'a cette fois-ci par permis l'obtention du dipeptide désiré (Schéma 122).

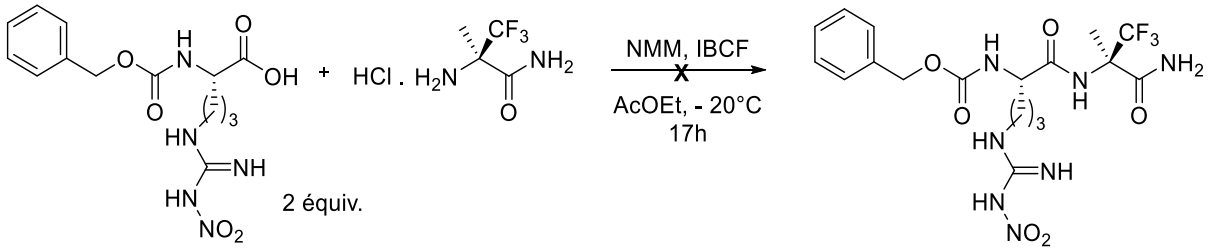


Schéma 122

En effet, après traitement de la réaction et extraction, aucune trace de produit fluoré n'est retrouvée dans la phase organique. L'amide de l'α-Tfm-Alanine est retrouvé inchangé dans la phase aqueuse. L'analyse par RMN de la fraction organique montre la présence de formation de l'acyle guanidinium cyclique (Figure 76) résultant de la cyclisation de la chaîne latérale de l'arginine sur la fonction acide carboxylique de la *N*-Cbz-Arg(NO_2)-OH.

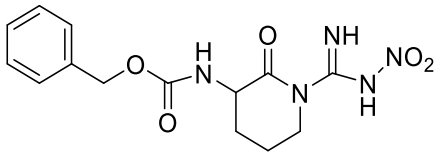


Figure 76 : Acyle guanidinium cyclique se formant durant la phase d'activation de la fonction acide carboxylique de la *N*-Cbz-Arg(NO_2)-OH

Il semblerait donc que ce couplage sur l'arginine apparaisse comme une limitation de la méthode des anhydrides mixtes.

3.2.2. Etude de 3-FABS

La méthode 3-FABS (three Fluorine Atoms for Biochemical Screening) permet d'étudier la capacité de peptides fluorés à agir comme substrats / inhibiteurs d'une enzyme par suivi de l'apparition du ou des produits d'hydrolyse fluorés. L'intensité du signal RMN du ^{19}F des produits formés permet alors le calcul des constantes d'affinité Km et Kd des peptides étudiés vis-à-vis de la trypsine.

Ainsi, les peptides **(*R,S,S*)-43** et **(*S,R,S,S*)-46** ont fait l'objet d'une expérience de digestion enzymatique par la trypsine. Afin de déterminer leur comportement vis-à-vis de cette enzyme, à savoir leur capacité à agir en tant que substrat, inhibiteur ou molécule espion pour d'éventuelles expériences de criblage de type FAXS, les spectres RMN ^{19}F ont été enregistrés à intervalles de temps réguliers.

3.2.2.1. Digestion du peptide **(*S,R,S,S*)-46** par la trypsine et analyse par étude de type 3-FABS

Le peptide **(*S,R,S,S*)-46** a ainsi été incubé dans une solution aqueuse de tampon phosphate à pH 7,4 en présence de trypsine à la température de 25 °C pendant 127 minutes. La concentration en peptide est de 77 µM et celle de l'enzyme de 100 nM. Des spectres de RMN ^{19}F ont alors été enregistrés à intervalles de temps réguliers en présence et en absence d'un inhibiteur connu de la trypsine : le chlorhydrate de 3-fluoro-4-méthylbenzènecarboximidamide (Figure 77).[181]

[181] Vulpetti, A.; Schiering, N.; Dalvit, C. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2010**, *78*, 3281-3291.

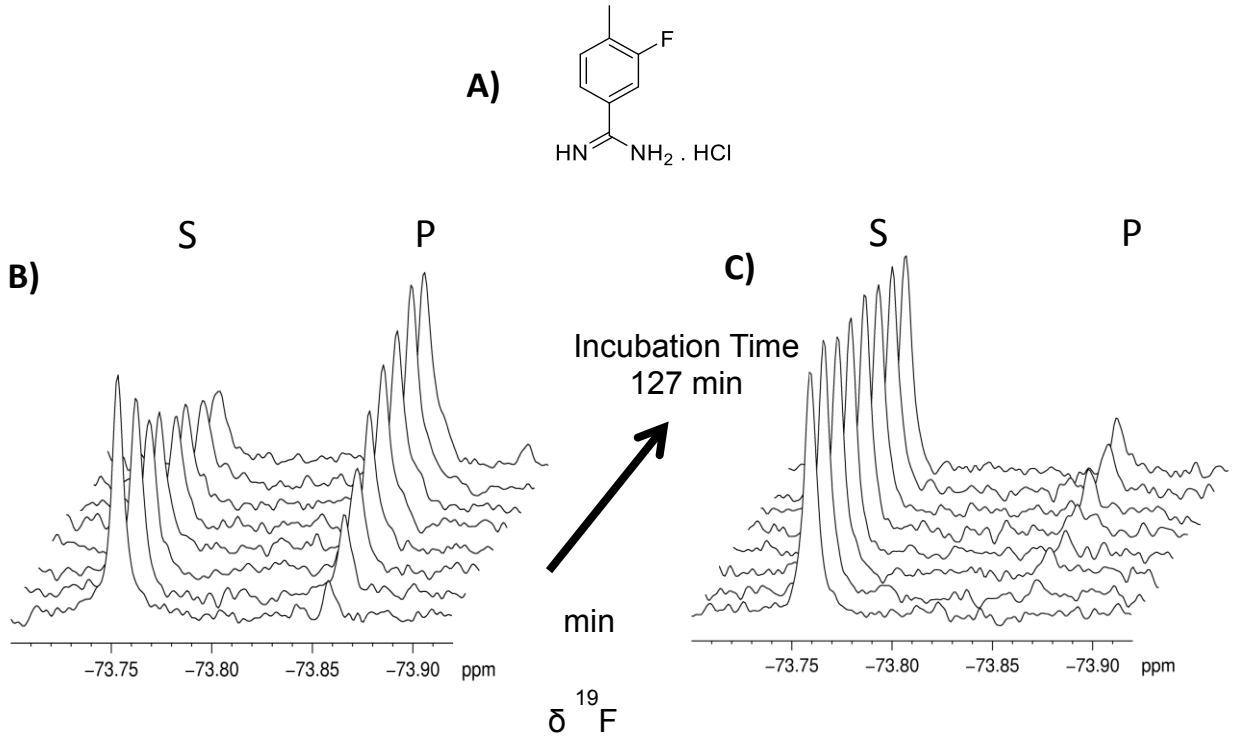


Figure 77 : Spectres de RMN ^{19}F de suivi de la digestion enzymatique du peptide (*S,R,S,S*)-46 par la trypsine. A) Structure du chlorhydrate de 3-fluoro-4-méthylbenzènecarboximidamide. B) Digestion en absence d'inhibiteur. C) Digestion en présence de l'inhibiteur à la concentration de 100 µM.

Les lettres S et P indiquent respectivement le déplacement chimique du substrat, **(*S,R,S,S*)-46** et de son produit fluoré de digestion par la trypsine. En absence d'inhibiteur (Figure 77 A), nous pouvons constater que le peptide **(*S,R,S,S*)-46** est lentement clivé en un deuxième produit fluoré P possédant un déplacement chimique différent du peptide d'origine ce qui permet de bien pouvoir les identifier. Après 127 minutes de digestion, le peptide est presque totalement converti en produit de digestion P. Ce tétrapeptide est donc reconnu par l'enzyme et, son clivage relativement rapide par celle-ci indique qu'il agit comme substrat de la trypsine. Le calcul de ses constantes d'affinité Km et K_{cat} est actuellement en cours à l'Université de Neuchâtel par le Dr. Dalvit.

En présence de l'inhibiteur, le peptide fluoré **(*S,R,S,S*)-46** n'est plus hydrolysé par la trypsine. Après 127 minutes d'expériences seules quelques traces de produit fluoré d'hydrolyse P sont observables sur le spectre RMN ^{19}F. **(*S,R,S,S*)-46** est donc déplacé facilement du site d'hydrolyse enzymatique par l'inhibiteur.

Ainsi, la capacité de **(S,*R,S,S*)-46** à être ligand de la trypsine et à être clivé par celle-ci indiquent qu'il agit en tant que substrat de l'enzyme. Egalement, le fait qu'il soit déplacé par un inhibiteur puissant le caractérise comme molécule espion potentielle pour des expériences de criblage d'inhibiteurs de la trypsine. En effet, une molécule espion doit pouvoir être reconnue par

l'enzyme cible mais ne doit pas être suffisamment liée à elle pour être déplacé par des ligands inhibiteurs plus puissants.

3.2.2.2. Digestion du peptide **(*R,S,S*)-43** par la trypsine et analyse par étude de type 3-FABS

Le peptide **(*R,S,S*)-43** ne possédant pas de résidu alanine en position *N*-terminale a également été incubé dans une solution aqueuse de tampon phosphate à pH 7,4 en présence de trypsine à la température de 25 °C pendant 127 minutes. La concentration de **(*R,S,S*)-43** est ici de 140 µM et celle de l'enzyme de 100 nM. De même que pour **(S,*R,S,S*)-46**, les spectres de RMN ^{19}F ont alors été enregistrés après 12 minutes puis après 41 minutes de digestion par la trypsine (Figure 78).

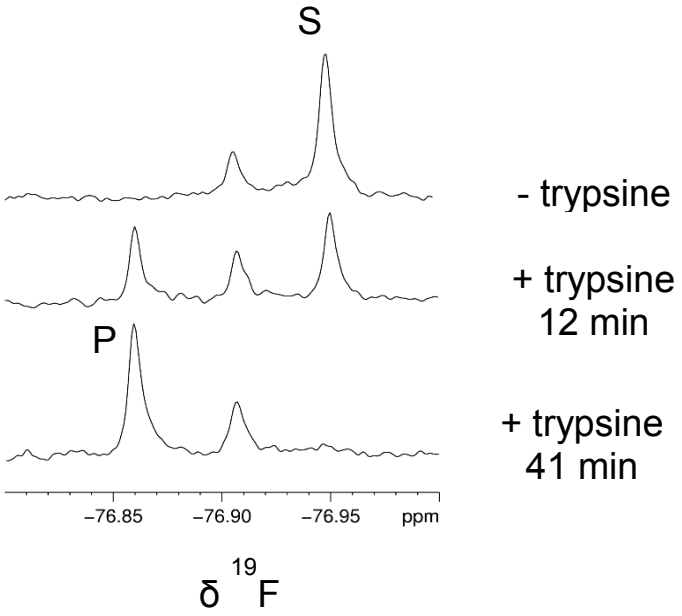


Figure 78 : Spectres de RMN ^{19}F de suivi de la digestion enzymatique du peptide (*R,S,S*)-40 par la trypsine. A) Spectre de référence en absence de trypsine. B) Spectre après 12 min de digestion par la trypsine. C) Spectre après 41 min de digestion par la trypsine.

Le spectre de référence du peptide **(*R,S,S*)-43** en absence de trypsine permet de relever le déplacement chimique du peptide à -76,96 ppm. Néanmoins, nous pouvons observer la présence d'une impureté résiduelle dont le pic possède un déplacement chimique à -76,91 ppm dont l'intensité demeure inchangée durant toute l'expérience de digestion. Après 12 minutes de digestion par la trypsine, on constate l'apparition d'un produit de digestion fluoré P à intensité équivalente avec le peptide **(*R,S,S*)-43** de départ.

Enfin, après 41 minutes d'expérience, le peptide **(*R,S,S*)-43** est totalement clivé en produit P. Plus aucune trace de peptide de départ n'est observable.

Ainsi, le tripeptide **(*R,S,S*)-43** agit, au même titre que **(S,*R,S,S*)-46** comme un substrat de la trypsine. Les mêmes expériences de digestion en présence d'un inhibiteur doivent encore être réalisées pour déterminer sa capacité à être déplacé par un inhibiteur afin de déterminer sa capacité à agir en tant que molécule espion.

3.3. Conclusion

Les études de digestion enzymatique par la trypsine, réalisées sur deux peptides incorporant une α-Tfm-Alanine, **(*R,S,S*)-43** et **(*S,R,S,S*)-46**, ont permis, par une étude RMN de type 3-FABS, de révéler leur capacité, dans un premier temps, à se lier à l'enzyme et à agir comme substrat. En effet, ces deux peptides sont clivés par la trypsine. D'autre part, des expériences similaires de digestion de **(*S,R,S,S*)-46** en présence d'un inhibiteur puissant connu de la trypsine ont montré que le peptide n'est pas clivé en sa présence, signifiant qu'il est déplacé du site catalytique par cet inhibiteur. Ces mêmes expériences doivent être réalisées sur le tripeptide **(*R,S,S*)-43**.

Ces deux caractéristiques, la capacité à être reconnu par la trypsine et à être déplacé par une autre molécule font de **(*S,R,S,S*)-46** un bon candidat espion pour des tests de criblage rapide de potentiels inhibiteurs.

Dans le but de développer des inhibiteurs de la trypsine, la synthèse du peptide H-Ala-Arg-(*R*)-α-Tfm-Ala-NH_2 possédant le résidu fluoré α-Tfm-Alanine en position *C*-terminale a été envisagée. En effet, la présence de l'α-Tfm-Alanine en position *N*-terminale de l'arginine basique pour les peptides **(*R,S,S*)-43** et **(*S,R,S,S*)-46** ne semble pas ralentir l'hydrolyse par la trypsine. En revanche, sa présence du côté *C*-terminal de l'arginine, au niveau du site de coupure de l'enzyme, pourrait permettre de générer un inhibiteur de cette enzyme. Cependant, la stratégie synthétique envisagée n'a pas permis pour le moment de coupler l'amide primaire **(*R*)-48** de l'α-Tfm-Alanine au résidu arginine (Schéma 122).

IV) Conclusion du chapitre

Une partie de mon travail de thèse a consisté à étudier les interactions peptide fluoré / protéine ainsi que la stabilité protéolytique de divers peptides fluorés vis-à-vis de deux enzymes : la pepsine et la trypsine. De plus, les activités des peptides H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OH et de son analogue non fluoré comportant un Aib à la place de l'α-Tfm-Ala sur l'inhibition de l'agrégation du peptide Aβ42 responsable de la maladie d'Alzheimer, ont été évaluées. Les

résultats, prometteurs, montrent un ralentissement significatif de l'agrégation du peptide Aβ42 par P-Aib et P-(*R*)-Tfm. Néanmoins, de nouvelles expériences d'agrégation observées par fluorescence à la ThT et dichroïsme circulaire réalisées sur un lot différent de peptide Aβ42 et en présence du peptide incorporant l'énantiomère (*S*) de l'α-Tfm-Alanine, **P-(*S*)-Tfm**, n'ont pas permis de confirmer les premiers résultats. **P-(*R*)-Tfm** ne ralentit plus que très légèrement la cinétique d'agrégation de Aβ42. Concernant **P-(*S*)-Tfm** et **P-Aib**, ils ne possèdent aucune activité inhibitrice. De nouveaux essais d'inhibition de la formation de fibres amyloïdes doivent être réalisés pour corroborer ces résultats.

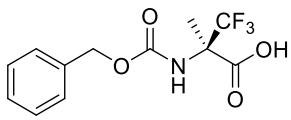
Par ailleurs, la stabilité métabolique de peptides incorporant une α-Tfm-Alanine a été évaluée. Des expériences de digestion enzymatique ont été réalisées en présence de pepsine porcine et de trypsine. Concernant la pepsine, les résultats indiquent un ralentissement considérable de la vitesse d'hydrolyse du peptide **(*S,S,R,S*)-24** par rapport au peptide incorporant un résidu Alanine **(*S,S,S,S*)-39** : alors que le peptide non fluoré **(*S,S,S,S*)-39** est hydrolysé après 15 minutes d'expérience, le peptide fluoré **(*S,S,R,S*)-2** est toujours intact même après 1h30 d'expérience. Ce n'est qu'après 24 heures de digestion que le peptide est clivé en position *C*-terminale par la pepsine à hauteur de 50%.

Concernant la trypsine, les expériences de digestion ont été réalisées sur deux peptides incorporant une (*R*)-α-Tfm-Alanine du côté *N*-terminal d'une arginine. La technique de RMN 3-FABS a permis de suivre les expériences de digestion effectuées et de déterminer si ces peptides agissent comme substrat de l'enzyme. De plus, le peptide **(*S,R,S,S*)-46** peut être déplacé du site catalytique de l'enzyme par un inhibiteur puissant de la trypsine. Il possède donc les qualités d'un bon candidat espion pour des test de criblage de potentiels inhibiteurs de la trypsine par des techniques de FAXS.

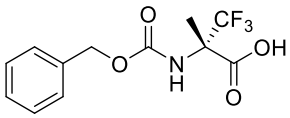
Dans le but de développer des inhibiteurs de la trypsine, la synthèse d'un peptide incorporant une α-Tfm-Alanine en position *C*-terminale du résidu arginine, au niveau du site de coupure de l'enzyme, a été envisagée. La synthèse d'un peptide de ce type est actuellement en cours au laboratoire.

CONCLUSION GÉNÉRALE

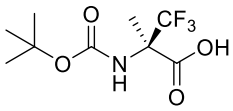
L'incorporation de l'α-Tfm-Alanine et plus particulièrement le couplage de sa fonction amine avec d'autres aminoacides était un enjeu important et une étape clef pour l'étude de l'influence de sa présence dans des peptides. Une première partie de mes travaux de thèse a consisté à optimiser les conditions de couplage des fonctions acide carboxylique et amine terminales. Nous avons montré que la protection des fonctions terminales est nécessaire pour l'obtention de produits facilement purifiables et, dans ce but, différents groupements protecteurs de l'α-Tfm-Alanine ont été obtenues avec succès.



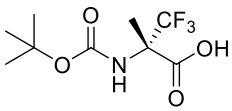
(*R*)-8



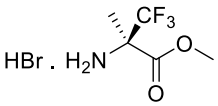
(*S*)-8



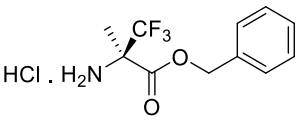
(*R*)-9



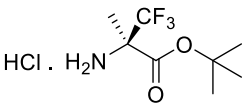
(*S*)-9



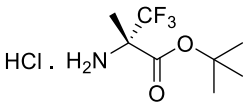
(*R*)-11



(*R*)-13

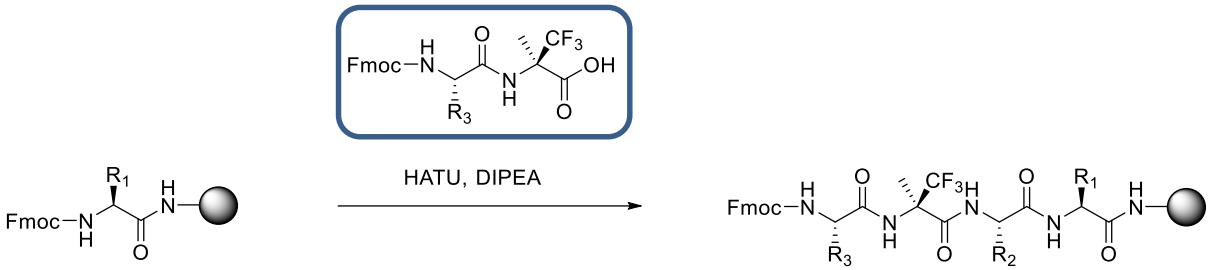


(*R*)-15

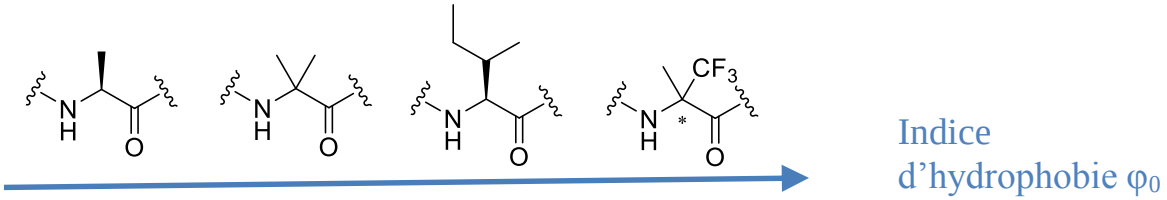


(*S*)-15

Si le couplage de la fonction acide carboxylique de l'α-Tfm-Alanine reste classique, celui de l'amine, fortement désactivée par la présence du groupement trifluorométhyle en position α, nécessite des conditions d'activation plus puissantes pour être réalisé. L'emploi des chlorures d'acyle s'est montré efficace mais n'étant stables qu'en présence du groupement protecteur Fmoc, leur utilisation comporte de nombreux inconvénients pour la synthèse en solution. Le recours aux anhydrides mixtes s'est montré particulièrement efficace pour le couplage de la fonction amine et est désormais la méthode de choix pour la synthèse de peptides fluorés en solution. Afin d'étendre la synthèse de peptides fluorés à plus grande échelle, l'incorporation de l'α-Tfm-Alanine par synthèse peptidique supportée est nécessaire. Nous avons montré que les stratégies classiques d'incorporation itérative des différents aminoacides de l'extrémité *C*-terminale vers l'extrémité *N*-terminale ne fonctionnaient pas pour l'extension des séquences peptidiques au-delà du résidu fluoré. Pour pouvoir poursuivre les synthèses en cours, nous avons développé une stratégie par incorporation de blocs dipeptidiques préalablement synthétisés en solution. Après déprotection du groupement Fmoc, la synthèse peut se poursuivre de manière classique.



L'emploi de ces conditions optimisées a ainsi permis l'obtention de divers peptides incorporant l'α-Tfm-Alanine de configuration (*R*) ou (*S*) en diverses positions Cette première phase d'optimisation des conditions de synthèse peptidique a ainsi permis l'étude de l'hydrophobie de tripeptides comportant une α-Tfm-Ala en différentes positions, dans le but de mesurer l'influence du groupement trifluorométhyle sur l'hydrophobie de tels peptides. Pour cela, la méthodologie d'analyse mise au point consiste en la mesure par RP-HPLC sur une colonne chromatographique de type C18, d'indices d'hydrophobie dérivés des temps de rétention des peptides étudiés. Cette étude a permis de fournir, pour la première fois, des valeurs mesurées et non calculées, d'indices d'hydrophobie φ_0 de peptides fluorés et de les comparer à ceux de peptides analogues. Une échelle des valeurs de φ_0 peut ainsi être établie permettant de visualiser la contribution du groupement trifluorométhyle sur l'augmentation de l'hydrophobie. Les peptides fluorés sont ainsi les plus hydrophobes avec une valeur de φ_0 plus élevée que celle du peptide analogue comportant un acide α-aminoisobutyrique, mais également supérieure au peptide incorporant une isoleucine considérée comme le résidu le plus hydrophobe.



L'intérêt du groupement trifluorométhyle pour l'augmentation de l'hydrophobie de fragments peptidique est donc clairement démontré. Dans le but de développer des fragments hautement hydrophobes, la synthèse de tripeptides incorporant un résidu Tfm-Cystéine a été réalisée. La mesure et la comparaison de leur hydrophobie par rapport aux peptides non fluorés est actuellement en cours.

Enfin, une dernière partie de ma thèse consistait à étudier les interactions peptide fluoré/protéine ainsi que leur stabilité protéolytique vis-à-vis de deux enzymes : la pepsine et la trypsine. Dans le cadre de l'inhibition de l'agrégation du peptide Aβ42 responsable du dépôt de plaques amyloïdes retrouvées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, l'activité inhibitrice de deux tripeptides incorporant une α-Tfm-Alanine de configuration (*R*) ou (*S*) ainsi

que celle de leurs analogues non fluorés comportant l'acide α-aminoisobutyrique ou une alanine a été évaluée. Les premiers résultats montrent un ralentissement significatif de l'agrégation de Aβ42 par le peptide fluoré **P-(*R*)-Tfm** et par son analogue incorporant un Aib **P-Aib**. Cependant, ces résultats ne sont pas reproductibles d'un lot de peptide Aβ42 à un autre. Concernant le peptide fluoré comportant l'énantiomère (*S*) de l'α-Tfm-Alanine, **P-(*S*)-Tfm**, ce dernier ne possède aucune activité inhibitrice. De nouveaux essais d'inhibition doivent être réalisés pour corroborer ces résultats.

Par ailleurs, la stabilité métabolique de peptides incorporant une α-Tfm-Alanine a été évaluée. Des expériences de digestion enzymatique ont été réalisées en présence de pepsine porcine et de trypsine. Concernant la pepsine, les résultats indiquent un ralentissement considérable de la vitesse d'hydrolyse du peptide H-Ala-Phe-(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-NH_2 **(*S,S,R,S*)-24** par rapport au peptide incorporant un résidu Alanine à la place de l'aminoacide fluoré : alors que le peptide non fluoré est hydrolysé après 20 minutes d'expérience, le peptide fluoré est toujours intact même après 1h30 d'expérience. Ce n'est qu'après 24 heures de digestion que le peptide est clivé par la pepsine à hauteur de 50%.

Afin d'étudier le comportement de peptides incorporant un résidu α-Tfm-Alanine envers la trypsine, des expériences de digestion de peptides comportant un résidu basique arginine ont été réalisées et suivies par une méthode de RMN ^{19}F appelée 3-FABS. Cette technique de détection permet, par la variation sensible du déplacement chimique de produits fluorés d'observer la disparition d'un substrat enzymatique fluoré et l'apparition de produits de digestion fluorés. Quantitative, elle permet également le calcul de constantes d'inhibition ou d'affinité, par mesure à intervalles de temps réguliers de l'intensité des signaux RMN ^{19}F du substrat et des produits de clivage enzymatique. Nous avons ainsi montré par expérience 3-FABS que le tétrapeptide H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg-Ala-NH_2 **(*S,R,S,S*)-46** est reconnu par la trypsine et est clivé par cette dernière. Il agit donc comme substrat de l'enzyme. Une même expérience réalisée en présence d'un inhibiteur connu de l'enzyme a montré que sa présence inhibe le clivage du peptide. Il possède donc les qualités d'un bon substrat pour des tests de criblage de potentiels inhibiteurs de la trypsine par des techniques de FAXs.

Dans le but de développer des inhibiteurs de la trypsine, la synthèse d'un peptide incorporant une α-Tfm-Alanine en position *C*-terminale du résidu arginine, au niveau du site de coupure de l'enzyme, a été envisagée. La synthèse d'un peptide de ce type est actuellement en cours au laboratoire.

EXPERIMENTAL PART

Solvents purification:

Solvents were dried and distilled as follow:

- THF and diethyl ether were distilled over sodium and benzophenone under argon atmosphere.
- Dichloromethane was distilled over calcium hydride under argon atmosphere.
- Toluene was distilled over sodium under argon atmosphere.
- DMF was distilled over 4Å molecular sieves

Chromatography:

Reactions were monitored by TLC on SDS silica gel 60 F254 sheets. TLC sheets were visualized under 254 nm UV light and revealed with either a 10% phosphomolibdic acid solution in ethanol or a $KMNO_4$ solution.

Purifications by silica gel chromatography were performed on Macherey-Nagel 70-230 mesh ASTM silica.

Products characterization:

^{1}H NMR spectra, ^{13}C NMR spectra and ^{19}F NMR spectra were recorded on a JEOL ECX-400 (400 MHz 1H, 100.5 MHz ^{13}C and 376.2 MHz ^{19}F). Chemical shift values (δ) were reported in ppm downfield from Me_4Si (δ 0.0 ppm), $CDCl_3$ (δ 77.16 ppm) or C_6F_6 (δ -164.9 ppm) or as internal standard. Data are reported as follows: chemical shift (δ ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, p = pentet, m = multiplet), coupling constant (Hz), integration.

Car (aromatic carbon), Cqar (quaternary aromatic carbon).

Infrared (IR-FT) spectra were performed on a Brucker Tensor.

Specific rotations were measured on a JASCO P1010 polarimeter.

Microanalysis were performed by the Service Central d'Analyses of CNRS, or by IMAGIF/ICSN-CNRS.

HRMS analyses were performed on a JEOL JMS-GC Mate II.

Melting points (uncorrected) were measured in a capillary tube on a Büchi apparatus

Elution conditions for hydrophobicity studies

The experiments were performed with an Agilent HPLC system coupled with a diode array UV/vis detector operated at 215 nm and an Evaporating Light Scattering Detector (ELSD). Data acquisition was performed with the System Software. The chromatography column used for analysis was a Zorbax RC-C_{18} analytical column (4.6 x 250 mm 5 µm).

Peptides were dissolved in the mobile phase at the concentration of 0.1 mg/mL. The chromatography was carried out at room temperature (25 °C) and the injection volume was 15 µL for all experiments.

For experiments performed at pH 2, mobile phase consisted of 0.1% trifluoroacetic acid in water and 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile at different proportions.

For experiments performed at pH 7, mobile phase consisted of 50 nM ammonium acetate in water and pure acetonitrile at different proportions.

The column dead time (t_0) was estimated from the retention time of sodium nitrate measured with ELSD. The obtained retention data were used to derive the values of capacity factor (k'), which was calculated in the usual manner, that is $k' = (tr - t_0)/t_0$.

Pepsin digestion

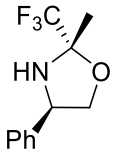
Proteolytic stability experiments of peptides against pepsin were performed in a HCl buffer at pH 2. A solution of pepsin in HCl at pH 2 at the concentration of 4 g/L was prepared. Peptides were dissolved in HCl at the concentration of 10 mmol/L. Digestion mixture consisted in mixing 100 µL of pepsin solution and 100 µL of peptides solution in a final volume of 1 mL. Digestion was monitored by UPLC analysis coupled with a mass detection at theses following times : 5, 15, 60, 150 minutes and after 24 hours of experiments. 20 µL samples were quenched by 20 µL of a solution of NaOH at pH 12 and analysed. Spectra were recorded using Mass Lynx Software

Trypsin digestion

Trypsin digestion experiments of peptides were performed by Dr. Claudio Dalvit of University of Neuchâtel, in an aqueous phosphate-buffered saline (PBS) solution at pH 7.4. A solution of trypsin in the aqueous phosphate-buffered saline solution at pH 7.4 at the concentration of 100 nM was prepared. Peptides were dissolved in the aqueous phosphate-buffered saline solution at the concentration of 140 µM for **(*R*,*S*,*S*)-43** and 77 µM for **(*S*,*R*,*S*,*S*)-46**.

3-FABS NMR experiments were performed at 25 °C on a Bruker Advance II 400 (376 MHz Larmor Frequency for ^{19}F) NMR spectrometer was equipped with a 5 mm BB/1H/^{19}F probe. 8% D_2O was added to the samples for the lock signal. Proton decoupling was applied during the acquisition period. The chemical shifts are referenced to $CFCl_3$. The data were multiplied with an exponential window function with 1 Hz line broadening prior to Fourier transformation.

(*2S,4R*)-2-methyl-4-phenyl-2-trifluoromethyl-1,3-oxazolidine 1



(*R*)-Phenylglycinol (17.98 g, 131 mmol) was added at 0 °C to a solution of trifluoroacetone (14.4 mL, 161 mmol, 1.23 equiv.) in toluene (680 mL), followed by the addition of PPTS (3.34 g, 0.1 equiv.). The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature and then warmed to reflux under a Dean–Stark apparatus. The reaction progress was monitored by ^{1}H NMR after 3 h, and trifluoroacetone (7 mL, 78 mmol, 0.6 equiv.) was added to the resulting mixture at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature and then warmed to reflux under a Dean–Stark apparatus for 3 h. The reaction mixture was cooled to 0 °C with an ice-bath and filtered, and toluene was evaporated. The crude oxazolidine **1** (29.07 g, 96%) was obtained as a single diastereomer and was used in the next step without further purification. A pure analytical sample of **1** was isolated by flash chromatography (petroleum ether/AcOEt, 90:10); yellow oil.

Aspect : yellow oil

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.62 (s, 3 H, Me), 2.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, NH), 3.82 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H, 5-Ha), 4.40 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H, 5-Hb), 4.58 (dt, *J* = 8.7, 7.8 Hz, 1 H, 4-H), 7.27–7.42 (m, 5 H, Ph) ppm.

^{13}C NMR (100.5 MHz, $CDCl_3$): δ 20.6 (CH_3), 62.0 (C4), 73.6 (C5), 94.2 (q, *J* = 30.8 Hz, C2), 124.8 (q, *J* = 287.2 Hz, CF_3), 126.7 (2 x CH, Ph), 128.2 (CH, Ph), 128.9 (2 x CH, Ph), 138.8 (C, Ph) ppm.

^{19}F NMR (376.2 MHz, $CDCl_3$): δ –85.7 (s, CF_3) ppm.

$[\alpha]_D$ = –23.2 (*c* = 1.8, $CHCl_3$).

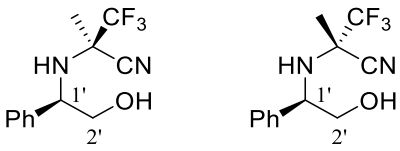
IR (neat/cm^{-1}): 3356, 3033, 2999, 1458, 1338, 1156.

MS (EI): m/z (%) = 232 $[M + H]^+$.

Anal. Calc. : % C57.14, %H 5.23, %N 6.06. Found : %C56.80, %H 5.05, %N 5.85.

Rf = 0.57 (Cyclohexane/AcOEt, 70:30)

3,3,3-Trifluoro-2-[(*1R*)-2-hydroxy-1-phenylethylamino]-2-methylpropionitrile (*R,R*)-2 et (*R,S*)-2



***(R,R)*-2** ***(S,R)*-2**

Cyanotrimethylsilane (25 mL, 186.8 mmol, 1.5 equiv.) and $BF_3{\cdot}OEt_2$ (23.7 mL, 186.8 mmol, 1.5 equiv.) were added under argon at 0 °C to a solution of the crude oxazolidine **1** (28.8 g, 124.5 mmol, 1.0 equiv.) in dichloromethane (400 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature until disappearance of the starting material (20 h, GC monitoring). The reaction mixture was then poured into saturated aqueous $NaHCO_3$ (400 mL) and vigorously stirred for 1 h. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 100 mL), and the combined organic extracts were washed with water (100 mL), dried with Na_2SO_4, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was poured into pentane (800 mL) and nitrile **(*S,R*)-2** was filtered. Both filtrate and precipitate were purified by flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 85:15) to gave pure isolated fractions of **(*R,R*)-2** (18.56 g, 58%) and **(*S,R*)-2** (11.95 g, 37 %).

iastereoisomer (*R,R*)-2 :

Aspect : pale yellow oil

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.32 (s, 3 H, Me), 1.91–1.98 (m, 1 H, OH), 2.84 (s, 1 H, NH), 3.49 (dd, *J* = 11.2, 9.6 Hz, 1 H, 2'-Ha), 3.80 (dd, *J* = 11.2, 4.1 Hz, 1 H, 2'-Hb), 4.10 (dd, *J* = 9.6, 4.1 Hz, 1 H, 1'-H), 7.28–7.41 (m, 5 H, Ph) ppm.

^{13}C NMR (100.5 MHz, $CDCl_3$): δ 20.2 (CH_3), 59.9 (q, *J* = 30.3 Hz, C2), 61.2 (C1'), 66.8 (C2'), 116.5 (CN), 123.1 (q, *J* = 283.6 Hz, CF_3), 127.0 (2 x CH, Ph), 128.0 (CH, Ph), 128.7 (2 x CH, Ph), 140.3 (C, Ph) ppm.

^{19}F NMR (376.2 MHz, $CDCl_3$): δ –82.6 (s, CF_3) ppm.

IR (neat/cm^{-1}): 3329, 3032, 2937, 1603, 1455, 1174.

MS (EI): m/z (%) = 258 $[M]^+$

Anal. Calc. : %C 55.81, %H 5.07, %N 10.85; found %C 55.45, %H 5.15, %N 10.51.

$[\alpha]_D$: –139.0 (c = 1.0, $CHCl_3$).

Rf : 0.46 (Cyclohexane/AcOEt, 85:15).

Diastereoisomer (*S,R*)-2 :

Aspect : white solid

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.74 (s, 3 H, Me), 1.98 (dd, *J* = 6.0, 5.6 Hz, 1 H, OH), 2.46 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, NH), 3.57 (ddd, *J* = 11.0, 7.6, 5.6 Hz, 1 H, 2'-Ha), 3.80 (ddd, *J* = 11.0, 6.0, 4.6 Hz, 1 H, 2'-Hb), 4.13 (ddd, *J* = 7.6, 5.5, 4.6 Hz, 1 H, 1'-H), 7.27–7.40 (m, 5 H, Ph) ppm.

^{13}C NMR (100.5 MHz, $CDCl_3$): δ 20.5 (CH_3), 58.3 (q, *J* = 31.6 Hz, C2), 60.9 (C1'), 67.0 (C2'), 116.2 (CN), 123.0 (q, *J* = 284.7 Hz, CF_3), 126.9 (2 x CH, Ph), 128.1 (CH, Ph), 128.7 (2 x CH, Ph), 139.1 (C, Ph) ppm.

^{19}F NMR (376.2 MHz, $CDCl_3$): δ –81.5 (s, CF_3) ppm.

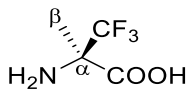
IR : 3322, 2945, 1613, 1455.

MP : 81–83 °C,

$[\alpha]_D$: –89.0 (*c* = 1.0, $CHCl_3$).

Rf : 0.19 (Cyclohexane/AcOEt, 85:15)

(*R*)-α-Tfm-Alanine (*R*)-3



A solution of the amino nitrile **(*R,R*)-2** (8.8 g, 34 mmol, 1 equiv.) in concentrated aqueous HCl (100 mL) was heated to reflux. After 16 h, the solution was allowed to cool to room temperature and diluted with Et_2O (100 mL). The layers were separated, the aqueous phase was extracted, and the combined aqueous fraction was concentrated under reduced pressure. The crude residue was loaded onto a DOWEX 50W8-400 column to afford the pure (*R*)-α-Tfm-Alanine **(*R*)-3** (4.62 g, 86%) as a white solid without m.p. (sublimation).

Aspect : white solid

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) : δ 1.51 (s, 3 H, Hβ) ppm.

^{13}C NMR (100.5 MHz, D_2O) : δ 16.6 (Cβ), 62.1 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα), 123.6 (q, *J* = 282.8 Hz, CF_3), 168.2 (CO_2H) ppm.

$[\alpha]_D$: +11.2 (*c* = 0.9, HCl).

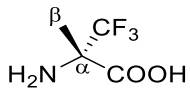
^{19}F NMR (376.2 MHz, D_2O) : δ = –79.2 (s, CF_3) ppm.

IR (neat/cm^{-1}) : 3506, 3257, 2959, 2592, 1652, 1605, 1538, 1156.

MS (EI) : m/z (%) = 112 $[M – CO_2H]^+$.

HRMS (EI): $C_4H_6F_3NO_2 – CO_2H$: 112.0374; found 112.0371.

(*S*)-α-Tfm-Alanine (*S*)-3



A solution of the amino nitrile **(*S,R*)-2** (5.2 g, 20 mmol, 1 equiv.) in concentrated aqueous HCl (60 mL) was heated to reflux. After 16 h, the solution was allowed to cool to room temperature and diluted with Et_2O (60 mL). The layers were separated, the aqueous phase was extracted, and the combined aqueous fraction was concentrated under reduced pressure. The crude residue was loaded onto a DOWEX 50W8-

400 column to afford the pure (*S*)-α-Tfm-Alanine **(*S*)-3** (2.94 g, 92%) as a white solid without m.p. (sublimation).
Aspect : white solid

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) : δ 1.52 (s, 3 H, Hβ) ppm.

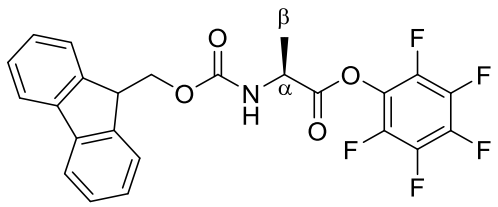
^{13}C NMR (100.5 MHz, D_2O) : δ 16.6 (Cβ), 62.3 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα), 123.6 (q, *J* = 282.8 Hz, CF_3), 168.2 (CO_2H) ppm.

^{19}F NMR (376.2 MHz, D_2O) : δ = –79.1 (s, CF_3) ppm.

$[\alpha]_D$: -11.2 (*c* = 0.9, HCl).

IR (neat/cm^{-1}) : 3506, 3257, 2959, 2592, 1650, 1607, 1532, 1156.

***N*-Fmoc-Ala-OPfP (*S*)-4**



To a solution of *N*-Fmoc-Ala-Cl (250 mg, 0.76 mmol, 1.0 equiv.) in THF (6 mL) at 4 °C was added pentafluorophenol (280 mg, 1.52 mmol, 2.0 equiv.). After addition of pyridine (2 mL), the crude mixture was evaporated under vacuum and the desired *N*-Fmoc-Ala-OPfP (*S*)-4 (319 mg, 88%) was recrystallized from pentane and obtained as a white solid.

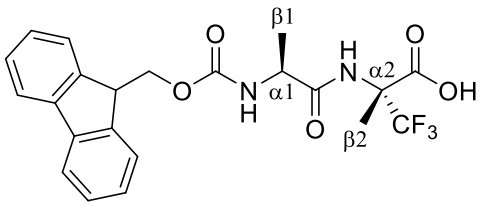
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 1.43 (d, ^{3}J = 6.9 Hz, 3 H, Hβ); 4.19 (t, ^{3}J = 6.9 Hz, 1 H, Hfmoc,); 4.39 (m, 3 H, C$\underline{H_2}$ Fmoc et Hα); 7.22 (s, 1 H, NH); 7.31 (t, ^{3}J = 7.8 Hz, 2 H, Fmoc); 7.40 (t, ^{3}J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.58 (d, ^{3}J = 7.3 Hz, 2 H HFmoc); 7.59 (d, ^{3}J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.76 (d, ^{3}J = 7.3 Hz, 2 H, Fmoc).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.5 MHz) : δ 18.8 (Cβ); 47.3 ($\underline{C}$H Fmoc); 50.2 (Cα); 67.5 ($\underline{C}H_2$ Fmoc); 120.3 (Car Fmoc); 125.8 (Car Fmoc); 128.0 (Car Fmoc); 128.0 (Car Fmoc); 141.4 (Cq ar Fmoc); 144.0 (Cq ar Fmoc); 165.4 (CO); 172.0 (CO).

^{19}F NMR ($CDCl_3$, 376.2 MHz) : δ = –161.2 (t, *J* = 20.9 Hz, 2 F) ; -156.6 (t, *J* = 20.9 Hz, 1 F); -151.5 (d, *J* = 18.0 Hz, 2 F) ppm.

MP : 169 °C

***N*-Fmoc-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH (*S*,*R*)-5**



To a suspension of (*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-3** (100 mg, 0.64 mmol, 1.0 equiv.) in THF (4 mL), were added Fmoc-Ala-Cl (250 mg, 0.76 mmol, 1.2 equiv.) and K_2CO_3 (176 mg, 1.27 mmol, 2.0 equiv). The reaction mixture was heated at 100 °C in a sealed tube for 1 h. The crude mixture was then cooled to room temperature, and the K_2CO_3 was filtered. The filtrated product was evaporated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC (Water/Acetonitrile 90/10 to 70/30) to afford the desired dipeptide Fmoc-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*S,R*)-5** (262 mg, 0.59 mmol, 92%) as a white hygroscopic solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) : δ 1.36 (d, ^3J = 7 Hz, 3 H, Hβ1); 1,72 (s, 3 H, Hβ2); 4,18 (t, ^3J = 7 Hz, 1 H, CHFmoc); 4,23 (q, ^3J = 7 Hz, 1 H, Hα1); 4,33 (t, ^3J = 7 Hz, 2 H, CH_2Fmoc); 7,29 (t, ^3J = 7 Hz, 2 H, HFmoc); 7,36 (t , ^3J = 7 Hz, 2 H, HFmoc); 7,64 (t, ^3J = 8 Hz, 2 H, HFmoc); 7,76 (d, ^3J = 8 Hz, 2 H, HFmoc); 8,74 (s, 1 H, NH) ppm.

^{13}C NMR (100.5 MHz, CD_3OD) : δ 19.1 (Cβ1), 19.7 (Cβ2); 47.1 (CHFmoc); 50,2 (Cα1), 61.2 (Cα2, $_J$ = 28,8 Hz); 68.8 (CH_2Fmoc); 121.7 (Car Fmoc); 124.6 (CF_3, *J* = 284.7 Hz); 127.1 (Car Fmoc); 141.5 (Car Fmoc); 143.8 (Car Fmoc); 144.0 (Car Fmoc); 156.9 (CO); 168.2 (CO)173.6 (CO_2H) ppm.

^{19}F NMR (376.2 MHz, D_2O) : δ = –80.3 (s, 3 F, CF_3) ppm.

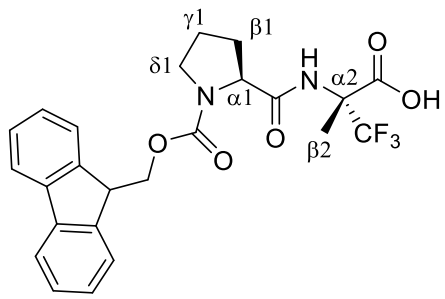
[α]$_D$: +17.9 (*c* = 0.9, HCl).

MP : 148 °C

IR (neat/cm^{-1}) : 3246, 2840, 2250, 2238, 1500.

MS (EI) : m/z (%) = 450.1 $[M]^+$

Fmoc-Pro-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH (*S,R*)-6



To a suspension of (*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-3** (99 mg, 0.64 mmol, 1.0 equiv.) in THF (4 mL), were added Fmoc-Pro-Cl (259 mg, 0.76 mmol, 1.2 equiv.) and K_2CO_3 (176 mg, 1.27 mmol, 2.0 equiv.). The reaction mixture was heated at 100 °C in a sealed tube for 1 h. The crude mixture was then cooled to room temperature, and the K_2CO_3 was filtered. The filtrated product was evaporated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC (water/acetonitrile 90/10 to 70/30) to afford the desired dipeptide Fmoc-Pro-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*S,R*)-6** (270 mg, 0.57 mmol, 90%) as a white hygroscopic solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) : δ 1.71 (s, 3 H, Hβ2); 1.92 (m, 2 H, Hγ1 and Hγ1'); 2.19 (m, 1 H, Hβ1); 2.39 (m, 1 H, Hβ1'); 3.44 (m, 1 H, Hδ1); 3.25 (m, 1 H, Hδ1'); 4.32 (t, ^3J = 6.9 Hz, 1 H, HFmoc); 4.36-4.46 (m, 3 H, Hα1 et C$\underline{H_2}$ Fmoc); 6.70 (s, 1 H, NH); 7.32 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.41 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.60 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, Hfmoc); 7.65 (s, 1 H, NH); 7.77 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc).

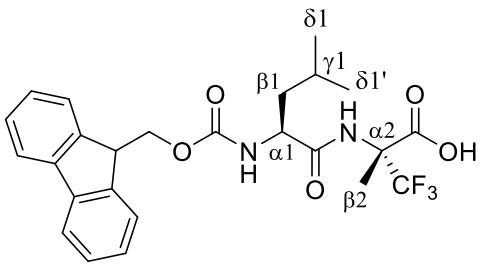
^{13}C NMR (100.5 MHz, CD_3OD) : δ 18.3 (Cβ2); 26.0 (Cγ1); 29.2 (Cβ1'); 47.4 ($\underline{C}$HFmoc); 47.9 (δ1); 60.7 (Cα1); 62.6 (q, J = 28.8 Hz, Cα2); 68.2 ($\underline{C}H_2$ Fmoc); 121.1 (Car Fmoc); 123.9 (q, J = 285.6 Hz, CF_3); 125.2 (Car Fmoc); 127.2 (Car Fmoc); 128.1 (Car Fmoc); 141.6 (Cqar Fmoc); 144.0 (Cqar Fmoc); 156.8 (CO); 165.6 (CO); 170.8 (CO).

^{19}F NMR (376.2 MHz, CD_3OD) : δ = –79.1 (s, CF_3) ppm.

$[\alpha]_D$: + 23.4 (c = 0.9, MeOH).

IR (neat/cm^{-1}) : 3506, 3257, 2959, 2592, 1650, 1607, 1532, 1156.

Fmoc-Leu-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH (*S*,*R*)-7



To a suspension of (*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-3** (80 mg, 0.51 mmol, 1.0 equiv.) in THF (4 mL), were added Fmoc-Leu-Cl (216 mg, 0.61 mmol, 1.2 equiv.) and K_2CO_3 (141 mg, 1.02 mmol, 2.0 equiv.). The reaction mixture was heated at 100 °C in a sealed tube for 1 h. The crude mixture was then cooled to room temperature, and the K_2CO_3 was filtered. The filtrated product was evaporated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC (water/acetonitrile 90/10 to 70/30) to afford the desired dipeptide Fmoc-Leu-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*S*,*R*)-7** (221 mg, 0.45 mmol, 88%) as a white hygroscopic solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) : δ 0.88 (d, ^3J = 5,5 Hz, 3 H, Hδ1); 0,91 (d, ^3J = 5,5 Hz, 3 H, Hδ1'); 1,60 (m, 3 H, Hβ1 et Hγ1); 1,69 (s, 3 H, Hβ2); 4,17 (t, ^3J = 6.9 Hz, 1 H, HFmoc); 4,36 (m, 3 H, Hα1 et C$\underline{H_2}$Fmoc); 6,02 (s, 1 H, NH); 7,27 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7,37 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7,54 (t, ^3J = 8.2 Hz, 2 H, HFmoc); 7,72 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc) ppm.

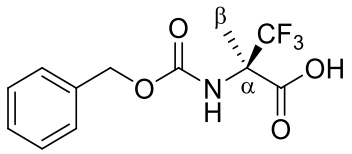
^{13}C NMR (100.5 MHz, CD_3OD) : δ 18.6 (Cβ2), 22,1 (Cδ1); 22,9 (Cδ1'); 24,8 (Cγ1); 41,0 (Cβ1); 47,2 ($\underline{C}$H Fmoc); 53,5 (Cα1); 62.1 (q, J = 29.7 Hz, Cα2), 68,1 ($\underline{C}H_2$Fmoc); 120,4 (Car Fmoc); 124,1 (q, J = 282.8 Hz, CF_3); 125,4 (Car Fmoc); 127.5 (Car Fmoc); 128.2 (Car Fmoc); 141.6 (Cq ar Fmoc); 143.8 (Cq ar Fmoc); 157.4 (CO); 168.6 (CO); 173.7 (CO); 168.2 (CO_2H) ppm.

^{19}F NMR (376.2 MHz, CD_3OD) : δ = –79.0 (s, CF_3) ppm.

$[\alpha]_D$: +6.3 (c = 0.9, MeOH).

IR (neat/cm^{-1}) : 3402, 2937, 1645, 1611, 1545.

***N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH (*R*)-8**



To a solution of (*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-3** (500 mg, 3.2 mmol, 1.0 equiv.) and K_2CO_3 (1,76 g, 12.7 mmol, 4.0 equiv.) in water (9 mL) at 0 °C was added dropwise CbzCl (1.14 mL, 8.0 mmol, 2.5 equiv., 1.4 M in dioxane). The solution was stirred for 10 min at 0°C and 3 h at room temperature. Another 8.0 mmol (1.14 mL, 2.5 equiv., 1.4 M in dioxane) of CbzCl were added following the same procedure. After completion of the reaction, the solution was washed with dichloromethane (3 x 3 mL). The aqueous layer was acidified with 10 % HCl solution to pH 1-2 and extracted with ethyl acetate (3 x 40 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO4, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product (1,053 g) was purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH 98/2) to afford the pure *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-8** (850 mg, 2.92 mmol, 92%) as a white solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 1.81 (s, 3H, Hβ); 5.11 (m, 2H, CH_2bzl); 7.26-7.46 (m, 5H, Haro) ppm.

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.5 MHz) : δ 18.6 (Cβ) ; 62.4 (q, *J* = 30.7 Hz, Cα); 68.0 (Cbzl); 124.3 (q, *J* = 284.7 Hz, CF_3);128.5-128.9 (Car); 135.7 (Car); 155.2 (CO Bzl); 169.9 (COOH) ppm.

^{19}F NMR ($CDCl_3$, 376.2 MHz) : δ -79.5 (s, 3 F, CF_3) ppm.

IR(neat/cm^{-1}) : 3324, 3036, 2952, 1720, 1627, 1247.

MP : 70 °C

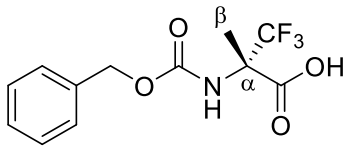
[α]$_D$: + 67.2 (*c* = 1.3, MeOH).

MS (EI) : *m/z* (%) = 292.1 $[M + H]^+$

HRMS (EI) : $C_{12}H_{12}F_3NO_4 + H^+$: 292.0797; found 292.0801.

Anal. Calc. : %C : 49.49; %H : 4.15; %N : 4.81. Found : %C : 49.27; %H : 4.04; %N : 4.71.

***N*-Cbz (*S*)-α-Tfm-Ala-OH (*S*)-8**



To a solution of (*S*)-α-Tfm-Ala-OH **(*S*)-3** (470 mg, 3.0 mmol, 1.0 equiv.) and K_2CO_3 (1,66 g, 12.0 mmol, 4.0 equiv.) in water (8.5 mL) at 0 °C was added dropwise CbzCl (1.07 mL, 7.5 mmol, 2.5 equiv., 1.4 M in dioxane). The solution was stirred for 10 min at 0°C and 3 h at room temperature. Another 7.5 mmol (1.07 mL, 2.5 equiv., 1.4 M in dioxane) of CbzCl were added following the same procedure. After completion of the reaction, the solution was washed with dichloromethane (3 x 3 mL). The aqueous layer was acidified with 10 % HCl solution to pH 1-2 and extracted with ethyl acetate (3 x 40 mL). The organic layers were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product (1,053 g)

was purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH 98/2) to afford the pure *N*-Cbz-(*S*)-α-Tfm-Ala-OH **(*S*)-8** (835 mg, 2.87 mmol, 96%) as a white solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz) : δ 1.81 (s, 3H, Hβ); 5.11 (m, 2H, CH$_2$bzl); 7.26-7.46 (m, 5H, Haro) ppm.

^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100.5 MHz) : δ 18.6 (Cβ) ; 62.4 (q, *J* = 30.7 Hz, Cα); 68.0 (Cbzl); 124.3 (q, *J* = 284.7 Hz, CF$_3$);128.5-128.9 (Car); 135.7 (Car); 155.2 (CO Bzl); 169.9 (COOH) ppm.

^{19}F NMR (CDCl$_3$, 376.2 MHz) : δ -79.5 (s, 3 F, CF$_3$) ppm.

IR(neat/cm^{-1}) : 3324, 3036, 2952, 1720, 1627, 1247.

MP : 72 °C

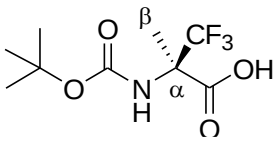
[α]$_D$: - 65.4 (*c* = 1.2, MeOH).

MS (EI) : *m/z* (%) = 290.1 [M - H]$^-$

HRMS (EI) : $C_{12}H_{12}F_3NO_4$ – H : 290.0640; found 290.0653

Anal. Calc. : %C : 49.49; %H : 4.15; %N : 4.81. Found : %C : 49.27; %H : 4.04; %N : 4.71.

***N*-Boc-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH (*R*)-9**



To a solution of (*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-3** (700 mg, 4.5 mmol, 1.0 equiv.) in THF (15 mL) was added DMAP (163 mg, 1.3 mmol, 0.3 equiv.). The resulting mixture was stirred for 10 min at room temperature. Di-*tert*-butyldicarbonate (1.24 mL, 5.4 mmol, 1.2 equiv.) was then added slowly and the solution was stirred for 3 h at room temperature. After completion of the reaction, the reaction mixture was evaporated under vaccum and dissolved in AcOEt (15 mL). The mixture was extracted with water (10 mL) and the aqueous layer was then extracted three times with AcOEt (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO$_4$, and evaporated under vacuum to give *N*-Boc-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-9** (1.102 g, 4,29 mmol, 96%), as a white solid. This product was then used without purification.

Aspect : white solid

^{1}H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 1.47 (s, 9H, *t*Bu); 1.62 (s, 3H, Hβ) ppm.

^{13}C NMR (MeOD, 100.5 MHz) : δ 20.4 (Cβ) ; 29.4 (C*t*Bu); 63.4 (q, *J* = 27.8 Hz, Cα); 82.1 (C*t*Bu); 126.9 (q, *J* = 284.7 Hz, CF$_3$); 156.9 (CO *t*Bu); 171.4 (COOH) ppm

^{19}F NMR (MeOD, 376.2 MHz) : δ -79.9 (s, 3 F, CF$_3$) ppm.

IR(neat/cm^{-1}) : 3325, 3249, 2974, 1730, 1699, 1652, 1396, 1382, 1370, 1155.

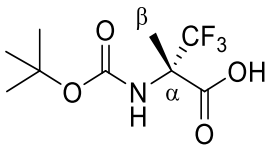
MP : 108 °C

[α]$_D$: - 5.7 (*c* = 0.7, MeOH)

MS (EI) : *m/z* (%) = 256.1 [M - H]$^-$

HRMS (EI) : $C_9H_{14}F_3NO_4$ -H$^+$: 256.0797; found 256.0788.

***N*-Boc-(*S*)-α-Tfm-Ala-OH (*S*)-9**



To a solution of (*S*)-α-Tfm-Ala-OH **(*S*)-3** (800 mg, 5.1 mmol, 1.0 equiv.) in THF (15 mL) was added DMAP (187 mg, 1.5 mmol, 0.3 equiv.). The resulting mixture was stirred for 10 min at room temperature. Di-*tert*-butyldicarbonate (1.40 mL, 6.1 mmol, 1.2 equiv.) was then added slowly and the solution was stirred for 3 h at room temperature. After completion of the reaction, the reaction mixture was evaporated under vaccum and dissolved in AcOEt (15 mL). The mixture was extracted with water (10 mL) and the aqueous layer was then extracted three times with AcOEt (3 x 15 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$, and evaporated under vacuum to give *N*-Boc-(*S*)-α-Tfm-Ala-OH **(*S*)-9** (1.283 g, 5,0 mmol, 98%), as a white solid. This product was then used without purification.

Aspect : white solid

^{1}H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 1.47 (s, 9H, *t*Bu); 1.61 (s, 3H, Hβ) ppm.

^{13}C NMR (MeOD, 100.5 MHz) : δ 20.4 (Cβ) ; 29.4 (C*t*Bu); 63.4 (q, *J* = 27.8 Hz, Cα); 82.1 (C*t*Bu); 126.9 (q, *J* = 284.7 Hz, CF_3); 156.9 (CO *t*Bu); 171.4 (COOH) ppm

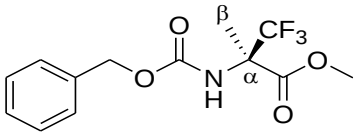
^{19}F NMR (MeOD, 376.2 MHz) : δ -79.9 (s, 3 F, CF_3) ppm.

IR(neat/cm^{-1}) : 3325, 3249, 2974, 1730, 1699, 1652, 1396, 1382, 1370, 1155.

MP : 100 °C

[α]$_D$: + 5.4 (*c* = 1.0, MeOH)

***N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-OMe (*R*)-10**



To a solution of *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-8** (1.5 g, 5.15 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (13 mL) was added K_2CO_3 (1.07 g, 7.73 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was stirred for 10 min at 0 °C and MeI was then added slowly. The reaction mixture was stirred for 30 min at 0 °C and 1 h at room temperature and was then diluted with water (20 mL). The diluted mixture was extracted with AcOEt (3 x 20 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt : 95/5 to 80/20) to afford desired *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-OMe **(*R*)-10** (1.35 g, 4.43 mmol, 86%) as a yellow oil.

Aspect : yellow oil

^{1}H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 1.78 (s, 3H, Hβ); 3.79 (s, 3H, OMe); 5.08 (s, 2H, C$\underline{H_2}$bzl); 5.50 (s, 2H, NH); 7.31-7.35 (m, 5H, Har) ppm.

^{13}C NMR (MeOD, 100.5 MHz) : δ 18.5 (Cβ) ; 53.5 ($CO_2\underline{C}H_3$); 62.2 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα); 67.5 (Cbzl); 126.3 (q, *J* = 285.6 Hz, CF_3); 135.9 (Car); 154.7 (CO Bzl); 167.6 ($\underline{C}O_2CH_3$) ppm.

^{19}F NMR (MeOD, 376.2 MHz) : δ -79.8 (s, 3 F, CF_3) ppm.

$[\alpha]_D$: + 2.4 (*c* = 1.0, $CHCl_3$)

IR(neat/cm^{-1}) : 3450-3250, 1710, 1730, 1524, 1450.

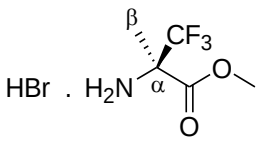
MS (EI) : *m/z* (%) = 306.1 $[M + H]^+$

HRMS (EI) : $C_{13}H_{14}F_3NO_4$ + H^+ : 306.0953; found 306.0960.

Anal. Calc. : %C : 51.15; %H : 4.62; %N : 4.59. Found : %C : 51.17; %H : 4.63; %N : 4.74.

R.f. : 0,68 (Cyclohexane/AcOEt, 7/3)

HBr. (*R*)-α-Tfm-Ala-OMe (*R*)-11



N-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-OMe **(*R*)-10** (200 mg, 0.66 mmol, 1.0 equiv.) was poured in a solution of HBr 33 % in acetic acid (8 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The crude mixture was then evaporated under vacuum and the desired HBr. (*R*)-α-Tfm-Ala-OMe **(*R*)-11** (82 mg, 0.48 mmol, 73%) was recrystallized from toluene and obtained as brown crystals without m.p. (sublimation).

Aspect : brown solid

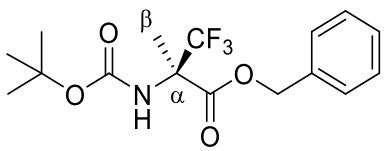
^{1}H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 1.87 (s, 3 H, Hβ); 4.01 (s, 3 H, OMe) ppm.

^{13}C NMR (MeOD, 100.5 MHz) : δ 18.2 (Cβ) ; 56.5 ($O\underline{C}H_3$); 63.8 (q, *J* = 30.7 Hz, Cα); 124.9 (q, *J* = 284.7 Hz, CF_3);166.6 (CO) ppm.

^{19}F NMR (MeOD, 376.2 MHz) : δ -80.2 (s, 3 F, CF_3) ppm.

IR(neat/cm^{-1}) : 3320, 1723, 1545, 1392.

***N*-Boc-(*R*)-α-Tfm-Ala-OBn (*R*)-12**



To a solution of *N*-Boc-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-9** (770 mg, 2.99 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (8 mL) were successively added K_2CO_3 (497 mg, 3.60 mmol, 1.2 equiv.) and benzyl bromide (427 µL, 3.60 mmol, 1.2

equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h and then diluted with water (15 mL). The aqueous mixture was extracted with AcOEt (3 x 30 mL) and the combined organic extracts were dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/AcOEt, 95/5 to 98/2) to afford *N*-Boc-(*R*)-α-Tfm-Ala-OBn **(*R*)-12** (854 mg, 2.46 mmol, 82%) as a white solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 1.37 (s, 9 H, HBoc); 1.74 (s, 3 H, Hβ); 5.24 (s, 2 H, CH_2bzl); 7.35 (m, 5 H, Haro) ppm.

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.5 MHz) : δ 18.9 (Cβ) ; 28.4 (CHBoc); 62.5 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα); 68.5 (Cbzl); 81.5 (C(CH_3)$_3$); 124.4 (q, *J* = 286.6 Hz, CF_3); 128.6-128.9 (Car); 135.1 (Cq bzl). 154.0 (CObzl); 167.2 (COtBu) ppm.

^{19}F NMR ($CDCl_3$, 376.2 MHz) : δ -79.6 (s, 3 F, CF_3) ppm.

$[\alpha]_D$: +3.7 (*c* = 1.0, $CHCl_3$).

MP : 94.2 °C

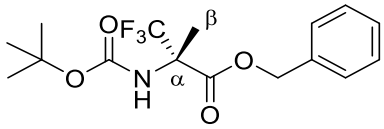
IR(neat/cm^{-1}) : 3363, 3008,1739, 1720, 1588.

MS (EI) : *m/z* (%) = 370.1 $[M + Na]^+$

HRMS (EI) : $C_{16}H_{20}F_3NO_4$ $+Na^+$: 370.1242; found 370.1233.

R.f. : 0,72 (Cyclohexane/AcOEt, 8/2)

***N*-Boc-(*S*)-α-Tfm-Ala-OBn (*S*)-12**



To a solution of *N*-Boc-(*S*)-α-Tfm-Ala-OH **(*S*)-9** (775 mg, 3.02 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (8 mL) were successively added K_2CO_3 (500 mg, 3.62 mmol, 1.2 equiv.) and benzyl bromide (430 µL, 3.62 mmol, 1.2 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h and then diluted with water (15 mL). The aqueous mixture was extracted with AcOEt (3 x 30 mL) and the combined organic extracts were dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/AcOEt, 95/5 to 98/2) to afford *N*-Boc-(*S*)-α-Tfm-Ala-OBn **(*S*)-12** (900 mg, 2.59 mmol, 86%) as a white solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 1.36 (s, 9 H, HBoc); 1.74 (s, 3 H, Hβ); 5.24 (s, 2 H, CH_2bzl); 7.35 (m, 5 H, Haro) ppm.

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.5 MHz) : δ 18.7 (Cβ) ; 28.4 (CHBoc); 62.5 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα); 68.5 (Cbzl); 81.5 (C(CH_3)$_3$); 124.4 (q, *J* = 286.6 Hz, CF_3); 128.6-128.9 (Car); 135.1 (Cq bzl). 154.0 (CO bzl); 167.2 (COtBu) ppm.

^{19}F NMR ($CDCl_3$, 376.2 MHz) : δ -79.6 (s, 3 F, CF_3) ppm.

[α]$_D$: -3.8 (*c* = 1.0, $CHCl_3$).

MP : 94.5 °C

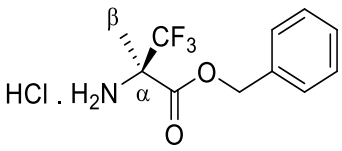
IR(neat/cm^{-1}) : 3363, 3008,1739, 1720, 1588.

MS (EI) : *m/z* (%) = 370.1 [M + Na]$^+$

HRMS (EI) : $C_{16}H_{20}F_3NO_4$ +Na$^+$: 370.1242; found 370.1259.

R.f. : 0,72 (Cyclohexane/AcOEt, 8/2)

HCl . (*R*)-α-Tfm-Ala-OBn (*R*)-13



N-Boc-(*R*)-α-Tfm-Ala-OBn **(*R*)-12** (163 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.) was poured into a 4 M AcOEt solution of HCl (6 mL) and the resulting solution was stirred for 2 h at room temperature. The mixture was then evaporated under vacuum to afford HCl . (*R*)-α-Tfm-Ala-OBn **(*R*)-13** (105 mg, 0.42 mmol, 90%) as a white crystalline solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz) : δ 1.65 (s, 3 H, Hβ); 5.25 (s, 2 H, CH_2bzl); 7.30 (s, 5 H, Haro) ppm.

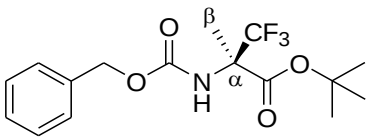
^{13}C NMR (D_2O, 100.5 MHz) : δ 16.4 (Cβ) ; 61.8 (q, *J* = 30.7 Hz, Cα); 70.2 (Cbzl); 122.5 (q, *J* =284.7 Hz, CF_3);128.7-129.2 (Car); 134.0 (Car); 165.0 (CO Bzl) ppm.

^{19}F NMR (D_2O, 376.2 MHz) : δ -79.1 (s, 3 F, CF_3) ppm.

MS (EI) : *m/z* (%) = 248.1 [M – Cl]$^+$

HRMS (EI) : $C_{11}H_{13}ClF_3NO_2$ -Cl : 248.0898; found 248.0900

***N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu (*R*)-14**



To a solution of *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-8** (650 mg, 2.23 mmol, 1.0 equiv.) in acetonitrile (20 mL) were successively added benzyl triethylammonium chloride (509 mg, 2.23 mmol, 1.0 equiv.), potassium carbonate (6.17 g, 44.67 mmol, 20 equiv.) and *tert*-butyl bromide (8.8 mL, 78.18 mmol, 35 equiv.) at room temperature. The reaction mixture was then heated to 48 °C and stirred for 20 h at 48 °C. The mixture was

cooled to room temperature and evaporated under vacuum. The crude product was diluted with water (20 mL) and extracted with AcOEt (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/AcOEt, 90/10) to afford *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*R*)-14** (729 mg, 2.10 mmol, 94%) as a white solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 1.38 (s, 9 H, HtBu); 1.70 (s, 3 H, Hβ); 5.01 (s, 2 H, CH2bzl); 5.58 (s, 1 H, NH); 7.23-7.36 (m, 5 H, Haro) ppm.

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.5 MHz) : δ 18.0 (Cβ) ; 27.8 (CH*t*Bu); 63.0 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα); 67.4 (Cbzl); 84.6 ($C(CH_3)_3$); 124.5 (q, *J* = 286.6 Hz, CF_3); 128.5-128.8 (Car); 136.2 (Cqbzl). 154.6 (CObzl); 166.0 (<u>C</u>O*t*Bu) ppm.

^{19}F NMR ($CDCl_3$, 376.2 MHz) : δ -79.4 (s, 3 F, CF_3) ppm.

$[\alpha]_D$: + 5.2 (*c* = 1.0, $CHCl_3$).

MP : 103.2 °C

IR(neat/cm^{-1}) : 3278, 1745, 1700, 1543.

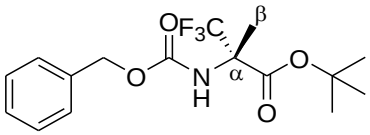
MS (EI) : *m/z* (%) = 370.1 $[M + Na]^+$

HRMS (EI) : $C_{16}H_{20}F_3NO_4$ $+Na^+$: 370.1242; found 370.1232.

Anal. Calc. : %C : 55.33; %H : 5.80; %N : 4.03. Found : %C : 55.27; %H : 5.81; %N : 3.89.

R.f. : 0,78 (Cyclohexane/AcOEt, 8/2)

***N*-Cbz-(*S*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu (*S*)-14**



To a solution of *N*-Cbz-(*S*)-α-Tfm-Ala-OH **(*S*)-8** (579 mg, 1.99 mmol, 1.0 equiv.) in acetonitrile (19 mL) were successively added benzyl triethylammonium chloride (453 mg, 1.99 mmol, 1.0 equiv.), potassium carbonate (5.50 g, 39.79 mmol, 20 equiv.) and *tert*-butyl bromide (7.8 mL, 69.64 mmol, 35 equiv.) at room temperature. The reaction mixture was then heated to 48 °C and stirred for 20 h at 48 °C. The mixture was cooled to room temperature and evaporated under vacuum. The crude product was diluted with water (20 mL) and extracted with AcOEt (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/AcOEt, 90/10) to afford *N*-Cbz-(*S*)-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*S*)-14** (635 mg, 1.83 mmol, 92%) as a white solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 1.46 (s, 9 H, H*t*Bu); 1.80 (s, 3 H, Hβ); 5.10 (s, 2 H, C<u>H$_2$</u>bzl); 5.60 (s, 1 H, NH); 7.26-7.37 (m, 5 H, Haro) ppm.

^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100.5 MHz) : δ 18.0 (Cβ) ; 27.9 (CHtBu); 63.1 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα); 67.5 (Cbzl); 84.7 (C(CH$_3$)$_3$); 124.5 (q, *J* = 286.6 Hz, CF$_3$); 128.6-128.9 (Car); 136.3 (Cq bzl). 154.6 (CO bzl); 166.0 (COtBu) ppm.

^{19}F NMR (CDCl$_3$, 376.2 MHz) : δ -79.5 (s, 3F, CF$_3$) ppm.

[α]$_D$: - 6.7 (*c* = 1.0, CHCl$_3$).

MP : 102.5 °C

IR(neat/cm^{-1}) : 3281, 1744, 1701, 1542.

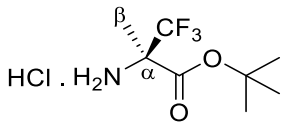
MS (EI) : *m/z* (%) = 370.1 [M + Na]$^+$

HRMS (EI) : $C_{16}H_{20}F_3NO_4$ +Na$^+$: 370.1242; found 370.1239.

Anal. Calc. : %C : 55.33; %H : 5.80; %N : 4.03. Found : %C : 55.53; %H : 5.88; %N : 3.91.

R.f. : 0,78 (Cyclohexane/AcOEt, 8/2)

HCl . (*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu (*R*)-15



Pd/C (250 mg, 0.072 mmol, 0,5 equiv.) was added to a solution of *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-OtBu **(*R*)-14** (345 mg, 0.99 mmol, 1,0 equiv.) in AcOEt (15 mL) under a nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred under a hydrogen atmosphere (3 bars) for 2 h. The catalyst was separated by filtration and HCl gas was bubbled through the solution for 10 min. The resulting solution was evaporated under vacuum to afford HCl . (*R*)-α-Tfm-Ala-OtBu **(*R*)-15** (210 mg, 0,98 mmol, 99%) which was then used without further purification.

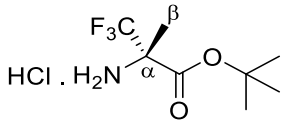
Aspect : white solid

^{1}H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 1.60 (s, 9 H, *t*Bu); 1.82 (s, 3 H, Hβ) ppm.

^{19}F NMR (MeOD, 376.2 MHz) : δ -79.6 (s, 3 F, CF$_3$) ppm.

Due to rapid deprotection of the *tert*-butyl group it was not possible to perform a ^{13}C NMR experiment

HCl . (*S*)-α-Tfm-Alanine-O*t*Bu (*S*)-15



Pd/C (250 mg, 0.072 mmol, 0,5 equiv.) was added to a solution of *N*-Cbz-(*S*)-α-Tfm-Ala-OtBu **(*S*)-14** (350 mg, 1,01 mmol, 1,0 equiv.) in AcOEt (15 mL) under a nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred under a hydrogen atmosphere (3 bars) for 2 h. The catalyst was separated by filtration and HCl gas was bubbled through the solution for 10 min. The resulting solution was evaporated under vacuum to afford HCl . (*S*)-α-Tfm-Alanine-OtBu **(*S*)-15** (206 mg, 0,98 mmol, 97%) which was then used without further purification.

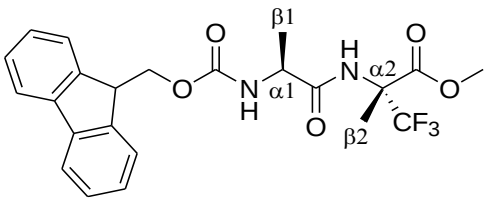
Aspect : white solid

^{1}H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 1.60 (s, 9 H, *t*Bu); 1.82 (s, 3 H, Hβ) ppm.

^{19}F NMR (MeOD, 376.2 MHz) : δ -79.6 (s, 3 F, CF_3) ppm.

Due to rapid deprotection of the *tert*-butyl group it was not possible to perform a ^{13}C NMR experiment

Fmoc-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-OMe (*S*,*R*)-16



To a solution of HBr . (*R*)-α-Tfm-Ala-OMe **(*R*)-11** (210 mg, 0.833 mmol, 1.0 equiv.) in DCM (10 mL) at room temperature were added Fmoc-Alanine-Cl (329 mg, 0.999 mmol, 1.2 equiv.) and zinc dust (110 mg, 1.666 mmol, 2.0 equiv.). The reaction mixture was stirred for 6 h at room temperature and evaporated under vacuum. The resulting evaporated phase was diluted in water (5 mL) and the aqueous solution was extracted with AcOEt (3 x 8 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 80/20) to afford Fmoc-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-OMe **(*S*,*R*)-16** (224 mg, 0.483 mmol, 92%) as a white solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR (400 MHz, $CHCl_3$) : δ 1.39 (d, ^{3}J = 6.9 Hz, 3 H, Hβ1); 1.74 (s, 3 H, Hβ2); 3.79 (s, 3 H, OMe); 4.21 (t, ^{3}J = 6,9 Hz, 1 H, C<u>H</u>Fmoc); 1,73-1.78 (m, 3 H, Hα1 et C<u>H$_2$</u>Fmoc); 5.44 (d, ^{3}J = 7.3 Hz, 1 H, NH); 7.22 (s, 1 H, NH); 7.31 (t, ^{3}J = 7.3 Hz, 2 H, <u>H</u>Fmoc); 7.40 (t, ^{3}J = 7.3 Hz, 2 H, <u>H</u>Fmoc); 7.57 (d, ^{3}J = 7.3 Hz, 2 H, <u>H</u>Fmoc); 7.77 (d, ^{3}J = 7.3 Hz, 2 H, <u>H</u>Fmoc) ppm.

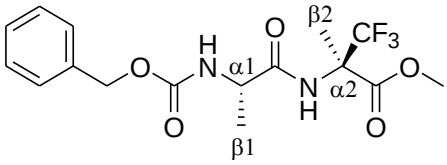
^{13}C NMR (100.5 MHz, $CHCl_3$) : δ 18.0 (Cβ2) ; 19.1 (Cβ1); 47.3 (<u>C</u>H Fmoc); 50.6 (Cα1); 53.4 (O<u>C</u>H$_3$); 62.9 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα2); 67.5 (<u>C</u>H$_2$ Fmoc); 120.3 (Car Fmoc); 124.5 (q, *J* = 285.6 Hz,CF_3); 125.4 (Car Fmoc); 127.4 (Car Fmoc); 128.0 (Car Fmoc); 141.6 (Cq ar Fmoc); 143.9 (Cq ar Fmoc); 156.4 (CO); 165.4 (CO); 172.0 (CO).

^{19}F NMR (376.2 MHz, CD_3OD) : δ = –79.4 (s, CF_3) ppm.

[α]$_D$: +24.5 (*c* = 1.0, CH_3Cl).

IR(neat/cm^{-1}) : 3309, 2976, 1742, 1679.

***N*-Cbz-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-OMe (*S*,*R*)-17**



To a solution of *N*-Cbz-L-Ala-OH (435 mg, 1.95 mmol, 1.0 equiv.) in THF (20 ml) at -20 °C was added *N*-methylmorpholine (236 µL, 2.14 mmol, 1.1 equiv.) and isobutylchloroformiate (280 µL, 2.14 mmol, 1.1

equiv.). The activation mixture was stirred for 30 min at -20 °C and was then added a THF solution (15 mL) of HBr . H-(*R*)-α-Tfm-Ala-OMe **(*R*)-11** (540 mg, 2.14 mmol, 1.1 equiv.) and *N*-methylmorpholine (236 µL, 2.14 mmol, 1.1 equiv.). The resulting mixture was stirred 1 h at -20 °C and 16 h at room temperature. The crude product was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/AcOEt, 80:20 to 60:40) to afford the dipeptide Cbz-L-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-OMe **(*S,R*)-17** (572 mg, 1.52 mmol, 78%) as a white solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz) : δ 1.36 (d, ^3J = 6.9 Hz, 3 H, Hβ1); 1.67 (s, 3 H, Hβ2); 3.77 (s, 3 H, OMe); 4.40 (q, ^3J = 6.9 Hz, 1 H, Hα1); 5.09 (s, 2 H, CH_2Bzl); 5.67 (d, ^3J = 7.3 Hz, 1 H, NH_{Ala}); 7.29-7.36 (m, 5 H, Haro); 7.48 (s, 1 H, NH) ppm.

^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100.5 MHz) : δ 18.2 (Cβ2); 18.5 (Cβ1); 50.5 (Cα1); 53.6 (O$\underline{C}H_3$); 61.9 (q, J = 28.8 Hz, Cα2); 67.4 (CBzl); 124.3 (q, J = 284.7 Hz, CF_3); 136.2 (Cq bzl); 128.2-128.8 (Car); 156.6 (CO bzl); 167.3 (CO); 172.4 (CO) ppm.

^{19}F NMR (CDCl$_3$, 376.2 MHz) : δ -79.3 (s, 3F, CF_3) ppm.

[α]$_D$: + 6.8 (c = 1.0, CH_3Cl)

MP : 89 °C

IR(neat/cm^{-1}) : 3299, 2363, 1756, 1679, 1525, 1456.

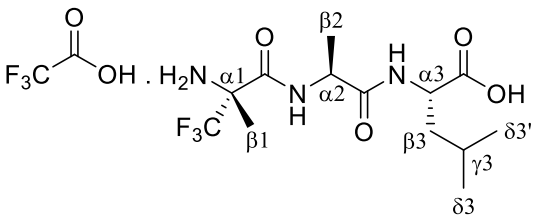
Anal. Calc. : %C : 51.06; %H : 5.09; %N : 7.44. Found : %C : 51.18; %H : 5.16; %N : 7.31.

MS (EI) : *m/z* (%) = 377.1 $[M + H]^+$

HRMS (EI) : $C_{16}H_{19}F_3N_2O_5$ + H : 377.1324; found 377.1332

R.f. : 0,65 (Cyclohexane/AcOEt, 7/3)

(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-Leu (*R,S,S*)-18



A sample of Fmoc-Leu-Wang resin (loading : 0.8 mmol/g, 200 mg, 0.16 mmol, 1.0 equiv.) was placed in a dried 15 mL glass reaction vessel, stirred in a mixture of dry DCM (2 mL) and DMF (2 mL) for 30 min, and drained. The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). To the resin were added a solution of Fmoc-Ala-OH (329 mg, 0.64 mmol, 4.0 equiv.), DIPEA (279 µl, 1.60 mmoles, 10 mmol) and HATU (243 mg, 0.64 mmol, 4.0 equiv.) in DMF (4 mL). The coupling reaction was stirred for 2 h at room temperature, after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The same procedure was repeted for the coupling of (*R*)-α-Tfm-Ala **(*R*)-3** (40 mg, 0.24 mmol, 1.5 equiv.). The coupling reaction was stirred for 2 days at room temperature and the resin was cleaved with a solution of TFA (95%) in dichloromethane for 3 hours. Purification by semi preparative HPLC (Acetonitrile (TFA

0.1%)/water (TFA 0.1%), 10 : 9 to 30 : 70) afforded tripeptide **(*R,S,S*)-18** (11 mg, 0.034 mmol, 21%) as a white solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 0.90 (d, ^3J = 6.4 Hz, 3 H, Hδ3); 0.94 (d, ^3J = 6.4 Hz, 3 H, , Hδ3'); 1.42 (d, 3 H, ^3J = 7 Hz, Hβ2); 1.62 (m, 2 H, Hβ3); 1.70 (m, 1 H, Hγ3); 1.79 (s, 3 H, Hβ1); 4.40 (m, 1 H, Hα2 ou Hα3); 4.48 (m, 1 H, Hα2 ou Hα3) ppm.

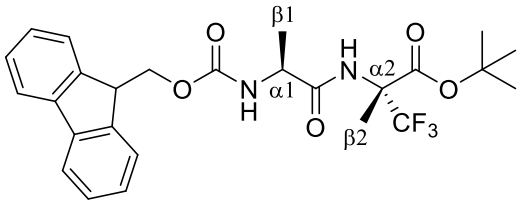
^{13}C NMR (CD_3OD): δ 15.7; 16.5; 22.0; 24.4; 26.6; 40.4; 50.1; 50.7; 61.5 (q, J_2C-F= 27 Hz); 123.5 (q, J_1C-F= 294 Hz); 174.3; 172.6; 163.5 ppm.

^{19}F NMR (CD_3OD): δ -81.0 (s, 3 F, CF_3); -80.4 (TFA salt) ppm.

lc/ms: m/z= 342.2 ([M+H]+)

HRMS: m/z= 342.1640 ([M+H]+); calcd: 342.1641

Fmoc-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu (*S,R*)-19



To a solution of *N*-Fmoc-Ala-OH . H_2O (313 mg, 0.95 mmol, 1.0 equiv.) in THF (15 mL) at -20 °C was added *N*-methylmorpholine (105 µL, 1.05 mmol, 1.1 equiv.) and isobutylchloroformiate (125 µL, 1.05 mmol, 1.1 equiv.). After 10 min at -20 °C, a solution of HCl . (*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*R*)-15** (182 mg, 0.86 mmol, 0.9 equiv.) and *N*-methylmorpholine (105 µL, 1.05 mmol, 1.1 equiv.) in THF (10 mL) was added to the reaction mixture and the resulting mixture was stirred 1 h at -20 °C and 2 h at room temperature. The reaction was evaporated under vacuum and diluted with water (15 mL). The aqueous solution was extracted with AcOEt (3 x 15 mL) and the combined organic extracts were dried with anhydrous $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt 90/10 to 70/30) to afford dipeptide Fmoc-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*S,R*)-19** (290 mg, 0.57 mmol , 67%) as a white solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 1.41 (d, ^3J = 6.9 Hz, 3 H, Hβ1,); 1.47 (s, 9 H, H*t*Bu); 1.73 (s, 3 H, Hβ2); 4.20 (t, ^3J = 6.9 Hz, 1 H, Hfmoc,); 4.39 (m, 3 H, C$\underline{H_2}$ Fmoc et Hα1); 5.62 (d, ^3J = 7.3 Hz, 1 H, NH); 7.22 (s, 1 H, NH); 7.31 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2 H, Fmoc); 7.40 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.58 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H HFmoc); 7.59 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.76 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, Fmoc).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.5 MHz) : δ 18.1 (Cβ2) ; 19.0 (Cβ1); 27.9 (C*t*Bu); 47.3 ($\underline{C}$H Fmoc); 50.6 (Cα1); 62.9 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα2); 67.5 ($\underline{C}H_2$ Fmoc); 84.2 (C*t*Bu); 120.3 (Car Fmoc); 124.5 (q, *J* = 285.6 Hz,CF_3);

125.4 (Car Fmoc); 127.4 (Car Fmoc); 128.0 (Car Fmoc); 141.6 (Cq ar Fmoc); 143.9 (Cq ar Fmoc); 156.4 (CO); 165.4 (CO); 172.0 (CO).

^{19}F NMR ($CDCl_3$, 376.2 MHz) : δ -79.1 (s, 3F, CF_3).

IR(neat/cm^{-1}) : 3400, 1747, 1673, 1538.

MP : 53°C-55°C

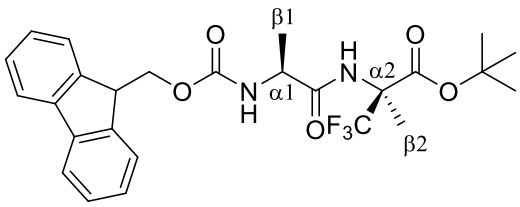
MS (EI) : *m/z* (%) = 507.2 $[M + H]^+$

HRMS (EI) : $C_{26}H_{29}F_3N_2O_5$ + H^+ : 507.2107; found 507.2111.

Anal. Calc. : %C : 61.65; %H : 5.77; %N : 5.53. Found : %C : 61.97; %H : 6.00; %N : 5.11.

R.f. : 0,35 (Cyclohexane/AcOEt, 7/3)

Fmoc-Ala-(*S*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu (*S*,*S*)-19



To a solution of *N*-Fmoc-Ala-OH . H_2O (250 mg, 0.76 mmol, 1.0 equiv.) in THF (12 mL) at -20 °C was added *N*-methylmorpholine (92 µL, 0.84 mmol, 1.1 equiv.) and isobutylchloroformiate (109 µL, 0.84 mmol, 1.1 equiv.). After 10 min at -20 °C, a solution of HCl . (*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*R*)-15** (145 mg, 0.68 mmol, 0.9 equiv.) and *N*-methylmorpholine (92 µL, 0.84 mmol, 1.1 equiv.) in THF (8 mL) was added to the reaction mixture and the resulting mixture was stirred 1 h at -20 °C and 2 h at room temperature. The reaction was evaporated under vacuum and diluted with water (12 mL). The aqueous solution was extracted with AcOEt (3 x 15 mL) and the combined organic extracts were dried with anhydrous $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt 90/10 to 70/30) to afford dipeptide *N*-Fmoc-Ala-(*S*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*S*,*S*)-19** (238 mg, 0.47 mmol , 69%) as a white solid.

Aspect : white solid.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 1.40 (d, ^3J = 6.9 Hz, 3 H, Hβ1,); 1.47 (s, 9 H, H*t*Bu); 1.73 (s, 3 H, Hβ2); 4.20 (t, ^3J = 6.9 Hz, 1 H, HFmoc); 4.39 (m, 3 H, C$\underline{H}_2$ Fmoc et Hα1); 5.60 (d, ^3J = 6.9 Hz, 1 H, NH); 7.18 (s, 1 H, NH); 7.30 (t, ^3J = 6.9 Hz, 2 H, Fmoc); 7.40 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, Fmoc); 7.57 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.58 (d, ^3J = Hz, 2 H, HFmoc); 7.76 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.5 MHz) : δ 18.3 (Cβ2) ; 18.7 (Cβ1); 27.9 (C*t*Bu); 47.3 ($\underline{C}$H Fmoc); 50.7 (Cα1); 62.7 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα2); 67.6 ($\underline{C}H_2$ Fmoc); 84.2 (C*t*Bu); 120.3 (Car Fmoc); 124.5 (q, *J* = 285.6 Hz,CF_3); 125.3 (Car Fmoc); 127.4 (Car Fmoc); 128.1 (Car Fmoc); 141.6 (Cq ar Fmoc); 143.9 (Cq ar Fmoc); 156.5 (CO); 165.5 (CO); 172.0 (CO).

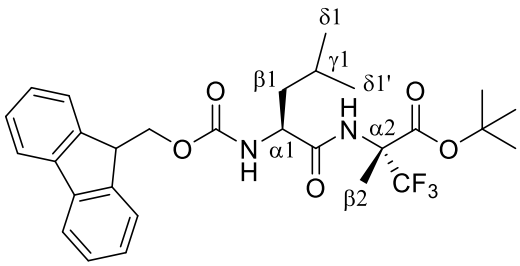
^{19}F NMR ($CDCl_3$, 376.2 MHz) : δ -78.9 (s, 3F, CF_3).

IR(neat/cm^{-1}) : 3301, 2981, 1745, 1680, 1508.

PF : 51.2-54.5°C

R.f. : 0,45 (Cyclohexane/AcOEt, 7/3)

Fmoc-Leu-(*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu (*S*,*R*)-20



To a solution of *N*-Fmoc-Leu-OH (339 mg, 0.96 mmol, 1.0 equiv.) in THF (15 mL) at -20 °C was added *N*-methylmorpholine (116 µL, 1.06 mmol, 1.1 equiv.) and isobutylchloroformiate (138 µL, 1.06 mmol, 1.1 equiv.). After 10 min at -20 °C, a solution of HCl . (*S*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*S*)-15** (170 mg, 0.80 mmol, 0.83 equiv.) and *N*-methylmorpholine (92 µL, 0.84 mmol, 1.1 equiv.) in THF (8 mL) was added to the reaction mixture and the resulting mixture was stirred 1 h at -20 °C and 2 h at room temperature. The reaction was evaporated under vacuum and diluted with water (12 mL). The aqueous solution was extracted with AcOEt (3 x 15 mL) and the combined organic extracts were dried with anhydrous $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt 90/10 to 70/30) to afford dipeptide Fmoc-Leu-(*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*S*,*R*)-20** (355 mg, 0.65 mmol, 81%) as a white solid.

Aspect : white solid.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 0.94 (s, 6 H, Hδ1 et Hδ1'); 1.46 (s, 9 H, H*t*Bu); 1.54 (m, 1 H, Hγ1); 1.67 (m, 2 H, Hβ1); 1.74 (s, 3 H, Hβ2); 4.20-4.28 (m, 2 H, Hα1 et HFmoc); 4.42 (d, ^3J = 6.9 Hz, 2 H, C$\underline{H_2}$ Fmoc); 5.25 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1 H, NH); 6.96 (s, 1 H, NH); 7.31 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.40 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2 H, HFmoc); 7.58 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.77 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.5 MHz) : δ 18.1 (Cβ2) ; 22.2 (Cδ1); 23.2 (Cδ1'); 24.9 (Cγ1); 27.9 (C*t*Bu); 41.4 (Cβ1); 47.4 ($\underline{C}$H Fmoc); 53.8 (Cα1)); 62.9 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα2); 67.5 ($\underline{C}H_2$ Fmoc); 84.3 (C*t*Bu); 120.6 (Car Fmoc); 124.5 (q, *J* = 285.6 Hz, CF_3); 125.4 (Car Fmoc); 127.4 (Car Fmoc); 128.1 (Car Fmoc); 141.6 (Cq ar Fmoc); 144.0 (Cq ar Fmoc); 156.7 (CO); 165.4 (CO); 171.8 (CO).

^{19}F NMR ($CDCl_3$, 376.2 MHz) : δ -79.1 (s, 3F, CF_3).

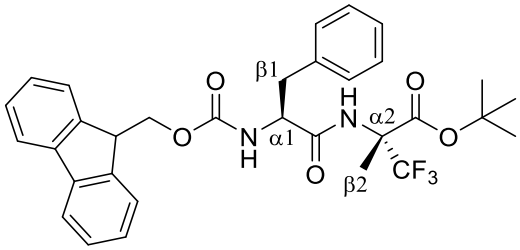
PF : 147.6 °C

IR(neat/cm^{-1}) : 3432, 3297, 1750, 1748, 1497.

MS (EI) : *m/z* (%) = 549.3 $[M + H]^+$

HRMS (EI) : $C_{29}H_{35}F_3N_2O_5$ -H+ : 549.2576; found 548.2579.

Fmoc-Phe-(*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu (*S*,*R*)-21



To a solution of *N*-Fmoc-Phe-OH (300 mg, 0.77 mmol, 1.0 equiv.) in THF (15 mL) at -20 °C was added *N*-methylmorpholine (94 µL, 0.85 mmol, 1.1 equiv.) and isobutylchloroformiate (111 µL, 0.85 mmol, 1.1 equiv.). After 10 min at -20 °C, a solution of HCl . (*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*R*)-15** (215 mg, 1.01 mmol, 1.3 equiv.) and *N*-methylmorpholine (94 µL, 0.85 mmol, 1.1 equiv.) in THF (8 mL) was added to the reaction mixture and the resulting mixture was stirred 1 h at -20 °C and 2 h at room temperature. The reaction was evaporated under vacuum and diluted with water (12 mL). The aqueous solution was extracted with AcOEt (3 x 15 mL) and the combined organic extracts were dried with anhydrous $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt 90/10 to 70/30) to afford dipeptide Fmoc-Leu-(*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*S*,*R*)-21** (342 mg, 0.58 mmol, 76%) as a white solid.

Aspect : white solid.

^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz) : δ 1.48 (s, 9 H, H*t*Bu); 1.69 (s, 3 H, Hβ2); 3.08 (s, 2 H, Hβ$_1$); 4.18 (t, ^3J = 7.3 Hz, 1 H, HFmoc); 4.28 (t, ^3J = 6.9 Hz, 1 H, C<u>H</u>$_2$Fmoc); 4.37 (t, ^3J = 8.2 Hz, 1 H, C<u>H</u>$_2$Fmoc); 4.57 (m, 1 H, Hα$_1$); 5.66 (d, ^3J = 7.3 Hz, 1 H, NH); 7.14-7.27 (m, 5 H, HarPhe); 7.31 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.41 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2H, HFmoc); 7.54 (m, 2 H, HFmoc); 7.77 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc).

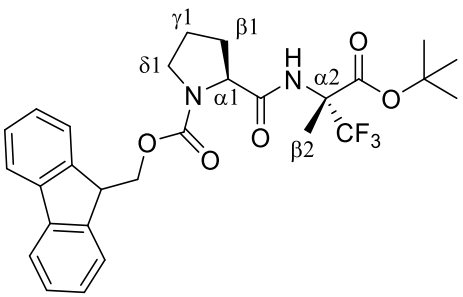
^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100.5 MHz) : δ 17.9 (Cβ2) ; 27.9 (C*t*Bu); 38.7 (Cβ1); 47.2 (<u>C</u>H Fmoc); 56.4 (Cα1); 62.7 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα2); 67.5 (<u>C</u>H$_2$ Fmoc); 84.2 (C*t*Bu); 120.3 (Car Fmoc); 124.3 (q, *J* = 285.6 Hz, CF$_3$); 125.4 (Car Fmoc); 127.4 (Car Fmoc); 128.1 (Car Fmoc); 141.6 (Cq ar Fmoc); 144.0 (Cq ar Fmoc); 156.7 (CO); 165.4 (CO); 171.8 (CO).

^{19}F NMR (CDCl$_3$, 376.2 MHz) : δ -78.7 (s, 3F, CF$_3$).

PF : 170.2 °C

IR(neat/cm^{-1}) : 3428, 3303, 3290, 1750, 1746, 1495.

Fmoc-Pro-(*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu (*S,R*)-22



To a solution of *N*-Fmoc-Pro-OH . H_2O (300 mg, 0.85 mmol, 1.2 equiv.) in THF (15 mL) at -20 °C was added *N*-methylmorpholine (101 µL, 0.92 mmol, 1.3 equiv.) and isobutylchloroformiate (120 µL, 0.92 mmol, 1.3 equiv.). After 10 min at -20 °C, a solution of HCl . (*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*R*)-15** (150 mg, 0.70 mmol, 1.0 equiv.) and *N*-methylmorpholine (101 µL, 0.92 mmol, 1.3 equiv.) in THF (8 mL) was added to the reaction mixture and the resulting mixture was stirred 1 h at -20 °C and 2 h at room temperature. The reaction was evaporated under vacuum and diluted with water (12 mL). The aqueous solution was extracted with AcOEt (3 x 15 mL) and the combined organic extracts were dried with anhydrous $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt 90/10 to 70/30) to afford dipeptide Fmoc-Pro-(*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*S,R*)-22** (232 mg, 0.44 mmol, 62%) as a white solid.

Aspect : white solid.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 1.44 (s, 9 H, H*t*Bu); 1.71 (s, 3 H, Hβ2); 1.95 (m, 2 H, Hγ1 and Hγ1'); 2.19 (m, 1 H, Hβ1); 2.39 (m, 1 H, Hβ1'); 3.44 (m, 1 H, Hδ1); 3.55 (m, 1 H, Hδ1'); 4.28 (t, ^3J = 6.9 Hz, 1 H, HFmoc); 4.36-4.46 (m, 3 H, Hα1 et C$\underline{H_2}$ Fmoc); 6.70 (s, 1 H, NH); 7.32 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.41 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.60 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, fmoc); 7.65 (s, 1 H, NH); 7.77 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, Fmoc).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.5 MHz) : δ 18.3 (Cβ2) ; 25.0 (Cγ1); 27.9 (C*t*Bu and Cβ1)'); 47.4 ($\underline{C}$HFmoc); 47.9 (δ1); 60.7 (Cα1); 62.6 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα2); 68.2 ($\underline{C}H_2$ Fmoc); 83.8 (C*t*Bu); 120.4 (Car Fmoc); 124.5 (q, *J* = 285.6 Hz, CF_3); 125.4 (Car Fmoc); 127.4 (Car Fmoc); 128.1 (Car Fmoc); 141.6 (Cq ar Fmoc); 144.0 (Cq ar Fmoc); 156.8 (CO); 165.6 (CO); 170.8 (CO).

^{19}F NMR ($CDCl_3$, 376.2 MHz) : δ -79.1 (s, 3F, CF_3).

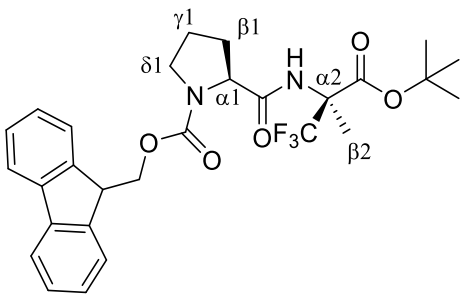
IR(neat/cm^{-1}) : 3354, 2975, 1735, 1709, 1693.

PF : 162.8-163.4°C

MS (EI) : *m/z* (%) = 533.2 $[M + H]^+$

HRMS (EI) : $C_{28}H_{31}F_3N_2O_5$ -H+ : 533.2263; found 533.2266.

Fmoc-Pro-(*S*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu (*S*,*S*)-22



To a solution of *N*-Fmoc-Pro-OH . H_2O (265 mg, 0.75 mmol, 1.2 equiv.) in THF (15 mL) at -20 °C was added *N*-methylmorpholine (89 µL, 0.81 mmol, 1.3 equiv.) and isobutylchloroformiate (106 µL, 0.81 mmol, 1.3 equiv.). After 10 min at -20 °C, a solution of HCl . (*S*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*S*)-15** (157 mg, 0.63 mmol, 1.0 equiv.) and *N*-methylmorpholine (89 µL, 0.81 mmol, 1.3 equiv.) in THF (8 mL) was added to the reaction mixture and the resulting mixture was stirred 1 h at -20 °C and 2 h at room temperature. The reaction was evaporated under vacuum and diluted with water (12 mL). The aqueous solution was extracted with AcOEt (3 x 15 mL) and the combined organic extracts were dried with anhydrous $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt 90/10 to 70/30) to afford dipeptide Fmoc-Pro-(*S*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*S*,*S*)-22** (255 mg, 0.48 mmol, 64%) as a white solid.

Aspect : white solid.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 1.46 (s, 9 H, H*t*Bu); 1.71 (s, 3 H, Hβ2); 1.97 (m, 2 H, Hγ1 and Hγ1'); 2.19 (m, 1 H, Hβ1); 2.39 (m, 1 H, Hβ1'); 3.44 (m, 1 H, Hδ1); 3.53 (m, 1 H, Hδ1'); 4.28 (t, ^3J = 6.9 Hz, 1 H, HFmoc); 4.36-4.46 (m, 3 H, Hα1 et C$\underline{H_2}$ Fmoc); 6.70 (s, 1 H, NH); 7.32 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.41 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.60 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, fmoc); 7.65 (s, 1 H, NH); 7.77 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, Fmoc).

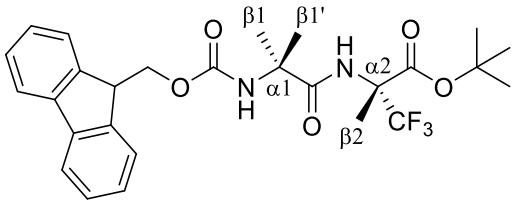
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.5 MHz) : δ 18.3 (Cβ2) ; 25.0 (Cγ1); 27.9 (C*t*Bu and Cβ1)'); 47.4 ($\underline{C}$HFmoc); 47.9 (δ1); 60.7 (Cα1); 62.6 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα2); 68.2 ($\underline{C}H_2$ Fmoc); 83.8 (C*t*Bu); 120.4 (Car Fmoc); 124.5 (q, *J* = 285.6 Hz, CF_3); 125.4 (Car Fmoc); 127.4 (Car Fmoc); 128.1 (Car Fmoc); 141.5 (Cq ar Fmoc); 144.0 (Cq ar Fmoc); 156.8 (CO); 165.6 (CO); 170.9 (CO).

^{19}F NMR ($CDCl_3$, 376.2 MHz) : δ -79.4 (s, 3F, CF_3).

PF : 158.7-159.2 °C

IR (neat/cm^{-1}) : 3350, 2977, 1738, 1710, 1690.

Fmoc-Aib-(*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu (*R*)-23



To a solution of *N*-Fmoc-Aib-OH . H_2O (245 mg, 0.75 mmol, 1.2 equiv.) in THF (15 mL) at -20 °C was added *N*-methylmorpholine (89 µL, 0.81 mmol, 1.3 equiv.) and isobutylchloroformiate (106 µL, 0.81 mmol, 1.3 equiv.). After 10 min at -20 °C, a solution of HCl . (*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*R*)-15** (155 mg, 0.63 mmol, 1.0 equiv.) and *N*-methylmorpholine (89 µL, 0.81 mmol, 1.3 equiv.) in THF (8 mL) was added to the reaction mixture and the resulting mixture was stirred 1 h at -20 °C and 2 h at room temperature. The reaction was evaporated under vacuum and diluted with water (12 mL). The aqueous solution was extracted with AcOEt (3 x 15 mL) and the combined organic extracts were dried with anhydrous $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt 90/10 to 70/30) to afford dipeptide Fmoc-Aib-(*R*)-α-Tfm-Ala-O*t*Bu **(*R*)-23** (208 mg, 0.40 mmol, 63%) as a white solid.

Aspect : white solid.

^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz) : δ 1.46 (s, 9 H, H*t*Bu); 1.52 (s, 6 H, Hβ1 et Hβ1'); 1,77 (s, 3 H, Hβ2); 4,21 (t, ^3J = 6.4 Hz, 1 H, HFmoc); 4,43 (d, ^3J = 5.0 Hz, 2 H, C$\underline{H_2}$Fmoc) ; 5,28 (s, 1 H, NH); 7.32 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.40 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc); 7.59 (m, 2 H, HFmoc); 7.76 (d, ^3J = 7.3 Hz, 2 H, HFmoc).

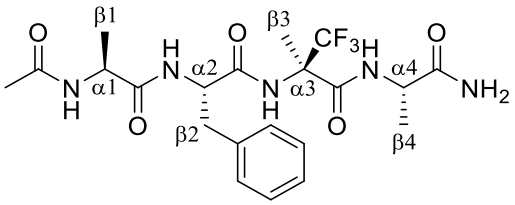
^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100.5 MHz) : δ 17.7 (Cβ2) ; 25.6 (Cβ1 et Cβ1'); 27,9 (CtBu); 47.4 ($\underline{C}$H Fmoc); 57,5 (Cα1); 62.9 (q, J = 28.8 Hz, Cα2); 67.1 ($\underline{C}H_2$ Fmoc); 84.3 (C*t*Bu); 120.1 (Car Fmoc); 124.6 (q, J = 285.6 Hz, CF_3); 125.3 (Car Fmoc); 127.4 (Car Fmoc); 128.1 (Car Fmoc); 141.6 (Cq ar Fmoc); 144.0 (Cq ar Fmoc); 155.6 (CO); 165.8 (CO); 173.7 (CO).

^{19}F NMR (CDCl$_3$, 376.2 MHz) : δ -79.1 (s, 3F, CF_3).

IR(neat/cm^{-1}) : 3420, 3293, 1747, 1752, 1490.

PF : 145.8-148.9 °C

Ac-Ala-Phe-(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-NH$_2$ (*S,S,R,S*)-24



A sample of *N*-Fmoc-Rink-amide resin (200 mg, 0.13 mmol, 1.0 equiv.) was placed in a dried 15 mL glass reaction vessel, stirred in a mixture of dry DCM (2 mL) and DMF (2 mL) for 30 min, and drained. The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). To the resin were added a solution of *N*-Fmoc-Ala-OH (422 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.), DIPEA (112 µl, 0.64 mmol, 5.0 equiv.) and HATU (244 mg, 0.64 mmol, 5.0 equiv.) in DMF (4 mL). The coupling reaction was shaken for 2 h at room temperature, after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). To the resin were added a solution of *N*-Fmoc-Phe-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH (140 mg, 0.26 mmol, 2.0 equiv.), DIPEA (45 µl, 0.26 mmol, 2.0 equiv.) and HATU (97 mg, 0.26 mmol, 2.0 equiv.) in DMF (2 mL). The coupling reaction was shaken for 3 h at room temperature, after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The same procedure was repeted for the coupling of *N*-Fmoc-Ala-OH (422 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.).

N–α Acetylation : A 10 ml solution of acetic anhydride/pyridine/DMF (1:2:3) was transferred to the peptidyl resin and was reacted at room temperature (2 x 60 min). The resin was drained, washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min).

Cleavage from the Resin : A total of 6 ml of TFA/TIS/water/EDT (94:1:2.5:2.5) was added to the acetylated peptidyl resin (0.26 mmol) and shaked at room temperature for 3 h. The resin was then removed by filtration and washed twice with 100% TFA.

The filtrate was evaporated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC (water/acetonitrile 90/10 to 70/30) to afford the desired tripeptide Ac-Ala-Phe-(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-NH$_2$ **(*S,S,R,S*)-24** (33 mg, 53%) as a white hygroscopic solid.

Aspect : white solid.

^{1}H NMR (CD$_3$OD, 400 MHz) : δ 1.27 (d, ^3J = 7.3 Hz, 3 H, Hβ1 or Hβ4); 1.40 (d, ^3J = 6.9 Hz, 3 H, Hβ1 or Hβ4); 1,68 (s, 3 H, Hβ3); 1.96 (s, 3 H, C$\underline{H_3}$CO) ; 2.99 (dd, ^2J = 14.2 Hz, ^3J = 9.2 Hz, 1 H, Hβ2); 3.18 (dd, ^2J = 14.2 Hz, ^3J = 6.0 Hz 1 H, Hβ2'); 4,31 (m, 2 H, Hα1 and Hα4); 4,57 (m, 1 H, Hα2); 7.24-7.33 (m, 5 H, Har) ; 7.89 (d, *J* = 6.9 Hz, 1 H, NH) ; 8.27 (d, *J* = 6.0 Hz, 1 H, NH) ; 8.8 (s, 1 H, NH) ppm.

^{13}C NMR (CD$_3$OD, 100.5 MHz) : δ 17.6 (Cβ1 and Cβ4) ; 19.1 (Cβ3); 22.3 ($\underline{C}$H$_3$CO) ; 37.7 (Cβ2) ; 50.4 (Cα1 or Cα4) ; 50.8 (Cα1 or Cα4) ; 56.4 (Cα2) ; 63.5 (q, *J* = 25.9 Hz, Cα3) ; 125.8 (q, *J* = 283.7 Hz, CF$_3$) ; 127.9 (Car) ; 129.5 (Car) ; 130.3 (Car) ;137.9 (Car) ; 168.0 (CO) ; 173.3 (CO) ; 173.7 (CO) ;175.6 (CO) ; 177.3 (CO) ppm.

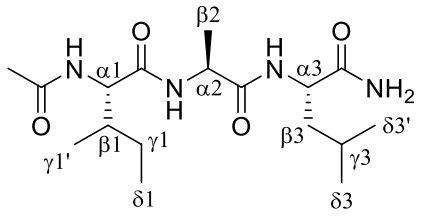
^{19}F RMN (CD$_3$OD, 376.2 MHz) : -79.1 (s, 3F, CF$_3$).

IR(neat/cm^{-1}) : 3402, 3350, 3250, 1740, 1628, 1550.

MS (EI) : *m/z* (%) = 488.2 [M + H]$^+$

HRMS (EI) : $C_{21}H_{28}F_3N_5O_5$ + H$^+$: 488.2121; found 488.2122

Ac-Ile-Ala-Leu-NH$_2$ (*S,S,S*)-25



A sample of *N*-Fmoc-Rink-amide resin (400 mg, 0.26 mmol, 1.0 equiv.) was placed in a dried 15 mL glass reaction vessel, stirred in a mixture of dry DCM (4 mL) and DMF (4 mL) for 30 min, and drained. The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). To the resin were added a solution of Fmoc-Leu-OH (452 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.), DIPEA (223 µl, 1.28 mmol, 5.0 equiv.) and HATU (487 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.) in DMF (8 mL). The coupling reaction was shaken for 2 h at room temperature, after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The same procedure was repeted for the coupling of Fmoc-Ala-OH (422 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.) and Fmoc-Ile-OH (452 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv).

N–α Acetylation : A 10 ml solution of acetic anhydride/pyridine/DMF (1:2:3) was transferred to the peptidyl resin and was reacted at room temperature (2 x 60 min). The resin was drained, washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min).

Cleavage from the Resin : A total of 6 ml of TFA/TIS/water/EDT (94:1:2.5:2.5) was added to the acetylated peptidyl resin (0.26 mmol) and shaked at room temperature for 3 h. The resin was then removed by filtration and washed twice with 100% TFA.

The filtrate was evaporated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC (water/acetonitrile 90/10 to 50/50) to afford the desired tripeptide Ac-Ile-Ala-Leu-NH$_2$ **(*S,S,S*)-25** (30 mg, 81.9 µmol, 32%) as a white hygroscopic solid.

IR(neat/cm^{-1}) : 3280, 2957, 1625, 1545.

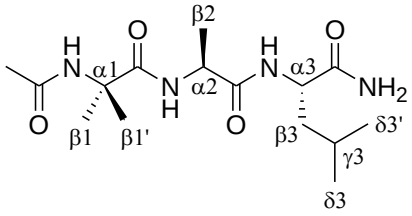
PF : 175 °C-178 °C.

MS (EI) : *m/z* (%) = 357.3 [M + H]$^+$

HRMS (EI) $C_{17}H_{32}N_4O_4$ +H$^+$: 357.2502; found 357.2518.

Due to solubility problems it was not possible to perform a NMR experiments.

Ac-Aib-Ala-Leu-NH$_2$ (*S,S*)-26



A sample of *N*-Fmoc-Rink-amide resin (400 mg, 0.26 mmol, 1.0 equiv.) was placed in a dried 15 mL glass reaction vessel, stirred in a mixture of dry DCM (4 mL) and DMF (4 mL) for 30 min, and drained. The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). To the resin were added a solution of Fmoc-Leu-OH (452 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.), DIPEA (223 µl, 1.28 mmol, 5.0 equiv.) and HATU (487 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.) in DMF (8 mL). The coupling reaction was shaken for 2 h at room temperature, after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The same procedure was repeted for the coupling of Fmoc-Ala-OH (422 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.) and Fmoc-Aib-OH (416 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.).

N–α Acetylation : A 10 ml solution of acetic anhydride/pyridine/DMF (1:2:3) was transferred to the peptidyl resin and was reacted at room temperature (2 x 60 min). The resin was drained, washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min).

Cleavage from the Resin : A total of 6 ml of TFA/TIS/water/EDT (94:1:2.5:2.5) was added to the acetylated peptidyl resin (0.26 mmol) and shaked at room temperature for 3 h. The resin was then removed by filtration and washed twice with 100% TFA.

The filtrate was evaporated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC (water/acetonitrile 90/10 to 70/30) to afford the desired tripeptide Ac-Aib-Ala-Leu-NH$_2$ **(*S,S*)-26** (54 mg, 0.16 mmol, 64%) as a white hygroscopic solid.

Aspect : white solid.

^{1}H NMR (CD$_3$OD, 400 MHz) : δ 0.92 (d, ^3J = 6.0 Hz, 3 H, Hδ3); 0.99 (d, ^3J = 6.0 Hz, 3 H, Hδ3'); 1.42-1.46 (m, 9 H, Hβ1, Hβ1' et Hβ2); 1.69 (m, 2 H, Hβ3); 1.89 (m, 1 H, Hγ3); 2.00 (s, 3 H, Ac); 4.18 (q, ^3J = 7.3 Hz, 1 H, Hα2); 4.31 (m, 1 H, Hα3) ppm.

^{13}C NMR (CD$_3$OD, 100.5 MHz) : δ 17.8 (Cβ2) ; 22.2 (Cδ3); 24.0 (CAc); 24.6 (Cδ3'); 25.3 (Cβ1 ou Cβ1'); 27.0 (Cγ3); 27.1 (Cβ1 ou Cβ1'); 41.8 (Cβ3); 53.1 (Cα2); 54.2 (Cα3); 58.3 (Cα1); 174.3 (CO); 176.6 (CO); 179.1 (CO); 179.1 (CO) ppm.

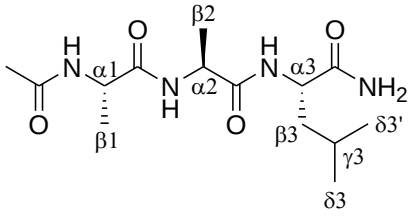
IR(neat/cm^{-1}) : 3269, 2958, 2455, 1635, 1538, 1429.

PF : 103 °C- 105 °C.

MS (EI) : *m/z* (%) = 351.2 [M + Na]$^+$

HRMS (EI) : $C_{15}H_{28}N_4O_4$ +Na+ : 351.2008; found 351.2013

Ac-Ala-Ala-Leu-NH$_2$ (*S,S,S*)-27



A sample of *N*-Fmoc-Rink-amide resin (400 mg, 0.26 mmol, equiv.) was placed in a dried 15 mL glass reaction vessel, stirred in a mixture of dry DCM (4 mL) and DMF (4 mL) for 30 min, and drained. To the resin were added a solution of Fmoc-Leu-OH (452 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv), DIPEA (223 µl, 1.28 mmol, 5.0 equiv.) and HATU (487 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.) in DMF (8 mL). The coupling reaction was shaken for 2 h at room temperature, after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). The same procedure was repeted for the coupling of 2 residues of Fmoc-Ala-OH (422 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.).

N–α Acetylation : A 10 ml solution of acetic anhydride/pyridine/DMF (1:2:3) was transferred to the peptidyl resin and was reacted at room temperature (2 x 60 min). The resin was drained, washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min).

Cleavage from the Resin : A total of 6 ml of TFA/TIS/water/EDT (94:1:2.5:2.5) was added to the acetylated peptidyl resin (0.26 mmol) and shaked at room temperature for 3 h. The resin was then removed by filtration and washed twice with 100% TFA.

The filtrate was evaporated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC (water/acetonitrile 90/10 to 70/30) to afford the desired tripeptide Ac-Ala-Ala-Leu-NH$_2$ **(*S,S,S*)-27** (28 mg, 89.6 µmol, 35%) as a white hygroscopic solid.

Aspect : White solid

^{1}H RMN (D$_2$O, 400 MHz) : δ 0.83 (d, ^3J = 5.5 Hz, 3 H, Hδ3; 0.89 (d, ^3J = 6.0 Hz, 3 H, Hδ3'); 1.31-1.38 (m, 6 H, Hβ1 et Hβ2); 1.54-1.65 (m, 3 H, Hβ3 et Hγ3); 1.97 (s, 3 H, Ac); 4.18-4.28 (m, 3 H, Hα1, Hα2 et Hα3) ppm.

^{13}C RMN (D$_2$O, 100.5 MHz) : δ 16.1 (Cβ1) ; 16.4 (Cβ2); 20.4 (Cδ3); 21.5 (CAc); 22.3 (Cδ3'); 24.3 (Cγ3); 39.6 (Cβ3); 49.6 (Cα1 ou Cα2 ou Cα3); 49.8 (Cα1 ou Cα2 ou Cα3); 52.1 (Cα1 ou Cα2 ou Cα3); 174.3 (CO); 175.0 (CO); 175.3 (CO); 177.6 (CO) ppm.

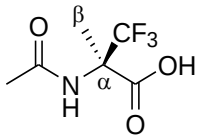
IR(neat/cm^{-1}) : 3276, 2956, 2419, 1675, 1622, 1533, 1456.

PF : 102 °C – 112 °C.

MS (EI) : *m/z* (%) = 315.2 [M + H]$^+$

HRMS (EI) : $C_{14}H_{26}N_4O_4$ +H+ : 315.2032; found 315.2019

Ac-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH (*R*)-28



To a solution of (*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-3** (145 mg, 0.924 mmol, 1.0 equiv.) in acetonitrile (3 mL) was added K_2CO_3 (320 mg, 2.31 mmol, 2.5 equiv.) and acetylchloride (0.20 mL, 2.77 mmol, 3.0 equiv.) and the resulting solution was heated at 100 °C in a sealed tube for 2 h. The reaction mixture was then cooled to room temperature and evaporated under vacuum. The crude product was dissolved in a 1 M aqueous solution of HCl and the aqueous phase was then extracted with AcOEt (3 x 10 mL). The combined organic extracts were dried over $MgSO_4$ and evaporated under vacuum to give Ac-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-28** (175 mg, 0.88 mmol, 95%) as a pale yellow solid. The product was used without purification.

Aspect : White solid

^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) : δ 1.66 (s, 3 H, Hβ); 2.01 (s, 3 H, Ac) ppm.

^{13}C NMR (CD_3OD, 100.5 MHz) : 20.1 (Cβ) ; 23.2 ($\underline{C}H_3CO$); 63.1 (q, J = 28.8 Hz, Cα); 126.8 (q, ^3J = 284.7 Hz, CF_3); 170.7 ($CH_3\underline{C}O$); 173.4 (COOH) ppm.

^{19}F NMR (CD_3OD, 376.2 MHz) : δ -79.1 (s, 3 F, CF_3) ppm.

IR(neat/cm^{-1}) : 3336, 3316, 2920, 1740, 1733, 1635, 1550.

PF : 199.5-207.2 °C

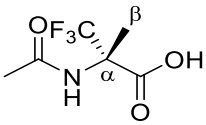
[α]$_D$: + 4.5 (c = 1.0, MeOH).

MS (EI) : m/z (%) = 198.0 $[M - H]^-$

HRMS (EI) : $C_6H_8F_3NO_3$ -H+ : 198.0378; found 198.0373.

Anal. Calc. : %C : 36.19; %H : 4.05; %N : 7.03. Found : %C : 36.32; %H : 4.06; %N : 6.99.

Ac-(*S*)-α-Tfm-Ala-OH (*S*)-28



To a solution of (*S*)-α-Tfm-Ala-OH **(*S*)-3** (235 mg, 1.50 mmol, 1.0 equiv.) in acetonitrile (3 mL) was added K2CO3 (827 mg, 5.99 mmoles, 4.0 equiv) and acetylchloride (0.32 mL, 4.49 mmol, 3.0 equiv.) and the resulting solution was heated at 100 °C in a sealed tube for 2 h. The reaction mixture was then cooled to room temperature and evaporated under vacuum. The crude product was dissolved in a 1 M aqueous solution of HCl and the aqueous phase was then extracted with AcOEt (3 x 10 mL). The combined organic extracts were dried over $MgSO_4$ and evaporated under vacuum to give Ac-(*S*)-α-Tfm-Ala-OH **(*S*)-28** (290 mg, 1.47 mmol, 98%) as a pale yellow solid. The product was used without purification.

Aspect : White solid.

^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) : δ 1.67 (s, 3H, Hβ); 2.01 (s, 3H, Ac)

^{13}C NMR (CD_3OD, 100.5 MHz) : 20.1 (Cβ) ; 23.2 (CH$_3$CO); 63.1 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα); 126.8 (q, ^3J = 284.7 Hz, CF$_3$); 170.9 (CH$_3$CO); 173.4 (COOH).

^{19}F NMR (CD_3OD, 376.2 MHz) : δ -79.1 (s, 3F, CF$_3$) ppm.

[α]$_D$: - 8.4 (*c* = 1.0, MeOH).

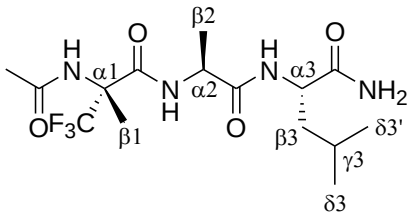
IR(neat/cm^{-1}) : 3330, 3316, 2920, 1740, 1733, 1635, 1550.

PF : 201.9-205.0 °C

MS (EI) : *m/z* (%) = 198.0

HRMS (EI) : $C_6H_8F_3NO_3$: 198.0378; found 198.0377.

Ac-(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-Leu-NH$_2$ (*R,S,S*)-29



A sample of *N*-Fmoc-Rink-amide resin (200 mg, 0.13 mmol, 1.0 equiv.) was placed in a dried 15 mL glass reaction vessel, stirred in a mixture of dry DCM (2 mL) and DMF (2 mL) for 30 min, and drained. The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). To the resin were added a solution of Fmoc-Leu-OH (226 mg, 0.64 mmol, 5.0 equiv.), DIPEA (112 µl, 0.64 mmoles, 5.0 mmol) and HATU (244 mg, 0.64 mmol, 5.0 equiv.) in DMF (4 mL). The coupling reaction was shaken for 2 h at room temperature, after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The same procedure was repeted for the coupling of Fmoc-Ala-OH (422 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.) and Ac-(*R*)-α-Tfm-Alanine (130 mg, 0.64 mmol, 2.0 equiv.)

Cleavage from the Resin : A total of 6 ml of TFA/TIS/water/EDT (94:1:2.5:2.5) was added to the acetylated peptidyl resin (0.26 mmol) and shaked at room temperature for 3 h. The resin was then removed by filtration and washed twice with 100% TFA.

The filtrate was evaporated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC (water/acetonitrile 90/10 to 60/40) to afford the desired tripeptide Ac-(*R*)-α-Tfm-Ala-Ala-Leu-NH$_2$ **(*R,S,S*)-29** (20 mg, 52 µmol, 40%) as a white hygroscopic solid.

Aspect : White solid.

^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) : δ 0.92 (d, ^3J = 6.5 Hz, 3 H, Hδ3); 0.99 (d, ^3J = 6.5 Hz, 3 H, Hδ3'); 1.44 (d, ^3J = 7.3 Hz, 3 H, Hβ2); 1.68 (m, 5 H, Hβ1 et Hβ3); 1.86 (m, 1 H, Hγ3); 2.09 (s, 3 H, Ac); 4.24 (q, ^3J = 7.3 Hz, 1 H, Hα2); 4.30 (m, 1 H, Hα3) ppm.

^{13}C NMR (CD_3OD, 100.5 MHz) : δ 17.7 (Cβ2) ; 18.7 (Cβ1); 22.1 (Cδ3); 24.0 (CAc); 24.5 (Cδ3'); 26.9 (Cγ3); 41.9 (Cβ3); 53.5 (Cα2); 54.3 (Cα3); 65.0 (q, *J* = 26.8 Hz, Cα1); 126.6 (q, *J* = 284.7 Hz, CF$_3$); 169.7 (CO); 174.9 (CO); 175.8 (CO); 178.9 (CO) ppm.

^{19}F NMR (CD_3OD, 376.2 MHz) : -80.6 (s, 3F, CF$_3$).

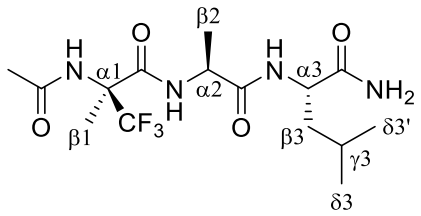
IR(neat/cm^{-1}) : 3271, 2958, 2458, 1645, 1544, 1429.

PF : 100 °C – 105 °C.

MS (EI) : *m/z* (%) = 405.2 [M + Na]$^+$

HRMS (EI) : $C_{15}H_{25}F_3N_4O_4$ +Na+ : 405.1726; found 405.1730.

Ac-(*S*)-α-Tfm-Ala-Ala-Leu-NH$_2$ (*S,S,S*)-29



A sample of *N*-Fmoc-Rink-amide resin (200 mg, 0.13 mmol, 1.0 equiv.) was placed in a dried 15 mL glass reaction vessel, stirred in a mixture of dry DCM (2 mL) and DMF (2 mL) for 30 min, and drained. The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). To the resin were added a solution of Fmoc-Leu-OH (226 mg, 0.64 mmol, 5.0 equiv), DIPEA (112 µl, 0.64 mmol, 5.0 equiv.) and HATU (244 mg, 0.64 mmol, 5.0 equiv.) in DMF (4 mL). The coupling reaction was shaken for 2 h at room temperature, after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The same procedure was repeted for the coupling of Fmoc-Ala-OH (422 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.).

The filtrate was evaporated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC (water/acetonitrile 90/10 to 60/40) to afford the desired tripeptide Ac-(*S*)-α-Tfm-Ala-Ala-Leu-NH$_2$ **(*S,S,S*)-29** (26 mg, 52%) as a white hygroscopic solid.

Aspect : white solid.

^{1}H NMR (CD$_3$OD, 400 MHz) : δ 0.93 (d, ^3J = 6.5 Hz, 3 H, Hδ3); 0.99 (d, ^3J = 6.5 Hz, 3 H, Hδ3'); 1.44 (d, ^3J = 7.3 Hz, 3 H, Hβ2); 1.68 (m, 5 H, Hβ1 et Hβ3); 1.86 (m, 1 H, Hγ3); 2.09 (s, 3 H, Ac); 4.24 (q, ^3J = 7.3 Hz, 1 H, Hα2,); 4.30 (m, 1 H, Hα3) ppm.

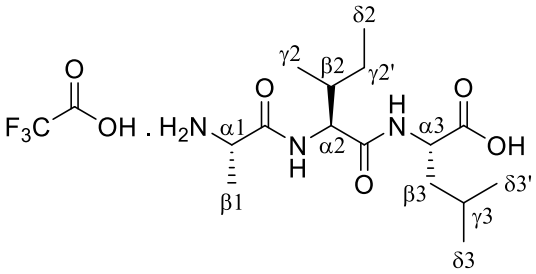
^{13}C NMR (CD$_3$OD, 100.5 MHz) : δ 17.5 (Cβ2) ; 18.7 (Cβ1); 22.1 (Cδ3); 24.1 (CAc); 24.7 (Cδ3'); 26.9 (Cγ3); 42.0 (Cβ3); 53.5 (Cα2); 54.3 (Cα3); 65.4 (q, *J* = 26.8 Hz, Cα1); 126.6 (q, *J* = 284.7 Hz, CF$_3$); 169.7 (CO); 174.9 (CO); 175.8 (CO); 178.9 (CO) ppm.

^{19}F NMR (CD$_3$OD, 376.2 MHz) : -80.6 (s, 3F, CF$_3$) ppm.

IR(neat/cm^{-1}) : 3238, 2905, 1648, 1575.

PF : 98.5 °C.

H-Ala-Ile-Leu-OH (*S,S,S*)-30



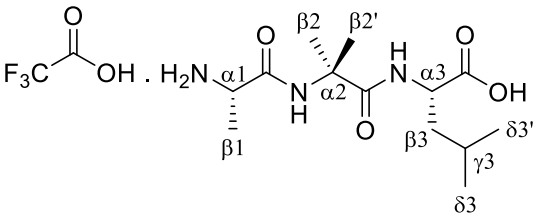
A sample of *N*-Fmoc-Leu-Wang resin (loading : 0.8 mmol/g, 380 mg, 0.30 mmol, 1.0 equiv.) was placed in a dried 15 mL glass reaction vessel, stirred in a mixture of dry DCM (2 mL) and DMF (2 mL) for 40 min, and drained. The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). To the resin were added a solution of *N*-Fmoc-Ile-OH (618 mg, 1.50 mmoles, 5.0 equiv), DIPEA (261 µl, 1.50 mmol, 5,0 equiv.) and HATU (570 mg, 1.50 mmol, 5.0 equiv.) in DMF (4 mL). The coupling reaction was stirred for 2 h at room temperature, after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The same procedure was repeted for the coupling of another *N*-Fmoc-Ala-OH (494 mg, 1.50 mmol, 5.0 equiv.). The coupling reaction was stirred for 2 h. Fmoc group is then removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin is cleaved with a solution of TFA (95%) in dichloromethane for 3 hours. Purification by semi preparative HPLC (Water/Acetonitrile (TFA 0.1%) 70/30 to 0:100) afforded tripeptide **(*S,S,S*)-30** (25 mg, 81 µmol, 27%) as a white solid.

Aspect : White solid.

MS (EI) : *m/z* (%) = 429.43 $[M - H]^-$

Due to solubility problems it was not possible to perform a NMR experiments.

H-Ala-Aib-Leu-OH (*S,S*)-31



A sample of *N*-Fmoc-Leu-Wang resin (loading : 0.8 mmol/g, 375 mg, 0.30 mmol, 1.0 equiv.) was placed in a dried 15 mL glass reaction vessel, stirred in a mixture of dry DCM (2 mL) and DMF (2 mL) for 40 min, and drained. The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). To the resin were added a solution of Fmoc-Aib-OH (488 mg, 1.50 mmoles, 5.0 equiv), DIPEA (261 µl, 1.50 mmol, 5,0 equiv.) and HATU (570 mg, 1.50 mmol, 5.0 equiv.) in DMF (4 mL). The coupling reaction was stirred for 2 h at room temperature,

after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The same procedure was repeted for the coupling of *N*-Fmoc-Ala-OH (494 mg, 1.50 mmol, 5.0 equiv..). The coupling reaction was stirred for 2 h. Fmoc group is then removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin is cleaved with a solution of TFA (95%) in dichloromethane for 3 hours. Purification by semi preparative HPLC (Acetonitrile (TFA 0.1%)/water (TFA 0.1%), 10 : 9 to 30 : 70) afforded tripeptide **(*S,S*)-31** (21 mg, 75 µmol, 25%) as a white solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 0.94-0.90 (m, 6 H, Hδ3 + Hδ3'); 1.47-1.52 (m, 9 H, Hβ1 + Hβ2 + Hβ2'); 1.53-1.59 (m, 2 H, Hβ3); 1.63 (m, 1 H, Hγ3); 3.93 (m, 1 H, Hα1 or Hα3); 4.43 (m, 1 H, Hα1 or Hα3) ppm.

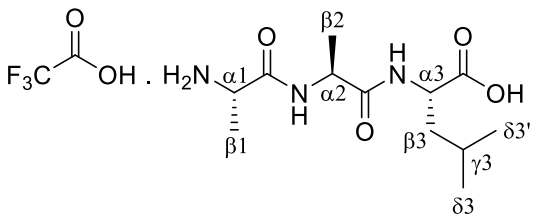
^{13}C NMR (CD_3OD): δ 17.6; 22.0; 23.4; 25.2; 25.4; 25.9; 41.7; 50.3; 52.3; 58.1; 118.0 (q, J1C-F= 291 Hz; TFA); 163.0 (q, J2C-F= 34 Hz, TFA); 170.4; 176.1; 176.2 ppm.

^{19}F NMR (CD_3OD): d ppm -80.0 (TFA salt) ppm.

lc/ms: m/z= 288.2 ($[M+H]^+$)

HRMS: m/z= 288.1912 ([M+H]+); calcd: 288.1923

H-Ala-Ala-Leu-OH (*S,S,S*)-32



A sample of *N*-Fmoc-Leu-Wang resin (loading : 0.8 mmol/g, 375 mg, 0.30 mmol, 1.0 equiv.) was placed in a dried 15 mL glass reaction vessel, stirred in a mixture of dry DCM (2 mL) and DMF (2 mL) for 40 min, and drained. The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). To the resin were added a solution of *N*-Fmoc-Ala-OH (494 mg, 1.50 mmol, 5.0 equiv.), DIPEA (261 µl, 1.50 mmol, 5,0 equiv.) and HATU (570 mg, 1.50 mmol, 5.0 equiv.) in DMF (4 mL). The coupling reaction was stirred for 2 h at room temperature, after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The same procedure was repeted for the coupling of another *N*-Fmoc-Ala-OH (494 mg, 1.50 mmol, 5.0 equiv.). The coupling reaction was stirred for 2 h. Fmoc group is then removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin is cleaved with a solution of TFA (95%) in dichloromethane for 3 hours. Purification by semi preparative HPLC (Acetonitrile (TFA 0.1%)/water (TFA 0.1%), 10 : 9 to 30 : 70) afforded tripeptide **(*S,S,S*)-32** (20 mg, 75 µmol, 25%) as a white solid.

Aspect : white solid

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 0.91 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, , Hδ3); 0.95 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, Hδ3'); 1.38 (d, *J* = 7.3 Hz, 3 H, Hβ1 or Hβ2); 1.50 (d, *J* = 7.3 Hz, 3 H, Hβ1 or Hβ2); 1.63 (m, 2 H, Hβ3); 1.71 (m, 1 H, Hγ3); 3.93 (m, 1H, Hα1 or Hα2); 4.41 (m, 1H, Hα1 or Hα2) ppm.

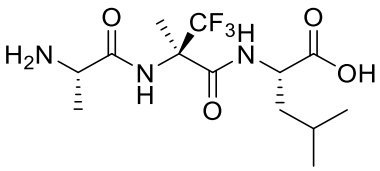
^{13}C NMR (CD_3OD): δ 17.6 (Cβ1 or Cβ2); 18.0 (Cβ1 or Cβ2); 21.8 (Cδ3); 23.4 (Cδ3'); 25.9 (Cγ3); 41.6 (Cβ3); 50.1 (Cα1 or Cα2 or Cα3); 50.3 (Cα1 or Cα2 or Cα3); 52.7 (Cα1 or Cα2 or Cα3); 170.7 (CO); 175.8 (CO); 174.6 (CO) ppm.

^{19}F NMR (CD_3OD): d ppm -80.02 (TFA salt) ppm.

lc/ms: m/z= 274.2 ($[M+H]^+$)

HRMS: m/z= 274.1761 ($[M+H]^+$); calcd: 274.1767

H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OH (*S,R,S*)-33



Pd/C (260 mg, 0.075 mmol, 0,5 equiv.) was added to a solution of *N*-Fmoc-Ala -(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn (100 mg, 0,15 mmol, 1,0 equiv.) in MeOH (5 mL) under a nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred under a hydrogen atmosphere (2 bars) for 2 h. The catalyst was separated by filtration and HCl gas was bubbled through the solution for 10 min. The resulting solution was evaporated under vacuum to afford H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OH **(*S,R,S*)-33** (40 mg, 77%) as a white solid.

Aspect : white solid.

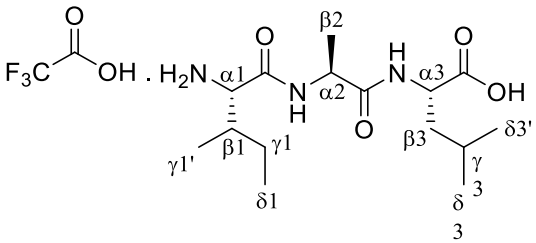
^{1}H NMR (CD_3OD): δ 0.91 (m, 6H, Hδ3 + Hδ3'); 1.50 (d, 3H, *J*= 6 Hz, Hβ1); 1.60-1.62 (m, 3H, Hβ3 + Hγ3); 1.76 (s, 3H, Hβ2); 3.99 (m, 1H, Hα1 or Hα3); 4.47 (m, 1H, Hα1 or Hα3) ppm.

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 17.5; 18.0; 21.9; 23.3. 25.8; 41.6; 50.3; 52.5; 63.9 (q, J_2C-F= 26 Hz); 117.5 (q, J_1C-F= 296 Hz; TFA); 125.8 (q, J_1C-F= 285 Hz); 162.5 (q, J_2C-F= 28 Hz, TFA); 167.4; 170.7; 175.4 ppm.

^{19}F NMR (CD_3OD): δ -79.7 (s, 3 F, CF_3); -80.1; (s, TFA salt) ppm.

MS (EI): m/z (%) = 232 $[M + H]^+$.

H-Ile-Ala-Leu-OH (*S,S,S*)-34



A sample of *N*-Fmoc-Leu-Wang resin (loading : 0.8 mmol/g, 375 mg, 0.30 mmol, 1.0 equiv.) was placed in a dried 15 mL glass reaction vessel, stirred in a mixture of dry DCM (2 mL) and DMF (2 mL) for 40 min, and drained. The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and

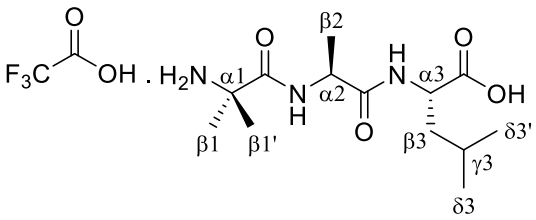
the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). To the resin were added a solution of *N*-Fmoc-Ala-OH (494 mg, 1.50 mmol, 5.0 equiv.), DIPEA (261 µl, 1.50 mmol, 5,0 equiv.) and HATU (570 mg, 1.50 mmol, 5.0 equiv.) in DMF (4 mL). The coupling reaction was stirred for 2 h at room temperature, after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The same procedure was repeted for the coupling of *N*-Fmoc-Ile-OH (615 mg, 1.50 mmol, 5.0 equiv.). The coupling reaction was stirred for 2 h. Fmoc group is then removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin is cleaved with a solution of TFA (95%) in dichloromethane for 3 hours. Purification by semi preparative HPLC (Water/Acetonitrile (TFA 0.1%) 70/30 to 0:100) afforded tripeptide **(*S*,*S*)-35** (90 mg, 0.29 mmol, 95%) as a white solid.

Aspect : White solid.

MS (EI) : *m/z* (%) = 429.43 $[M - H]^-$

Due to solubility problems it was not possible to perform a NMR experiments.

H-Aib-Ala-Leu-OH (*S*,*S*)-35



A sample of *N*-Fmoc-Leu-Wang resin (loading : 0.8 mmol/g, 375 mg, 0.30 mmol, 1.0 equiv.) was placed in a dried 15 mL glass reaction vessel, stirred in a mixture of dry DCM (2 mL) and DMF (2 mL) for 40 min, and drained. The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). To the resin were added a solution of *N*-Fmoc-Ala-OH (494 mg, 1.50 mmol, 5.0 equiv.), DIPEA (261 µl, 1.50 mmol, 5,0 equiv.) and HATU (570 mg, 1.50 mmol, 5.0 equiv.) in DMF (4 mL). The coupling reaction was stirred for 2 h at room temperature, after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The same procedure was repeted for the coupling of *N*-Fmoc-Aib-OH (488 mg, 1.50 mmoles, 5.0 equiv). The coupling reaction was stirred for 2 h. Fmoc group is then removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin is cleaved with a solution of TFA (95%) in dichloromethane for 3 hours. Purification by semi preparative HPLC (Acetonitrile (TFA 0.1%)/water (TFA 0.1%), 10 : 9 to 30 : 70) afforded tripeptide **(*S*,*S*)-35** (15 mg, 54 µmol, 18%) as a white solid.

Aspect : white solid.

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 4.39 (m, 2 H); 1.76-1.66 (m, 1 H); 1.64-1.58 (m, 8 H); 1.39 (d, 3 H, *J*= 7 Hz); 0.95 (d, 3 H, *J*= 6.4 Hz); 0.90 (d, 3 H, *J*= 6.4 Hz) ppm.

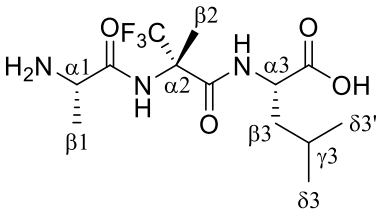
^{13}C NMR (CD_3OD): δ 17.7; 21.8; 23.3; 24.0; 24.6; 25.9; 41.6; 50.8; 52.1; 58.1; 118.0 (q, J_1C-F= 295 Hz; TFA); 163.5 (q, J_2C-F= 31 Hz, TFA); 173.0; 174.9; 176.0 ppm.

^{19}F NMR (CD_3OD): d ppm -80.0 (TFA salt)

lc/ms: m/z= 288.2 ($[M+H]^+$)

HRMS: m/z= 288.1919 ($[M+H]^+$); calcd: 288.1923

H-Ala-(*S*)-α-Tfm-Ala-Leu-OH (*S,S,S*)-36



Pd/C (120 mg) was added to a solution of *N*-Cbz-Ala-(*S*)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn **(*S,S,S*)-37** (115 mg, 0.20 mmol, 1,0 equiv.) in methanol (8 mL) under a nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred under a hydrogen atmosphere (5 bars) for 18 h. The catalyst was separated by filtration through a celite pad. The crude product was purified by semi-preparative HPLC to afford the pure tripeptide **(*S,S,S*)-38** (23 mg, 0.67 mmol, 33%) as a white solid.

Aspect : white solid.

^{1}H NMR (CD_3OD): δ 0.92 (m, 6H, Hδ3 + Hδ3'); 1.54 (d, 3H, *J*= 6 Hz, Hβ1); 1.71-1.59 (m, 3H, Hβ3 + Hγ3); 1.76 (s, 3H, Hβ2); 3.99 (m, 1H, Hα1 or Hα3); 4.49 (m, 1H, Hα1 or Hα3) ppm.

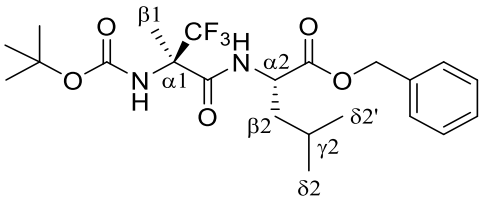
^{13}C NMR (CD_3OD): δ 17.4; 18.3; 21.8; 23.3. 25.8; 41.6; 50.3; 52.5; 63.9 (q, J_2C-F= 26 Hz); 117.5 (q, J_1C-F= 296 Hz; TFA); 125.8 (q, J_1C-F= 285 Hz); 162.5 (q, J_2C-F= 28 Hz, TFA); 167.4; 170.7; 175.4 ppm.

^{19}F NMR (CD_3OD): δ -79.7 (s, 3 F, CF_3); -80.1; (s, TFA salt) ppm.

lc/ms: m/z= 342.2 ($[M+H]^+$)

HRMS: m/z= 342.1649 ($[M+H]^+$); calcd: 342.1654

***N*-Boc-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn (*R,S*)-37**



To a solution of *N*-Boc-(*R*)-α-TfmAla-OH **(*R*)-9** (300 mg, 1.17 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (10 mL) were added successively HOBt (205 mg, 1.52 mmol, 1.3 equiv.), EDCI (291 mg, 1.52 mmol, 1.3 equiv.), OTs. Leu-OBn (460 mg, 1.17 mmol, 1.0 equiv.) and DIPEA (0.8 mL, 4.67 mmol, 4 equiv.) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture was diluted with water (10 mL) and extracted with AcOEt (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 90:10 to 70:30) to afford the pure dipeptide *N*-Boc-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn **(*R,S*)-37** (328 mg, 0,71 mmol, 61%) as a white solid.

Aspect : White solid.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ 0.89 (d, ^{3}J = 6.0 Hz, 3 H, H δ2'); 0.92 (d, ^{3}J = 6.0 Hz, 3 H, Hδ2); 1.41 (s, 9 H, H Boc); 1.55-1.68 (m, 3 H, H β2 et Hγ2); 1.73 (s, 3 H, hβ1); 4.69 (m, 1 H, Hα2); 5.14 (s, 2 H, Hbzl); 5.54 (s, 1 H, NH); 6.92 (s, 1 H, NH); 7.26-7.35 (m, 5 H, Har) ppm.

^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100.5 MHz) : δ 18.2 (Cβ1) ; 22.2 (Cδ2); 23.0 (Cδ2'); 24.9 (Cγ2); 28.3 (C$\underline{H_3}$*Boc*); 41.8 (Cβ2); 51.5 (Cα2); 62.9 (q, *J* = 26.8 Hz, Cα1); 67.4 (Cbzl); 81.8 (CqBoc); 124.7 (q, *J* = 285.6 Hz, CF$_3$), 128.5-128.8 (Car); 135.5 (CqBzl); 153.9 (COBoc); 166.1 (CObzl); 172.6 (CONH) ppm.

^{19}F RMN (CDCl$_3$, 376.2 MHz) : δ -79.1 (s, 3F, CF$_3$) ppm.

IR(neat/cm^{-1}) : 3248, 2898, 1750, 1747, 1690.

PF : 65.3-66.2 °C

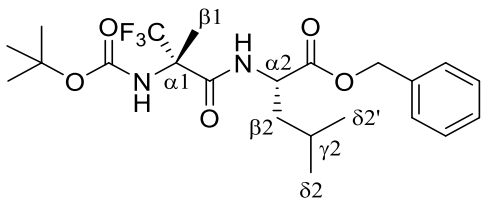
[α]$_D$: + 9.5 (*c* = 1.0, CHCl$_3$)

MS (EI) : *m/z* (%) = 483.2 [M + Na]$^+$

HRMS (EI) : $C_{22}H_{31}F_3N_2O_5$ +Na$^+$: 483.2083; found 4 483.2083.

Anal. Calc. : %C : 57.38; %H : 6.79; %N : 6.08. Found : %C : 57.55; %H : 6.92; %N : 5.86.

***N*-Boc-(*S*)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn (*S*,*S*)-37**



To a solution of *N*-Boc-(*S*)-α-Tfm-Ala-OH **(*S*)-9** (299 mg, 1.16 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (10 mL) were added HOBt (205 mg, 1.51 mmol, 1.3 equiv.), EDCI (290 mg, 1.51 mmol, 1.3 equiv.), OTs. Leu-OBn (455 mg, 1.17 mmol, 1.0 equiv.) and DIPEA (0.8 mL, 4.65 mmol, 4 equiv.) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture was diluted with water (10 mL) and extracted with AcOEt (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO$_4$ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 90:10 to 70:30) to afford the pure dipeptide *N*-Boc-(*S*)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn **(*S*,*S*)-37** (301 mg, 0,65 mmol, 56%) as a white solid.

Aspect : White solid.

^{1}H RMN (CDCl$_3$, 400 MHz) : δ 0.89 (d, ^3J = 6.0 Hz, 3 H, H δ2'); 0.91 (d, ^3J = 6.0 Hz, 3 H, Hδ2); 1.43 (s, 9 H, H Boc); 1.54-1.68 (m, 3 H, H β2 et Hγ2); 1.76 (s, 3 H, hβ1); 4.70 (m, 1 H, Hα2); 5.15 (s, 2 H, Hbzl); 5.33(s, 1 H, NH); 6.80 (s, 1 H, NH); 7.31-7.39 (m, 5 H, Har) ppm.

^{13}C RMN (CDCl$_3$, 100.5 MHz) : δ 18.0 (Cβ1) ; 22.1 (Cδ2); 23.1 (Cδ2'); 24.9 (Cγ2); 28.4 (C$\underline{H_3}$*Boc*); 41.9 (Cβ2); 51.6 (Cα2); 62.9 (q, *J* = 26.8 Hz, Cα1); 67.5 (C bzl); 81.7 (Cq Boc); 124.7 (q, *J* = 285.6 Hz, CF$_3$), 128.6-128.9 (Car); 135.5 (CqBzl); 153.9 (COBoc); 166.1 (CObzl); 172.6 (CONH) ppm.

^{19}F RMN (CDCl$_3$, 376.2 MHz) : δ -79.3 (s, 3F, CF$_3$) ppm.

IR(neat/cm^{-1}) : 3310, 2955, 1710, 1685, 1515, 1150.

PF : 68.6-69.1 °C

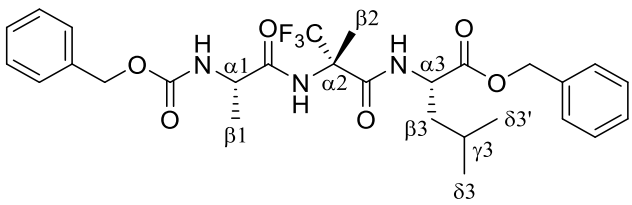
[α]$_D$: - 2.9 (*c* = 1.0, CHCl$_3$)

MS (EI) : *m/z* (%) = 483.2 [M + Na]$^+$

HRMS (EI) : $C_{22}H_{31}F_3N_2O_5$ +Na+ : 483.2083; found 483.2086.

Anal. Calc. : %C : 57.38; %H : 6.79; %N : 6.08. Found : %C : 57.32; %H : 6.88; %N : 5.99.

N-Cbz-Ala-(S)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn (S,S,S)-38



Peptide **(S,S)-37** (256 mg, 0.56 mmol, 1.0 equiv.) was poured into a 4 M AcOEt solution of HCl (5 mL) and the resulting solution was stirred for 2 h at room temperature and the mixture was then evaporated under vacuum to the afford crude deprotected peptide HCl . H-(*S*)-Tfm-Ala-Leu-OBn (220 mg, 0.56 mmol, 1.0 equiv.) which was used without purification. To a solution of *N*-Cbz-Ala-OH (150 mg, 0.67 mmol, 1.2 equiv.) in THF (5 mL) at -20 °C were added *N*-methylmorpholine (7 µL, 0.67 mmol, 1.2 equiv.) and isobutylchloroformiate (9 µL, 0.67 mmol, 1.2 equiv.). The activation mixture was stirred for 30 min at -20 °C and was then added a THF solution (5 mL) of crude deprotected dipeptide HCl . H-(*S*)-Tfm-Ala-Leu-OBn (220 mg, 0.56 mmol, 1.0 equiv.) and *N*-methylmorpholine (7 µL, 0.67 mmol, 1.2 equiv.). The reaction mixture was stirred at -20 °C for 30 min and at room temperature for 16 h and was then evaporated under reduce pressure. The crude product was diluted in AcOEt (10 mL) and extracted with water (10 mL). The aqueous layer was extracted with AcOEt (3 x 15 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (Cyclohexane/AcOEt, 90:10 to 70:30) to afford the pure tripeptide *N*-Cbz-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Leu-OBn **(S,S,S)-38** (227 mg, 0,40 mmol, 60%) as a white solid.

Aspect : white solid.

^{1}H NMR (CDCl$_3$, 400 MHz) : δ 0.90 (d, ^3J = 6.0 Hz, 3 H, H δ3'); 0.90 (d, ^3J = 6.0 Hz, 3 H, Hδ3); 1.38 (d, ^3J = 7.3 Hz, 3 H, Hβ1); 1.57-1.69 (m, 3 H, H β3 et Hγ3); 1.78 (s, 3 H, Hβ2); 4.16 (m, 1 H, Hα3); 4.66 (m, 1 H, Hα1); 5.12-5.22 (m, 4 H, Hbzl); 6,94 (s, 1 H, NH); 7.05 (s, 1 H, NH); 7.31-7.53 (m, 10 H, Har) ppm.

^{13}C NMR (CDCl$_3$, 100.5 MHz) : δ 17.5 (Cβ2) ; 17.7(Cβ1); 22.1(Cδ3); 23.1 (Cδ3'); 25.0 (Cγ3); 41.5 (Cβ3); 51.7 (Cα3); 51.9(Cα1); 63.2 (q, *J* = 26.8 Hz, Cα2); 67.5 (Cbzl); 67.8(Cbzl); 124.7 (q, *J* = 285.6 Hz, CF_3), 128.5-129.0 (Car); 135.6 (CqBzl); 136.1(CqBzl); 165.5 (CObzl); 171.7 (CO); 172.4 (CO) ppm.

^{19}F NMR (CDCl$_3$, 376.2 MHz) : δ -79.0 (s, 3F, CF_3) ppm.

IR(neat/cm^{-1}) : 3350, 3100, 2950, 1730, 1695, 1620, 1535.

PF : 145.2-146.7 °C

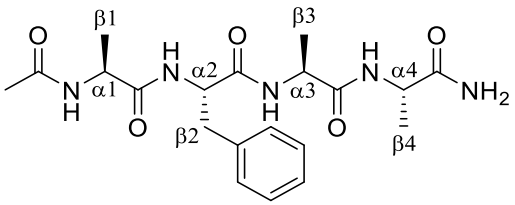
[α]$_D$: - 14.9 (*c* = 1.0, $CHCl_3$)

MS (EI) : *m/z* (%) = 588.2 $[M + Na]^+$

HRMS (EI) : $C_{28}H_{34}F_3N_3O_6$ $+Na^+$: 588.2297; found 588.2305.

Anal. Calc. (+H_2O): %C : 57.63; %H : 6.22; %N : 7.20. Found (+H_2O): %C : 58.02; %H : 6.02; %N : 7.41.

Ac-Ala-Phe-Ala-Ala-NH$_2$ (*S,S,S,S*)-39



A sample of *N*-Fmoc-Rink-amide resin (400 mg, 0.26 mmol, 1.0 equiv.) was placed in a dried 15 mL glass reaction vessel, stirred in a mixture of dry DCM (4 mL) and DMF (4 mL) for 30 min, and drained. The Fmoc group was removed with 10 ml of 20% piperidine in DMF (3 x 10 min) and the resin was washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min). To the resin were added a solution of Fmoc-Ala-OH (422 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.), DIPEA (223 µl, 1.28 mmol, 5.0 equiv.) and HATU (487 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.) in DMF (8 mL). The coupling reaction was shaken for 2 h at room temperature, after which the resin was washed with 5 mL of DMF (3 x 2 min) and 5 mL of DCM (3 x 2 min). The same procedure was repeted for the coupling of Fmoc-Ala-OH (422 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.), Fmoc-Phe-OH (500 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.) and Fmoc-Ala-OH (422 mg, 1.28 mmol, 5.0 equiv.).

N–α Acetylation : A 10 ml solution of acetic anhydride/pyridine/DMF (1:2:3) was transferred to the peptidyl resin and was reacted at room temperature (2 x 60 min). The resin was drained, washed with DMF (3 x 1 min) and DCM (3 x 1 min).

Cleavage from the Resin : A total of 6 ml of TFA/TIS/water/EDT (94:1:2.5:2.5) was added to the acetylated peptidyl resin (0.26 mmol) and shaked at room temperature for 3 h. The resin was then removed by filtration and washed twice with 100% TFA.

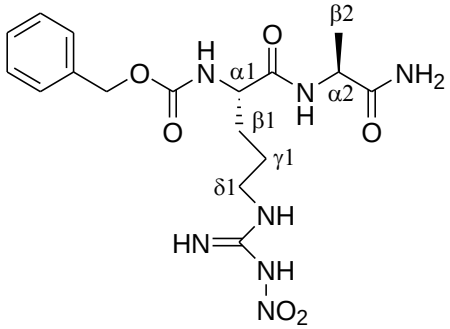
The filtrate was evaporated under vacuum and purified by semi-preparative HPLC (water/acetonitrile 90/10 to 70/30) to afford the desired tripeptide Ac-Ala-Phe-Ala-Ala-NH$_2$ **(*S,S,S,S*)-39** (15 mg, 39 µmol, 15%) as a white hygroscopic solid.

Aspect : white solid.

MS (EI) : *m/z* (%) = 442.2 [M + H + CH_3CN]$^+$

HRMS (EI) : $C_{20}H_{29}N_5O_5$ + H^+ : 420.2247; found 420.2238

N-Cbz-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 (S,S)-40



To a solution of N-Cbz-Arg(NO_2)-OH (750 mg, 2.1 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (10 mL) were successively added HOBt (353 mg, 2.5 mmol, 1,2 equiv.), $NaHCO_3$ (714 mg, 8.5 mmol, 4 equiv.) EDCI (489 mg, 2.5 mmol, 1,2 equiv.) and HCl . H-Ala-NH_2 (316 mg, 2.5 mmol, 1,2 equiv.). The reaction mixture was stirred for 12 h at room temperature and then diluted with water (10 mL). The crude mixture was extracted with AcOEt (3 x 20 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH 90/10) to afford N-Cbz-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 **(S,S)-40** (870 mg, 2,05 mmol, 97%) as a white solid.

Aspect : White solid.

^{1}H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 1.37 (d, ^3J = 6.9 Hz, 3 H, Hβ2); 1.68 (m, 2 H, Hγ1); 1.84 (m, 2 H, Hβ1); 3.25 (t, ^3J = 6.4 Hz, 2 H, Hδ1); 4.15 (t, ^3J = 4,6 Hz, 1 H, Hα1); 4.35 (q, ^3J = 6.9 Hz, 1 H, Hα2); 5.08 (d, ^3J = 5.5 Hz, 1 H, Hbzl); 7.28-7.39 (m, 5H, Haro) ppm.

^{13}C NMR (MeOD, 100.5 MHz) : δ 19.1 (Cβ2) ; 26.9 (Cγ1); 31.3 (Cβ1); 42.6 (Cδ1); 51.0 (Cα2); 56.8 (Cα1); 68.7 (Cbn); 130.4; 129.8; 130.0; 130,4 (Car); 139.0 (Car); 159.5, 161.9, 175.1, 178.4 (CO, CNH) ppm.

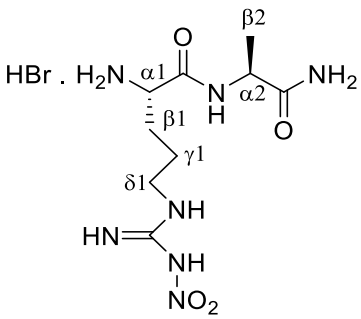
IR(neat/cm^{-1}) : 3212, 1643, 1602, 1542.

PF : 168°C.

MS (EI) : *m/z* (%) = 424.2 $[M + H]^+$

HRMS (EI) : $C_{17}H_{25}N_7O_6$ + H : 424.1945; found 424.1950.

HBr . H-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 (S,S)-41



Dipeptide Cbz-L-Arg(NO_2)-L-Ala-NH_2 **(S,S)-40** (810 mg, 1.9 mmol, 1.0 equiv.) was poured into a solution of HBr 33% in acetic acid (9 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was then evaporated under vacuum to give the deprotected dipeptide HBr . Arg(NO_2)-Ala-

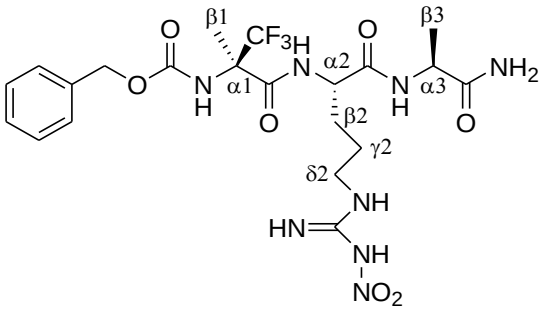
NH_2 **(*S,S*)-41** (879 mg, quantitative) as an hygroscopic brown solid. This product was used without purification.

Aspect : Hygroscopic brown solid.

^{1}H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 1.42 (d, ^3J = 7.3 Hz, 3 H, Hβ2); 1.76 (m, 2 H, Hγ1); 1.95 (m, 2 H, Hβ1); 3.34 (m, 2 H, Hδ1); 4.01 (t, ^3J = 6.0 Hz, 1 H, Hα1); 4.40 (q, ^3J = 7.3 Hz, 1 H, Hα2) ppm.

^{13}C NMR (MeOD, 100.5 MHz) : δ 19.0 (Cβ2) ; 25.1 (Cγ1); 30.3 (Cβ1); 43.4 (Cδ1); 51.3 (Cα2); 54.5 (Cα1); 170.5, 175.0, 178.2 (CO, CNH) ppm.

***N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 (*R,S,S*)-42**



To a solution of *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-8** (125 mg, 0.43 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (10 mL), were added HOBt (70 mg, 0.52 mmol, 1.2 equiv.) and EDCI (100 mg, 0.52 mmol, 1.2 equiv.) The resulting suspension was stirred at room temperature until complete dissolution of the reactants (10 min). $NaHCO_3$ (216 mg, 2.58 mmol, 6 equiv.) and a solution of dipeptide **(*S,S*)-41** (1,8 eq.) and $NaHCO_3$ (108 mg, 1.29 mmol, 3 équiv.) in DFM (5 mL) were finally added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h and then diluted in water (20 mL). The diluted mixture was extracted with AcOEt (3 x 20 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH, 95:5 to 90:10) to afford tripeptide **(*R,S,S*)-42** (200 mg, 0.36 mmol, 83%) as a white solid.

Aspect : White Solid

^{1}H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 1.43 (d, ^3J = 6.9 Hz, 3 H, Hβ3); 1.69 (s, 3 H, Hβ1); 1.79 (m, 2 H, Hγ2); 1.99 (m, 2 H, Hβ2); 3.26 (t, ^3J = 6.9 Hz, 2 H, Hδ2); 4.34 (m, 2 H, Hα2 et Hα3); 4.99 (s, 2 H, HBzl); 7.32-7.42 (m, 5 H, Haro) ppm.

^{13}C NMR (MeOD, 100.5 MHz) : δ 18.8 (Cβ3) ; 19.8 (Cβ1); 26.9 (Cγ2) ; 29.9 (Cβ2) ; 42.5 (Cδ2); 51.3 (Cα2); 56.3 (Cα3); 64.7 (q, *J* = 27.8 Hz, Cα1); 69.2 (CBzl); 126.7 (q, *J* = 285.6 Hz, CF_3); 129.7-130,4 (Car); 138.3 (Car); 158.3, 161.7, 170.2, 174.2, 178.6 (CO, CNH) ppm.

^{19}F NMR (MeOD, 376.2 MHz) : δ -79.7 (s, 3 F, CF_3) ppm.

IR(neat/cm^{-1}) : 3422, 3312, 2982, 3290, 1657, 1652, 1532, 1409, 1255.

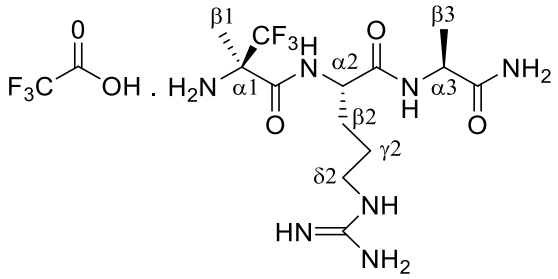
PF : 119°C.

[α]$_D$: - 18.8 (*c* = 0.7, MeOH)

MS (EI) : *m/z* (%) = 563.2 $[M + H]^+$

HRMS (EI) : $C_{21}H_{29}F_3N_8O_7$ +H : 563.2190; found 563.2174

H-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg-Ala-NH$_2$ (*R,S,S*)-43



Pd/C (120 mg) was added to a solution of *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Arg(NO$_2$)-Ala-NH$_2$ **(*R,S,S*)-42** (115 mg, 0.20 mmol, 1,0 equiv.) in methanol (8 mL) under a nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred under a hydrogen atmosphere (5 bars) for 18 h. The catalyst was separated by filtration through a celite pad. The crude product was purified by semi-preparative HPLC to afford the pure tripeptide **(*S,S,S*)-38** (23 mg, 0.67 mmol, 33%) as a white solid.

Aspect : White Solid

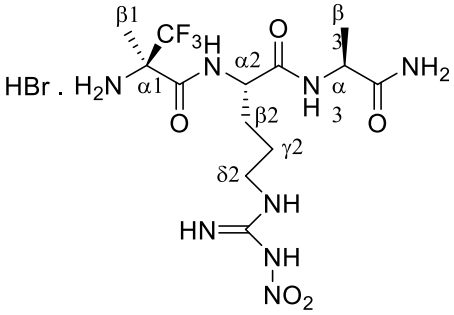
^{1}H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 1.22 (m, 3 H, Hβ3); 1.49 (m, 2 H, Hγ2); 1.67 (m, 5 H, Hβ1 et β2), 3.05 (m, 2 H, Hδ2); 4.11 (t, ^3J = 8.7 Hz, 1 H, Hα2); 4.23 (q, ^3J = 7.8 Hz, 1 H, Hα3) ppm.

^{13}C NMR (MeOD, 100.5 MHz) : δ 18.8 (Cβ3) ; 19.8 (Cβ1); 26.9 (Cγ2) ; 29.9 (Cβ2) ; 42.5 (Cδ2); 51.3 (Cα2); 56.3 (Cα3); 64.7 (q, *J* = 27.8 Hz, Cα1); 69.2 (CBzl); 126.7 (q, *J* = 285.6 Hz, CF$_3$); 129.7-130,4 (Car); 138.3 (Car); 158.3, 161.7, 170.2, 174.2, 178.6 (CO, CNH) ppm.

^{19}F NMR (MeOD, 376.2 MHz) : δ -78.9 (s, 3 F, CF$_3$); -79.8 (s, TFA) ppm.

MS (EI) : *m/z* (%) = 384.5 [M + H]$^+$

HBr . H-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg(NO$_2$)-Ala-NH$_2$ (*R,S,S*)-44



Tripeptide *N*-Cbz-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg(NO$_2$)-Ala-NH$_2$ **(*R,S,S*)-42** (340 mg, 0.6 mmol, 1.0 equiv.) was poured into a solution of HBr 33% in acetic acid (15 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was then evaporated under vacuum to give the deprotected tripeptide HBr . H-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg(NO$_2$)-Ala-NH$_2$ **(*R,S,S*)-44** (360 mg, quantitative) as an hygroscopic brown solid. This product was used without purification.

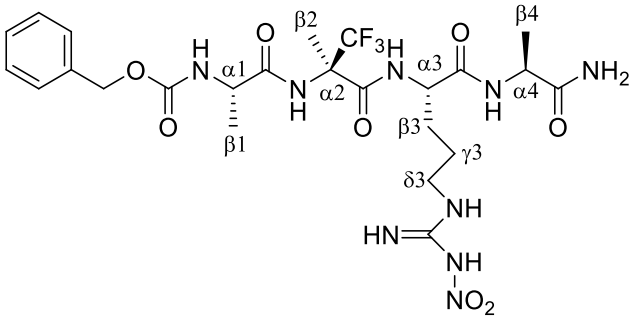
Aspect : Hygroscopic brown solid.

^{1}H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 1.40 (d, ^{3}J = 7.3 Hz, 3 H, Hβ3), 1.71 (m, 2 H, γ2), 1.93 (s, 3 H, Hβ1), 2.03 (m, 2 H, Hβ2), 3.32 (m, 2 H, δ2), 4.37 (m, 2 H, α2 and α3) ppm.

^{13}C NMR (MeOD, 100.5 MHz) : δ 17.8 (Cβ1), 18.9 (Cβ3), 26.2 (Cγ2), 30.2 (β2), 43.8 (Cδ2), 51.2 (Cα3), 55.9 (Cα2), 63.9 (q, J = 27.8 Hz, Cα1), 125.0 (q, J = 285.6 Hz, CF_3), 154.6, 164.9, 173.2, 178.9 (CO, CNH) ppm.

^{19}F NMR (MeOD, 376.2 MHz) : δ -80.6 (s, 3 F, CF_3) ppm.

N-Cbz-Ala-(R)-α-Tfm-Ala-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 (S,R,S,S)-45



To a solution of N-Cbz-Ala-OH (50 mg, 0.22 mmol, 1.0 equiv.) in AcOEt (5 mL) at -20 °C was added N-methylmorpholine (30 µL, 0.27 mmol, 1.2 equiv.) and isobutylchloroformiate (35 µL, 0.27 mmol, 1.2 equiv.). The activation mixture was stirred for 30 min at -20 °C and was then added a AcOEt solution (5 mL) of tripeptide **(R,S,S)-44** (160 mg, 0.27 mmol, 1.2 equiv.) and DIPEA (78 µL, 0.45 mmol, 2 equiv.). The resulting mixture was stirred 1 h at -20 °C and 16 h at room temperature. The crude product was purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH, 95:5 to 90:10) to afford the tetrapeptide N-Cbz-Ala-(R)-α-Tfm-Ala-Arg(NO_2)-Ala-NH_2 **(S,R,S,S)-45** (72 mg, 0,11 mmol, 52%) as a white solid.

Aspect : White solid.

^{1}H NMR (MeOD, 400 MHz) : δ 1.39 (d, ^{3}J = 6.9 Hz, 3 H, Hβ1), 1.43 (d, ^{3}J = 6.9 Hz, 3 H, Hβ4), 1.71 (s, 3 H, Hβ2), 1.57-1.82 (m, 2 H, Hγ3), 1.89-2.01 (m, 2 H, Hβ3), 3.20 (m, 2 H, Hδ3), 4.16 (t, ^{3}J = 7.3 Hz, 1 H, α3), 4.34 (m, 2 H, α1 et α4), 5.13 (s, 2 H, Hbzl), 7.27-7.45 (m, 5 H, Haro) ppm.

^{13}C NMR (MeOD, 100.5 MHz) : δ 18.1 (Cβ1), 19.0 (Cβ4), 20.0 (Cβ2), 26.8 (Cγ3), 30.3 (Cβ3), 42.5 (Cδ3), 51.2 (Cα1); 53.3 (Cα4); 55.8 (Cα3); 64.4 (q, J = 25.9 Hz, Cα2), 68.7 (CH_2bzl), 126.8 (q, J = 285.6 Hz, CF_3); 129.5-130.4 (Car); 138.8 (Car); 159.6, 161.7, 169.8, 174.2, 176.9, 178.5 (CO, CNH) ppm.

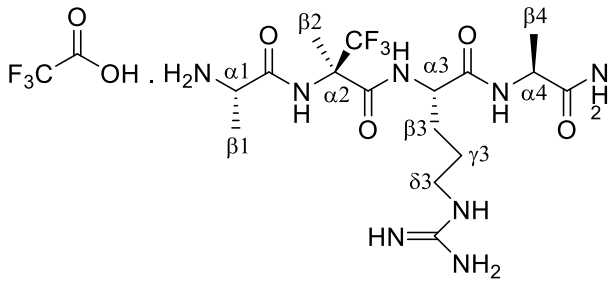
^{19}F NMR (MeOD, 376.2 MHz) : δ -79.0 (s, 3 F, CF_3) ppm.

$[\alpha]_D$: - 12.3 (c = 6.0, MeOH)

PF : 124 °C.

IR(neat/cm^{-1}) : 3300, 1658, 1542, 1449.

H-Ala-(*R*)-α-Tfm-Ala-Arg-Ala-NH$_2$ (*S,R,S,S*)-46



Pd/C (120 mg) was added to a solution of *N*-Cbz-Ala-(*R*)-α-Tfm-Arg(NO$_2$)-Ala-NH$_2$ **(*S,R,S,S*)-45** (115 mg, 0.20 mmol, 1,0 equiv.) in methanol (8 mL) under a nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred under a hydrogen atmosphere (5 bars) for 18 h. The catalyst was separated by filtration through a celite pad. The crude product was purified by semi-preparative HPLC to afford the pure tripeptide **(*S,S,S*)-38** (23 mg, 0.67 mmol, 33%) as a white solid.

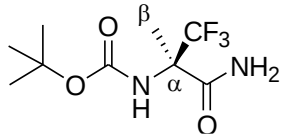
^{1}H NMR (D$_2$O, 400 MHz) : δ 1.22 (d, ^3J = 7.3 Hz, Hβ1); 1.36 (d, ^3J = 7.3 Hz, 3 H, Hβ4); 1.53 (s, 3 H, Hβ2); 1.64 (m, 4 H, Hβ3 and Hγ3); 3.00 (m, 2 H, δ3), 3.94 (d, ^3J = 7.3 Hz, Hα1); 4.11 (m, 2 H, α2 and α3) ppm.

^{13}C NMR (D$_2$O, 100.5 MHz) : δ 16.3 (Cβ4); 16.7 (Cβ1); 18.1 (Cβ2); 24.3 (Cγ3); 27.4 (β3); 40.4 (Cδ3); 49.0 (Cα1); 49.5 (Cα4); 53.7 (Cα3); 62.2 (q, *J* = 28.8 Hz, Cα2), 116.3 (q, *J* = 291.2 Hz, CF$_3$), 156.8, 168.0; 170.7; 172.7; 177.6 (CO, CNH) ppm.

^{19}F NMR (D$_2$O, 376.2 MHz) : δ -76.8 (s, 3 F, CF$_3$); -81.1 (s, TFA) ppm.

MS (EI) : *m/z* (%) = 455.5 [M + H]$^+$

***N*-Boc-(*R*)-α-Tfm-Ala-NH$_2$ (*R*)-47**



To a solution of *N*-Boc-(*R*)-α-Tfm-Ala-OH **(*R*)-9** (1.130 g, 4.4 mmol, 1.0 equiv.) in DCM (25 mL) were added EDCI (1.011 g, 5.3 mmol, 1.2 equiv.) and HOBt (729 mg, 5.3 mmol, 1.2 equiv.). After 10 min. at room temperature, NH$_3$ g was bubbled within the solution during 30 min at 0 °C. The reaction mixture was then allowed to warm to room temperature and stirred for another 1 h. The crude mixture was evaporated under vacuum and diluted with water (25 mL) and the aqueous mixture was extracted with AcOEt (3 x 25 mL). The combined organic layers were evaporated under vaccum and the resulting crude product was purified by silica gel chromatography (AcOEt, 100%) to afford *N*-Boc-(*R*)-α-Tfm-Ala-NH$_2$ **(*R*)-47** (1.114 g, 4.4 mmol, 99%) as a white solid.

Aspect : White solid.

^{1}H NMR (CD$_3$OD, 400 MHz) : δ 1.47 (s, 9 H, HBoc); 1.68 (s, 3 H, Hβ) ppm.

^{13}C NMR (CD$_3$OD, 100.5 MHz) : δ 19.9 (Cβ) ; 29.4 (CBoc); 64.1 (q, *J* = 26.8 Hz, Cα); 82.3 (CqBoc); 127.0 (q, *J* = 284.7 Hz, CF$_3$); 156.6 (COBoc); 172.5 (CONH$_2$) ppm.

^{19}F NMR (CD_3OD, 376.2 MHz) : δ -79.9 (s, 3 F, CF_3) ppm.

IR(neat/cm^{-1}) : 3422, 3312, 2982, 1733, 1721, 1694, 1674.

PF : 152 °C.

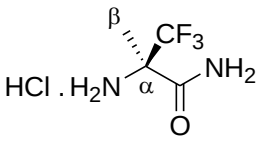
[α]$_D$: + 12.7 (*c* = 0.9, MeOH)

MS (EI) : *m/z* (%) = 279.1 [M + Na]$^+$

HRMS (EI) : $C_9H_{15}F_3N_2O_3$ + Na+ : 279.0932; found 279.0938.

Anal. Calc. : %C : 42.19; %H : 5.90; %N : 10.93. Found : %C : 42.50; %H : 5.91; %N : 10.56.

HCl . H-(*R*)-α-Tfm-Ala-NH$_2$ (*R*)-48



N-Boc-(*R*)-Tfm-Ala-NH$_2$ **(*R*)-47** (1.200 g, 4.7 mmol, 1.0 equiv.) was poured into a 4 N solution of HCl in AcOEt (55 mL) and the reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature. The crude mixture was then evaporated under vacuum to give HCl .H-(*R*)-α-Tfm-Ala-NH$_2$ **(*R*)-48** (651 mg, 4,2 mmol, 89%) as a white crystalline solid.

Aspect : White crystalline solid.

^{1}H RMN (D_2O, 400 MHz) : δ 1.70 (s, 3 H, Hβ) ppm.

^{13}C RMN (D_2O, 100.5 MHz) : δ 16.1 (Cβ); 62.0 (q, *J* = 30.7 Hz, Cα); 122.8 (q, *J* = 283.7 Hz, CF_3); 166.0 ($CONH_2$) ppm.

^{19}F RMN (D_2O, 376.2 MHz) : δ -79.8 (s, 3 F, CF_3) ppm.

IR(neat/cm^{-1}) : 3401, 3278, 3211, 2867, 1732.

PF : decomposition from 164 °C.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. *Chem. Biol. Drug Des*. **2013**, *81*, 136-147.
(2) Kauzmann, W. Adv. *Protein Chem*. **1959**, *14*, 1-63.
(3) Tanford, C. *J. Phys. Chem*. **1962**, *84*, 4240-4247.
(4) Dill, K. A. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7133-7155.
(5) Honig, B.; Yang, A.-S. *Adv. Protein Chem*. **1995**, *46*, 27-58.
(6) Lebouvier, N.; Laroche, C.; Huguenot, F.; Brigaud, T. *Tetrahedron Lett*. **2002**, *43*, 2824-2830.
(7) imon, J.; Nguyen, T. T.; Chelain, E.; Lensen, N.; Pytkowicz, J.; Chaume, G.; Brigaud, T. Tetrahedron: Asymmetry **2011**, *22*, 309-314.
(8) Chaume, G.; Lensen, N.; Caupène, C.; Brigaud, T. *Eur. J. Org. Chem*. **2009**, 5717-5724.
(9) Koksch, B.; Sewald, N.; Hofmann, H.-J.; Burger, K.; Jakubke, H.-D. *J. Pept. Sci*. **1997**, *3*, 157-167.
(10) Purser, S.; Moore, P. R. ; Swallow, S.; Gouverneur, V.; *Chem. Soc. Rev*. **2008**, *37*, 320-330.
(11) Salwiczek, M.; Nyakatura, E. K.; Gerling, U. I. M.; Ye, S.; Koksch, B. *Chem. Soc. Rev*. **2012**, *41*, 2135-2171.
(12) O'Hagan, D., *Chem. Soc. Rev*. **2008**, *37*, 308-319.
(13) Uneyama, K. *Organofluorine chemistry*; Blackwell Publishing Ltd.; Oxford, 2006.
(14) Chambers, R. *Fluorine in organic chemistry*; Blackwell Publishing Ltd.; Oxford, 2004.
(15) Mikami, K.; Itoh, Y.; Yamanaka, M. *Chem. Rev*. **2004**, *104*, 1-16.
(16) Bégué, J.-P.; Bonnet-Delpon, D.; *Chimie bioorganique et médicinal du fluor*; CNRS Editions, Paris, 2005.
(17) Pauling, L.*; The Nature of the Chemical Bond and the Structure of Molecules and Crystals : An Introduction to Modern Structural Chemistry;* Cornell University Press; Ithaca, NY, **1939**.
(18) Wiberg, K. B.; Rablen, P. R. *J. Am. Chem. Soc*. **1993**, *115*, 614-625.
(19) Leroux, F. *ChemBioChem*. **2004**, *5*, 644-649.
(20) Muller, K.; Faeh, C.; Diederich, F. *Science* **2007**, *317*, 1881-1886.
(21) Wiberg, K. B.; Murcko, M. A.; Laidig, K. E.; MacDougall, P. J. *J. Phys. Chem*. **1990**, *94*, 6956-6969.
(22) Goodman, L.; Gu, H.; Pophristic, V., *J. Phys. Chem., A*. **2005**, *109*, 1223-1229.
(23) Schlosser, M. *Angew. Chem. Int. Ed*. **1998**, *110*, 1496-1513.
(24) Rowley, M.; Hallett, D. J.; Goodacre, S.; Moyes, C.; Crawforth, J.; Sparey, T. J.; Patel, S.; Marwood, R.; Patel, S.; Thomas, S.; Hitzel, L.; O'Connor, D.; Szeto, N.; Castro, J. L.; Hutson, P. H.; Macleod, A. M.; *J. Med. Chem*. **2001**, *44*, 1603-1614.
(25) Smart, B. E. *J. Fluorine Chem*. **2001**, *109*, 3-11.
(26) Huchet, Q. A.; Kuhn, B.; Wagner, B.; Fischer,H.; Kansy, M.; Zimmerli, D.; Carreira, E. M.; Müller, K. *J. Fluorine Chem.* **2013**, *152*, 119-128.
(27) Toniolo, C.; Benedetti, E. *Macromolecules* **1991**, *24*, 4004-4009.
(28) Tang, Y.; Ghirlanda, G.; Vaidehi, N.; Kua, J.; Mainz, D. T.; Goddard III, W. A.; DeGrado, W. F.; Tirrell, D. A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2790-2796.
(29) Son, S.; Tanrikulu, I. C.; Tirrell, D. A. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1251-1257.
(30) Bilgiçer, B.; Xing, X.; Kumar, K. *J. Am. Chem. Soc*. **2001**, *123*, 4393-4399.
(31) Bilgiçer, B.; Kumar, K. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4105.
(32) Zheng, H.; Gao, J.; *Angew. Chem. Int. Ed*. **2010**, *49*, 8635-8639.
(33) Marsden, H. R.; Fraaije, J. G. E. M.; Kros, A. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2010**, *49*, 8570-8572.
(34) Cole, P. A.; Sondhi, D.; Kim, K. *Pharmacol. Ther*. **1999**, *82*, 219-229.
(35) Kim, K.; Cole, P. A. *J. Am. Chem. Soc*. **1998**, *120*, 6851-6858.
(36) Thorson, J. S.; Chapman, E.; Murphy, E. C.; Schultz, P. G.; Judice, J. K. *J. Am. Chem. Soc*. **1995**, *117*, 1157-1158.
(37) Gottler, L. M.; de la Salud-Bea, R.; Marsh, E. N. G. *Biochemistry* **2008**, *47*, 4484-4490.
(38) Horng, J.-C.; Raleigh, D. P. *J. Am. Chem. Soc*. **2003**, *125*, 9286-9287.
(39) Chiu, H.-P.; Kokona, B.; Fairman, R.; Cheng, R. P. *J. Am. Chem. Soc*. **2009**, *131*, 13192-13193.
(40) Cho, J.; Sawaki, K.; Hanashima, S.; Yamaguchi, Y.; Shiro, M.; Saigo, K.; Ishida, Y. *ChemComm* **2014**, *50*, 9855-9858.
(41) Yaron, A.; Naider, F. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **1993**, *28*, 31-81.
(42) Vanhoof, G.; Goossens, F.; De Meester, I.; Hendriks, D.; Scharpe, S. *FASEB J*. **1995**, *9*, 736-744.
(43) DeRider, M. L.; Wilkens, S. J.; Waddell, M. J.; Bretscher, L. E.; Weinhold, F.; Raines, R. T.; Markley, J. L. *J. Am. Chem. Soc*. **2002**, *124*, 2497-2505.
(44) Shoulders, M. D.; Raines, R. T. *Annu. Rev. Biochem*. **2009**, *78*, 929-958.
(45) Bretscher, L. E.; Jenkins, C. L.; Taylor, K. M.; DeRider, M. L.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc*. **2001**, *123*, 777-778.
(46) Bella, J.; Eaton, M.; Brodsky, B.; Berman, H. M. *Science* **1994**, *266*, 75-81.
(47) Barth, D.; Milbradt, A. G.; Renner, C.; Moroder, L. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 79-86.
(48) Hortin, G.; Stern, A. M.; Miller, B.; Abeles, R. H.; Boime, I. *J. Biol. Chem*. **1983**, *258*, 4047-4050.

(49) Gorres, K. L.; Edupuganti, R.; Krow, G. R.; Raines, R. T. *Biochemistry* **2008**, *47*, 9447-9455.
(50) Golbik, R.; Yu, C.; Weyher-Stingl, E.; Huber, R.; Moroder, L.; Budisa, N.; Schiene-Fischer, C. *Biochemistry* **2005**, *44*, 16026-16034.
(51) Gottler, L. M.; Lee, H. Y.; Shelburne, C. E.; Ramamoorthy, A.; Marsh, E.N. G. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 370-373.
(52) Zheng, Y.-J.; Ornstein, R. L. *J. Am. Chem. Soc*. **1997**, *119*, 1523-1528.
(53) Yeh, H. J. C.; Kirk, K. L.; Cohen, L. A.; Cohen, J. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1975**, 928-934.
(54) Jackson, D. Y.; Burnier, J.; Quan, C.; Stanley, M.; Tom, J.; Wells, J. A. *Science* **1994**, *266*, 243-247.
(55) Ulrich, A. S. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc*. **2005**, *46*, 1-21.
(56) Grage, S. L.; Wang, J.; Cross, T. A.; Ulrich, A.S. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 3335–3336.
(57) Smith, S. O.; Aschheim, K.; Groesbeek, M. *Quart. Rev. Biophys*. **1996**, *29*, 395–449.
(58) Gilchrist Jr., M. L.; Monde, K.; Tomita, Y.; Iwashita, T.; Nakanishi, K.; McDermott, A.E. *J. Magn. Reson*. **2001**, *152*, 1–6.
(59) Jackson, J. C.; Hammill, J. T.; Mehl, R. A. *J. Am. Chem. Soc*. **2007**, *129*, 1160-1166.
(60) Feeney, J.; McCormick, J.E.; Bauer, C.J.; Birdsall, B.; Moody, C.M.; Starkmann, B.A.; Young, D. W.; Francis, P.; Havlin, R. H.; Arnold, W. D.; Oldfield, E. *J. Am. Chem. Soc*. **1996**, *118*, 8700-8706.
(61) Dalvit, C.; Ardini, E.; Flocco, M.; Fogliatto, G. P.; Mongelli, N.; Veronesi, M. Drug Discov. Today **2004**, *9*, 505-602.
(62) Dalvit, C.; Ardini, E.; Flocco, M.; Fogliatto, G. P.; Mongelli, N.; Veronesi, M. *J. Am. Chem. Soc*. **2003**, *125*, 14620-14625.
(63) Tarrago, T.; Frutos, S.; Rodriguez-Mias, R. A.; Giralt, E. *ChemBioChem*. **2006**, *7*, 827-833.
(64) Smits, R.; Cadicamo, C. D.; Burger, K.; Koksch, B. *Chem. Soc. Rev*. **2008**, *37*, 1727-1739.
(65) Koksch, B.; Dahl, C.; Radics, G.; Vocks, A.,; Arnold, K.; Arnhold, J.; Sieler, J.; Burger, K. *J. Pept. Sci*. **2004**, *10*, 67-81.
(66) Bégué, J.-P.; Bonnet-Delpon, D.; Crousse, B.; Legros, J. *Chem. Soc. Rev*. **2005**, *34*, 562-572.
(67) Xu, Y.; Dolbier Jr., W. R. *J. Org. Chem*. **2000**, *65*, 2134-2137.
(68) Weygand, F.; Steglich, W.; Oettmeier, W.; Maierhofer, A.; Loy, R. S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **1966**, *5*, 600-601.
(69) Huguenot, F.; Brigaud, T. *J. Org. Chem*. **2006**, *71*, 7075-7078.
(70) Wang, H.; Zhao, X.; Li, Y.; Lu, L.; *Org. Lett*. **2006**, *8*, 1379-1381.
(71) Aceña, J. L.; Sorochinsky, A. E.; Soloshonok, V. A. *Synthesis* **2012**, *44*, 1591-1602.
(72) Soloshonok, V. A.; Gerus, I. I.; Yagupolskii, Y. L. *Zh. Org. Khim*. **1986**, *22*, 1335-1337.
(73) Osipov, S. N.; Chkanikov, N. D.; Kolomiets, A. F.; Fokin, A. V. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim*. **1986**, 1384-1387.
(74) Ohkura, H.; Berbasov, D. O.; Soloshonok, V. A. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 1647-1656.
(75) Uneyama, K. *J. Fluorine Chem*. **1999**, *97*, 11-25.
(76) Watanabe, H.; Hashizume, Y.; Uneyama, K. Tetrahedron Lett. **1992**, *33*, 4333-4336.
(77) Burger, K.; Gaa, K. *Chem.–Ztg*. **1990**, *114*, 101-104.
(78) Moroni, M.; Koksch, B.; Osipov, S. N.; Crucianelli, M.; Frigerio, M.; Bravo P.; Burger, K. *J. Org. Chem*. **2001**, *66*, 130-133.
(79) Osipov, S. N.; Golubev, A. S.; Sewald, N.; Burger, K. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5965-5966.
(80) Bravo, P.; Capelli, S.; Meille, S. V.; Viani, F.; Zanda, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 2009-2018.
(81) Crucianelli, M.; Bravo, P.; Arnone, A.; Corradi, E.; Meille, S. V.; Zanda, M. *J. Org. Chem*. **2000**, *65*, 2965-2971.
(82) Bravo, P.; Soloshonok, V. A.; Viani, F.; Zanda, M. *Gazz. Chim. Ital*. **1995**, *125*, 149-150.
(83) Bravo, P.; Crucianelli, M.; Vergani, B.; Zanda, M. *Tetrahedron Lett*. **1998**, *39*, 7771-7774.
(84) Bravo, P.; Fustero, S.; Guidetti, M.; Volonterio, A.; Zanda, M. *J. Org. Chem*. **1999**, *64*, 8731-8735.
(85) Hoss, E.; Rudolph, M.; Seymour, L.; Schierlinger, C.; Burger, K. *J. Fluorine Chem*. **1993**, *61*, 163-170.
(86) Sewald, N.; Seymour, L. C.; Burger, K.; Osipov, S. N.; Kolomiets, A. F.; Fokin, A. V. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1051-1060.
(87) Guo, Y.; Fujiwara, K.; Uneyama, K. Org. *Lett*. **2006**, *8*, 827-829.
(88) El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev*. **2011**, *111*, 6557-6602.
(89) Prasad, K. V. S. R. G.; Barathi, K.; Haseena, B. B. *IJPSRR*, **2011**, *8*, 108-119.
(90) Joullié, M.; Lassen, K. *ARKIVOC*, **2010**, 189-250.
(91) Sheehan, J. C.; Boshart, G. L.; Cruickshank, P. A. *J. Org. Chem*. **1961**, *26*, 2525-2525.
(92) Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
(93) Marder, O.; Shvo, Y.; Albericio, F. *Chim. Oggi*. **2002**, *20*, 37-41.
(94) Coste, J.; Lenguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett*. **1990**, *31*, 205-208.
(95) Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. *Tetrahedron Lett*. **1997**, *38*, 4853-4856.
(96) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc*. **1955**, *77*, 1067-1068.

(97) Subiros-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Eur. J*. **2009**, *15*, 9394-9403.
(98) El-Faham, A.; Albericio, F. *Eur. J. Org. Chem*. **2009**, 1499-1501.
(99) Dourtoglou, V.; Ziegler, J. C.; Gross, B. *Tetrahedron Lett*. **1978**, 1269-1272.
(100) Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc*. **1993**, *115*, 4397-4398.
(101) Marder, O.; Shvo, Y.; Albericio, F. *Chim. Oggi*. **2002**, *20*, 37-41.
(102) Coste, J.; Lenguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett*. **1990**, *31*, 205-208.
(103) Fischer, E.; Otto, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1903**, *36*, 2106-2116.
(104) Kricheldorf, H. R.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **2006**, *45*, 5752-5784.
(105) Leuchs, H. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1906**, *39*, 857-861.
(106) Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Org. Chem*. **1972**, *37*, 3404-3409.
(107) Jedrzejczak, M.; Motie, R. E.; Satchell, D. P. N.; Satchell, R. S.; Wassef, W. N. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 1471-1479.
(108) Schierlinger, C.; Burger, K. Tetrahedron Lett. **1992**, *33*, 193-194.
(109) Dal Pozzo, A.; Muzi, L.; Moroni, M.; Rondanin, R.; de Castiglione, R.; Bravo, P.; Zanda, M. Tetrahedron **1998**, *54*, 6019-6028.
(110) Koksch, B.; Ullmann, D.; Jakubke, H.-D.; Burger, K. *J. Fluorine Chem*. **1996**, *80*, 53-57.
(111) Burger, K.; Mutze, K.; Hollweck, W.; Koksch, B. Tetrahedron **1998**, *54*, 5915-5928.
(112) Dal Pozzo, A.; Dikovskaya, K.; Moroni, M.; Fagnoni, M.; Vanini, L.; Bergonzi, R.; de Castiglione, R.; Bravo, P.; Zanda, M. *J. Chem. Res*. (S) **1999**, 468-469.
(113) Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E.; Yahya Sadat-Aalaee, Jr., S.; Tien, J.-H.; Langridge, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3732-3734.
(114) Carpino, L. A.; Sadat-Aalaee, D.; Chao, H. G.; DeSelms, R. H. *J. Am. Chem. Soc*. **1990**, *112*, 9651-9652.
(115) Sewald, N.; Hollweck, W.; Michel, T.; Burger, K. *Liebigs Ann. Chem*., **1997**, 2549-2551.
(116) Burger, K.; Mutze, K.; Hollweck, W.; Koksch, B. Tetrahedron **1998**, *54*, 5915-5928.
(117) Koksch, B.; Quaedflieg, P. J. L. M.; Michel, T.; Burger, K.; Broxterman, Q. B.; Schoemaker, H. E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1401-1407.
(118) Dal Pozzo, A.; Ni, M.; Muzi, L.; Caporale, A.; de Castiglione, R.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Formaggio, F. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6372-6375.
(119) Dal Pozzo, A.; Ni, M.; Muzi, L.; de Castiglione, R.; Mondelli, R.; Mazzini, S.; Penco, S.; Pisano, C.; Castorina, M.; Giannini, G. *J. Med. Chem*. **2006**, *49*, 1808-1818.
(120) Kantharaju Patil, B. S.; Babu, V.V. S. *Letters in Peptide Science* **2002**, 227-229**.**
(121) Jakobsen, M. H.; Buchardt, O.; Engdahl, T.; Holm, A. *Tetrahedron Lett*. **1991**, *32*, 6199-6202.
(122) Lai, M. Y. H.; Brimble, M. A.; Callis, D. J.; Harris, P. W. R.; Levi, M. S.; Sieg, F. *Bioorg. Med. Chem*. **2005**, *13*, 533-548.
(123) Ginisty, M.; Gravier-Pelletier, C. ; Le Merrer, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 142-150.
(124) Tantry, S. J.; Rao, R. V. R.; Babu, V. V. S. *Arkivoc*, **2006**, 21-30.
(125) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc*. **1963**, 85, 2149-2154.
(126) Schnolzer, M.; Alewood, P.; Jones, A.; Alewood, D.; Kent, S. B. *Int. J. Pept. Protein. Res*. **1992**, *40*, 180-193.
(127) Mitchell, A. R.; Kent, S.B.H.; Engelhard, M.; Merrifield, R.B. *J. Org. Chem*. **1978**, *43*, 2845-2852.
(128) Matsueda, G. R.; Stewart, J. M. *Peptides* **1981**, *2*, 45-50.
(129) Albericio, F. *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide, In Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide; CRC Press; Boca Raton*, 2000, p 848.
(130) Wang, S. S. *J. Am. Chem. Soc*. **1973**, *95*, 1328-1333.
(131) Adams, D. J., Butler, M. F., Frith, W. J., Kirkland, M., Mullen, L., Sanderson, P., *Soft Matter*, **2009**, *5*, 1856-1862.
(132) Nozaki, Y.; Tanford, C. *J. Biol. Chem*. **1971**, *246*, 2211-2217.
(133) Silva, M. F.; Chipre, L. F.; Raba, J.; Luco, J. M. *Chromatographia* **2001**, *53*, 392-400.
(134) Biswas, K. M.; DeVido, D. R.; Dorsey, J. G. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 637-655.
(135) Lawson, E. Q.; Sadler, A. J.; Harmatz, D.; Brandau, D. T.; Micanovic, R.; MacElroy, R. D.; Middaugh, C. R. *J. Biol. Chem*. **1984**, *259*, 2910-2912.
(136) Jones, D. D. *J. Theor. Biol*. **1975**, *50*, 167-183.
(137) Fauchere, J. L.; Pliska, V. *Eur. J. Med. Chem*. **1983**, *18*, 369-375.
(138) Hodges, R. S.; Zhu, B.-Y.; Zhou, N. E.; Mant, C. T. *J. Chromatogr. A* **1994**, 676, 3-15.
(139) Meek, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **1980**, *77*, 1632-1636.
(140) Samsonov, S. A.; Salwiczek, M.; Anders, G.; Koksch, B.; Pisabarro, M. T. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 16400–16408.
(141) Kovacs, J. M.; Mant, C. T.; Hodges, R. S. *Biopolymers (Pept. Sci.)* **2006**, *84*, 283-297.
(142) Mant, C. T.; Kovacs, J. M.; Kim, H.-M.; Pollock, D. D.; Hodges, R. S. *Biopolymers (Pept. Sci)* **2009**, *92*, 573-595.

(143) Valko, K.; Bevan, C.; Reynolds, D. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2022-2029.
(144) Harnisch, M.; Möckel, H. J.; Schulze, G. *J. Chromatogr.* **1983**, *282*, 315-332.
(145) Valko, K.; Slegel, P. *J. Chromatogr.* **1993**, *631*, 49-61.
(146) Mutton, I. M. *J. Chromatogr. A.* **1995**, *697*, 191-201.
(147) Aboderin, A. A. *Int. J. Biochem.* **1971**, *2*, 537-544.
(148) Pliska, V.; Schmidt, M.; Fauchere, J. L. *J. Chromatogr.* **1981**, *216*, 79-92.
(149) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
(150) Bantan-Polak; T., Grant, K. B. *Chem. Commun.* **2002**, 1444-1445 (supplementary Material).
(151) Krokhin, O. V.; Spicer, V. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9522-9530.
(152) Chiti, F.; Dobson, C. M. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333-366.
(153) Aguzzi, A.; O'Connor, T. *Nature Rev. Drug. Discov.* **2010**, *9*, 237–248.
(154) Bartolini, M.; Andrisano, V. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1018–1035.
(155) Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A. Ø.; Riekel, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D. *Nature* **2005**, *435*, 773–778.
(156) Dalvit, C. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, *51*, 243-271.
(157) Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H. *Lancet* **2006**, *368*, 387-403
(158) Abbott, A. *Nature* **2011**, *475*, S2-S4.
(159) Miller, Y.; Ma, B.; Nussinov, R. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4820-4838.
(160) Petkova, A. T.; Ishii, Y.; Balbach, J. J.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Delaglio, F.; Tycko, R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 16742-16747.
(161) Mori, H.; Takio, K.; Ogawara, M.; Selkoe, D. J. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17082-17086.
(162) Yin, Y. I.; Bassit, B.; Zhu, L.; Yang, X.; Wang, C.; Li, Y.-M. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 23639-23644
(163) Bucciantini, M. M.; Giannoni, E. E.; Chiti, F. F.; Baroni, F. F.; Formigli, L. L.; Zurdo, J. J.; Taddei, N. N.; Ramponi, G. G.; Dobson, C. M. C.; Stefani, M. M. *Nature* **2002**, *416*, 507-511.
(164) Butterfield, S. M.; Lashuel, H. A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 5628-5654.
(165) Luhrs, T.; Ritter, C.; Adrian, M.; Riek-Loher, D.; Bohrmann, B.; Dobeli, H.; Schubert, D.; Riek, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 17342-17347.
(166) Yamin, G.; Ruchala, P.; Teplow D. B. *Biochemistry* **2009**, *48*, 11329–11331.
(167) Cheng, P.-N.; Liu, C.; Zhao, M.; Eisenberg D.;. Nowick, J. S. *Nature Chemistry*. **2012**, *4*, 927-933.
(168) Giacomelli, C. E.; Norde, W. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1719-1726.
(169) Vieira, E. P.; Hermel, H.; Mohwald, H. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1645*, 6-14.
(170) Török, M.; Abid, M.; Mhadgu, S. C.; Török, B. *Biochemistry* 2006, 45, 5377-5383.
(171) LeVine, H. 3rd *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 274-284.
(172) Asimov, I.; *A Short History of Biology*; Conn : Greenwood Press; Westport, **1980**, p.95.
(173) Ramsey, V. G.; Doherty, J. M.; Chen, C. C.; Stappenbeck, T. S.; Konieczny, S. F.; Mills, J. C. *Development (Cambridge, England)* **2007**, *134*, 211-222.
(174) Johnston, N.; Dettmar, P. W.; Bishwokarma, B.; Lively, M. O.; Koufman, J. *Laryngoscope*, **2004**, *114*, 2129-2134.
(175) Suguna, K.; Padlan, E. A.; Smith, C. W.; Carlson, W. D.; Davies, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 7009-7013.
(176) Brik, A.; Wong, C. H. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 5-14.
(177) Delaroche, D.; Aussedat, B.; Aubry, S.; Chassaing, G.; Burlina, F.; Clodic, G.; Bolbach, G.; Lavielle, S.; Sagan, S. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1932-1938.
(178) Hajduk, P.J.; Burns, D.J. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2002**, *5*, 613–621
(179) Chiyoda, T.; Iida, K.; Takatori, K.; Kajiwara, M. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo*) **1998**, *46*, 718-720.
(180) Hubbard, R. E. *Structure-Based Drug Discovery: An Overview*; Royal Society of Chemistry; 2006, p.111-112.
(181) Vulpetti, A.; Schiering, N.; Dalvit, C. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2010**, *78*, 3281-3291.