



HAL
open science

La multi-ligation triazole : Développement de nouveaux outils pour la synthèse de mimes de protéines par cycloadditions successives

Ibai Valverde

► **To cite this version:**

Ibai Valverde. La multi-ligation triazole : Développement de nouveaux outils pour la synthèse de mimes de protéines par cycloadditions successives. Chimie. Université d'Orléans, 2010. Français. NNT: . tel-01157275

HAL Id: tel-01157275

<https://theses.hal.science/tel-01157275>

Submitted on 27 May 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 D'ORLÉANS



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans

THÈSE présentée par :

Ibai VALVERDE

soutenue le : **14 Avril 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Chimie

**La multi-ligation triazole :
Développement de nouveaux outils pour la
synthèse de mimes de protéines par
cycloadditions successives**

THÈSE dirigée par :

Agnès DELMAS

Directeur de Recherche, CBM CNRS Orléans

RAPPORTEURS :

David CRICH

Directeur de Recherche, ICSN CNRS Gif-sur-Yvette

Gilles GUICHARD

Directeur de Recherche, CBMN CNRS Pessac

JURY :

Luigi AGROFOGLIO

Professeur, Université d'Orléans, Président

Vincent AUCAGNE

Chargé de Recherche, CBM CNRS Orléans

David CRICH

Directeur de Recherche, ICSN CNRS Gif-sur-Yvette

Agnès DELMAS

Directeur de Recherche, CBM CNRS Orléans

Gilles GUICHARD

Directeur de Recherche, CBMN CNRS Pessac

Nicolas INGUIMBERT

Professeur, Université de Perpignan

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au Centre de Biophysique Moléculaire à Orléans dirigé par le docteur Jean-Claude Beloeil avec le financement du CNRS, la Région Centre, la Fondation pour la Recherche Médicale, la Ligue Contre le Cancer et Arc Grand Ouest.

Je remercie chaleureusement le professeur David Crich et le docteur Gilles Guichard d'avoir accepté de juger ce travail. Je tiens également à adresser mes remerciements aux professeurs Luigi Agrofoglio et Nicolas Inguibert d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Ma plus sincère reconnaissance à Agnès Delmas pour m'avoir accueilli au sein de son équipe ainsi que pour ses conseils, sa disponibilité et son enthousiasme. Je ne pourrais pas remercier assez Vincent Aucagne pour son travail d'encadrement, jour par jour, manip' par manip' et pour m'avoir fait aimer mon travail pendant trois ans.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Pr. Gilles Lalmanach et au Dr. Fabien Lecaille pour leur grande disponibilité et leurs conseils ainsi que pour une bonne et très fructueuse collaboration.

Je remercie également le reste de l'équipe « Peptides, glycopeptides et protéines de synthèse », Dominique Lelièvre et Philippe Marceau, pour m'avoir fait profiter de leur grande expérience et de leurs *tips and tricks*.

Un grand merci au service de spectrométrie de masse du CBM, à « Massman » Guillaume Gabant qui ne compte pas ses heures pour son service et à Martine Cadène pour tous les grands coups de pouce qu'elle m'a donnés en masse et en enzymo. Je remercie très sincèrement Sandrine Villette pour toute l'aide fournie au cours des expériences de spectroscopie. Un très grand merci à Hervé Meudal pour l'acquisition des spectres RMN.

Je remercie très chaleureusement toutes les personnes du CBM, chefs d'équipe, chercheurs, enseignants, ITAs, techniciens, thésards et stagiaires qui ont contribué à rendre ce travail de thèse agréable et très instructif.

ABREVIATIONS

Ac : acétyle

Boc : *tert*-butyloxycarbonyle

CuAAC : cycloaddition des alcynes sur les azotures catalysée par le cuivre (*copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*)

DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène

DCC : *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide

DIEA : diisopropyléthylamine

DMAP : 4-(*N,N*-diméthylamino)pyridine

DMF : *N,N*-diméthylformamide

DTT : dithiothréitol

EDTA : éthyldiamine tétraacétate

Et : éthyle

Fmoc : 9*H*-fluorén-9-ylméthoxycarbonyle

GuHCl : chlorure de guanidium

HATU : hexafluorophosphate de 2-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthylaminium

HBTU : hexafluorophosphate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthylaminium

HFIP : 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-propan-2-ol

HOBt : *N*-hydroxybenzotriazole

*i*Pr : *iso*-propyle

m-CPBA : acide *méta*-chloroperbenzoïque

Me : méthyle

NMP : *N*-méthylpirrolidinone

Pbf : 2,2,4,6,7-pentaméthylhydrobenzofuran-5-sulfonyle

PEG-A : résine polyéthylèneglycol-acrylamide

Ph : phényle

Pnp : *para*-nitrophényle

Pyr : pyridine

TBAF : fluorure de tétrabutylammonium

TBDMS : *tert*-butyldiméthylsilyle

TBDPS : *tert*-butyldiphénylsilyle

*t*Bu : *tert*-butyle

TES : triéthylsilyle

Tf : trifluorométhanesulfonyle (triflyle)

TFA : acide trifluoroacétique

TFE : 2,2,2-trifluoroéthanol

THF : tétrahydrofurane

TIPS : triisopropylsilyle

TIS : triisopropylsilane

TMS : triméthylsilyle

Trt : triphénylméthyle (trityle)

m/z : rapport masse sur charge

CCM : chromatographie sur couche mince

éq. : équivalent

Fmoc-SPPS : synthèse de peptides sur phase solide en stratégie Fmoc/*t*Bu

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

HRMS : spectrométrie de masse haute résolution

MALDI : matrix-assisted laser desorption ionization

MS : spectrométrie de masse

n.d. : non déterminé

quantit. : quantitatif/ve

Rdt. : rendement

RMN : résonance magnétique nucléaire

SPPS : synthèse de peptides sur phase solide

temp. : température (en °C)

TOF : time of flight

UV : ultraviolet

ACIDES AMINES

A/Ala : Alanine

D/Asp : Acide aspartique

E/Glu : Acide glutamique

F/Phe : Phénylalanine

f/D-Phe : D-Phénylalanine

G/Gly : Glycine

H/His : Histidine

I/Ile : Isoleucine

K/Lys : Lysine

L/Leu : Leucine

M/Met : Méthionine

N/Asn : Asparagine

O/Orn : Ornithine

P/Pro : Proline

Q/Gln : Glutamine

R/Arg : Arginine

S/Ser : Sérine

T/Thr : Thréonine

V/Val : Valine

Y/Tyr : Tyrosine

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PARTIE I – LA LIGATION CHIMIQUE : POURQUOI ET COMMENT	3
I-1 – Un défi pour le chimiste : la synthèse de protéines par voie chimique	3
I-1.A – Génome et Protéome	3
I-1.B – Synthèse de protéines par voie recombinante	3
I-1.C – Synthèse de protéines par voie chimique	4
I-2 – Synthèse chimique de protéines par condensation de peptides protégés	5
I-2.A – Synthèse de peptides sur phase solide.....	5
I-2.B – Synthèse de protéines par condensation de peptides entièrement protégés	6
I-2.C – Synthèse de protéines par condensation de peptides partiellement protégés	6
I-3 – Ligation chimique de peptides	8
I-3.A – Ligations natives	9
I-3.A.a – La ligation chimique native (ou Native Chemical Ligation, NCL)	9
I-3.A.b – Ligations chimiques natives de « deuxième génération »	10
I-3.A.c – La ligation de Staudinger native	12
I-3.A.d – Nouvelles méthodes de formation d'un amide compatibles avec la ligation de peptides déprotégés.....	13
I-3.B – Ligations pseudo-natives	14
I-3.B.a – Ligation thioéther	14
I-3.B.b – Ligation thioester	15
I-3.B.c – Ligation de type imine : thiaprolines et oxaprolines.....	15
PARTIE II – LIGATION CHIMIQUE DE PEPTIDES SUCCESSIVE	17
II-1 – Problématique	17
II-2 – Stratégies de multi-ligation de peptides.....	18
II-2.A – Synthèse de protéines par ligations mixtes.....	18
II-2.A.a – Principe.....	18
II-2.A.b – Ligations mutuellement compatibles : thioester - oxime	18
II-2.A.c – Ligations partiellement compatibles : association des ligations thioester et pseudoproline.....	19
II-2.A.d – Avantages et inconvénients de l'approche mixte	20
II-2.B – Synthèse par masquage d'un partenaire de ligation	20
II-2.B.a – Ligations chimiques natives successives.....	20
II-2.B.b – Ligations successives sur support solide	22
II-3 – Conclusion.....	23
PARTIE III – LA CYCLOADDITION DES ALCYNES ET LES AZOTURES CATALYSEE PAR LE CUIVRE ...	25
III-1 – Introduction	25
III-2 – La réaction	26
III-2.A – Mécanisme réactionnel.....	26
III-2.B – Les sources de cuivre (I)	28
III-2.C – Influence de l'alcyne et de l'azoture sur la réaction	28
III-2.D – Peptides, protéines et CuAAC	28
III-2.D.a – CuAAC sur des peptides protégés.....	29

III-2.D.b – CuAAC sur des peptides déprotégés.....	31
III-2.D.c – CuAAC sur les protéines.....	32
III-2.D.d – Oxydations des protéines en conditions de CuAAC.....	33
III-3 – Les 1,2,3 triazoles	34
III-3.A – Le 1,2,3 triazole disubstitué comme mime d'un amide.....	34
III-3.A.a – Comparaison des 1,2,3 triazoles disubstitués et des liaisons amide.....	34
III-3.A.b – Effet du remplacement des amides par des 1,2,3 triazoles sur des composés à activité biologique.....	34
III-3.B – Le 1,2,3-triazole dans la structure secondaire et tertiaire d'une protéine.....	36
III-4 – Conclusion.....	37
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	39
PARTIE IV – ETUDE DES GROUPES PROTECTEURS DES ALCYNES.....	41
IV-1 – Choix d'une stratégie pour réaliser des CuAAC multiples sur les peptides.....	41
IV-1.A – Stratégies pour la CuAAC successive.....	41
IV-1.B – Stratégie pour la CuAAC successive sur les peptides.....	43
IV-2 – Conception et synthèse d'un modèle pour l'étude des groupes protecteurs des alcynes	44
IV-2.A – Conception des composés modèles.....	44
IV-2.B – Synthèse des composés modèles.....	45
IV-2.B.a – Silylation du propargylamide de phénylacétyle.....	46
IV-2.B.b – Silylation de propargylamine suivie de phénylacétylation.....	48
IV-3 – Etudes de stabilité des groupes protecteurs des alcynes	51
IV-3.A – Stabilité en conditions de CuAAC.....	51
IV-3.B – Stabilité en conditions de SPPS en stratégie Fmoc/tBu.....	51
IV-3.C – Stabilité en conditions diverses.....	53
IV-4 – Etude de la déprotection des alcynes silylés.....	54
IV-4.A – Déprotection par substitution nucléophile avec les fluorures.....	54
IV-4.B – Déprotection par alcoolyse alcaline.....	55
IV-4.B.a – Etude préliminaire : cinétique et sélectivité.....	56
IV-4.B.b – Etudes approfondies : influence de la base et influence du solvant.....	56
IV-4.B.c – Conclusion sur l'alcoolyse alcaline.....	59
IV-4.C – Déprotection par protiodésilylation catalysée par l'argent (I).....	59
IV-4.C.a – Etudes préliminaires : cinétique et sélectivité.....	60
IV-4.C.b – Influence du solvant.....	61
IV-4.D – Conclusion sur les études de stabilité et de la déprotection des groupes protecteurs silylés.....	62
IV-5 – Application à la CuAAC successive : « Click-Click-Click ».....	63
IV-5.A – Introduction.....	63
IV-5.B – Synthèse d'un composé tris-triazole.....	64
IV-5.C – Conclusion.....	66
PARTIE V – SYNTHÈSE D'UN ANALOGUE DE PROTÉINE PAR LIGATIONS TRIAZOLES SUCCESSIVES.....	67
V-1 – Problématique.....	67

V-2 – Développement d'une stratégie générale pour l'introduction des partenaires de ligation triazole dans les peptides.....	67
V-2.A – Introduction d'azotures en extrémité N-terminale	67
V-2.A.a – Le transfert de diazo	68
V-2.A.b – Synthèse d'azido-acides par transfert de diazo.....	69
V-2.B – Introduction de N-propargylamides en extrémité C-terminale	70
V-2.B.a – Choix d'une stratégie pour la synthèse de N-propargylamides en extrémité C- terminale.....	71
V-2.B.b – Le Backbone Amide Linker.....	72
V-2.B.c – Synthèse de bras de type propargylamine benzylique	73
V-2.C – Choix de la résine	74
V-3 – Synthèse d'un analogue de protéine par double ligation triazole.....	76
V-3.A – Choix de la cible	76
V-3.A.a – Les stéfines.....	76
V-3.A.b – La stéfine A humaine : séquence, structure et mode d'action.....	77
V-3.B – Synthèse des différents fragments peptidiques	79
V-3.B.a – Synthèse du fragment médian.....	79
V-3.B.b – Synthèse du fragment N-terminal	86
V-3.B.c – Synthèse du fragment C-terminal	89
V-3.C – Synthèse d'un analogue de la stéfine A humaine par double ligation triazole successive	91
V-3.C.a – Etape 1 : Ligation entre le fragment N-terminal et le fragment médian.....	91
V-3.C.b – Etape 2 : Désilylation chimiosélective du produit de couplage 36	95
V-3.C.c – Etape 3 : Ligation finale	97
V-4 – Activité de la bis-triazole protéine 38	99
V-4.A Le repliement des protéines.....	99
V-4.B – Méthodes de repliement et de mesure d'activité de 38	100
V-4.B.a – Méthodes de repliement de la stéfine A humaine.....	100
V-4.B.b – Evaluation de l'activité biologique de la stéfine A humaine	101
V-4.B.c – Résultats	101
V-4.C – Evaluation de la structure secondaire par dichroïsme circulaire	103
V-4.C.a – Principe du dichroïsme circulaire.....	103
V-4.C.b – Spectres dichroïques de 38	105
V-5 – Caractérisation de l'activité inhibitrice.....	107
V-5.A – Caractérisations <i>in vitro</i> : Etude de la stabilité en fonction du pH et de la température	107
V-5.A.a – Stabilité en fonction du pH.....	107
V-5.A.b – Stabilité en fonction de la température	108
V-5.B – Caractérisations <i>in vitro</i> : Mesures de K_i vis-à-vis de cathepsines à cystéine d'intérêt thérapeutique	109
V-5.B.a – Définition du K_i	109
V-5.B.b – Mesures du K_i	110
V-5.C – Caractérisations <i>in vivo</i> : Evaluation de l'inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire	110
V-6 – Conclusion sur la synthèse d'un bis-triazolo analogue de la stéfine A	112
PARTIE VI – MULTI-CUAAC SUR PHASE SOLIDE	115

VI-1 – Problématique	115
VI-2 – La ligation chimique sur phase solide appliquée à la CuAAC successive	115
VI-2.A – Principe de la ligation chimique sur phase solide	115
VI-2.B – « C-vers-N » vs. « N-vers-C ».....	116
VI-2.B.a – Elongation de « C-vers-N ».....	117
VI-2.B.b – Elongation de « N vers C »	119
VI-2.C – Application de la ligation sur phase solide à la ligation triazole successive	121
VI-2.C.a – Immobilisation de peptides sur support solide.....	121
VI-2.C.b – Le bras Azido-Ethoxyéthylsulfonylethoxyloxycarbonate (N_3 -Esoc)	123
VI-2.D – Conclusion	124
VI-3 – MUC1	124
VI-4 – Synthèse d'un analogue non-glycosylé de MUC1 par multi-ligation triazole sur phase solide	127
VI-4.A – Synthèses de la séquence répétée non-glycosylée de MUC1	127
VI-4.A.a – Synthèse de 39	128
VI-4.A.b – Synthèse en parallèle de 40 et 41	129
VI-4.B – Etudes préliminaires pour la multi-ligation triazole sur support solide.....	133
VI-4.B.a – Immobilisation de 41 sur phase solide par ligation triazole	133
VI-4.B.b – Déprotection des alcynes sur résine.....	135
VI-4.C – Synthèse d'un analogue de la protéine MUC1 par multi-ligation triazole.....	136
VI-4.C.a – Stratégie.....	136
VI-4.C.b – Cycloadditions successives et oxydations métallo-catalysées.....	137
VI-4.C.c – Synthèse d'un analogue de la protéine MUC1 par triple ligation triazole.....	139
VI-4.C.d – Bilan	142
VI-5 – Vers la synthèse d'un analogue glycosylé de MUC1 par multi-ligation triazole sur phase solide	142
VI-5.A – Synthèse d'acides aminés glycosylés.....	142
VI-5.A.a – Généralités sur le couplage glycosidique, activation et stéréosélectivité.....	143
VI-5.A.b – Synthèse d'un acide aminé glycosylé pour utilisation en SPPS.....	145
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	147
BIBLIOGRAPHIE	151
MODES OPÉRATOIRES	164
General information	166
Part IV	168
Part V	185
Part VI	206
ANNEXE	228

INTRODUCTION

Les protéines sont les macromolécules biologiques qui effectuent la plupart des fonctions biochimiques de la cellule et qui sont aussi largement employées dans des rôles structurels. Le séquençage de génome a révélé qu'une cellule eucaryote peut avoir entre 20000 et 25000 séquences d'ADN codant pour des protéines. En raison des rôles divers et importants que les protéines jouent dans le monde biologique, les scientifiques ont longtemps cherché à comprendre finement le mécanisme d'action des protéines. Pour résoudre cette énigme, les biochimistes et les biologistes ont eu un recours quasi-exclusif aux techniques de biologie moléculaire à base d'ADN recombinant. Malgré la contribution de cette voie de synthèse à l'étude du fonctionnement des protéines, l'approche est soumise à certaines limitations puisque seulement les vingt acides aminés protéinogènes peuvent être aisément incorporés dans la structure primaire d'une protéine par l'intermédiaire de la machinerie cellulaire. De plus, l'introduction de modifications post-traductionnelles à des résidus spécifiques est, à ce jour, difficile à réaliser et contrôler.

La synthèse de protéines par voie chimique représente une voie complémentaire très intéressante puisqu'elle permet toute modification spécifique sur les chaînes latérales et sur le squelette peptidique. Toutefois, les méthodes traditionnelles de synthèse de protéines par voie chimique sont généralement limitées. La synthèse de peptides sur phase solide, est restreinte en routine à la synthèse de séquences ne dépassant pas une cinquantaine de résidus. La condensation de fragments peptidiques protégés est, quant à elle, peu accessible à cause de la solubilité des peptides protégés et de l'épimérisation en α de l'acide carboxylique activé lors des condensations. Ces quinze dernières années, de nouvelles approches de ligation chimique, consistant à condenser des fragments peptidiques complètement déprotégés en milieu aqueux au moyen de réactions extrêmement chimiosélectives et efficaces, ont fait l'objet de recherches particulièrement intenses. Nous présenterons les différentes approches utilisées pour la production de protéines par voie chimique mises au point à ce jour en insistant particulièrement sur l'intérêt des stratégies permettant de réaliser des ligations de façon successive.

La réaction de cycloaddition entre un alcyne terminal et un azoture catalysée par le cuivre (I) (ou CuAAC) a été récemment découverte en 2001. Sa chimiosélectivité et sa régiosélectivité exceptionnelles semblent parfaitement indiquées pour la synthèse d'analogues fonctionnels de protéines mais, de façon surprenante, la réaction n'a jamais été utilisée dans ce but précis.

L'objectif de cette thèse a été l'utilisation de la CuAAC comme une nouvelle méthode de ligation successive pour la production de pseudo-protéines fonctionnelles.

Pour mettre au point une stratégie de multi-CuAAC successive compatible avec les peptides déprotégés, nous avons évalué la robustesse de groupes protecteurs classiques des alcynes dans une large gamme de conditions réactionnelles ainsi qu'étudié leurs différentes conditions de coupure. Cette étude nous a permis de développer une stratégie générale de protection temporaire de la fonction alcyne afin de pouvoir réaliser de multiples cycloadditions successives, compatibles avec une très large gamme de substrats y compris les peptides.

Nous avons ensuite utilisé la CuAAC successive pour assembler un analogue de protéine par ligation triazole successive. Nous avons d'abord concentré nos efforts sur l'introduction de chacun des partenaires de ligation, l'azoture et l'alcyne, dans des peptides. Nous avons alors pu synthétiser le *bis*-triazolo analogue d'un inhibiteur de protéases à cystéine de 98 acides aminés, la stéfine A par double ligation triazole dont la structure secondaire, l'activité *in vitro* vis-à-vis de cathepsines à cystéine d'intérêt thérapeutique et l'activité *in vivo* vis-à-vis de l'invasivité des cellules cancéreuses a été évaluée.

Pour finir, nous avons mis au point une nouvelle méthodologie de synthèse de protéines alliant ligation triazole et synthèse sur phase solide. Cette approche nous a permis de surmonter les limitations de la ligation en solution dues à la purification et la manipulation des intermédiaires réactionnels, et de multiplier le nombre de ligations effectuées, donnant accès à des triazolo-protéines dépassant largement la centaine d'acides aminés. L'efficacité de la méthode a été illustrée par la synthèse d'un analogue de 160 acides aminés de la glycoprotéine MUC1 par quadruple ligation triazole successive.

PARTIE I – LA LIGATION CHIMIQUE : POURQUOI ET COMMENT

I-1 – Un défi pour le chimiste : la synthèse de protéines par voie chimique

I-1.A – Génome et Protéome

Un des objectifs principaux de la recherche biomédicale est de comprendre le mode d'action au niveau moléculaire des nombreuses activités biologiques des protéines, de prévoir et contrôler ces activités. La difficulté et l'importance de cette tâche sont devenues évidentes depuis le séquençage des génomes. En 2004, les derniers résultats sur l'analyse du génome humain ont annoncé que celui-ci contient approximativement 20000 à 25000 gènes codant pour des protéines.¹ Ce chiffre est encore augmenté puisqu'au cours de la synthèse d'une protéine fonctionnelle, le transcrit et la chaîne polypeptidique peuvent être modifiés de multiples façons, de sorte que l'ensemble des protéines exprimées par un génome (*i.e.* le protéome) est très supérieur à celui prédit à partir de l'étude des gènes.^{2,3}

Une fois que la séquence d'une protéine est prédite grâce à des études de génomique, la difficulté réside dans la détermination de sa fonction biologique. A ce stade, la production de protéines est incontournable pour résoudre cette énigme.

I-1.B – Synthèse de protéines par voie recombinante

La plupart des études du mode d'action des protéines ont été réalisées à partir de protéines obtenues par voie recombinante *i.e.* exprimées par des cellules transfectées par de l'ADN recombinant. Depuis son introduction, cette méthode a révolutionné l'étude des protéines en donnant accès à d'importantes quantités de protéines de structure définie et en autorisant la variation systématique de la séquence des protéines. L'expression de protéines dans des cellules compétentes est devenue une technique de routine mais est encore loin d'être universelle. Par exemple, la surexpression de protéines cytotoxiques ou de faible solubilité pose souvent des problèmes. De plus, la technique exploite la machinerie moléculaire de la cellule et par conséquent, l'introduction de modifications post-traductionnelles de façon contrôlée est, à ce jour, difficile voire impossible selon la modification et le système

¹ Human Genome Sequencing Consortium International *Nature* **2004**, *431*, 931-945

² European Bioinformatics Institute *International Protein Index v.10/12/2010*

³ Boeckmann, B.; Blatter, M.; Famiglietti, L.; Hinz, U.; Lane, L.; Roechert, B.; Bairoch, A. *C. R. Biol* **2005**, *328*, 882-899

d'expression. Il est également possible mais difficile d'introduire les modifications post-traductionnelles par voie chimique ou enzymatique sur les protéines, une fois celles-ci extraites et purifiées.

Plus récemment, l'incorporation d'acides aminés non protéinogènes ayant des propriétés uniques (fluorescence, réactivité chimique particulière) par voie recombinante est une voie de recherche particulièrement intéressante et active.^{4,5} Les méthodes existantes consistent, soit en un remplacement systématique de certains résidus, ce qui permet de changer les propriétés physico-chimiques de la protéine exprimée,^{6,7} soit en l'introduction d'acides aminés non canoniques à des positions spécifiques, pour permettre l'étude de la structure des protéines à l'échelle moléculaire aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.^{8,9}

I-1.C – Synthèse de protéines par voie chimique

La synthèse chimique est apparue récemment comme une alternative viable pour la production de protéines. L'assemblage d'une protéine par voie chimique autorise toute modification de la structure d'une chaîne polypeptidique pour permettre une étude exhaustive de son mécanisme d'action.

- acides aminés non codés dans le génome,
- modifications du squelette protéique avec une précision atomique,
- modifications post-traductionnelles (phosphorylations, glycosylations, lipidations...),
- outils pour la caractérisation spectroscopique...

En raison de tous ses avantages, la synthèse totale de protéines par voie chimique est un défi de longue date pour le chimiste. Lorsqu'Emil Fischer a reçu le prix Nobel en 1902, il prévoyait déjà que la « chimie physiologique » permettrait de préparer des enzymes synthétiques sur mesure pour servir dans un but précis. Aujourd'hui, cette vision devient une réalité grâce aux avancées prodigieuses en synthèse de peptides qui ont eu lieu au cours de ce dernier siècle.

⁴ Link, A. J.; Mock, M. L.; Tirrell, D. A. *Curr. Opin. Biotech.* **2003**, *14*, 603-609

⁵ Neumann, H.; Wang, K.; Davis, L.; Garcia-Alai, M.; Chin, J. W. *Nature* **2010**, *464*, 441-444

⁶ Kiick, K. L.; Hest, J. C. M. V.; Tirrell, D. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2148-2152

⁷ Link, A. J.; Vink, M. K. S.; Tirrell, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10598-10602

⁸ Wang, L.; Xie, J.; Schultz, P. G. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 225-249

⁹ Dougherty, D. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 645-652

I-2 – Synthèse chimique de protéines par condensation de peptides protégés

I-2.A – Synthèse de peptides sur phase solide

La synthèse de peptides en phase solide (SPPS), mise au point par Merrifield,¹⁰ a révolutionné la synthèse de peptides et les a rendus facilement accessibles. En SPPS, le peptide est synthétisé de façon récurrente et itérative plutôt que de façon convergente (Figure 1). L'originalité de la méthode provient du fait que le peptide est accroché sur un support insoluble polymérique (dit « résine ») par son extrémité C-terminale. L'immobilisation d'un des partenaires réactifs permet la séparation des co-produits de couplage ou de déprotection du peptide en croissance par simple filtration, accélérant considérablement la synthèse du peptide. De plus, la séparation par filtration permet l'emploi de larges excès de l'acide aminé à coupler aboutissant ainsi à des rendements quasi-quantitatifs.

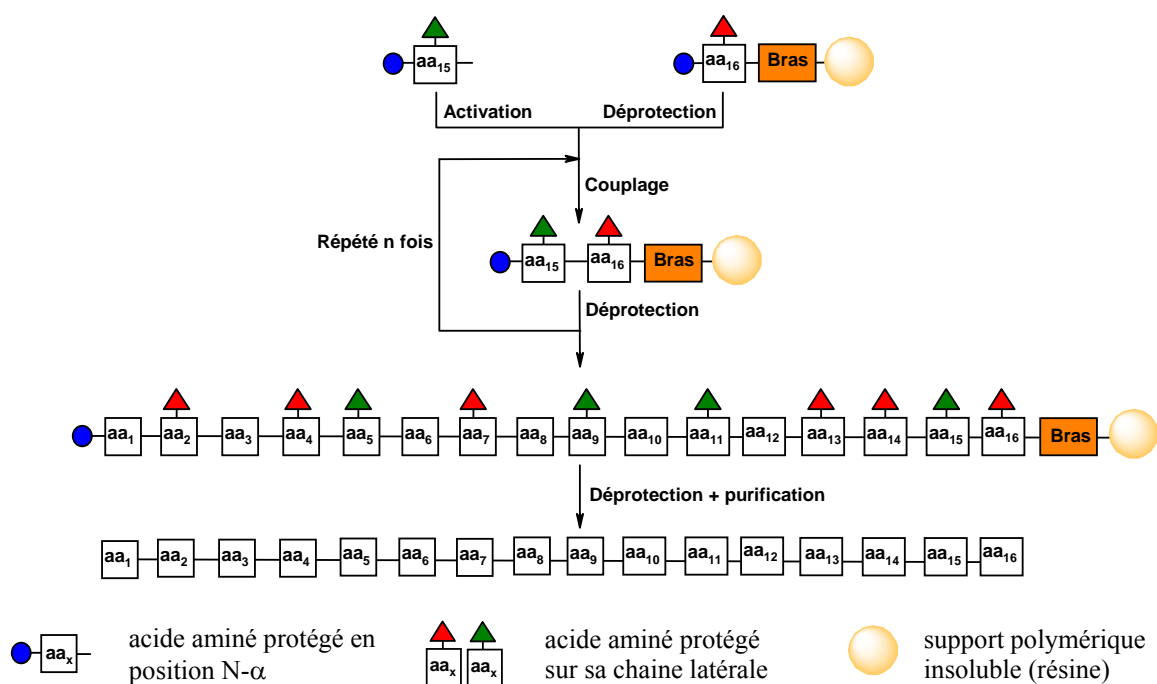


Figure 1 : Stratégie de synthèse de peptides sur phase solide

Un avantage majeur de la SPPS est que, puisque les opérations mises en œuvre sont répétitives, elle est automatisable, rendant accessible la synthèse de peptides à des laboratoires non spécialistes.¹¹ Toutefois, malgré le fait que la méthodologie proposée par Merrifield a été optimisée de façon intense (résines,^{12,13} réactifs de couplage,¹⁴ groupes protecteurs,¹⁵ bras de

¹⁰ Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154

¹¹ Kent, S. B. H. *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 957-989

¹² Hudson, D. *J. Comb. Chem.* **1999**, 1, 333-360

synthèse¹⁶...), la taille des peptides synthétisés par cette méthode est limitée, en moyenne, à une cinquantaine d'acides aminés.¹⁷

I-2.B – Synthèse de protéines par condensation de peptides entièrement protégés

La stratégie consiste à assembler de façon convergente consistant à condenser, par formation d'une liaison amide, deux peptides totalement protégés issus de la SPPS (Figure 2). Cette méthode est un excellent moyen d'atteindre des protéines dépassant 50 résidus¹⁸ ou pour la production de peptides thérapeutiques de haute pureté.¹⁹

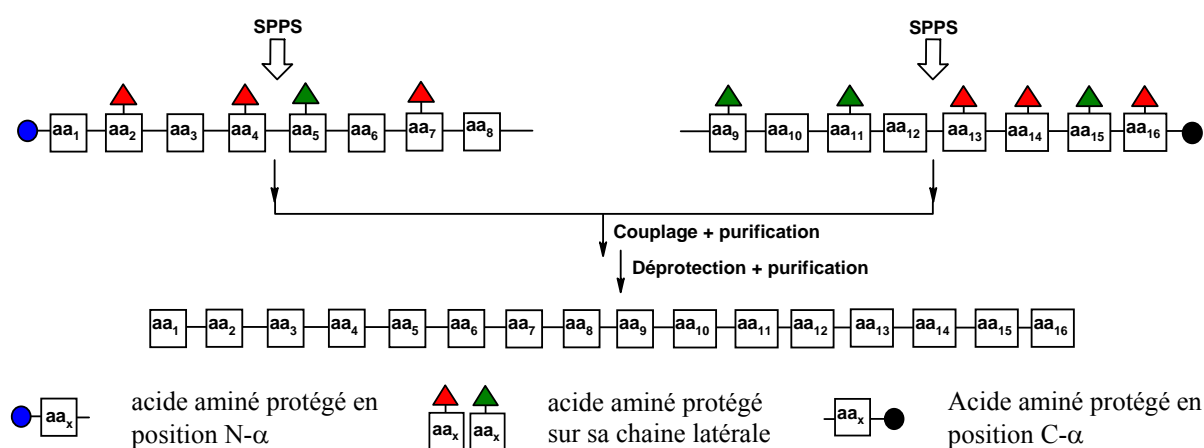


Figure 2 : Stratégie de synthèse de peptides en solution

Le couplage de peptides protégés en solution possède de nombreux inconvénients, le plus limitant étant la solubilité des peptides protégés dans les solvants organiques mais également l'épimérisation en position α de l'acide aminé activé.

I-2.C – Synthèse de protéines par condensation de peptides partiellement protégés

¹³ Hudson, D. J. *Comb. Chem.* **1999**, *1*, 403-457

¹⁴ Valeur, E.; Bradley, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631

¹⁵ Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455-2504

¹⁶ Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2158

¹⁷ Albericio, F. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 211-221

¹⁸ Nishiuchi, Y.; Inui, T.; Nishio, H.; Bódi, J.; Kimura, T.; Tsuji, F. I.; Sakakibara, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13549-13554

¹⁹ Bray, B. L. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 587-593

Cette méthode est la première à être basée sur le couplage de peptides partiellement protégés et la première à utiliser des thiocarboxyles en tant que groupements donneurs d'acyle activés pour réaliser des couplages chimiosélectifs (Figure 3).^{20,21,22}

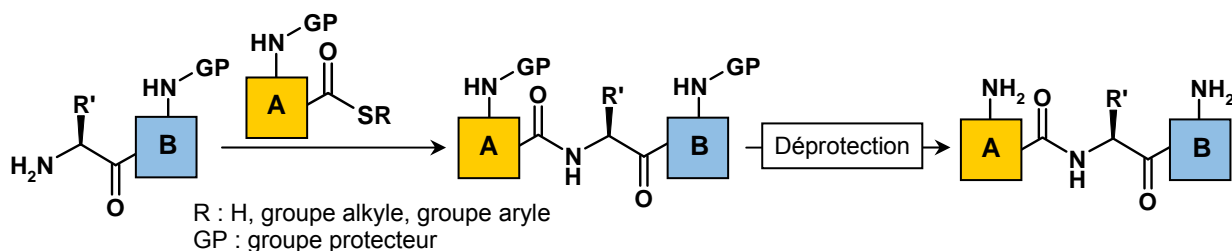


Figure 3 : Principe de ligation chimique de peptides par aminolyse directe d'un acyle activé

Cette stratégie représente une avancée considérable par rapport aux approches présentées précédemment puisqu'elle possède l'avantage d'être réalisable dans des solvants dans lesquels les peptides déprotégés sont très solubles, comme l'eau ou le DMF, et emploie un donneur d'acyle faiblement activé, ce qui limite les problèmes d'épimérisation.

Toutefois, l'acylation très chimiosélective présente le désavantage de ne pas être régiosélective, forçant ainsi à protéger les chaînes latérales des résidus lysyles (et diminuant la solubilité du peptide dans l'eau) et de nécessiter des temps de couplage excessivement longs de jusqu'à 96h.²³

En dépit de ces inconvénients, cette méthode connaît un regain d'intérêt depuis les travaux pionniers de Blake et ses collaborateurs^{20,21} et Aimoto et Hojo.²² Initialement limitée par l'utilisation de groupes protecteurs des amines lipophiles qui rendent difficile le couplage en milieu aqueux,²⁴ cette stratégie est de nouveau utilisée et fait actuellement l'objet d'une recherche active pour la synthèse de peptides,²⁵ glycopeptides²⁶ et glycoprotéines.^{23,27}

²⁰ Blake, J.; Li, C. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4055-4058

²¹ Blake, J.; Li, C. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 1556-1559

²² Hojo, H.; Aimoto, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 111-117

²³ Payne, R. J.; Ficht, S.; Greenberg, W. A.; Wong, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4411-4415

²⁴ Aimoto, S. *Pept. Sci.* **1999**, *51*, 247-265

²⁵ Crich, D.; Sharma, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7591-7594

²⁶ Tan, Z.; Shang, S.; Halkina, T.; Yuan, Y.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5424-5431

²⁷ Katayama, H.; Hojo, H.; Ohira, T.; Nakahara, Y. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5492-5494

I-3 – Ligation chimique de peptides

La ligation chimique de peptides consiste dans le couplage chimiosélectif et régiosélectif de deux peptides entièrement déprotégés (Figure 4). Un couplage entre peptides dans ces conditions permet de contourner les principaux désavantages de la synthèse convergente en milieu organique mentionnée plus tôt,

- une solubilité accrue de tous les fragments peptidiques
- des conditions de couplage non épimérisantes

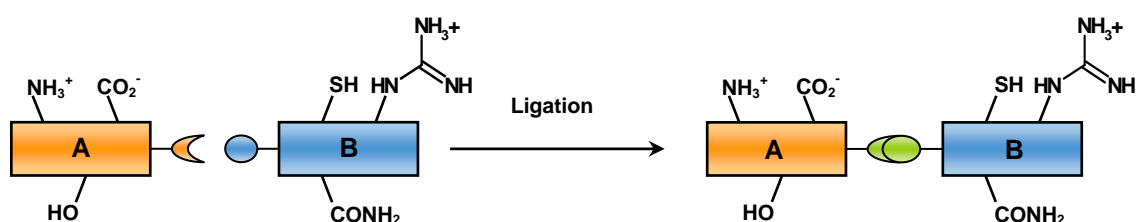


Figure 4 : Principe de la ligation chimique

Au cours d'une ligation chimique de peptides, deux fragments peptidiques sont couplés *via* la formation d'une liaison covalente entre deux partenaires réactifs (par exemple : entre un aldéhyde électrophile et un amino-oxy nucléophile pour donner un oxime) de façon à fournir un mime de liaison amide ou un mime de protéine.

Tout le défi de la mise au point d'une méthode de ligation repose dans le fait de trouver des partenaires que l'on puisse introduire facilement dans des peptides par SPPS et qui soient suffisamment réactifs chimio- et régiosélectivement en solution aqueuse et en même temps suffisamment stables pour que leur manipulation soit facile.

Le défi est considérablement augmenté si on tient compte du fait qu'une fois que la séquence primaire de la protéine est assemblée par ligation, le polymère synthétique doit se replier de façon identique à la protéine native et conserver son activité.

La recherche de nouvelles méthodes ligations fait encore l'objet d'efforts intenses.²⁸ Les grands axes de recherche consistent à exploiter des réactions péryclics (Diels-Alder,²⁹ cycloadditions dipolaires 1,3³⁰...) ou la catalyse organométallique (couplages de Suzuki³¹ ou

²⁸ Kurpiers, T.; Mootz, H. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1729-1731

²⁹ Araújo, A. D. D.; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Köhn, M.; Schröder, H.; Wacker, R.; Niemeyer, C.; Alexandrov, K.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 296-301

³⁰ Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047

³¹ Chalker, J. M.; Wood, C. S. C.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346-16347

métathèse croisée des oléfines hydrocompatibles³²...) pour tirer parti de l'inertie chimique des partenaires et de la chimiosélectivité exceptionnelle des réactions de couplage.

Parmi les réactions qui possèdent toutes ces caractéristiques, seulement quelques unes ont été utilisées pour la synthèse totale de protéines ou d'analogues structuraux bioactifs de protéines. Nous les avons classées en deux catégories distinctes, les ligations natives et pseudo-natives.

I-3.A – Ligations natives

I-3.A.a – La ligation chimique native (ou Native Chemical Ligation, NCL)

La réaction est basée sur la réaction d'un thioester avec une cystéine N-terminale.

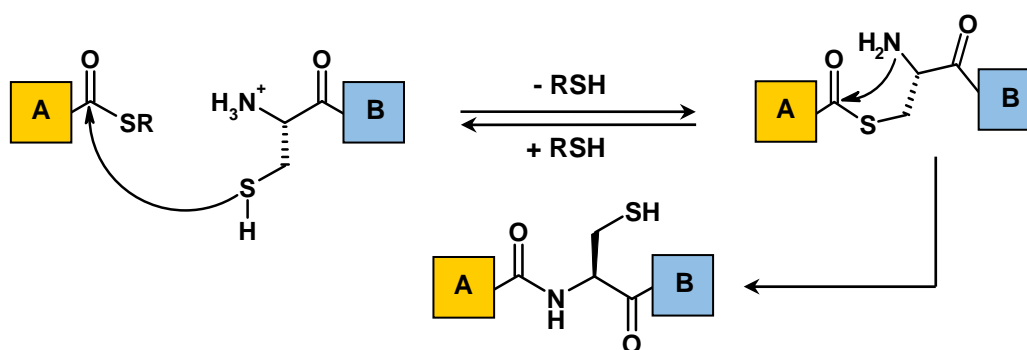


Figure 5 : Principe de la Ligation Chimique Native

La première étape est un processus dynamique. Il se produit une trans-thioestérification réversible en extrémité C-terminale du fragment thioester. Cet intermédiaire se réarrange spontanément par une addition nucléophile de l'amine sur le carbonyle suivie d'une élimination pour fournir une liaison peptidique native (Figure 5).³³ La chimiosélectivité de la réaction provient de la trans-thioestérification, qui permet de rapprocher le carbonyle électrophile et l'amine nucléophile, et de l'activation régiosélective de l'amine voisine au thioester à un pH (~ 7,4) auquel les amines sur les chaînes latérales des lysines sont majoritairement protonées. Le couplage se fait sans épimérisation et sa cinétique dépend de l'encombrement de la chaîne latérale de l'acide aminé portant le thioester.³⁴

³² Lin, Y. A.; Chalker, J. M.; Floyd, N.; Bernardes, G. J. L.; Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9642-9643

³³ Johnson, E. C. B.; Kent, S. B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640-6646

³⁴ Hackeng, T. M.; Griffin, J. H.; Dawson, P. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10068-10073

Le premier exemple de *NCL* est la synthèse d'une protéine de 72 résidus, l'interleukine humaine 8 réalisée Kent et ses collaborateurs (Figure 6).³⁵

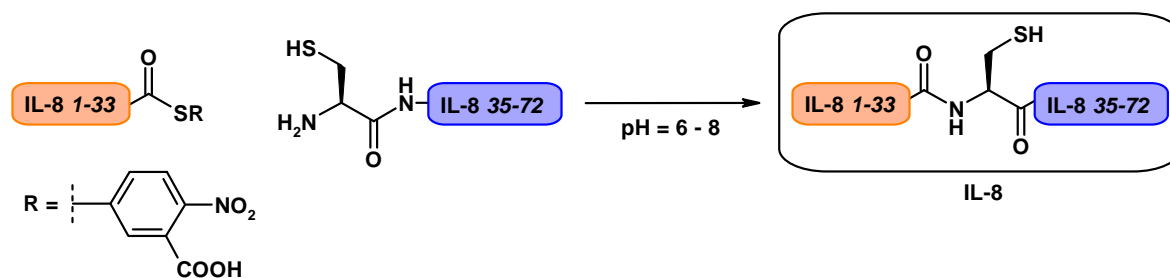


Figure 6 : Synthèse totale de l'interleukine humaine 8 par ligation chimique native³⁵

La *NCL* est probablement la méthode de ligation native la plus populaire et la plus employée. Le succès de cette réaction est illustré par presque un millier de citations du premier article qui la décrit (source : ISI Web of Knowledge 10/01/2010).³⁵ La *NCL* a permis la synthèse de bon nombre de protéines par voie exclusivement chimique ou par combinaison de synthèse chimique et recombinante.³⁶

Toutefois, la méthode possède quelques inconvénients. Les cystéines et les thioesters sont très réactifs vis-à-vis des électrophiles et des nucléophiles respectivement. Les thioesters sont particulièrement instables, sensibles à l'hydrolyse à un pH dépassant la neutralité, ce qui rend leur synthèse et manipulation délicates. Actuellement, la seule méthode universelle pour la synthèse de peptides thioester est la stratégie Boc/*t*Bu qui est de plus en plus proscrite des laboratoires en raison de sa dangerosité (manipulation d'acide fluorhydrique anhydre). Les thioesters sont instables en milieu basique et nucléophile, ce qui rend difficile leur synthèse en stratégie Fmoc/*t*Bu, de sorte qu'il n'existe pas, à ce jour, de méthode donnant un accès facile à ces composés. Enfin, la réaction est spécifique des cystéines N-terminales, or cet aminé est le plus rare d'entre tous (abondance relative : 1,35%),³⁷ ce qui veut dire que le nombre de protéines que l'on peut synthétiser par cette méthode reste limité.

I-3.A.b – Ligations chimiques natives de « deuxième génération »

Toutes les méthodes présentées dans cette partie, décrites comme des *NCL* de deuxième génération, ont été développées pour essayer de dépasser un des principaux inconvénients de la ligation chimique native, la nécessité d'avoir une cystéine au point de ligation. Parmi ces méthodes, la désulfuration et l'utilisation d'auxiliaires sont les stratégies les plus courantes.

³⁵ Dawson, P.; Muir, T.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. *Science* **1994**, 266, 776-779

³⁶ Severinov, K.; Muir, T. W. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 16205-16209

³⁷ Swiss Institute of Bioinformatics; UniProtKB/Swiss-Prot Release 57.13

Les deux méthodes exploitent les caractéristiques uniques de la *NCL* qui sont, l'activation de l'acide carboxylique en extrémité C-terminale sous forme d'un thioester et l'activation régiosélective de l'amine à proximité du thioester (Figure 5).

I-3.A.b.1 – Désulfuration du produit de la *NCL*

La désulfuration de la cystéine ayant servi lors de la *NCL* (Figure 7) rend possible le couplage entre fragments peptidiques à des résidus plus abondants dans la nature comme l'alanyl.^{38,39} La stratégie a été étendue à d'autres résidus comme la valinyle,^{40,41} ou la phénylalanyle.⁴² Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite la protection des thiols présents sur la séquence peptidique (Figure 7).

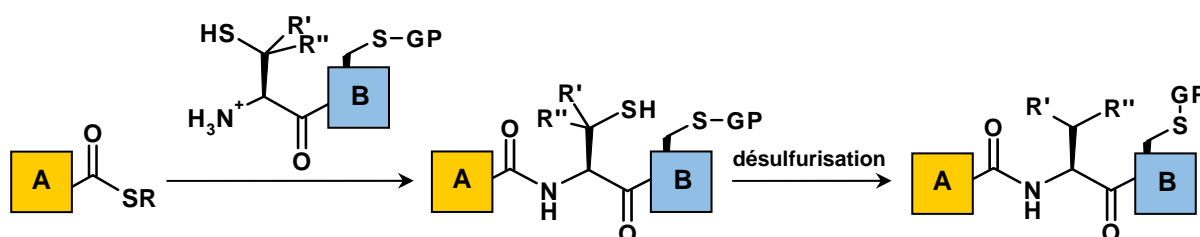


Figure 7 : Principe de la modification du produit de la *NCL* par désulfuration

La désulfuration à l'aide de métaux de transition semble comporter certains inconvénients, comme l'utilisation de larges excès de métaux, l'épimérisation des alcools secondaires (thréonines)⁴³ et la réduction des thioéthers (méthionines).⁴⁴

En revanche, la désulfuration radicalaire, développée par Danishefsky et ses collaborateurs,⁴⁰ semble plus douce,⁴⁵ mais elle n'évite pas l'étape, toujours délicate, de la déprotection des autres cystéines présentes sur la protéine.

I-3.A.b.2 – La ligation chimique native assistée par des auxiliaires

Une alternative à la désulfuration est l'utilisation d'auxiliaires thiolés qui seront éliminés sélectivement après la ligation. Le principal avantage de cette méthode est que l'utilisation d'auxiliaires permet de réaliser des ligations à n'importe quel résidu (Figure 8).

³⁸ Yan, L. Z.; Dawson, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526-533

³⁹ Bang, D.; Makhatadze, G. I.; Tereshko, V.; Kossiakoff, A. A.; Kent, S. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3852-3856

⁴⁰ Wan, Q.; Danishefsky, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248-9252

⁴¹ Haase, C.; Rohde, H.; Seitz, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6807-6810

⁴² Crich, D.; Banerjee, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10064-10065

⁴³ Nishide, K.; Shigeta, Y.; Obata, K.; Inoue, T.; Node, M. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2271-2274

⁴⁴ Smith, M. B.; March, J. Dans *March's Advanced Organic Chemistry- Reactions, Mechanisms, and Structure*; Wiley, 2007; p. 1848-1850

⁴⁵ Garner, J.; Jolliffe, K. A.; Harding, M. M.; Payne, R. J. *Chem. Commun.* **2009**, 6925-6927

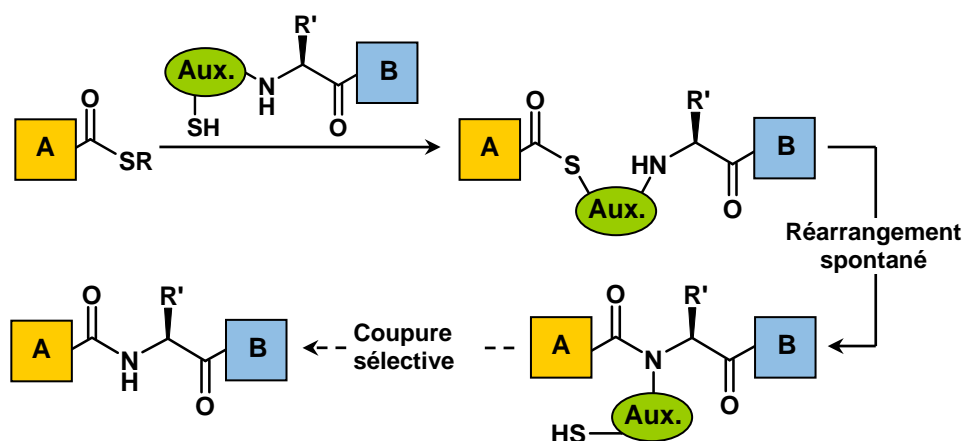


Figure 8 : Principe de ligation chimique native assistée par des auxiliaires

La nature des auxiliaires varie selon leurs stratégies de coupure. Les plus utilisés sont acido-labiles (HF⁴⁶ ou TFA⁴⁷) ou photo-labiles.⁴⁸ Toutefois, des difficultés peuvent découler de la coupure de l'auxiliaire et la substitution de l'amine ralentit le transfert d'acyle final, rendant propices d'autres réactions secondaires.^{49,50}

I-3.A.c – La ligation de Staudinger native⁵¹

Cette méthode a été découverte indépendamment par les équipes de Bertozzi et Raines.^{52,53} Le couplage est basé sur la réaction entre une phosphine et un azoture organique pour former un intermédiaire de type aza-ylure suivi d'une attaque nucléophile de l'azote sur le carbonyle pour fournir *in fine*, une liaison amide native (Figure 9). Ce réarrangement est particulièrement favorisé quand la phosphine est porté par un thioester en extrémité C-terminale.

⁴⁶ Botti, P.; Carrasco, M. R.; Kent, S. B. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1831-1833

⁴⁷ Offer, J.; Dawson, P. E. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 23-26

⁴⁸ Chatterjee, C.; McGinty, R.; Pellois, J.; Muir, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2814-2818

⁴⁹ Wu, B.; Chen, J.; Warren, J. D.; Chen, G.; Hua, Z.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4116-4125

⁵⁰ Nagaike, F.; Onuma, Y.; Kanazawa, C.; Hojo, H.; Ueki, A.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4465-4468

⁵¹ Köhn, M.; Breinbauer, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106-3116

⁵² Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143

⁵³ Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941

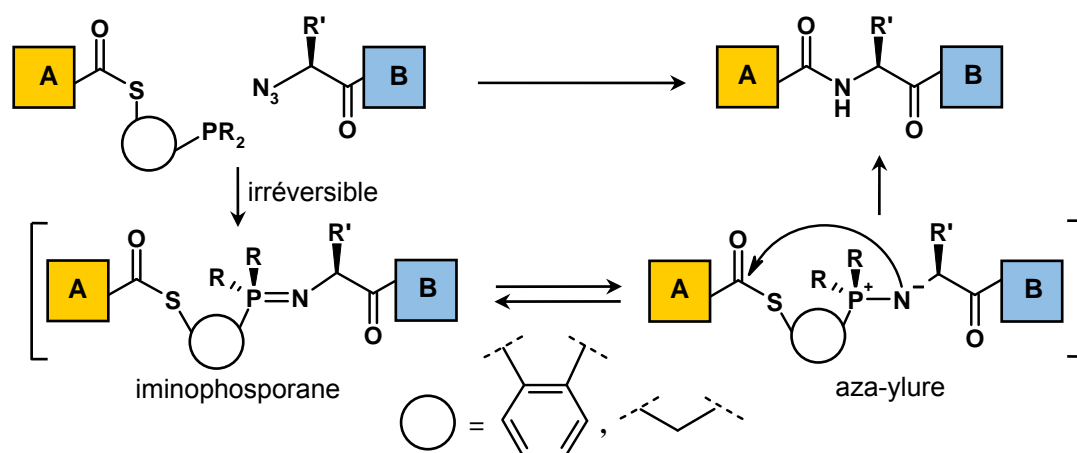


Figure 9 : Principe de la ligation de Staudinger

L'avantage de cette méthode est que la ligation s'effectue indépendamment du résidu au point de déconvolution, sur le peptide. La chimiosélectivité de l'attaque d'une phosphine sur un azote est supérieure à celle du reste des méthodes présentées jusqu'ici et compatible avec toutes les fonctionnalités présentes sur un peptide.⁵⁴

Toutefois, cette méthode hérite de toutes les difficultés de la synthèse d'un thioester en y ajoutant en plus la présence d'un groupement phosphine oxydable. De plus, les études mécanistiques et les résultats expérimentaux envisagent une compétition entre l'attaque de l'eau sur le phosphonium de l'aza-ylure et l'attaque de l'amine sur le carbonyl (Figure 9). De façon à favoriser la deuxième réaction, les auteurs suggèrent de se placer à des concentrations en peptides de l'ordre de 100 mM, difficilement applicables à la ligation de peptides.⁵⁵

Il faut également souligner que, malgré tout son potentiel et d'excellents résultats,⁵⁶ cette méthode n'a pas encore été utilisée pour la synthèse de protéines par ligation chimique de peptides.

1-3.A.d – Nouvelles méthodes de formation d'un amide compatibles avec la ligation de peptides déprotégés

En dépit de la difficulté de former des liaisons amide en milieu aqueux de façon chimio- et régiosélective, de nouvelles méthodes prometteuses continuent d'émerger mais n'ont pas encore été utilisées pour la synthèse de protéines fonctionnelles (Figure 10). Dans ce domaine, il convient d'attirer l'attention sur une méthode particulièrement prometteuse mettant en jeu la

⁵⁴ Staudinger, H.; Meyer, J. *Helv. Chim. Acta* **1919**, 2, 635-646

⁵⁵ Soellner, M. B.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8820-8828

⁵⁶ Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, 287, 2007-2010

réaction d'un α -cétoacide et d'une hydroxylamine pour fournir une liaison amide par condensation et décarboxylation concomitante.

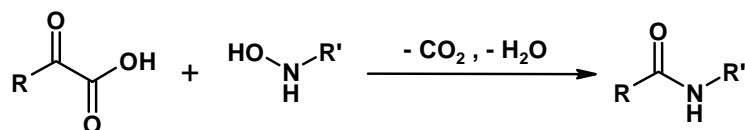


Figure 10 : Nouvelles méthodes de formation d'un amide compatibles avec la ligation de peptides déprotégés⁵⁷

I-3.B – Ligations pseudo-natives

Nous avons considéré comme méthodes pseudo-natives l'ensemble des techniques de ligation qui fournissent un mime de liaison amide, incluant isostères et bioisostères.

I-3.B.a – Ligation thioéther

La ligation thioéther exploite la réactivité unique de la chaîne latérale des résidus cystéine. La fonction thiol est un bon nucléophile et va pouvoir réaliser des réactions d'addition ou de substitution nucléophiles sélectivement par rapport aux amines.

La ligation avec un partenaire bromoalkyle a été employée avec succès dans la synthèse d'un analogue de la protéase de l'HIV-1 (Figure 11).⁵⁸ Au cours de la synthèse, le fragment N-terminal de la protéine cible, fonctionnalisé sous forme d'une thioéthylamide à son extrémité C-terminale, réagit avec le fragment C-terminal de la protéine cible, fonctionnalisé en extrémité N-terminale par un groupement bromoacétyle.

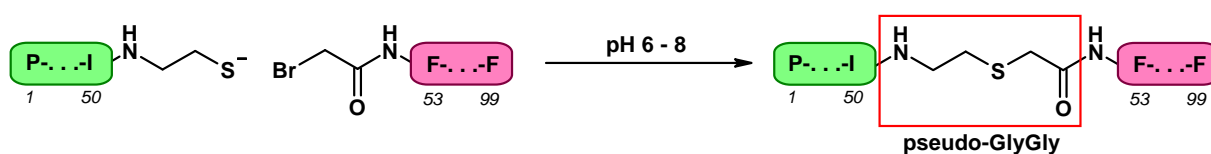


Figure 11 : Exemple de ligation thioéther, synthèse d'un analogue de la protéase de HIV-1 par ligation thioester d'après Englebretsen et al.⁵⁸

Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle n'est pas sélective d'un thiol en particulier sur la séquence d'un peptide, ce qui veut dire qu'elle n'est utilisable que s'il n'y a qu'une seule cystéine (voire aucune) sur la séquence de la protéine native.

⁵⁷ Bode, J. W.; Fox, R. M.; Baucom, K. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248-1252

⁵⁸ Englebretsen, D. R.; Garnham, B. G.; Bergman, D. A.; Alewood, P. F. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8871-8874

I-3.B.b – Ligation thioester

Elle est proche de la ligation thioéther, puisqu'il s'agit du même partenaire électrophile. Au cours de la réaction, un thiocarboxylate réagit avec un bromoacétyle selon une réaction de substitution nucléophile pour fournir un thioester (Figure 12).

La ligation thioester peut être considérée comme une technique pseudo-native puisqu'elle permet d'obtenir un isostère de la liaison amide. On peut remarquer que cette technique de ligation est la première à avoir été réalisée avec des peptides entièrement déprotégés et a conduit à la synthèse totale d'un analogue fonctionnel de la protéase de HIV-1 (Figure 12).⁵⁹

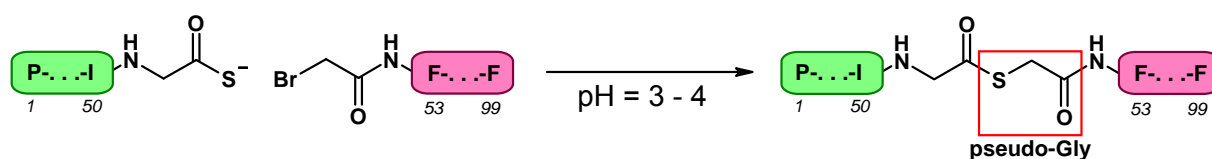


Figure 12 : Synthèse d'un analogue de la protéase de HIV-1 par ligation thioester d'après Schnolzer et al.⁵⁹

Malgré ces résultats convaincants, cette méthode possède les nombreux désavantages de la ligation thioéther en y ajoutant le fait qu'elle impose l'utilisation de D-bromo-acides ou la déconvolution exclusive aux résidus glycyle (Figure 12). De plus, la liaison thioester est instable à des pH dépassant la neutralité, ce qui limite la manipulation et la stabilité du produit de ligation.

I-3.B.c – Ligation de type imine : thiaprolines et oxaprolines

Mises au point par Liu et Tam⁶⁰ ces ligations mettent en jeu la condensation d'un aldéhyde sur un β -aminothiol ou un β -aminoalcool.

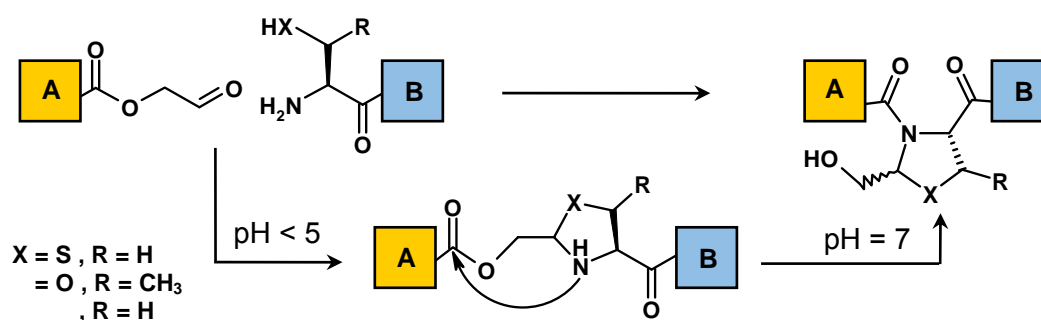


Figure 13 : Principe de la ligation pseudoproline

⁵⁹ Schnolzer, M.; Kent, S. *Science* **1992**, 256, 221-225

⁶⁰ Liu, C. F.; Tam, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 6584-6588

La fonction aldéhyde forme une imine sur laquelle vient s'additionner la fonction thiol pour former une thiazolidine, le produit de couplage obtenu peut subir un transfert d'acyle de O vers N pour fournir quantitativement une liaison amide (Figure 13).^{61,62}

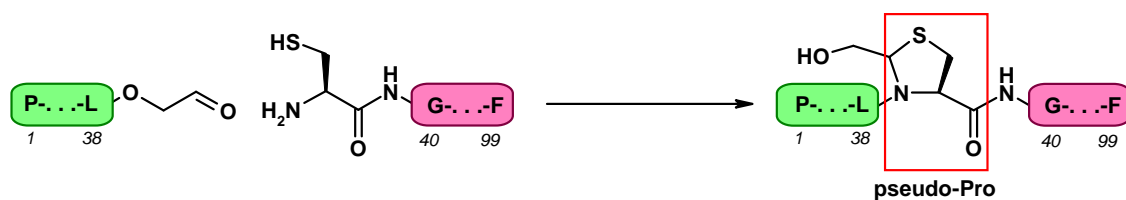


Figure 14 : Synthèse d'un analogue de la protéase de HIV-1 par ligation thioester d'après Liu et al.⁶²

Cette ligation présente une excellente chimiosélectivité mais la grande réactivité des aldéhydes vis-à-vis des nucléophiles (notamment envers les amines des chaînes latérales des lysines) et des cystéines N-terminales envers les électrophiles peut s'avérer problématique.

⁶¹ Liu, C.; Tam, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4149-4153

⁶² Liu, C.; Rao, C.; Tam, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 307-312

PARTIE II – LIGATION CHIMIQUE DE PEPTIDES SUCCESSIVE

II-1 – Problématique

Le protéome humain est l'ensemble des protéines exprimées par le génome humain. La figure 15 illustre l'abondance des protéines exprimées par le génome humain en fonction de leur taille et met en évidence que les protéines accessibles par SPPS (de taille inférieure à 50 résidus) ne constituent qu'un faible pourcentage du protéome (environ 5%). De plus, nous constatons également qu'une seule ligation (<100 acides aminés) ne donne accès qu'à environ 15% du protéome humain.

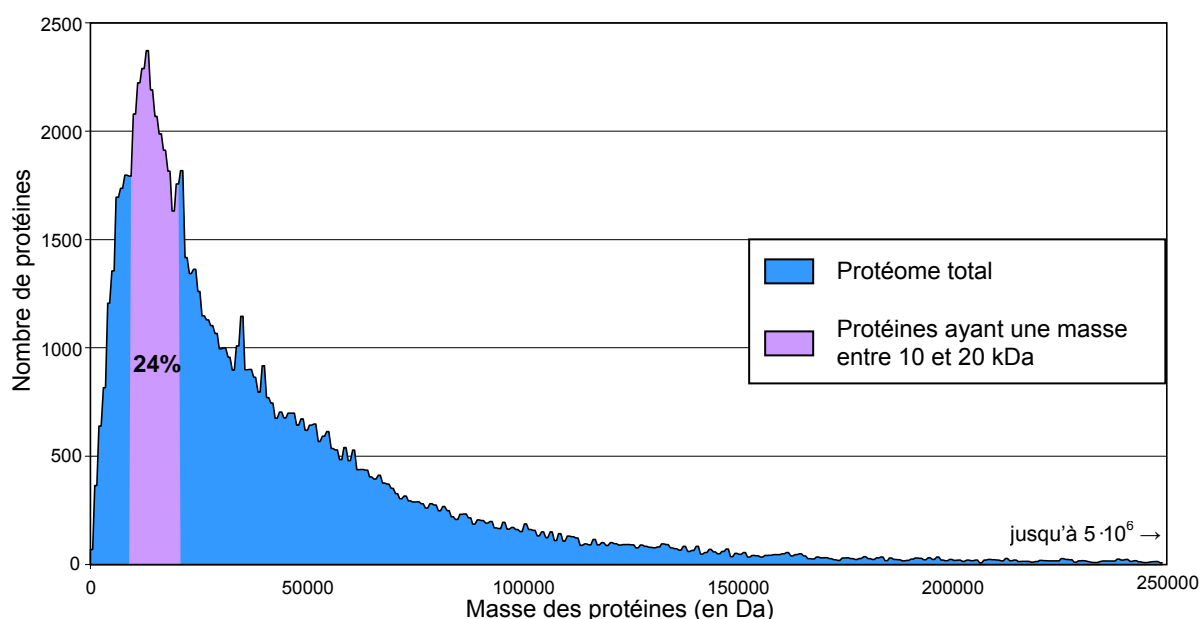


Figure 15 : Graphique représentant le nombre de protéines du protéome humain en fonction de leur masse molaire

Il est nécessaire de pouvoir réaliser plusieurs ligations successives de façon à atteindre des protéines d'une masse avoisinant les 20 kDa et fournissant ainsi une méthode de synthèse chimique à environ 38% du protéome humain.⁶³ La multi-ligation de peptides augmente de façon considérable les cibles biologiques potentielles de la synthèse chimique de peptides, puisqu'environ 24% du protéome humain (Figure 15, partie mauve) possède une masse entre 10000 (limite de la mono-ligation de peptides) et 20000 (limites actuelles de la multi-ligation de peptides) et qui n'est donc accessible que par multi-ligation chimique de peptides. A ce jour, seules quelques dizaines de protéines de cette taille ont pu être obtenues par voie chimique.

⁶³ Cadene, M.; Fenyó, D. *Communication personnelle basée sur une analyse algorithmique de l'International Protein Index v.19/12/2009*

II-2 – Stratégies de multi-ligation de peptides

Deux stratégies ont principalement été décrites jusqu'ici :

- une approche mixte, en utilisant deux méthodes de ligation mutuellement compatibles (Figure 16).

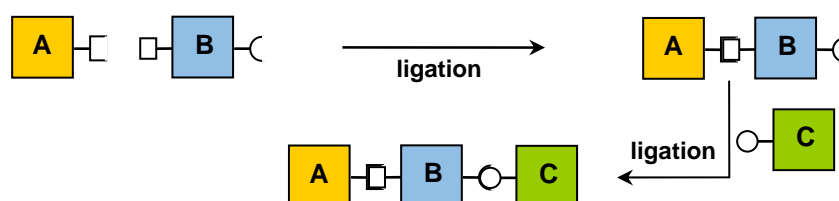


Figure 16 : Principe de ligations successives par utilisation de méthodes de ligation mixtes

- une même méthode de ligation, utilisée plusieurs fois, en masquant un partenaire lors d'une première ligation (Figure 17).

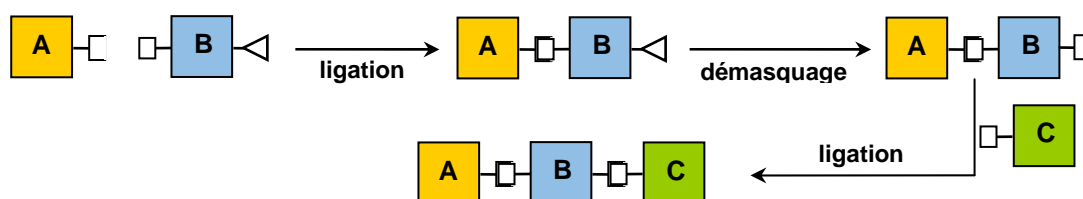


Figure 17 : Principe de ligations successives par utilisation de groupes protecteurs

II-2.A – Synthèse de protéines par ligations mixtes

II-2.A.a – Principe

Cette stratégie exploite la compatibilité mutuelle ou une compatibilité partielle entre différentes méthodes de ligation. Elle s'appuie sur la chimiosélectivité des réactions de ligation qui autorise leur utilisation en tandem (Figure 16).

L'efficacité de l'approche est illustrée par deux exemples de cette approche de multi-ligation en tandem utilisés pour la synthèse de protéines ou d'analogues de protéines.

II-2.A.b – Ligations mutuellement compatibles : thioester - oxime

Un bon exemple est l'utilisation conjointe de la ligation oxime et thioester dans la synthèse de l'analogue de la protéine cMyc-Max (Figure 18).

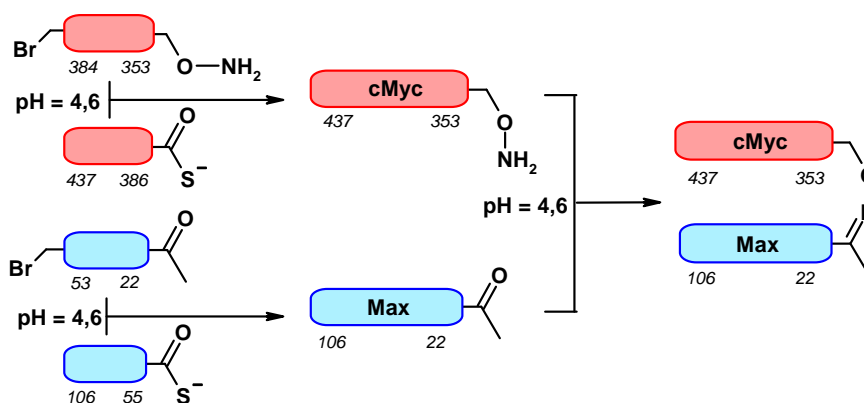


Figure 18 : Combinaison de deux méthodes ligation : thioester et oxime d'après Canne et al.⁶⁴

Un contrôle cinétique de la thioestérification lors de l'assemblage de cMyc conduit à une substitution préférentielle du partenaire bromoacétyle par le thiocarboxylate pour fournir exclusivement le peptide-amino-oxy cMyc(353-437). Parallèlement, une thioestérification analogue fournit le peptide-aldéhyde Max(22-106). Les deux peptides sont ensuite couplés par condensation du fragment carbonylé avec le fragment amino-oxy pour fournir un analogue fonctionnel de la protéine cible.

II-2.A.c – Ligations partiellement compatibles : association des ligations thioester et pseudoproline

Tam et ses collaborateurs ont proposé la combinaison de la ligation native et la ligation pseudoproline.⁶⁵

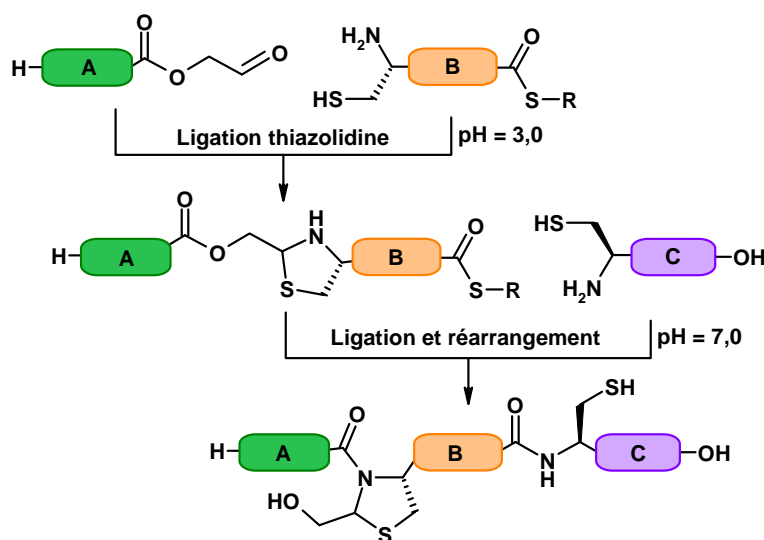


Figure 19 : Combinaison de deux méthodes ligation : NCL et pseudoproline d'après Tam et al.

⁶⁴ Canne, L. E.; Ferre- D'Amare, A. R.; Burley, S. K.; Kent, S. B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2998-3007

⁶⁵ Tam, J. P.; Yu, Q.; Yang, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2487-2494

Même si les deux ligations, pseudoproline et thioester, ont le même partenaire nucléophile, une cystéine N-terminale, la formation d'une thiazolidine est favorisée à pH 3, évitant ainsi une cyclisation du fragment B (Figure 19). Le fragment obtenu AB est alors mis en conditions de ligation native, à pH neutre, pour sa condensation avec le fragment C, déclenchant par la même occasion le réarrangement de la thiazolidine en pseudoproline. Il est important de noter que l'ordre d'assemblage des fragments et un contrôle fin des conditions réactionnelles sont importants étant donné que les ligations thiazolidine et la *NCL* ont le même partenaire nucléophile.

II-2.A.d – Avantages et inconvénients de l'approche mixte

Si l'utilisation de ligations en tandem possède l'avantage indéniable de simplifier la stratégie d'assemblage de la protéine, elle cumule les défauts liés à chaque technique. De plus, puisque toutes les réactions de ligation exploitent des réactions d'addition ou de substitution nucléophiles sur des partenaires électrophiles, la ligation en tandem impose d'avoir un contrôle très fin des conditions réactionnelles de façon à éviter toute compétition entre réactions de ligation.

Nous pouvons également souligner que le nombre de techniques de ligation mutuellement compatibles est très limité et, par conséquent, le nombre de ligations qu'on peut effectuer par cette stratégie l'est aussi.

II-2.B – Synthèse par masquage d'un partenaire de ligation

Une autre stratégie plus versatile réside dans le masquage d'un des partenaires de ligation pour ensuite le démasquer et continuer l'assemblage d'une protéine en utilisant toujours la même méthode de ligation (Figure 17).

II-2.B.a – Ligations chimiques natives successives

La synthèse de la crambine (46 résidus et très difficile à synthétiser par SPPS linéaire) par ligation chimique native successive est une excellente illustration de cette approche (Figure 20).⁶⁶

⁶⁶ Bang, D.; Kent, S. B. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534-2538

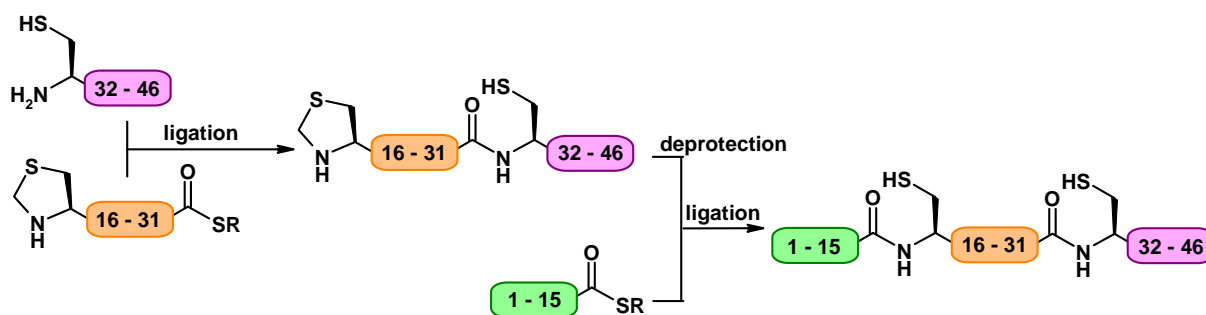


Figure 20 : Synthèse de la crambine par ligation chimique native successive d'après Bang et al.⁶⁶

La première ligation est réalisée de façon sélective grâce au masquage d'une cystéine N-terminale sous la forme d'une thiazolidine. La coupure de ce groupe protecteur en conditions douces et chimiosélectives par l'hydrochlorure de méthoxyamine permet d'obtenir une nouvelle cystéine N-terminale qui servira dans une nouvelle ligation pour fournir la crambine. Le groupe protecteur des cystéines Acn a également été utilisé avec succès dans la synthèse d'un analogue de l'EPO (166 résidus) par triple ligation native successive,⁶⁷ ainsi que pour la synthèse de la crambine selon une stratégie analogue.⁶⁸

Plus récemment, Kent et ses collaborateurs ont amélioré et étendu cette approche de multi-ligation en exploitant la différence de réactivité de thioesters aryliques et aliphatiques et réalisant ainsi la synthèse du lysozyme humain (130 résidus, 8 cystéines, 4 ponts disulfures) par multi-NCL selon une approche convergente (Figure 21).⁶⁹

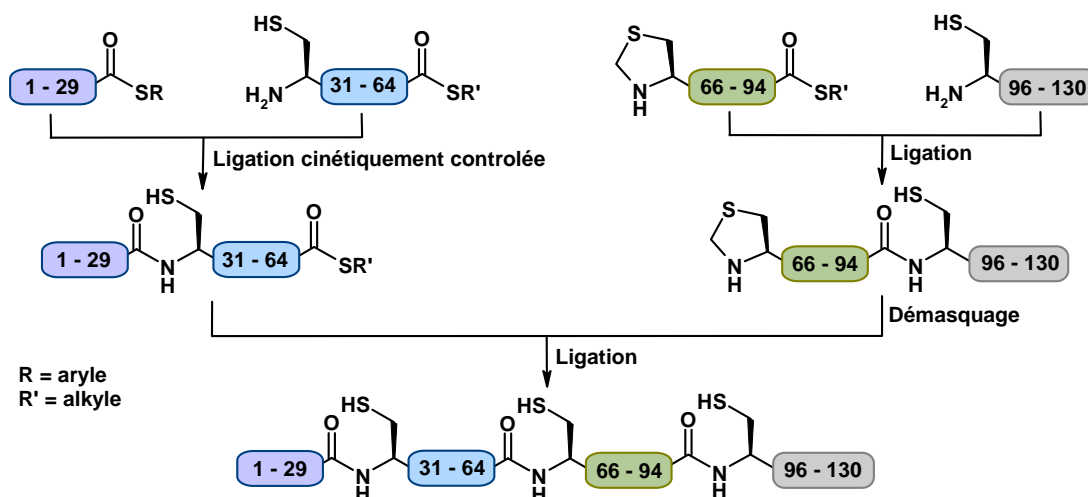


Figure 21 : Synthèse convergente du lysozyme humain d'après Durek et al.⁶⁹

⁶⁷ Kochendoerfer, G. G.; Chen, S.; Mao, F.; Cressman, S.; Traviglia, S.; Shao, H.; Hunter, C. L.; Low, D. W.; Cagle, E. N.; Carnevali, M.; Gueriguian, V.; Keogh, P. J.; Porter, H.; Stratton, S. M.; Wiedeke, M. C.; Wilken, J.; Tang, J.; Levy, J. J.; Miranda, L. P.; Crnogorac, M. M.; Kalbag, S.; Botti, P.; Schindler-Horvat, J.; Savatski, L.; Adamson, J. W.; Kung, A.; Kent, S. B. H.; Bradburne, J. A. *Science* **2003**, 299, 884-887

⁶⁸ Bang, D.; Chopra, N.; Kent, S. B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1377-1383

⁶⁹ Durek, T.; Torbeev, V. Y.; Kent, S. B. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 4846-4851

II-2.B.b – Ligations successives sur support solide

L'approche de ligation successive ou convergente est particulièrement lente en raison des purifications de chaque intermédiaire de synthèse mais également à cause de la manipulation difficile des peptides. Kent et ses collaborateurs ont proposé de réaliser des ligations successives sur support solide.⁷⁰ Cette méthode rassemble les avantages de la synthèse sur phase solide et de la ligation de peptides et représente un excellent moyen de synthétiser des mimés de protéines allant jusqu'à 200 résidus.

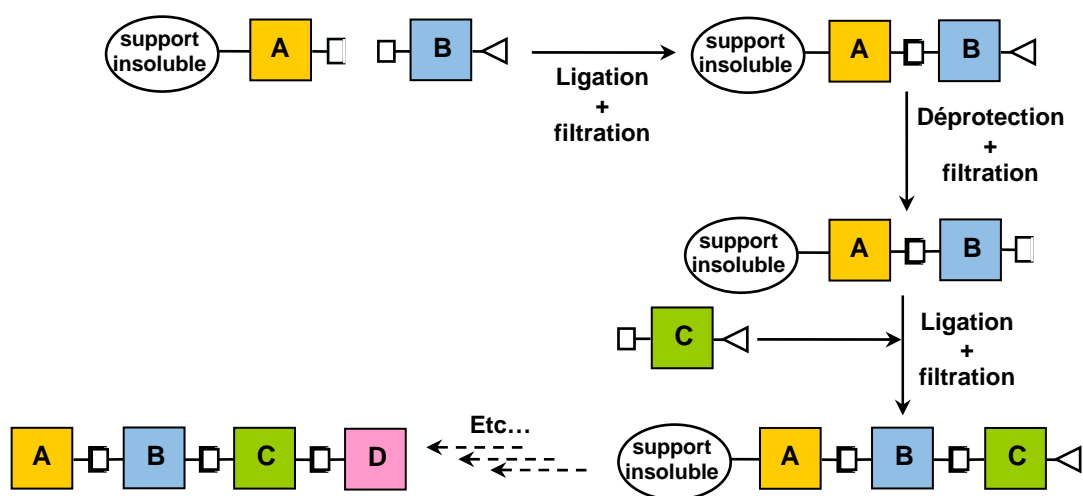


Figure 22 : Principe de la ligation successive sur phase solide

Les étapes de purification lors de la ligation et de la déprotection sont alors accélérées de façon drastique (Figure 22). A notre connaissance, cette approche a uniquement été appliquée à deux méthodes de ligation, la *NCL*, par utilisation du groupe protecteur thiazolidine,⁷⁰ et la ligation oxime, par utilisation du groupe protecteur allyloxycarbonyle.⁷¹

Cette méthode sera présentée et étudiée plus en détail ultérieurement (cf. Partie VI-2.A p. 115).

⁷⁰ Canne, L. E.; Botti, P.; Simon, R. J.; Chen, Y.; Dennis, E. A.; Kent, S. B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8720-8727

⁷¹ Decostaire, I. Université d'Orléans, 2008

II-3 – Conclusion

La ligation chimique de peptides donne accès à des protéines ou à des analogues de protéines de structure parfaitement définie, autorisant toute sorte de modifications impossibles à réaliser par synthèse recombinante.⁷² Tout au long de cette partie, nous avons pu étudier la variété de techniques de ligation chimique de peptides utilisées en synthèse de protéines et d'analogues de protéines.

Nous avons également pu constater que la faiblesse de chaque technique utilisée repose principalement sur la chimiosélectivité des réactions de couplage. En effet, les techniques utilisées exploitent des additions ou des substitutions nucléophiles sur des électrophiles ce qui cause des problèmes de :

- Chimiosélectivité des réactions : la *NCL* nécessite une cystéine N-terminale, ce qui limite son applicabilité.
- Difficulté d'obtention des fragments peptidiques de départ : certains fonctions partenaires de ligation sont difficiles à introduire dans des peptides et à synthétiser, c'est le cas des peptides thioesters.
- Stabilité des fragments peptidiques de départ : si certains partenaires de ligation sont faciles à introduire dans des peptides et à synthétiser, leur manipulation est délicate en raison de leur grande réactivité, c'est le cas des peptides amino-oxy utilisés en ligation oxime ou des thioesters.

La multi-ligation successive de peptides représente un formidable outil pour la synthèse de protéines inaccessibles par SPPS ou par mono-ligation, mais hérite des inconvénients des techniques de ligation actuelles.

Parmi les méthodes présentées, la multi-ligation par masquage d'un partenaire de ligation est la méthode la plus versatile et la plus populaire, particulièrement si elle peut être réalisée sur support solide. Toutefois, cette stratégie nécessite la mise au point d'une méthode de masquage et démasquage efficace d'un des partenaires de ligation dans des conditions douces et très chimiosélectives, compatibles avec un peptide déprotégé.

⁷² Milton, R.; Milton, S.; Kent, S. *Science* **1992**, 256, 1445-1448

PARTIE III – LA CYCLOADDITION DES ALCYNES ET LES AZOTURES CATALYSEE PAR LE CUIVRE

III-1 – Introduction

La cycloaddition des azotures sur les alcynes terminaux catalysée par le cuivre (I) ou CuAAC (Figure 23) a été décrite pour la première fois en 2001 par Meldal et Tornøe.⁷³ Elle a, par la suite, fait l'objet d'une publication simultanée par les groupes de Meldal⁷⁴ et Sharpless en 2002⁷⁵ et suscite depuis un vif intérêt dans tous les domaines de la chimie. En effet, elle représente à la perfection le concept de « *click chemistry* » énoncé auparavant par Sharpless⁷⁶ : quantitative, chimiosélective, reproductible, fiable, ne génère pas de co-produits nocifs, insensible aux conditions réactionnelles, compatible avec une très large gamme de fonctions chimiques et peut être réalisée en milieu aqueux ou organique.

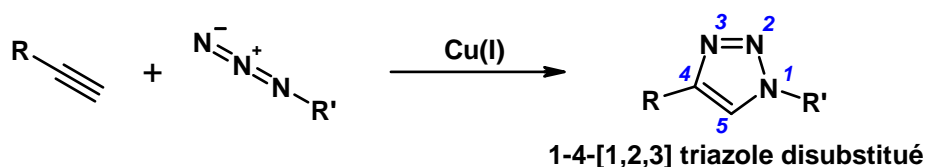


Figure 23 : Cycloaddition des azotures sur les alcynes catalysée par le cuivre

Plus de 1600 citations des premiers articles la décrivant témoignent du succès de cette réaction auprès de la communauté scientifique (Figure 24).

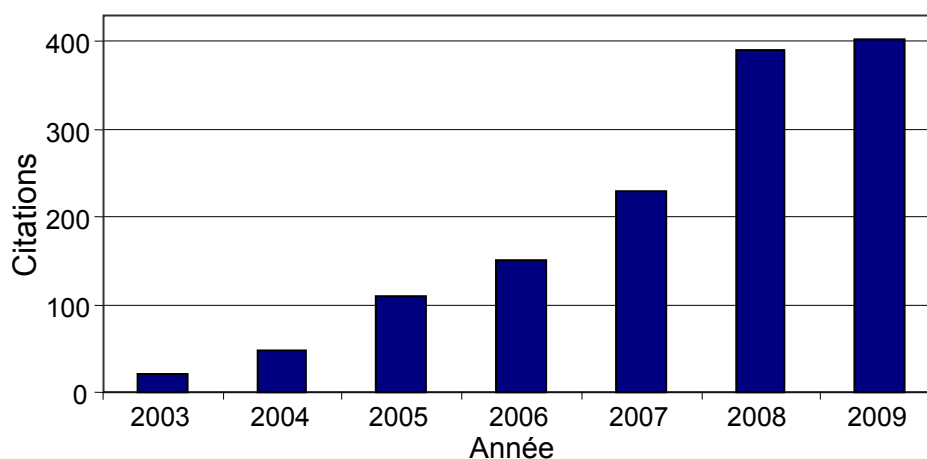


Figure 24 : Moyenne des citations des premiers articles sur la CuAAC par année (Source : ISI Web of Knowledge 10/01/2010)

⁷³ Tornøe, C. W.; Meldal, M. Dans *Peptides 2001*; American Peptide Society and Kluwer Academic Publishers: San Diego, 2001; Vol. Peptides 2001, p. 263-264

⁷⁴ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064

⁷⁵ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599

⁷⁶ Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021

Même si elle est utilisée dans presque tous les domaines de la chimie, la CuAAC est encore relativement peu utilisée en chimie des peptides, même si elle présente toutes les caractéristiques d'une excellente méthode de ligation. Pour étudier l'applicabilité de cette réaction à la synthèse d'analogues de protéines, il convient d'analyser différents aspects concernant cette réaction, son mécanisme et les propriétés des 1,2,3-triazoles 1,4 disubstitués.

III-2 – La réaction

III-2.A – Mécanisme réactionnel

Le mécanisme de la cycloaddition catalysée par le cuivre n'est pas encore connu avec précision. Diverses études expérimentales ont prouvé que la réaction est d'ordre 2 par rapport à l'alcyne et au cuivre.^{77,78} Ces résultats sont en accord avec les études théoriques de la réaction qui écartent un mécanisme de type monomoléculaire où un seul atome de cuivre (I) aligné sur la liaison C-C entrerait en réaction avec un azoture organique.⁷⁹ Meldal a comparé les observations expérimentales, les calculs théoriques et les structures cristallographiques de complexes du Cu(I) disponibles dans la Cambridge Crystallography Database de façon à proposer le mécanisme présenté par le Schéma 1.⁸⁰

- Le cuivre (I) se coordonne à la triple liaison C-C. S'ensuit un abaissement du pKa du proton de l'alcyne vrai qui favorise, après déprotonation, la formation d'un alcynylcuprate.
- L'azoture est coordonné par un atome de cuivre à proximité de l'alcynylcuprate et s'additionne sur l'alcyne pour donner un métallocycle à six centres.
- Il se produit une extrusion du cuivre de l'intermédiaire cyclique. Pour fournir, après reprotonation, un 1-4 [1,2,3] triazole disubstitué.

⁷⁷ Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2210-2215

⁷⁸ Aucagne, V.; Berna, J.; Crowley, J. D.; Goldup, S. M.; Hanni, K. D.; Leigh, D. A.; Lusby, P. J.; Ronaldson, V. E.; Slawin, A. M. Z.; Viterisi, A.; Walker, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11950-11963

⁷⁹ Straub, B. F. *Chem. Commun.* **2007**, 3868-3870

⁸⁰ Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015

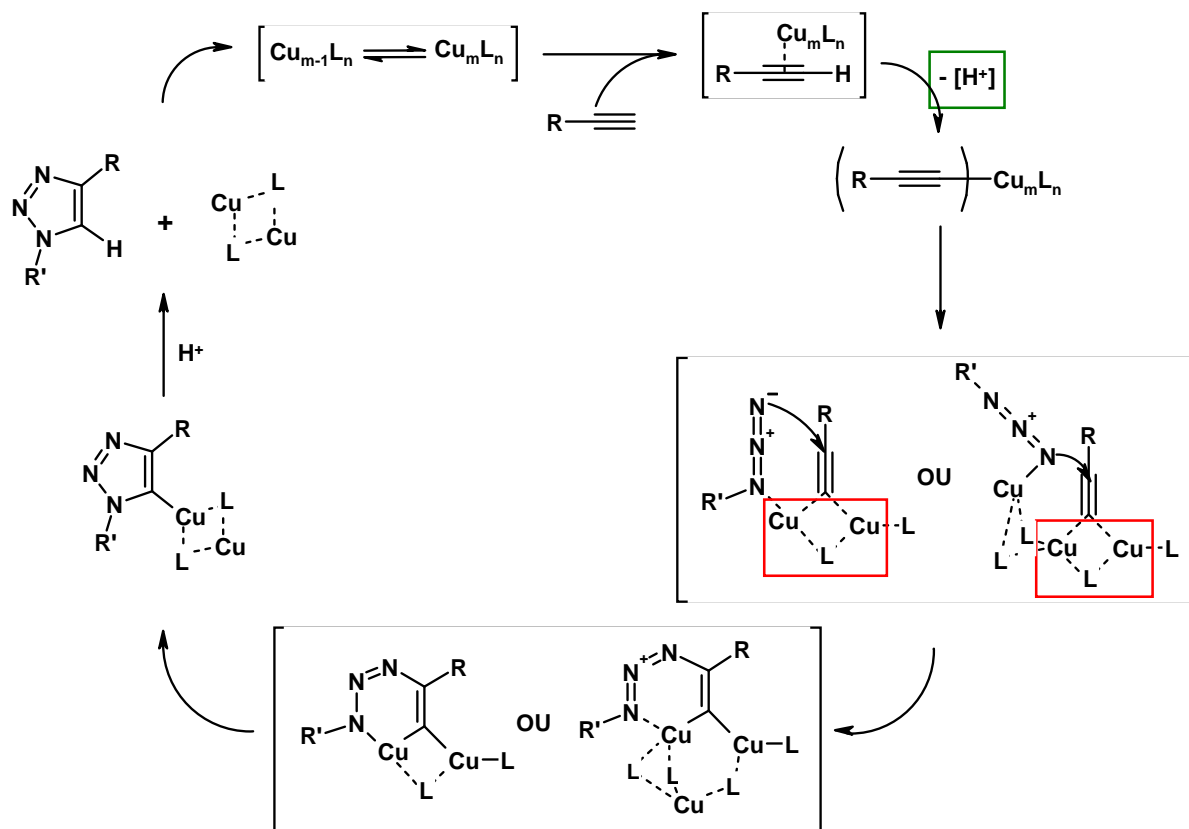


Schéma 1 : Mécanisme réactionnel proposé de la CuAAC d'après Meldal et Tornøe⁸⁰

Il faut retenir plusieurs informations importantes de ce mécanisme qui, bien qu'hypothétique, résume aussi bien les études théoriques que les résultats expérimentaux.

- La formation du complexe réactif d'alcyne-cuprate implique la coordination de plusieurs atomes de cuivre par l'alcyne (Schéma 1, encadré rouge), ce qui implique que la concentration en espèce catalytique est un paramètre extrêmement important pour réaliser une CuAAC.
- La présence d'un accepteur de protons est également essentielle (Schéma 1, encadré vert). Lorsque la CuAAC est réalisée en milieu organique, une base azotée comme la DIEA, la pyridine ou tout simplement l'eau ou un alcool sont souvent utilisées. En milieu aqueux, la réaction est fortement influencée par le pH et l'utilisation de tampons est fortement conseillée en cas de cycloaddition entre des espèces ayant des propriétés acido-basiques.

III-2.B – Les sources de cuivre (I)

La CuAAC est une réaction robuste pour la synthèse de 1,2,3-triazoles qui peut être réalisée dans une grande variété de conditions et entre une grande variété de substrats en présence de cuivre (I) correctement solvato. Le plus souvent, la source employée dépend du milieu réactionnel choisi. Si la réaction est effectuée en milieu strictement anhydre ou dans des milieux organiques non miscibles à l'eau, ce sont les sels d'halogénure (particulièrement l'iodure de cuivre) qui sont utilisés. En milieu aqueux, c'est souvent la formation *in situ*, à partir de Cu(II) accompagné d'un réducteur (habituellement l'ascorbate de sodium), qui est préconisée.⁷⁵

Dans tous les cas, le succès de la cycloaddition repose sur la conservation du cuivre (I) à une concentration suffisante pour que la réaction ait lieu de façon quantitative. Or, le Cu(I) est instable, cette espèce se dismute et est sensible à l'oxydation, de sorte qu'il est difficile de garder une concentration de cuivre (I) suffisante jusqu'à la fin de la réaction. Ce problème augmente avec la dilution et particulièrement en milieu aqueux.

III-2.C – Influence de l'alcyne et de l'azoture sur la réaction

La réaction est peu sensible à l'encombrement. En revanche, l'environnement électronique de l'alcyne ou l'azoture semble jouer un rôle plus important puisque celui-ci conditionne la formation de l'alcyne de cuivre ou la coordination de l'azoture à celui-ci. La taille des substrats, lors de bioconjugaison, peut également rallonger considérablement les temps de réaction.⁸¹

En somme, à l'exception de quelques rares cas particuliers, la CuAAC est une réaction qui admet une très large gamme de substrats.

III-2.D – Peptides, protéines et CuAAC

La CuAAC est particulièrement prisée pour la fonctionnalisation de biomolécules polyfonctionnalisées en raison de son excellente chimiosélectivité. Pourtant, il n'existe aucun exemple, à ce jour, de cycloaddition réalisée en conditions de ligations de peptides. Au début de la préparation de cette thèse, il existait de nombreux exemples de CuAAC qui démontrent la compatibilité de la réaction avec les peptides protégés. Les exemples mettant en jeu la

⁸¹ Humenik, M.; Huang, Y.; Wang, Y.; Sprinzl, M. *ChemBioChem* **2007**, 8, 1103-1106

CuAAC sur des peptides déprotégés sont beaucoup plus rares et il n’y a en a aucun, à notre connaissance, qui démontre la compatibilité de la CuAAC avec les acides aminés ayant des résidus potentiellement oxydables (méthionine, histidine et tryptophane).

III-2.D.a – CuAAC sur des peptides protégés

Nous avons choisi d’illustrer la compatibilité de la CuAAC avec les peptides protégés grâce à trois exemples que nous avons jugés pertinents.

La synthèse des premiers triazo-peptides a été décrite par Meldal et ses collaborateurs, qui ont utilisé la CuAAC pour fonctionnaliser un peptide avec des sucres azotés et des dérivés d’acides aminés azotés protégés afin de produire des bibliothèques d’inhibiteurs de protéases selon une approche de *split and mix* (Figure 25).⁸²

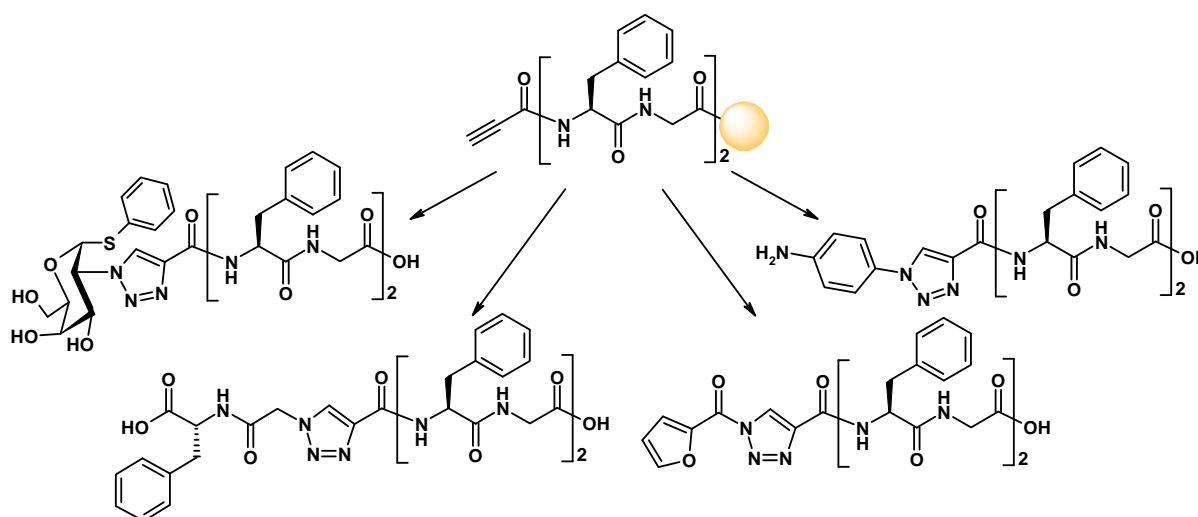


Figure 25 : Synthèse de bibliothèques de peptido-triazoles sur phase solide d’après Tornøe et al.⁸²

Angelo et Arora ont proposé une synthèse sur phase solide d’oligomères de triazoles qui présentent des propriétés de repliement proches de celles des protéines (Figure 26).⁸³

⁸² Tornøe, C. W.; Sanderson, S. J.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Meldal, M. J. *Comb. Chem.* **2004**, *6*, 312-324

⁸³ Angelo, N. G.; Arora, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17134-17135

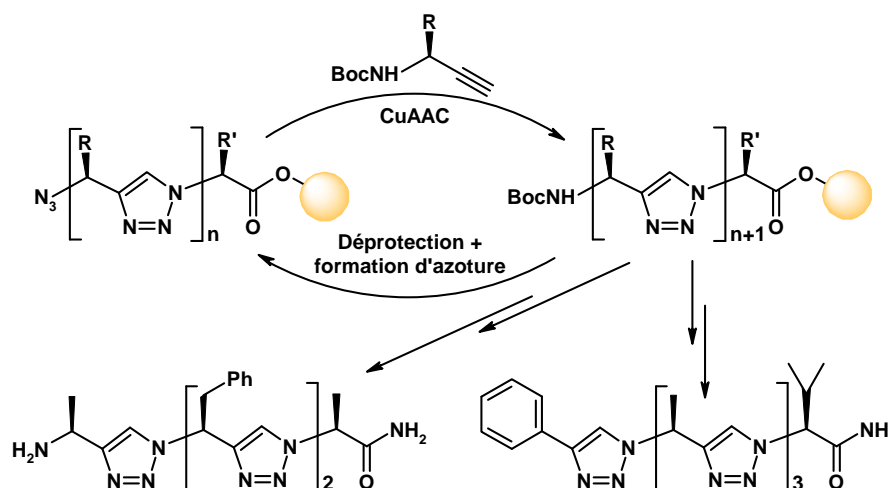


Figure 26 : Synthèse de triazolamères par CuAAC successive d'après Angelo et Arora⁸⁴

Ces résultats confirment la compatibilité des peptides et des chaînes latérales aliphatiques des acides aminés avec des cycles répétés de CuAAC.

Franke *et al.* ont proposé la fonctionnalisation d'un châssis moléculaire avec des peptides protégés à l'aide de la CuAAC (Figure 27).⁸⁵

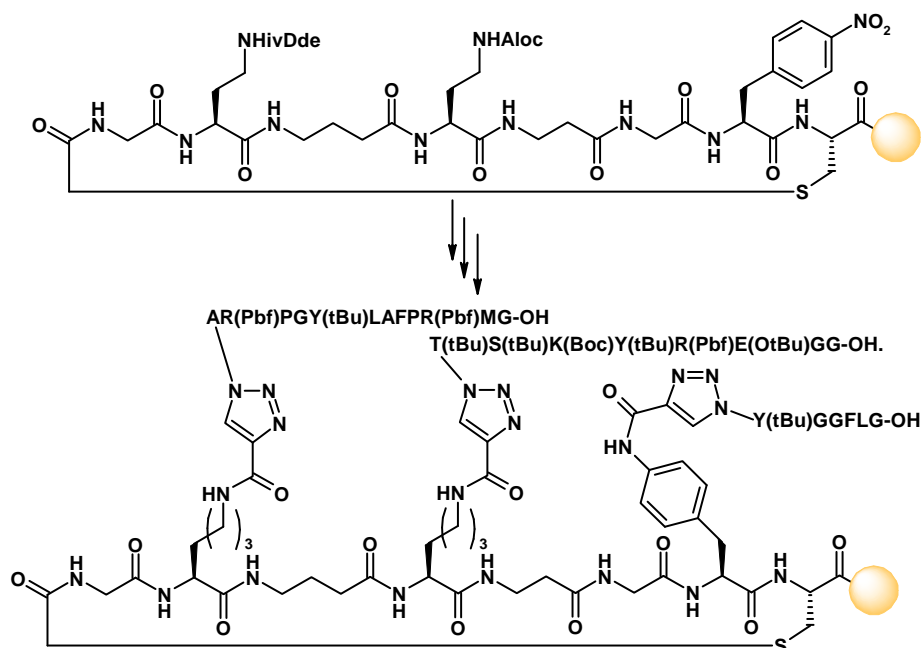


Figure 27 : Fonctionnalisation d'un châssis peptidique avec des peptides par CuAAC

La CuAAC a été employée avec succès sur des peptides protégés dans des milieux organiques et la réaction s'effectue aussi bien sur les chaînes latérales que sur la chaîne principale du peptide indépendamment des substituants de l'alkyne ou de l'azoture.

⁸⁴ Angelo, N. G.; Arora, P. S. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7963-7967

⁸⁵ Franke, R.; Doll, C.; Eichler, J. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4479-4482

III-2.D.b – CuAAC sur des peptides déprotégés

Avant le début de cette thèse, seulement deux articles illustraient l'utilisation de la CuAAC pour la fonctionnalisation de peptides déprotégés en milieu aqueux.

Wan *et al.* ont tiré parti de la chimiosélectivité de la cycloaddition pour conjuguer des antigènes saccharidiques sur des substrats peptidiques non protégés démontrant ainsi la compatibilité de la réaction avec un peptide nu (Figure 28).⁸⁶

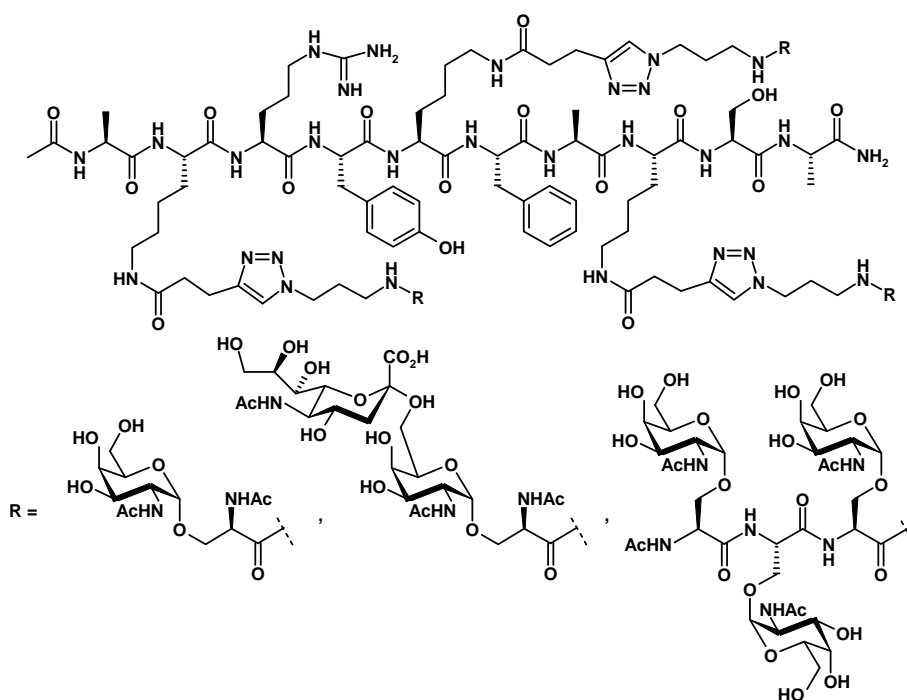


Figure 28 : Synthèse de glycopeptides à visée antitumorale par CuAAC d'après Wan *et al.*⁸⁶

Dans une approche similaire, Lin et Walsh ont proposé également une synthèse d'analogues glycosylés de la tyrocidine par couplage de diverses formes saccharidiques avec un peptide cyclique déprotégé (Figure 29).⁸⁷

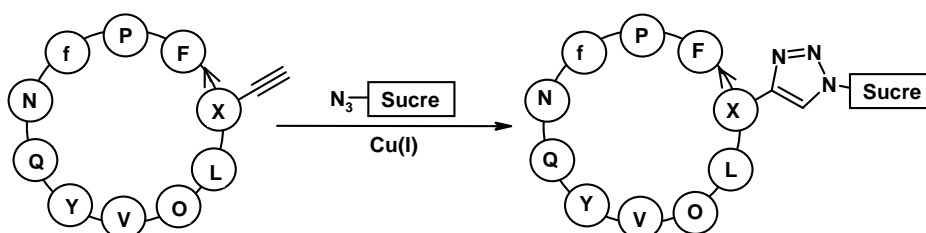


Figure 29 : Synthèse d'antibiotiques glycopeptidiques par CuAAC d'après Lin et Walsh⁸⁷

Les auteurs signalent l'apparition d'un co-produit de la réaction de cycloaddition issu de l'oxydation du glyco-conjugué, que les auteurs attribuent à la formation de 5-hydroxytriazole.

⁸⁶ Wan, Q.; Chen, J.; Chen, G.; Danishefsky, S. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8244-8249

⁸⁷ Lin, H.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13998-14003

La formation de produits issus de la l'oxydation du triazole a déjà été signalée auparavant,⁷⁵ et met en évidence que sous certaines conditions, la cycloaddition catalysée par le cuivre peut s'avérer oxydante.

Il convient de remarquer qu'aucune des séquences peptidiques présentées ne contient de résidus réputés comme sensibles à l'oxydation (cystéines, méthionines, histidines et tryptophanes).

III-2.D.c – CuAAC sur les protéines

On peut également trouver deux exemples de CuAAC réalisée sur des protéines en présence de tous les acides aminés protéinogènes, y compris ceux considérés comme oxydables.

Lin *et al.* ont utilisé la CuAAC pour la modification résidu-spécifique de la Maltose Binding Protein (366 résidus) (Figure 30).⁸⁸

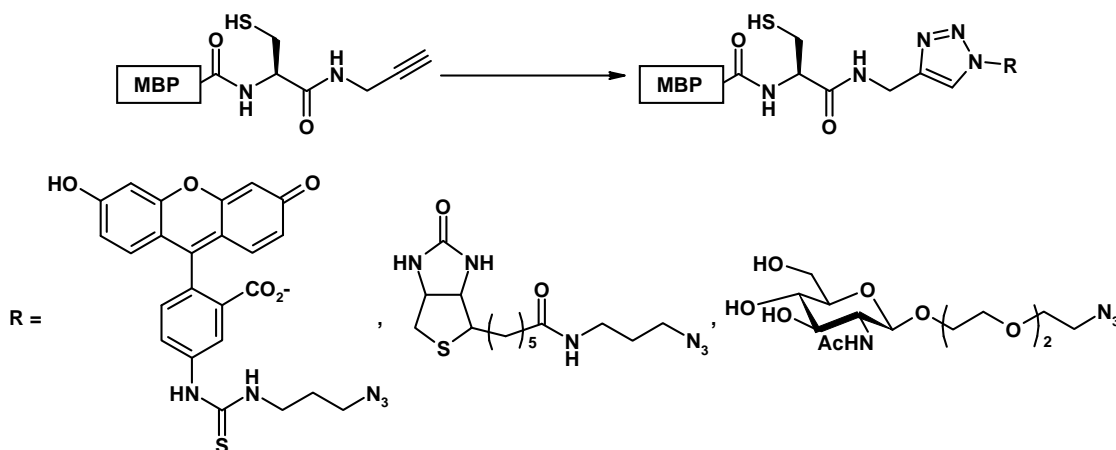


Figure 30 : Ligation de divers azotures organiques sur la MBP d'après Lin *et al.*⁸⁸

De façon surprenante, les auteurs ne mentionnent aucune réaction d'oxydation au cours de la cycloaddition. Toutefois, nous pouvons nous demander si les analyses par spectrométrie de masse réalisées sur le produit de couplage ont assez de résolution pour identifier des produits d'oxydation.

Dans une approche similaire, Finn et ses collaborateurs ont voulu tester la CuAAC comme méthode de marquage sélectif de la capsid du virus de la mosaïque de la cornille (Figure 31).⁸⁹

⁸⁸ Lin, P.; Ueng, S.; Tseng, M.; Ko, J.; Huang, K.; Yu, S.; Adak, A. K.; Chen, Y.; Lin, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4286-4290

⁸⁹ Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193

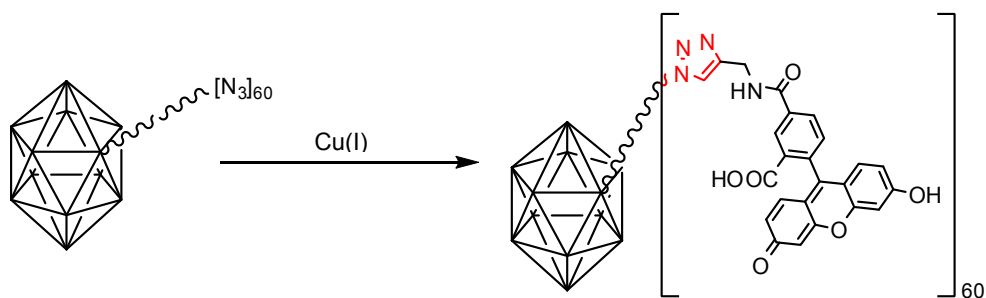
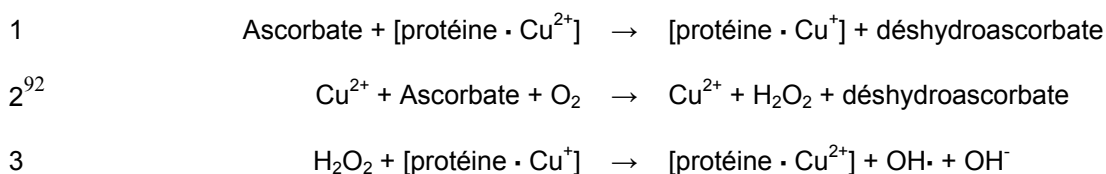


Figure 31 : Marquage de la capside du virus de la cornille par CuAAC avec la fluorescéine

Les auteurs signalent que la capside du virus fonctionnalisée avec des triazoles est instable en présence de cuivre (II) et de cuivre (I). De plus, l'utilisation d'ascorbate pour générer du Cu(I) à partir de sources de cuivre (II) solubles dans l'eau a pour effet de décomposer la capside virale. Ce phénomène peut être évité par utilisation de ligands du cuivre (I) et d'autres réducteurs. Ces données, nous suggèrent qu'en présence d'un large excès de cuivre et en absence de ligands du cuivre (I), le métal s'associe à la capside du virus et participe activement à une dégradation oxydative de celle-ci.

III-2.D.d – Oxydations des protéines en conditions de CuAAC

Une analyse de la littérature sur l'effet des métaux de transition sur les protéines, a apporté une certaine lumière sur le problème des oxydations pendant la CuAAC. En effet, l'utilisation de cuivre (II) et d'un réducteur comme l'ascorbate sont bien connues pour oxyder les chaînes latérales de certains acides aminés.⁹⁰ Ces oxydations sont susceptibles d'avoir lieu sur des sites de liaison des métaux comme les chaînes latérales de certains acides aminés ayant des propriétés chélatantes (histidines, cystéines, méthionines...).⁹¹ Chevion *et al.* proposent l'équation-bilan globale suivante (Équation 1) :



Équation 1 : Génération de radicaux hydroxyles en conditions de CuAAC

Le radical hydroxyle généré grâce à l'utilisation simultanée de cuivre et d'ascorbate est l'une des espèces dérivées de l'oxygène les plus réactives (Équation 1-3, plus connue sous le nom de réaction de Fenton), capable d'oxyder la plupart des composés organiques. Les auteurs

⁹⁰ Stadtman, E. R. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 797-821

⁹¹ Shinar, E.; Navok, T.; Chevion, M. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 14778-14783

⁹² Khan, M. M. T.; Martell, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 4176-4185

signalent que l'addition de ligands du cuivre (II) comme l'EDTA dans le milieu réactionnel (qui empêchent l'association du cuivre (II) et la protéine) a un effet protecteur vis-à-vis de l'oxydation, de même que l'ajout d'espèces piégeant les radicaux hydroxyles comme le mannitol ou l'histidine.⁹¹

III-3 – Les 1,2,3 triazoles

III-3.A – Le 1,2,3 triazole disubstitué comme mime d'un amide

III-3.A.a – Comparaison des 1,2,3 triazoles disubstitués et des liaisons amide

Il existe un large consensus pour considérer cet hétérocycle aromatique comme un bio-isostère de la liaison amide, premièrement de par ses propriétés physiques. En effet, les deux liaisons sont similaires en taille et en moment dipolaire (Figure 32).

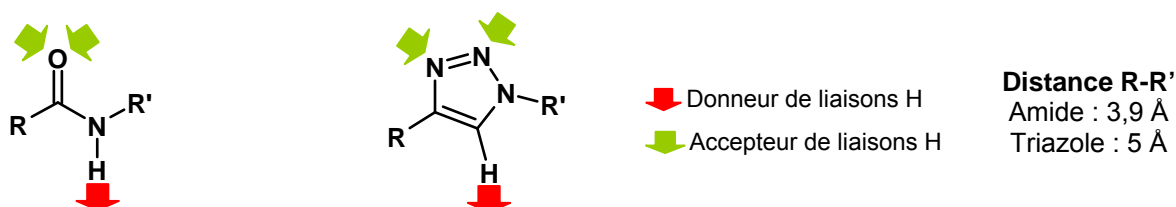


Figure 32 : Comparaison des 1,4 et trans- amides⁹³

Le triazole disubstitué est plan, possède un moment dipolaire global de ~ 5 Debye contre 3,7 - 4 Debye pour un amide⁹⁴ et orienté dans le même sens.

Nous pouvons en conclure que les 1,2,3 triazoles 1,4 disubstitués et les liaisons peptidiques sont très proches d'un point de vue physico-chimique.

III-3.A.b – Effet du remplacement des amides par des 1,2,3 triazoles sur des composés à activité biologique

Bock *et al.* ont utilisé la CuAAC pour la synthèse de cyclotetrapeptides. Il est intéressant de noter que la CuAAC a été choisie à la fois comme méthode de cyclisation puisque les méthodes classiques de macrolactamisation sont, dans ce cas, inefficaces,⁹⁵ mais également parce que les triazoles sont considérés comme des isostères de la liaison amide⁹⁶ (Tableau

⁹³ Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. *Med. Res. Rev.* **2008**, 28, 278-308

⁹⁴ Purcell, W. P.; Singer, J. A. *J. Phys. Chem.* **1967**, 71, 4316-4319

⁹⁵ Bock, V. D.; Perciaccante, R.; Jansen, T. P.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. *Org. Lett.* **2006**, 8, 919-922

⁹⁶ Borg, S.; Estenne-Bouhtou, G.; Luthman, K.; Csoeregh, I.; Hesselink, W.; Hacksell, U. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 3112-3120 et références citées.

1).⁹⁷ Nous pouvons constater que les *mono-* et *bis-*triazolo-peptides conservent l'activité biologique du cyclopeptide naturel.

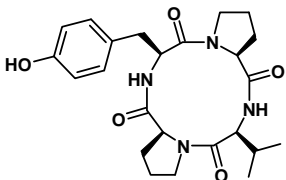
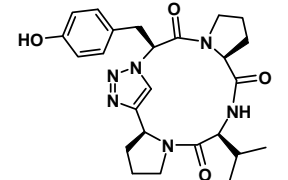
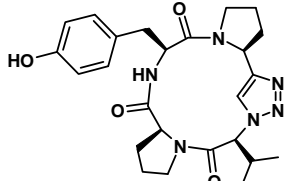
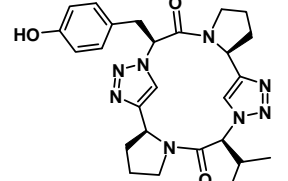
Structure	Inhibition de la tyrosinase (IC ₅₀ en mM)	Structure	Inhibition de la tyrosinase (IC ₅₀ en mM)
	1,5		0,6
	0,6		1,6

Tableau 1: Activité inhibitrice vis à vis de la tyrosinase de champignon (EC 1.14.18.1) en fonction de la structure de triazolo-peptides cycliques d'après Bock et al.⁹⁷

Appendino *et al.* ont proposé de remplacer l'amide de la capsaïcine, indispensable à son activité biologique, par un triazole (Tableau 2).⁹⁸

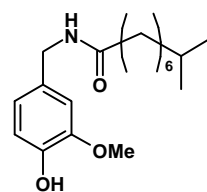
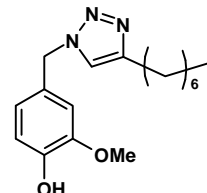
Structure	Activité sur les récepteurs à vanilloïdes et cannabinoïdes		
	TRPV1 EC ₅₀ (nM)	CB1 K _i (μM)	CB2 K _i (μM)
 capsaïcine	30,1	>5,6	>7,9
 triazolo-analogue de la capsaïcine	170	4,0	7,9

Tableau 2 : Comparaison de l'activité agoniste de la capsaïcine et son triazolo-analogue sur les récepteurs à vanilloïdes (TRPV1) et cannabinoïdes (CB1 et CB2) (EC₅₀ : half maximal effective concentration, K_i : constante d'inhibition) d'après Appendino et al.

Cette étude nous permet de constater que les propriétés biologiques de cet agoniste sont conservées chez les isostères triazolés.

⁹⁷ Bock, V. D.; Speijer, D.; Hiemstra, H.; Maarseveen, J. H. V. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 971-975

⁹⁸ Appendino, G.; Bacchiega, S.; Minassi, A.; Cascio, M. G.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 9312-9315

Des études complémentaires basées sur des structures cristallographiques⁹⁹ ou déduites par *docking*¹⁰⁰ permettent d'étayer ces résultats, en mettant en évidence que les triazoles sont capables d'établir les mêmes liaisons hydrogène qu'un amide.

III-3.B – Le 1,2,3-triazole dans la structure secondaire et tertiaire d'une protéine

La capacité des triazoles à mimer un amide a fait l'objet de recherches afin de déterminer si cette caractéristique est maintenue au sein d'une structure secondaire peptidique. Les travaux de Horne *et al.* démontrent que le triazole est capable de s'insérer dans un réseau de liaisons hydrogène de façon similaire à celle d'une liaison peptidique native (Figure 33).¹⁰¹

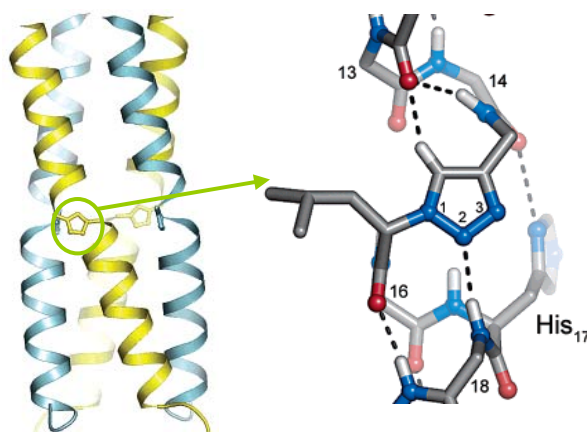


Figure 33 : Détail de la structure cristalline d'un peptide intégrant un hétérocycle de type 1,2,3 triazole 1,4 disubstitué dans l'hélice α d'après Horne *et al.*¹⁰¹

Les 1,2,3-triazoles 1,4 disubstitués peuvent être considérés comme des mimes de liaisons peptidiques *trans*-.

⁹⁹ Brik, A.; Alexandratos, J.; Lin, Y.; Elder, J. H.; Olson, A. J.; Wlodawer, A.; Goodsell, D. S.; Wong, C. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1167-1169

¹⁰⁰ Lee, T.; Cho, M.; Ko, S.; Youn, H.; Baek, D. J.; Cho, W.; Kang, C.; Kim, S. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 585-589

¹⁰¹ Horne, W. S.; Yadav, M. K.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366-15367

III-4 – Conclusion

Les différentes caractéristiques de la réaction présentées ont aidé à comprendre que la CuAAC est une méthode particulièrement appréciée pour sa simplicité de mise en œuvre et sa robustesse qui permet de « clicker », même les fragments polyfonctionnalisés les plus complexes, comme un jeu de LEGO moléculaire :

- la méthode est extrêmement chimiosélective.
- elle n'est pas (ou peu) influencée par l'encombrement de chacun des partenaires.
- elle est efficace en présence d'eau.
- les deux partenaires sont inertes et stables en absence de catalyseur.

Toutes ces caractéristiques cumulées font que la CuAAC est potentiellement plus efficace que les méthodes de ligation connues avec néanmoins un seul défaut, le fait d'introduire une liaison non native. Toutefois, les 1,2,3 triazoles 1,4 disubstitués sont des bioisostères de la liaison amide en configuration *–trans* de sorte que leur introduction dans des structures protéiques n'entraîne pas de changements conformationnels.

D'autre part, les informations existantes sur la CuAAC appliquée à des peptides ou des protéines en milieu aqueux confirment que la réaction est compatible avec la présence de molécules polyfonctionnalisées, comme les glycoprotéines de la capsid d'un virus (Figure 31), mais une étude de la littérature met en évidence que les chaînes latérales de certains acides aminés peuvent être oxydées en conditions de CuAAC.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

L'intérêt d'appliquer la réaction de CuAAC à la ligation chimique de peptides est évident mais, de façon surprenante, son utilisation est introuvable en ce qui concerne la synthèse d'analogues de protéines.¹⁰² Cette réaction possède pourtant toutes les caractéristiques d'une excellente méthode de ligation. Si le but de la ligation chimique est de fournir des protéines ou des analogues de protéines, aussi bien pour des études théoriques (repliement, structure, fonction...) que pour la mise au point de protéines thérapeutiques, les nouvelles méthodes doivent permettre l'accès à des structures dépassant les 15 kDa.

L'ensemble du travail dans la suite de ce manuscrit vise à inclure la CuAAC parmi les techniques servant à la synthèse d'analogues de protéines par voie chimique. Pour cela, nous nous sommes fixés comme objectif de mettre au point une méthodologie de ligation de peptides robuste et efficace. De façon à augmenter la versatilité de la méthode, celle-ci doit pouvoir être réalisée de façon successive, un aspect essentiel pour la synthèse de protéines longues ou difficiles. Il faut donc qu'on s'intéresse aux méthodes de CuAAC successive voire que l'on mette au point nos propres méthodes de CuAAC successive. Il faut inclure les groupes fonctionnels partenaires de ligation dans des peptides et mettre au point les conditions de ligation afin d'obtenir des analogues fonctionnels de protéines par multi-ligation triazole en solution. Nous avons souhaité explorer la méthodologie de multi-ligation triazole et réaliser des synthèses d'analogues de protéines par ligation sur phase solide.

¹⁰² Dirksen, A.; Dawson, P. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 760-766

PARTIE IV – ETUDE DES GROUPES PROTECTEURS DES ALCYNES

IV-1 – Choix d’une stratégie pour réaliser des CuAAC multiples sur les peptides

Depuis la découverte de la CuAAC, beaucoup de groupes appartenant à des domaines de la chimie très différents, se sont concentrés sur le développement de la CuAAC successive afin d’exploiter pleinement du potentiel de la réaction.

IV-1.A – Stratégies pour la CuAAC successive

Pour effectuer des CuAAC multiples de façon successive après un premier cycle de CuAAC, on peut, soit introduire un azoture (Figure 34 voie A), soit un alcyne terminal (Figure 34 voie B).

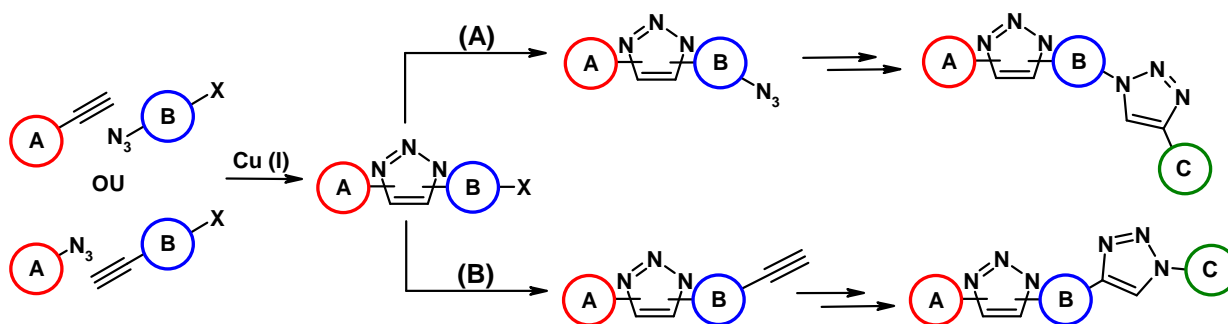


Figure 34 : Stratégies de multi-cycloaddition successive

Plusieurs possibilités ont été décrites pour générer un azoture après une première étape de CuAAC (Figure 35) :

- introduction de l’azoture par substitution nucléophile d’un groupe partant¹⁰³ tel qu’un halogénure ou un sulfonate par un sel d’azoture inorganique (Figure 35 a).^{104,105,106}
- introduction d’un fragment contenant un azoture *via* une réaction quantitative, par amidation,^{107,108} estérification,¹⁰⁹ hydrosilylation¹¹⁰ ... (Figure 35 b)

¹⁰³ Scriven, E. F. V.; Turnbull, K. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 297-368

¹⁰⁴ Lu, G.; Lam, S.; Burgess, K. *Chem. Commun.* **2006**, 1652-1654

¹⁰⁵ Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Fréchet, J. M. J.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3928-3932

¹⁰⁶ Cheshev, P.; Marra, A.; Dondoni, A. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3225-3227

¹⁰⁷ Holub, J. M.; Jang, H.; Kirshenbaum, K. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1497-1502

¹⁰⁸ Xie, J.; Seto, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 458-473

¹⁰⁹ Wu, P.; Chen, X.; Hu, N.; Tam, U.; Blixt, O.; Zettl, A.; Bertozzi, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5022-5025

¹¹⁰ Ornelas, C.; Ruiz Aranzaes, J.; Cloutet, E.; Alves, S.; Astruc, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 872-877

– obtention d’un azoture à partir d’une amine de façon chimiosélective par transfert de diazo (Figure 35 c).⁸⁴

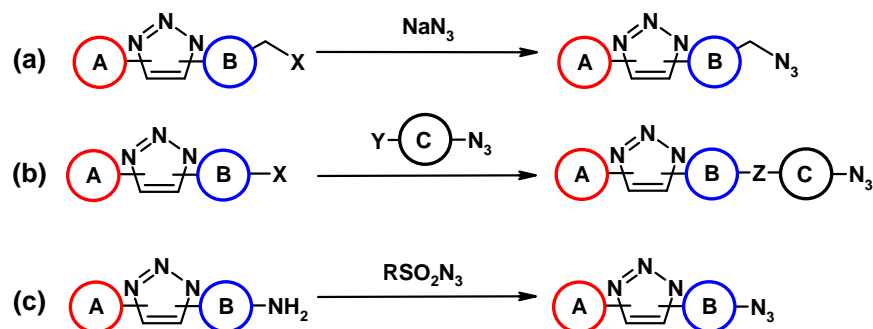


Figure 35 : Méthodes usuelles d’introduction d’azotures après une CuAAC

On peut également classer en trois stratégies courantes l’introduction d’un alcyne (Figure 36),

– introduction d’un alcyne par transformation d’une fonction chimique préexistante, par exemple par réaction de Sonogashira¹¹¹ ou au moyen du réactif de Bestmann-Ohira¹¹² (Figure 36 a).¹¹³

– introduction par une réaction de substitution ou d’acylation par une molécule fonctionnalisée avec un alcyne terminal (Figure 36 b).^{85,114}

– déprotection d’un alcyne disubstitué pour donner un alcyne terminal (Figure 36 c).^{111,115,116,117}

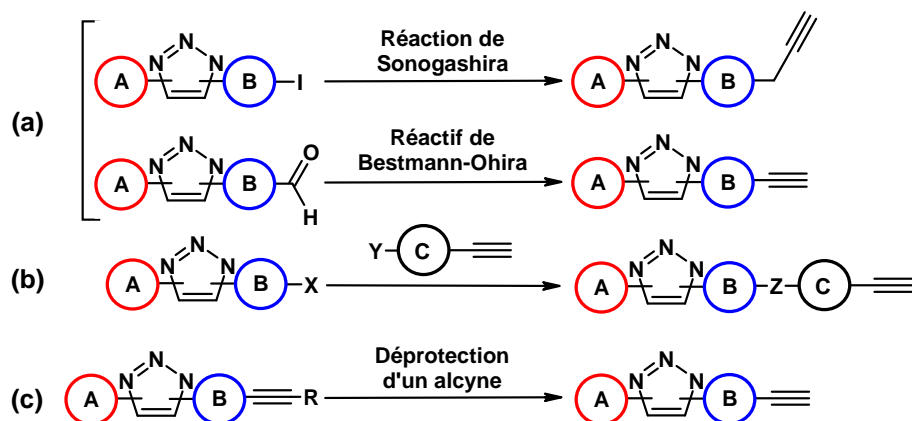


Figure 36 : Méthodes usuelles d’introduction d’alcynes après une CuAAC

¹¹¹ Li, Y.; Flood, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12111-12122

¹¹² Müller, S.; Liepold, B.; Roth, G. J.; Bestmann, H. J. *Synlett* **1996**, 521-522

¹¹³ Nuzzi, A.; Massi, A.; Dondoni, A. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1191-1199

¹¹⁴ Ortega-Muñoz, M.; Lopez-Jaramillo, J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. *Adv. Syn. Catal.* **2006**, *348*, 2410-2420

¹¹⁵ Aucagne, V.; Leigh, D. A. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4505-4507

¹¹⁶ Montagnat, O. D.; Lessene, G.; Hughes, A. B. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6971-6974

¹¹⁷ Meudtner, R. M.; Ostermeier, M.; Goddard, R.; Limberg, C.; Hecht, S. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9834-9840

IV-1.B – Stratégie pour la CuAAC successive sur les peptides

Parmi les méthodes présentées ci-dessus, seule la déprotection des alcynes est compatible avec des peptides déprotégés pour des raisons de chimio- ou de régiosélectivité. Les premiers exemples ont été rapportés simultanément en 2006.

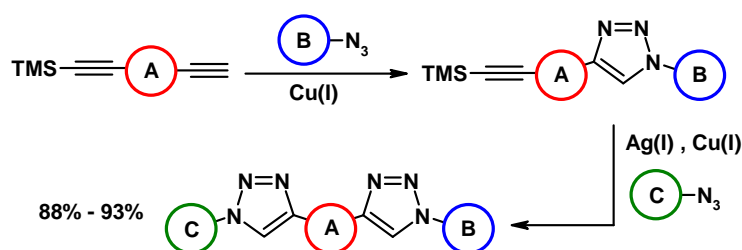


Schéma 2 : Formation chimiosélective de triazoles en 'one-pot' : Chimie « Click-Click » d'après Aucagne et Leigh¹¹⁵

Ces travaux, ont montré l'efficacité du masquage des alcynes par le groupe triméthylsilyle (TMS) pour la multi-CuAAC (Schéma 2) et de sa coupure dans des conditions suffisamment douces, pour être compatibles avec la nature polyfonctionnelle des peptides.^{115,116} Toutefois, le groupe protecteur TMS est partiellement déprotégé en présence de cuivre (I) (Schéma 3),¹¹⁵ ce qui avait déjà été observé 10 ans plus tôt.¹¹⁸

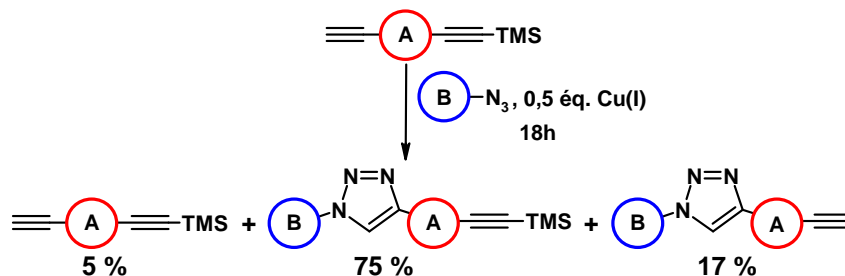


Schéma 3 : Déprotection partielle d'un alcyne TMS en conditions de CuAAC d'après Aucagne et Leigh¹¹⁵

Le potentiel de la technique est donc limité par la labilité du groupe TMS et limite son applicabilité. Pour généraliser l'approche de multi-CuAAC successive, il est nécessaire d'étudier la robustesse des groupes protecteurs des alcynes dans une large gamme de conditions réactionnelles incluant les conditions de CuAAC et les conditions de synthèse de peptides.

¹¹⁸ Ito, H.; Arimoto, K.; Sensul, H.; Hosomi, A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3977-3980

IV-2 – Conception et synthèse d'un modèle pour l'étude des groupes protecteurs des alcynes

L'étude de la stabilité des différents groupes protecteurs des alcynes s'est appuyée sur le cahier des charges suivant :

- Le groupe protecteur devra être résistant à des cycles multiples de CuAAC et aux conditions de synthèse de peptides sur phase solide en stratégie Fmoc/*t*Bu.
- Il devra être coupé en conditions douces, compatibles avec un peptide déprotégé.

IV-2.A – Conception des composés modèles

On distingue deux grandes catégories de groupes protecteurs de la fonction alcyne terminal, les composés silylés, qui constituent la grande majorité, et les diméthylhydroxyles.¹¹⁹ En raison des conditions de déprotection particulièrement « dures » de ces derniers, nous avons limité notre étude aux groupes silylés. Parmi ceux-ci, le triméthylsilyle (TMS), le triéthylsilyle (TES), le *t*-butyldiméthylsilyle (TBDMS), le *t*-butyldiphénylsilyle (TBDPS) et le triisopropylsilyle (TIPS) sont utilisés dans 92% des exemples de protection des alcynes (Tableau 3, source Beilstein v.04/2009).

Recherche Beilstein	Groupe protecteur	Nbre. d'exemples	Proportion
*—≡—Si(Me) ₃	TMS	20706	72 %
*—≡—Si(iPr) ₃	TIPS	3624	13 %
*—≡—Si(Et) ₃	TES	1249	4 %
*—≡—Si— <i>t</i> Bu	TBDMS	851	3 %
*—≡—Si— <i>t</i> Bu Ph Ph	TBDPS	145	0,5 %
—≡—Si	C _{sp} -Si	28750	100 %

Tableau 3 : Utilisation des différents groupes silylés pour la protection des alcynes terminaux

Ces cinq groupes commerciaux, ont été greffés sur une molécule de base. Dans notre cas, nous avons souhaité que cette structure commune soit soluble dans les solvants organiques

¹¹⁹ Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. Dans *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis 4th Edition*; John Wiley & Sons, 2007; p. 927-933

d'extraction liquide-liquide usuels mais également soluble dans des mélanges d'eau et d'acétonitrile utilisés en HPLC en phase inverse (Figure 37).

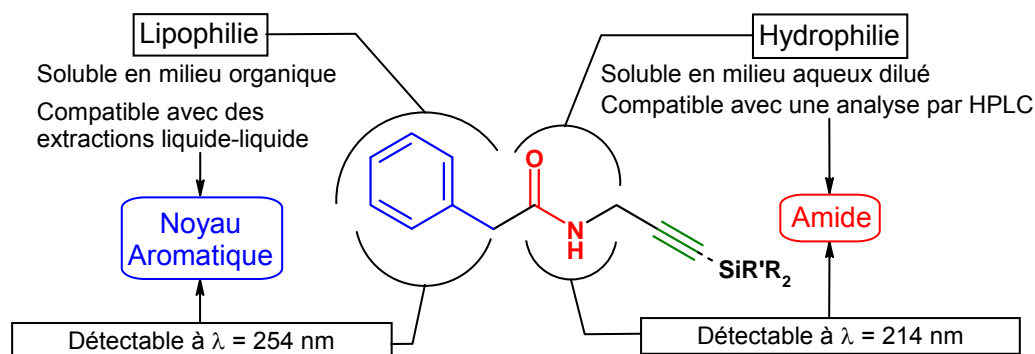


Figure 37 : Conception d'une molécule modèle pour l'étude systématique de stabilité des groupes protecteurs silylés

Nous avons alors envisagé une série de composés modèles de type phénylacétamide de propargylsilyle. La structure commune, le *N*-propargylphénylacétamide, comporte un seul alcyne disubstitué et possède une liaison amide qui garantit une solubilité relative dans l'eau à basse concentration et qui facilite sa détection en HPLC à une longueur d'onde d'absorbance de 214 nm. Quant au noyau aromatique, il procure aux composés silylés leur solubilité en milieu organique, une lipophilie suffisante pour pouvoir effectuer des extractions liquide-liquide et une absorbance à 254 nm de façon à rendre possible leur détection par CCM.

IV-2.B – Synthèse des composés modèles

L'étape-clé de la synthèse de notre gamme de propargylamides cibles est la silylation. Deux stratégies peuvent être envisagées. On peut, soit acyler les propargylamines silylées, soit silyler la propargylamide (Schéma 4).

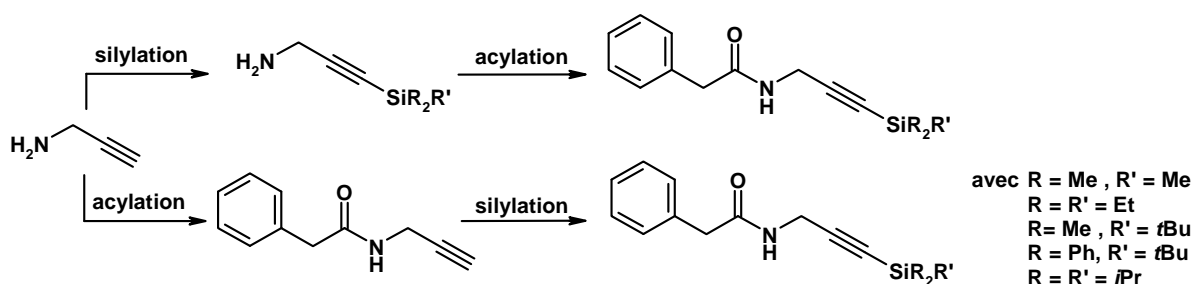


Schéma 4 : Stratégie de synthèse des propargylamides silylés

La silylation des alcynes résulte le plus souvent de la substitution nucléophile d'un chlorure ou d'un triflate de trialkylsilyle par un alcynylmétal, espèce nucléophile qui peut être générée par deux types de méthodes (Schéma 5).

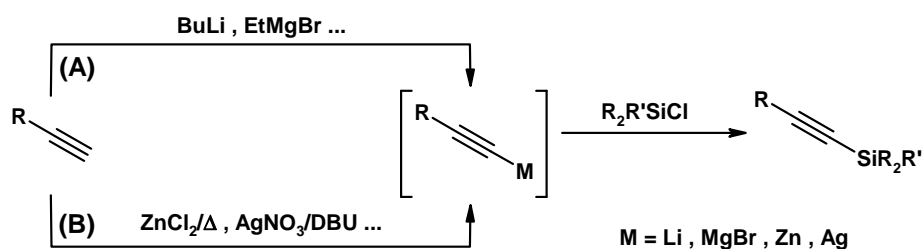


Schéma 5 : Différentes voies pour la silylation d'alcynes

- par réaction d'alcynes terminaux avec des organométalliques en quantité stœchiométrique, le plus souvent avec des organolithiens et des organomagnésiens. En raison de la forte réactivité des bases nécessaires pour déprotoner l'alcyne terminal, l'ajout de l'électrophile se fait sur l'alcynylmétal préformé.¹²⁰ Cette méthode ne semble pas très adaptée pour la silylation du propargylamide de phénylacétyle puisque des protons plus acides que celui de l'alcyne sont présents sur ce composé.
- par réaction d'alcynes terminaux avec des sels de métaux acides de Lewis en quantité stœchiométrique ou catalytique. L'électrophile réagit avec l'alcynylmétal au fur et à mesure de sa génération *in situ*.^{121,122}

Il nous a semblé judicieux de nous intéresser d'abord à la silylation catalysée par les sels d'argent puisque les conditions réactionnelles, les plus douces décrites dans la littérature, sont susceptibles d'être compatibles avec les propargylamides.

IV-2.B.a – Silylation du propargylamide de phénylacétyle

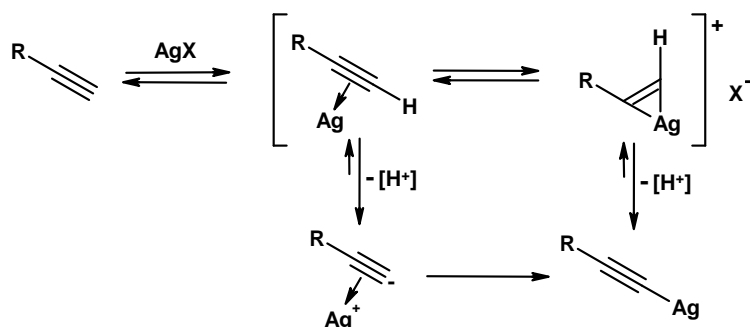
L'avantage de cette voie de synthèse, outre sa rapidité, est que la formation *in situ* d'un alcynure d'argent est particulièrement chimiosélective (Schéma 6). En effet, la force motrice de la réaction est l'affinité de l'argent (I) pour les triples liaisons carbone-carbone. Des études mécanistiques suggèrent que la première étape est la formation d'un complexe π entre l'argent (I) et l'alcyne. Avec l'assistance d'une base, l'ion métallique déplace le proton pour former un alcynure d'argent (Schéma 6).¹²³ Cet intermédiaire organométallique réagit sur un donneur de silyle tel qu'un chlorosilane *via* une réaction de substitution nucléophile pour fournir l'alcyne silylé disubstitué.

¹²⁰ Davidsohn, W. E.; Henry, M. C. *Chem. Rev.* **1967**, 67, 73-106

¹²¹ Andreev, A. A.; Konshin, V. V.; Komarov, N. V.; Rubin, M.; Brouwer, C.; Gevorgyan, V. *Org. Lett.* **2004**, 6, 421-424

¹²² Taniguchi, Y.; Inanaga, J.; Yamaguchi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, 54, 3229-3230

¹²³ Halbes-Letinois, U.; Weibel, J.; Pale, P. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 759-769

Schéma 6 : Mécanisme de formation d'un alcynure d'argent (I) d'après Pale et al.¹²⁴

Nous avons appliqué cette méthode à la synthèse de nos composés modèles (Schéma 7). Après une première étape d'acylation de la propargylamine **1** par le chlorure de phénylacétyle, nous avons appliqué avec succès les conditions réactionnelles décrites dans la littérature pour la synthèse du dérivé triméthylsilylé **3** (Tableau 4, entrée 1).^{122,125}

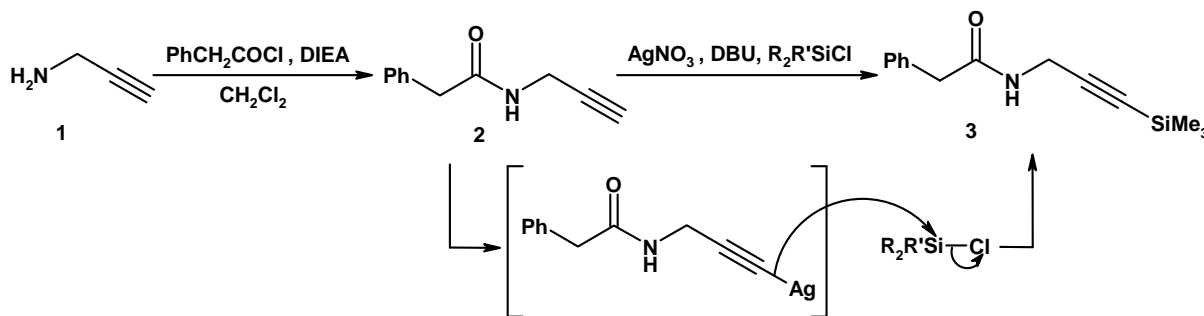


Schéma 7 : Silylation de la propargylamide

	R ₂ R'SiCl	n _{éq.} AgNO ₃ (éq.)	t (h)	temp. (°C)	Solvant	Rdt. (%)
1	TMSCl	0,1	24	40	CH ₂ Cl ₂	60 %
2	TBDMSCl	0,2	24	40	CH ₂ Cl ₂	n.d.
3	TBDMSCl	1	24	65	CHCl ₃	n.d.
4	TBDMSCl	1	36	65	CHCl ₃	n.d.
5	TESCl	1	18	40	CH ₂ Cl ₂	n.d.
6	TESCl	1	18	80	PhCH ₃	n.d.
7	TBDPSCI	2	24	65	CHCl ₃	n.d.

Tableau 4 : Etude de la silylation catalysée à l'argent (I) de 2

Des conditions réactionnelles similaires sont inefficaces pour l'introduction du dérivé TBDMS. L'augmentation de la quantité de catalyseur (Tableau 4, entrée 2), de la température (Tableau 4 entrée 3) et du temps de réaction (Tableau 4 entrée 4) sont sans effet sur la *t*-

¹²⁴ Letinois-Halbes, U.; Pale, P.; Berger, S. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9185-9190¹²⁵ Malkoch, M.; Thibault, R. J.; Drockenmuller, E.; Messerschmidt, M.; Voit, B.; Russell, T. P.; Hawker, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14942-14949

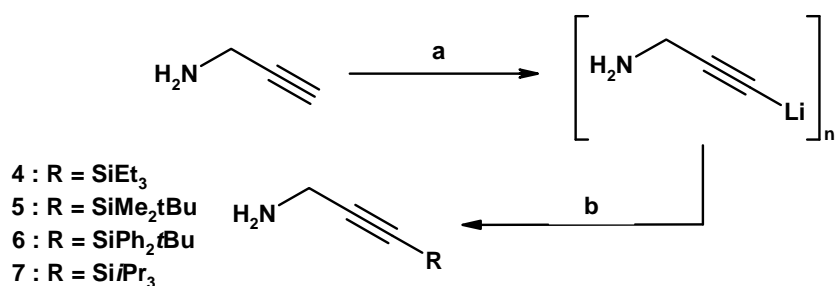
butyldiméthylsilylation de la propargylamine **2**. Nous avons réalisé des modifications des conditions réactionnelles semblables pour l'introduction des résidus triéthylsilyle et le *t*-butyldiphénylsilyle sans résultat (Tableau 4 entrées 5 à 7). Dans chacun des cas, le suivi réactionnel par CCM montre l'apparition de plusieurs produits difficiles à séparer par chromatographie éclair.

Outre le peu d'information trouvée dans la littérature sur cette réaction, notons que seule l'introduction du groupe TMS a été rapportée. On peut donc conclure que la réactivité de l'alcynure d'argent (I) est très sensible à l'encombrement stérique du chlorosilane. Il nous a semblé judicieux, plutôt que de persévérer dans cette voie, d'utiliser une alternative.

IV-2.B.b – Silylation de propargylamine suivie de phénylacétylation

Nous nous sommes tournés vers la silylation des alcynes terminaux par des organométalliques tels que les bases lithiées, réputées comme plus réactives que les organomagnésiens.

La première méthode que nous avons mise en œuvre pour silyler la propargylamine consiste à réaliser une déprotonation de la propargylamine par ajout d'une quantité stœchiométrique de *n*-butyllithium suivi de l'ajout d'un chlorosilane (Schéma 8). Cette méthode fournit les dérivés triisopropylsilylé **7** et triéthylsilylé **4** avec des rendements jugés acceptables (Tableau 5 entrées 1 et 4). Cependant, elle est inefficace pour la synthèse des dérivés *tert*-butylés **5** et **6** (Tableau 5 entrées 2 et 3).



a) BuLi, THF, -78°C b) RCl, THF

Schéma 8 : Synthèse de propargylamines silylées à partir de la propargylamine **1**

	Electrophile (RCl)	Rendement
1	TESCI	44 %
2	TBDMSCl	8 %
3	TBDPSCI	11 %
4	TIPSCI	82 %

Tableau 5 : Rendements de silylation de la propargylamine **2**

Les organolithiens sont connus pour former des structures oligomériques et il existe une forte corrélation négative entre l'état d'agrégation de ces structures et leur réactivité.^{126,127,128} La formation d'un précipité au cours de la lithiations de la propargylamine **1** semble confirmer cette hypothèse. On peut supposer que l'amine propargylique, grâce à son caractère coordinant, augmente la polymérisation de l'espèce lithiée et en diminue la réactivité.

Une méthode alternative à la lithiation directe de la propargylamine **1** consiste à protéger l'amine par le TMS avant la déprotonation.¹²⁹ Il est possible qu'en substituant l'amine avec un groupe encombrant comme le TMS, on diminue le caractère coordinant de l'amine, on augmente la solubilité de l'intermédiaire lithié et par conséquent, qu'on augmente la réactivité du complexe métallique.

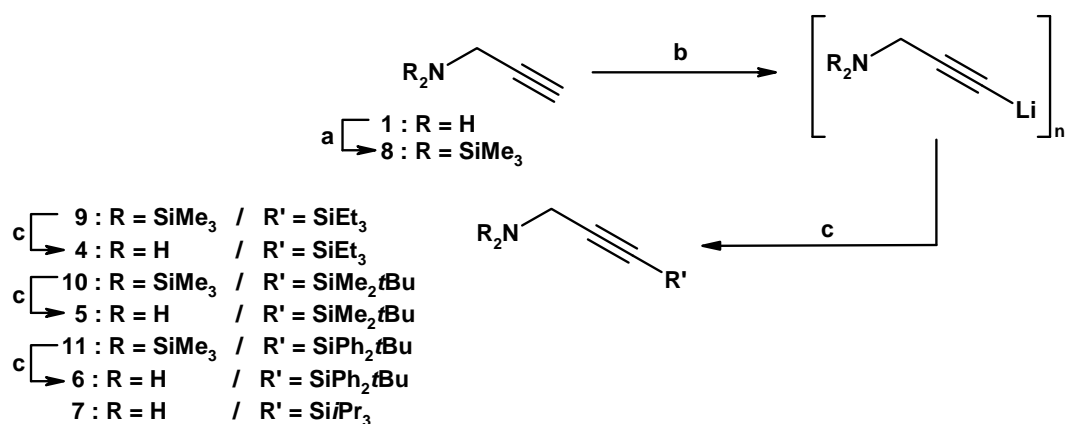
Suite à une étape de triméthylsilylation de l'amine pour obtenir **8**, l'alcyne est silylé et l'amine est déprotégée par traitement avec une solution aqueuse acide (Schéma 9). Cette stratégie a permis d'obtenir les deux composés *tert*-butylés **5** et **6** (Tableau 6 entrées 2 et 3) avec des rendements acceptables. En revanche, elle n'apporte aucune amélioration pour la triéthylsilylation par rapport à la méthode précédente (Tableau 5, entrée 1 et Tableau 6, entrée 1).

¹²⁶ Jones, A. C.; Sanders, A. W.; Bevan, M. J.; Reich, H. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3492-3493

¹²⁷ Gessner, V. H.; Däschlein, C.; Strohmman, C. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3320-3334

¹²⁸ Mallan, J. M.; Bebb, R. L. *Chem. Rev.* **1969**, *69*, 693-755

¹²⁹ Corriu, R. J. P.; Huynh, V.; Iqbal, J.; Moreau, J. J. E.; Vernhet, C. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 6231-6244



a) TMSCl, DIEA, CH_2Cl_2 b) 1) BuLi, THF, $-78^\circ C$ 2) R'Cl, THF c) HCl, H_2O , AcOEt

Schéma 9 : Synthèse de propargylamines silylées à partir de la N,N-propargylamine silylée 8

	Electrophile (R'Cl)	Rendement
1	TESCl	44%
2	TBDMSCl	76 %
3	TBDPSCl	65 %

Tableau 6 : Rendements de silylation de la N,N-propargylamine silylée 8

La synthèse de notre gamme de composés modèles se finit par la phénylacétylation des amines silylées 4 à 7 dans des conditions classiques fournissant les produits désirés 12 à 15 avec de bons rendements (Schéma 10).

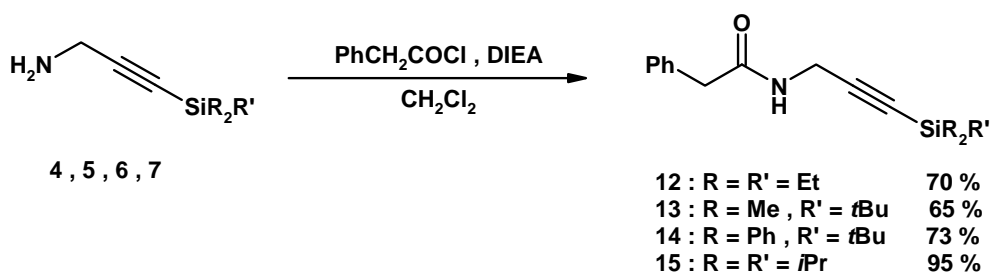


Schéma 10 : Phénylacétylation de différentes propargylamines silylées

IV-3 – Etudes de stabilité des groupes protecteurs des alcynes

Les composés silylés **3** et de **12** à **15**, ont été soumis à un criblage de façon à évaluer la robustesse du lien carbone-silicium selon le groupe silylé.

Nous avons placé les cinq composés en conditions

- de CuAAC
- de SPPS en stratégie Fmoc/*t*Bu
- classiques en chimie organique (oxydatives, réductrices, acides de Lewis)

La proportion de coupure de la liaison alcyne-silyle a été évaluée par analyse par HPLC.

IV-3.A – Stabilité en conditions de CuAAC

Puisqu'on compte utiliser les groupements silylés pour réaliser des cycloadditions successives, nos premières expériences ont visé à évaluer leur stabilité en conditions de CuAAC poussées (Tableau 7).

Conditions	Coupure de la liaison C _{sp} -Si pour donner 2 (%)					
	Temps (h)	TMS (3)	TES (12)	TBDMS (13)	TBDPS (14)	TIPS (15)
CuSO ₄ 2 éq. + Ascorbate de sodium 4 éq., <i>t</i> BuOH/H ₂ O (9 :1)	20	38	0	0	0	0

Tableau 7 : Stabilité des groupes protecteurs silylés en conditions de cycloaddition catalysées par le Cu(I)

Le groupe TMS est coupé à 38%, ce qui confirme les résultats décrits dans la littérature.¹¹⁵ Les autres groupes sont résistants aux conditions de l'étude et sont donc de parfaits candidats pour des CuAACs successives.

IV-3.B – Stabilité en conditions de SPPS en stratégie Fmoc/*t*Bu

Un point essentiel de notre cahier des charges consiste à trouver les groupes silylés résistants aux conditions de synthèse des peptides sur phase solide en stratégie Fmoc/*t*Bu (Tableau 8) puisque c'est par cette stratégie que l'on souhaite obtenir nos peptides.

Conditions	Coupure de la liaison C _{sp} -Si pour donner 2 (%)					
	Temps (h)	TMS (3)	TES (12)	TBDMS (13)	TBDPS (14)	TIPS (15)
1 Pipéridine/DMF (2 : 8)	5	0	0	0	0	0
2 TFA / CH ₂ Cl ₂ (2 :8)	2	0	0	0	0	0
3 TFA / CH ₂ Cl ₂ (5 :5)	2	10	<1	0	0	0
4 TFA / TIS / H ₂ O (95:2,5:2,5)	2	24	<1	0	0	0

Tableau 8 : Stabilité des groupes protecteurs silylés en conditions basiques et acides (Fmoc-SPPS)

D'après les résultats obtenus, nous pouvons affirmer que tous les groupes silylés de notre gamme sont résistants à l'équivalent d'une trentaine de déprotections d'un groupe Fmoc (Tableau 8 entrée 1). Nous nous sommes aussi intéressés à la sensibilité des différents substrats vis-à-vis de l'acide trifluoroacétique (TFA), utilisé pour décrocher concomitamment un peptide immobilisé sur résine et déprotéger les chaînes latérales des peptides. Nous avons étudié l'influence de la concentration en TFA sur la stabilité de la liaison carbone-silicium en partant des conditions de déprotection d'un groupe protecteur Boc (Tableau 8 entrée 2) jusqu'à des conditions classiques de coupure de résine et déprotection d'un peptide (Tableau 8 entrée 4). Les résultats obtenus mettent en évidence que le TMS est sensible en milieu acide. La coupure du groupe silylé augmente avec la concentration en acide dans la solution (Tableau 8 entrées 2 à 4). Les autres groupes silylés ne sont pas coupés dans ces conditions.

D'autre part, nous avons observé, dans les conditions décrites dans l'entrée 4, pour chacun des substrats, la formation de co-produits différents de l'alcyne vrai **2** (Tableau 9).

Conditions	Formation de co-produit (%)					
	Temps (h)	TMS (3)	TES (12)	TBDMS (13)	TBDPS (14)	TIPS (15)
1 TFA / CH ₂ Cl ₂ (1 :1)	2	0	0	0	0	0
2 TFA / TIS / H ₂ O (95:2,5:2,5)	2	33	43	28	45	14

Tableau 9 : Formation d'un co-produit en conditions acides

Nos tentatives pour isoler et caractériser ces produits ont été sans succès. Leur formation est favorisée dans des conditions standard de déprotection des peptides (Tableau 9, entrée 2). Une étude de la littérature suggère des réactions de cycloisomérisation et/ou d'hydratation acido-catalysées, cette dernière étant favorisée par la présence du silicium qui est connu pour augmenter l'électrophilie de l'atome en position β, comme une explication possible.¹³⁰ On

¹³⁰ Wipf, P.; Aoyama, Y.; Benedum, T. E. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3593-3595

verra au cours des parties V et VI que l'hypothèse d'une hydratation acido-catalysée a été confirmée par spectrométrie de masse.

IV-3.C – Stabilité en conditions diverses

De façon à appréhender la stabilité de notre gamme d'alcynes silylés vis-à-vis d'autres conditions courantes en chimie organique, nous avons réalisé des expériences supplémentaires en conditions oxydantes, réductrices et acides de Lewis (Tableau 10)

Conditions	Coupure de la liaison C _{sp} -Si pour donner 2 (%)					
	Temps (h)	TMS (3)	TES (12)	TBDMS (13)	TBDPS (14)	TIPS (15)
1 <i>m</i> -CPBA 1 éq. , CH ₂ Cl ₂	1	0	0	0	0	0
2 BF ₃ ·Et ₂ O 1 éq. , CH ₂ Cl ₂	1	0	0	0	0	0
3 NaBH ₄ 1 éq. , MeOH	1	3	0	0	0	0

Tableau 10 : Stabilité des groupes protecteurs silylés en conditions oxydantes, réductrices et acides de Lewis

De cette étude, nous pouvons retenir la résistance des différents groupes protecteurs vis-à-vis des conditions oxydantes ainsi qu'envers les acides de Lewis (Tableau 10 entrées 1 et 2). Seul le TMS est coupé en présence de borohydrure de sodium dans le méthanol comme décrit dans la littérature (Tableau 10 entrée 3).¹³¹

¹³¹ Myers, A. G.; Harrington, P. M.; Kuo, E. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 694-695

IV-4 – Etude de la déprotection des alcynes silylés

Dans un second temps, les conditions de coupure des groupes alcynylsilyle classiques (TBAF, méthanolyse alcaline)¹¹⁹ et plus récentes (protiolyse catalysée par l'argent (I)),^{132,133} ont été étudiées de façon approfondie pour chaque substituant.

La proportion de coupure de la liaison alcynylsilyle dans les différentes conditions réactionnelles décrites est évaluée par analyse par HPLC.

IV-4.A – Déprotection par substitution nucléophile avec les fluorures

Les ions fluorure sont décrits comme réactifs universels pour la coupure des groupes silylés. La force motrice de la réaction est la forte affinité du silicium pour le fluor (Tableau 11).

X	C-X	O-X	F-X	Cl-X	Br-X
C	356	336	485	327	285
Si	290	368	582	391	310

Tableau 11 : Energies de liaison moyennes en kJ/mol¹³⁴

Le mécanisme de la désilylation est celui d'une substitution nucléophile impliquant un intermédiaire pentavalent (Schéma 11).

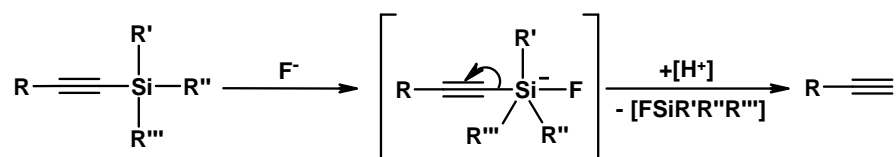


Schéma 11 : Mécanisme de la désilylation par l'ion fluorure

De ce mécanisme, on s'attend à ce que la réaction soit gouvernée par trois paramètres, le caractère nucléofuge de l'alcyne, la nucléophilie du fluorure et l'encombrement du silicium. Dans le cas de notre étude, le premier paramètre est constant, ce qui nous permet de nous en affranchir. Nous avons donc procédé à l'étude de l'influence des deux derniers paramètres sur la cinétique de la réaction.

¹³² Carpita, A.; Mannocci, L.; Rossi, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1859-1864

¹³³ Orsini, A.; Viterisi, A.; Bodlenner, A.; Weibel, J.; Pale, P. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 2259-2262

¹³⁴ Clayden; Greeves; Warren; Wethers Dans *Organic Chemistry*; Oxford University Press, 2000; p. 1279-1312

Conditions (concentration : 0,01 M)	Temps nécessaire à la coupure de la liaison C _{sp} -Si				
	TMS (3)	TES (12)	TBDMS (13)	TBDPS (14)	TIPS (15)
1 TBAF anhydre 3 éq. THF	<5 min	<5 min	<5 min	15 min	<5 min
2 TBAF·3H ₂ O 3 éq. THF	<5 min	<5 min	17 h	48 h	5 j
3 TBAF·AcOH anhydre 3 éq. THF	2 h	-	24 h	24 h	24 h

Tableau 12 : Stabilité des groupes protecteurs silylés en présence de fluorures

En conditions anhydres, les groupes silylés sont coupés par le fluorure de façon rapide et efficace (Tableau 12 entrée 1). En présence d'eau (Tableau 12 entrée 2) ou d'acide acétique (Tableau 12 entrée 3), la réactivité nucléophile du fluorure est diminuée et nous avons pu observer une variation des cinétiques de déprotection des alcynes en fonction de l'encombrement du groupe silylé. On en déduit que la nucléophilie de l'ion fluorure, qui est un très puissant accepteur de liaisons hydrogène, est fonction de son environnement. Plus ses doublets non liants sont impliqués dans des liaisons hydrogène, moins il est réactif et vice-versa. Il est donc courant de contrôler la réactivité des ions fluorure, notamment à cause de leur basicité pouvant donner lieu à des réactions secondaires,¹³⁵ par ajout d'un donneur de liaisons hydrogène.¹¹⁷

IV-4.B – Déprotection par alcoolyse alcaline

Le groupe triméthylsilyle est connu pour sa labilité dans le méthanol en conditions basiques. Cette stratégie de déprotection a été très largement employée, mais à notre connaissance, elle n'a pas été étudiée. Par analogie avec la coupure des groupes silylés par les ions fluorure et les données de la littérature,¹³⁶ on peut supposer que le mécanisme de la réaction est le suivant (Schéma 12).

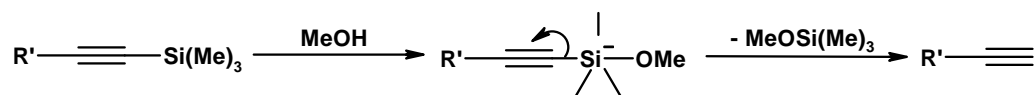


Schéma 12 : Mécanisme proposé de méthanolyse alcaline d'un alcyne triméthylsilylé

¹³⁵ Clark, J. H. *Chem. Rev.* **1980**, 80, 429-452¹³⁶ Nishikawa, T.; Urabe, D.; Yoshida, K.; Iwabuchi, T.; Asai, M.; Isobe, M. *Org. Lett.* **2002**, 4, 2679-2682

IV-4.B.a – Etude préliminaire : cinétique et sélectivité

Etant donnée l'absence d'études dans la littérature, nous nous sommes intéressés à l'influence sur la cinétique de désilylation de plusieurs paramètres : l'encombrement du silicium, la base et l'alcool. Nous avons comparé la robustesse des différents alcynes silylés en conditions classiques (Tableau 13).

Conditions (concentration : 0,01 M)	temps	Coupure de la liaison C _{sp} -Si pour donner 2 (%)				
		TMS (3)	TES (12)	TBDMS (13)	TBDPS (14)	TIPS (15)
1 K ₂ CO ₃ 10 éq. dans MeOH	15 min	>99	<1	0	0	0
2 K ₂ CO ₃ 50 éq. dans MeOH	36 h	100	>99	<1	0	0

Tableau 13 : Stabilité des groupes protecteurs silylés en conditions de méthanolyse alcaline

Le TMS est coupé de façon rapide et efficace en 15 minutes en conditions classiques sans que les autres groupes soient affectés (Tableau 13 entrée 1). En conditions proches de la saturation en base (Tableau 13 entrée 2), le dérivé triéthylsilylé est coupé sélectivement vis-à-vis des groupes TBDMS, TBDPS et TIPS. Si la sélectivité de la coupure d'un TES par rapport à un TIPS dans ces conditions a déjà été rapportée,¹³⁷ cette dernière série de mesures étend cette sélectivité aux groupes TBDMS et TBDPS.

Ces expériences d'alcoolyse alcaline de la liaison C_{sp}-Si effectuées jusqu'ici nous ont permis de mettre en évidence la forte sensibilité de la réaction à l'encombrement stérique autour du silicium et de connaître la sélectivité de la réaction. Toutefois, il reste quelques points à éclaircir de façon à disposer d'une méthode plus polyvalente. La désilylation d'un alcyne triéthylsilylé est lente (Tableau 13 entrée 2) et il devrait être possible d'accélérer la réaction en augmentant le nombre d'équivalents de base, mais la solubilité du K₂CO₃ dans le méthanol reste limitée. De plus, si on voulait exploiter cette déprotection sur des substrats plus apolaires, il faudrait rajouter un co-solvant, réduisant ainsi la solubilité des bases inorganiques. Est-il possible d'utiliser d'autres bases miscibles en milieu organique ? Enfin, quelle est l'influence de la nature de l'alcool sur la désilylation ? Nous n'avons trouvé aucune réponse à nos questions dans la littérature, c'est pourquoi nous avons décidé de mener des études cinétiques supplémentaires.

IV-4.B.b – Etudes approfondies : influence de la base et influence du solvant

¹³⁷ Wiel, M. K. J. T.; Odermatt, S.; Schanen, P.; Seiler, P.; Diederich, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 3449-3462

IV-4.B.b.1 – Etude de l'influence de la base

Nous avons étudié l'influence de la nature de la base sur la vitesse de la réaction en comparant les cinétiques de déprotection par le K_2CO_3 et le DBU. Cette base a été choisie car elle est miscible en toute proportion avec la plupart des alcools et son pKa (10,3)¹³⁸ est proche de celui du carbonate (11,6).

Le dérivé triméthylsilylé **3** a été mis en présence d'un équivalent de base dans le méthanol et la cinétique de déprotection a été analysée par HPLC (Figure 38).

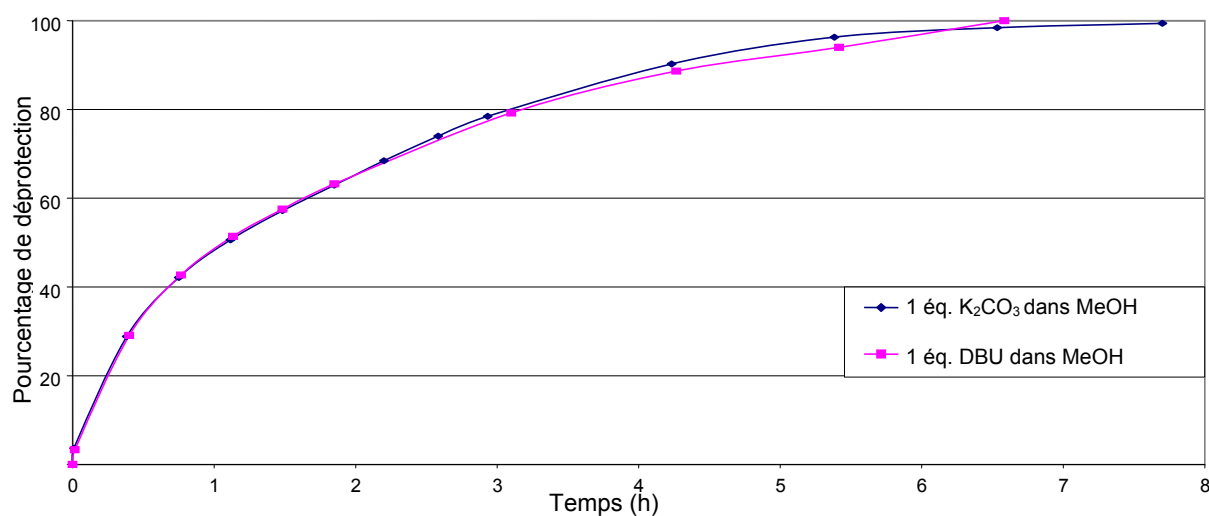


Figure 38 : Cinétique de désilylation par méthanolyse alcaline en fonction de la base

A la vue de ces résultats, nous pouvons conclure que l'utilisation du DBU est complètement équivalente à celle du K_2CO_3 puisque les cinétiques de désilylation sont quasiment identiques.

IV-4.B.b.2 – Etude de l'influence du solvant

Pour compléter cette étude sur la déprotection des alcynes en conditions basiques, nous avons étudié l'influence de l'alcool sur la cinétique et la sélectivité de la déprotection. Nous avons, dans un premier temps, effectué des expériences de solvolysse alcaline dans le méthanol et dans l'éthanol et comparé la vitesse de coupure du groupe triméthylsilyle (Figure 39).

¹³⁸ Albert, A.; Goldacre, R.; Phillips, J. J. *Chem. Soc.* **1948**, 2240-2249

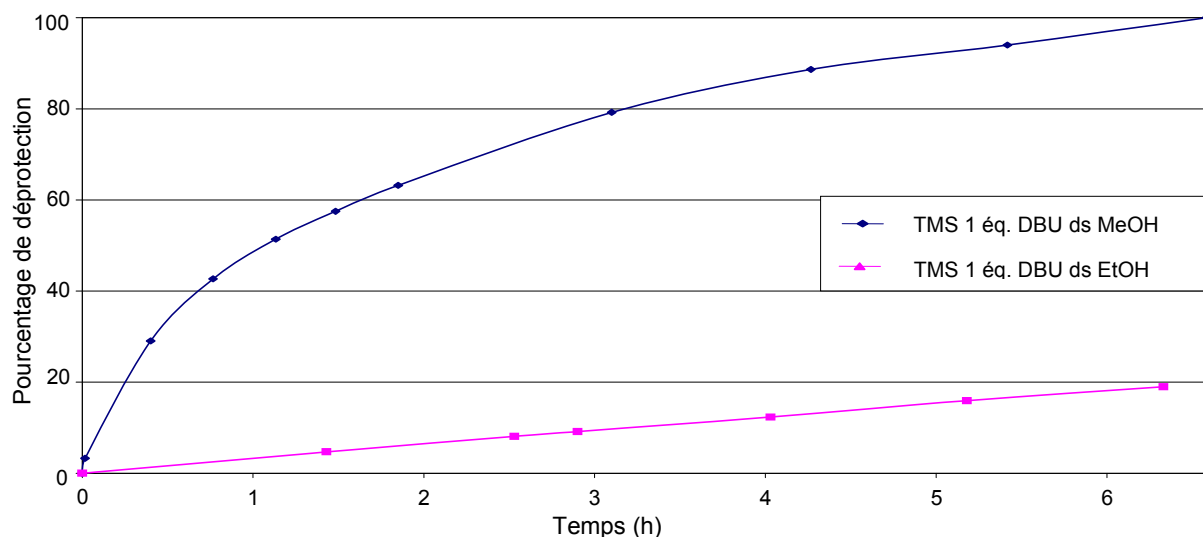


Figure 39 : Cinétique de désilylation par alcoolyse alcaline en fonction du solvant

Comme on pouvait l'anticiper, les mesures mettent en évidence que la cinétique de la réaction est fortement dépendante de la nature de l'alcool. Ce résultat est en accord avec le mécanisme de la déprotection proposé puisque, plus l'oxygène est encombré, plus l'attaque nucléophile est difficile.

Nous avons vu que la méthanolyse alcaline est sélective des dérivés triméthylsilylé et triéthylsilylé (Tableau 13). Compte tenu de la sensibilité de la réaction à l'encombrement autour du silicium, on peut envisager que l'éthanololyse alcaline ait une sélectivité différente de celle de la méthanolyse. De façon à observer cet éventuel effet les alcynes triméthylsilylé **3** et triéthylsilylé **12** ont été traités par l'éthanol en présence de 10 équivalents de DBU (Figure 40).

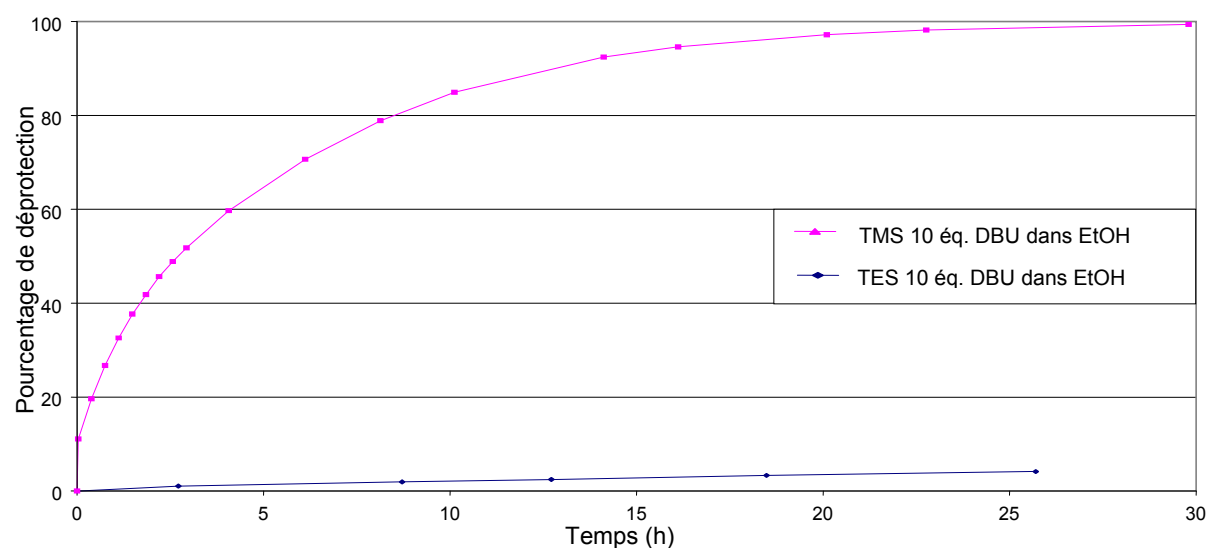


Figure 40 : Cinétique de désilylation par éthanololyse alcaline en fonction du substituant silylé

Le graphe de la Figure 40 met en évidence que le changement d’alcool a un effet négligeable, voire néfaste, sur la sélectivité de la réaction puisque quand 99% du TMS est coupé, l’alcyne triéthylsilylé est déprotégé à 4% (contre <1% lorsque la déprotection est réalisée par méthanolyse alcaline).

IV-4.B.c – Conclusion sur l’alcoololyse alcaline

Pour conclure sur cette réaction, la solvololyse en conditions alcalines est une méthode rapide et efficace de déprotection des alcynes triméthylsilylés et triéthylsilylés. Elle possède quand même un inconvénient majeur, puisqu’elle est incompatible avec des substrats baso-sensibles et peut être à l’origine de réactions secondaires non souhaitées (Schéma 13).

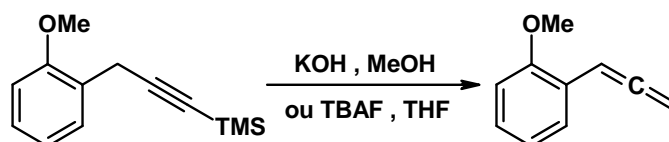


Schéma 13 : Désilylation et isomérisation concomitante des silylalcynes benzyliques en milieu basique, d’après Jung et Hagenah¹³⁹

IV-4.C – Déprotection par protiodésilylation catalysée par l’argent (I)

Une procédure de désilylation catalysée par des sels d’argent a été décrite pour la première fois comme une alternative à la méthanolyse alcaline pour les substrats baso-sensibles.¹⁴⁰ Jung et Hagenah ont démontré clairement son utilité en comparant les deux méthodes de déprotection. Alors que la méthanolyse alcaline fournit exclusivement un composé allénique (Schéma 13), la désilylation avec des sels d’argent fournit exclusivement l’alcyne terminal (Schéma 14).¹³⁹

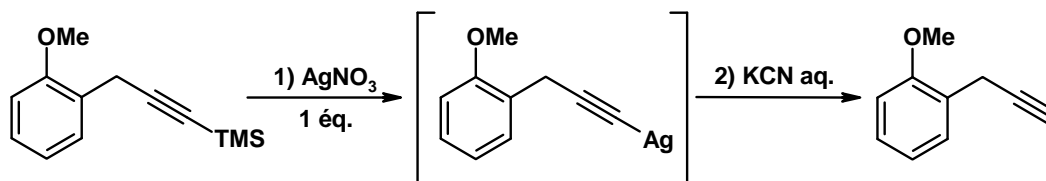


Schéma 14 : Désilylation par utilisation de sels d’argent d’après Jung et Hagenah¹³⁹

Toutefois la procédure mise au point par Schmidt et Arens propose l’utilisation d’un équivalent de sels d’argent et un excès de cyanure en un protocole en deux étapes.¹⁴⁰ En 2004,

¹³⁹ Jung, M. E.; Hagenah, J. A. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 1889-1902

¹⁴⁰ Schmidt, H. M.; Arens, J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1967**, 86, 1138-1142

les équipes de Pale et Rossi ont développé, de façon indépendante, une version catalytique de la réaction qui permet la régénération de l'argent (I) *in situ* par ajout d'une source de protons.^{132,133} Le mécanisme de déprotection proposé est analogue à celui de la silylation catalysée par l'argent (I) présentée précédemment (Schéma 15).

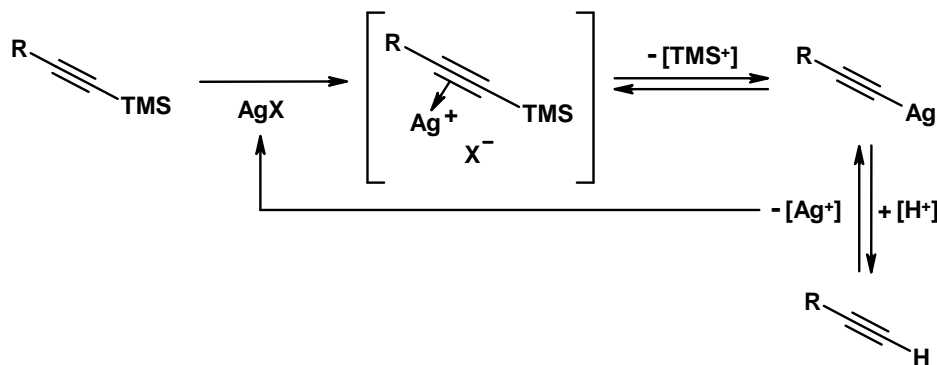


Schéma 15 : Mécanisme de désilylation catalysée par l'argent (I)

IV-4.C.a – Etudes préliminaires : cinétique et sélectivité

Nous avons étudié la stabilité de la liaison alcynylsilyle en présence de quantités stœchiométriques de sels d'argent et en nous inspirant des conditions réactionnelles de la littérature.¹³³

Conditions	Coupure de la liaison C _{sp} -Si pour donner 2 (%)					
	Temps (h)	TMS (3)	TES (12)	TBDMS (13)	TBDPS (14)	TIPS (15)
1 Ag (I) 1 éq. , CH ₂ Cl ₂ /MeOH/H ₂ O (7:4:1)	48	100	47	<1	0	0
2 Ag (I) 10 éq. , CH ₂ Cl ₂ /MeOH/H ₂ O (7:4:1)	8	100	>99	24	<1	<1

Tableau 14 : Stabilité des groupes protecteurs silylés en présence d'argent (I)

Ces expériences suggèrent que tous les groupes silylés sont sensibles en présence d'argent (I) (Tableau 14, entrée 2). Nous constatons que la vitesse de cette réaction dépend fortement de l'encombrement du silicium, plus la gêne stérique est importante, plus la désilylation est lente (Tableau 14 entrée 1). La différence de vitesse de désilylation entre les substituants permet la désilylation sélective d'un TMS par rapport à un TBDMS, un TBDPS ou un TIPS (Tableau 14, entrée 1) ou d'un TES par rapport à un TBDPS ou un TIPS (Tableau 14, entrée 2). Ce résultat est particulièrement intéressant puisque seule la coupure d'un groupe triméthylsilyle est décrite dans la littérature par cette méthode.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la sélectivité de la coupure d'un dérivé triméthylsilylé par rapport à un triéthylsilylé (Figure 41).

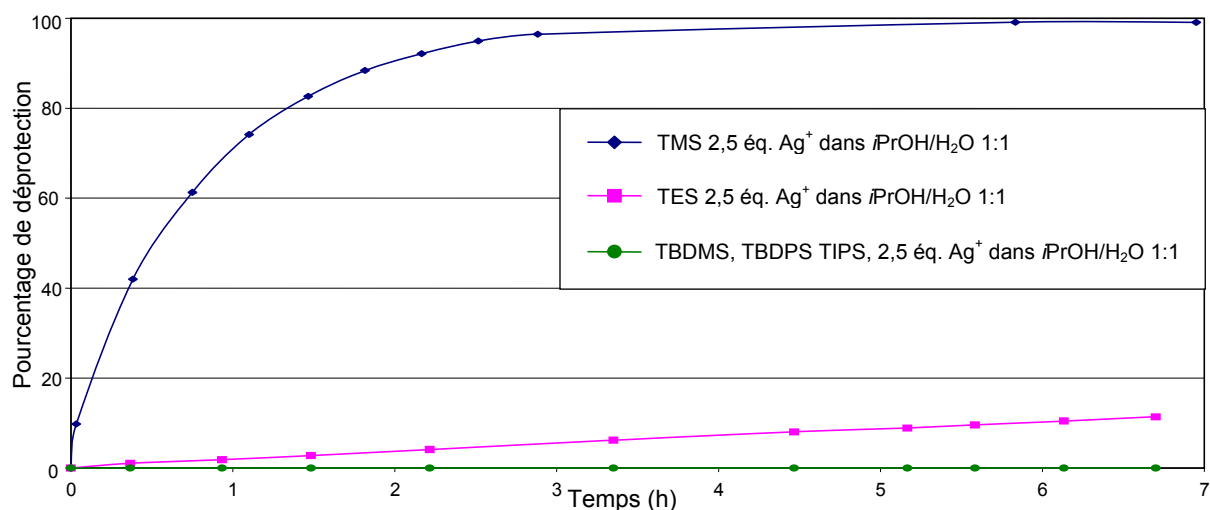


Figure 41 : Cinétique de désilylation par protolyse en fonction du substituant silylé

Comme en témoignent les mesures, la coupure d'un TMS par rapport à un TES n'est pas suffisamment sélective pour être utilisable en CuAAC successive puisque quand le dérivé triméthylsilylé est coupé à 100%, 10% de dérivé triéthylsilylé est déprotégé.

IV-4.C.b – Influence du solvant

Nous avons souhaité utiliser cette réaction pour la déprotection de peptides substitués par un alcyne silylé en solution aqueuse. Or, la littérature rapporte essentiellement l'utilisation de la protiodésilylation dans des solvants incompatibles avec les peptides. Nous avons donc vérifié la compatibilité de la réaction avec des solvants plus polaires, compatibles avec les peptides déprotégés.

		Coupure de la liaison C _{sp} -Si pour donner 2 (%)		
		CH ₂ Cl ₂ /MeOH/H ₂ O (7 : 4 : 1)	<i>i</i> PrOH/H ₂ O (1 : 1)	MeCN/H ₂ O (1 : 1)
	temps			
3 , Ag (I) 10 éq.	8h	100 %	100 %	40 %

Tableau 15 : Stabilité d'un alcyne triméthylsilylé en présence d'argent en fonction de la polarité du solvant

Ces résultats, nous permettent d'affirmer que la réaction est probablement compatible avec la déprotection d'alcynes silylés en milieu aqueux (Tableau 15).

IV-4.D – Conclusion sur les études de stabilité et de la déprotection des groupes protecteurs silylés

Cette étude de la stabilité des différents groupes silylés protecteurs des alcynes les plus couramment utilisés a été réalisée dans un but précis, trouver le (ou les) trialkylsilyles susceptibles d'être utilisés en synthèse peptidique, résistants aux conditions de CuAAC multiples et dont les conditions de déprotection sont compatibles avec un peptide non protégé. Au final, seul un groupe silylé remplit toutes ces conditions, le TIPS. D'après notre étude, il s'agit du groupe protecteur le plus stable, notamment en conditions de déprotection d'un peptide, et les deux méthodes pour le couper, fluorures ou protiodésilylation catalysée à l'argent (I), sont compatibles avec les peptides non protégés.

En plus d'avoir déterminé quel groupe silylé est le plus adapté à nos besoins, nous avons étudié les conditions de déprotection des différents alcynes, mettant en évidence des sélectivités dans la coupure du lien alcyne-silyle pouvant s'avérer très utiles pour réaliser des CuAAC successives mais aussi des réactions de Sonogashira¹⁴¹, Glaser^{142, 143} ou de Cadiot-Chodkiewicz successives qui emploient toutes une activation sélective des alcynes terminaux par le cuivre (I).¹⁴⁴

¹⁴¹ Halbes-Létinois, U.; Vasiliev, A.; Pale, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2828-2834

¹⁴² Manini, P.; Amrein, W.; Gramlich, V.; Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4339-4343

¹⁴³ Mössinger, D.; Chaudhuri, D.; Kudernac, T.; Lei, S.; De Feyter, S.; Lupton, J. M.; Höger, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *0*

¹⁴⁴ Bohner, T. V.; Beaudegnies, R.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 143-160

IV-5 – Application à la CuAAC successive : « Click-Click-Click »

IV-5.A – Introduction

La découverte de conditions de désilylation sélectives encore inconnues, nous a donné l'idée de valoriser notre étude en mettant au point une stratégie de synthèse robuste, généralisable et en même temps innovante pour réaliser une triple CuAAC successive sur une même molécule servant de châssis autrement dit, une « Click-Click-Click » (Schéma 16).

- Les études de stabilité et de déprotection suggèrent que la combinaison des groupes TES et TIPS ou TES et TBDPS sont parfaites pour des applications de CuAAC successive.
- L'utilisation du TES constitue une amélioration des stratégies préexistantes¹⁴⁵ en raison de sa stabilité vis-à-vis du cuivre (I) et de sa coupure chimiosélective en conditions par protiodésilylation.
- Nous avons choisi d'utiliser le TIPS comme deuxième groupe protecteur en raison de sa plus grande stabilité comparé au TBDPS, notamment en conditions acides (cf. IV-3.B, Tableau 8, p.51), ce qui nous laisse une plus grande liberté pour synthétiser le châssis moléculaire qui portera les diverses fonctions alcyne.
- Enfin, nous avons exploité des protocoles innovants pour écourter et simplifier les traitements des réactions par utilisation de résines fonctionnalisées de façon à réaliser notre séquence réactionnelle sans purifications chromatographiques intermédiaires.^{146,147}

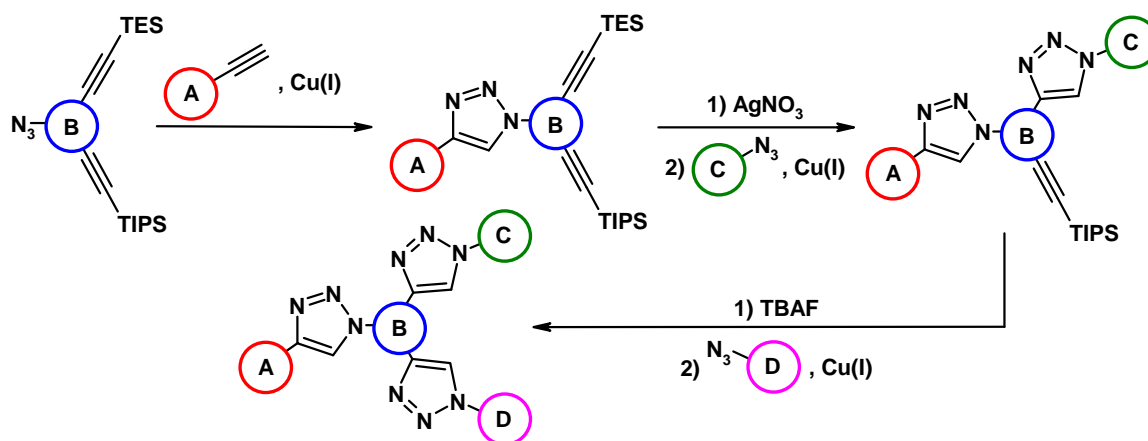


Schéma 16 : Stratégie de triple cycloaddition successive

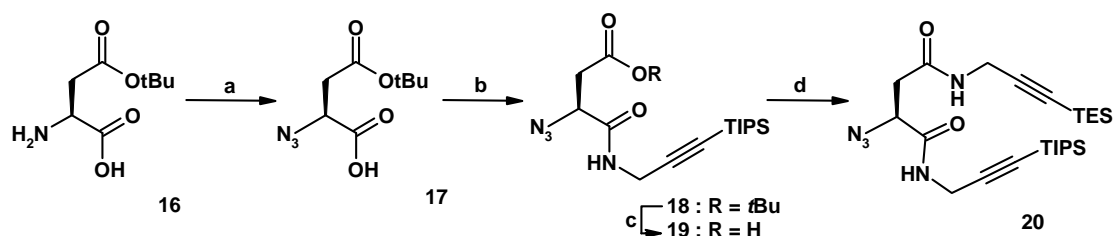
¹⁴⁵ Gramlich, P. M.; Warncke, S.; Gierlich, J.; Carell, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442-3444

¹⁴⁶ Opsteen, J. A.; Hest, J. C. M. V. *Chem. Commun.* **2005**, 57-59

¹⁴⁷ Urbani, C. N.; Bell, C. A.; Lonsdale, D. E.; Whittaker, M. R.; Monteiro, M. J. *Macromolecules* **2007**, *40*, 7056-7059

IV-5.B – Synthèse d'un composé *tris*-triazole

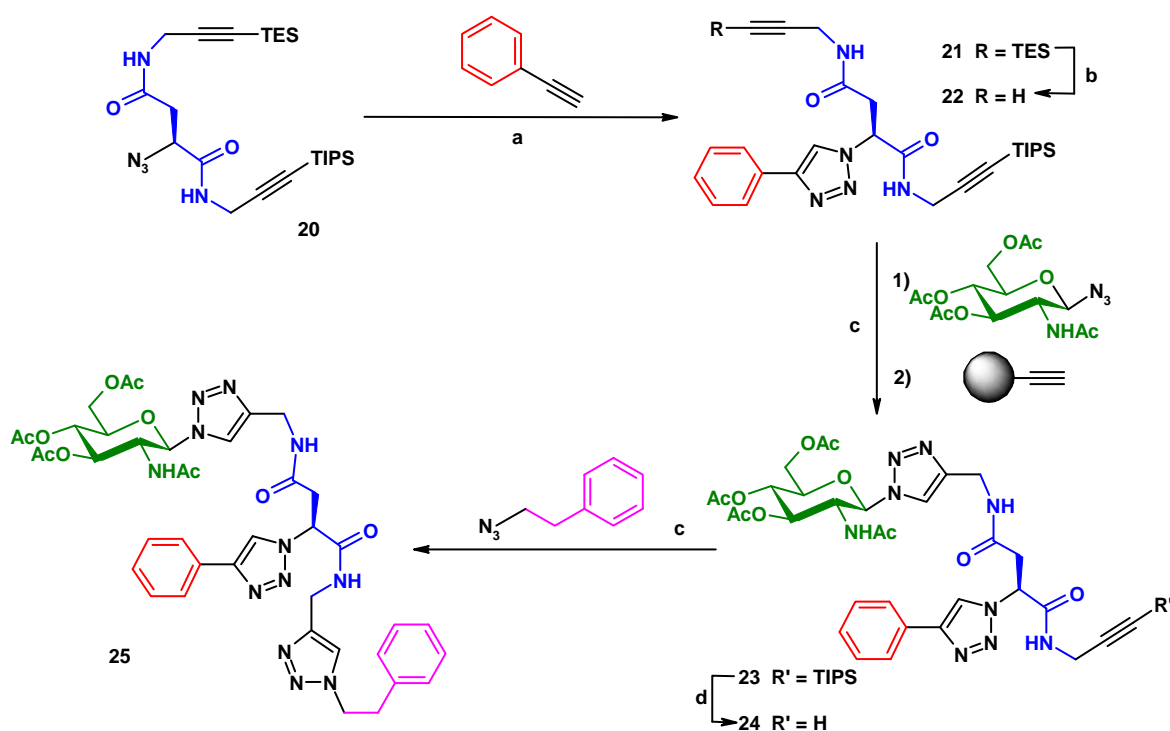
Nous avons synthétisé le châssis moléculaire **20** à partir de produits de départ commerciaux ou aisément disponibles au laboratoire. Il est substitué par trois fonctions chimiques qui nous permettront de réaliser trois CuAAC de façon successive (Schéma 17).



a) TfN_3 , CuSO_4 , K_2CO_3 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ b) **7**, EDCI, HOBT, DIEA, CH_2Cl_2 c) TFA, 0°C d) **4**, EDCI, HOBT, DIEA, CH_2Cl_2

Schéma 17 : Synthèse d'un bis-alcyne à partir de l'acide aspartique

L'azoturation de l'acide aspartique protégé commercial **16** par des méthodes décrites dans la littérature (cf. V-2.A.b, p.69), a permis d'obtenir **17**. Le couplage de la propargylamine **7** permet d'obtenir le propargylamide silylé **18**. Après coupure du groupe *tert*-butyle, et couplage avec l'amine **4**, nous avons obtenu le diamide **20** (Schéma 17).



a) $\text{CuSO}_4/\text{Ascorbate}$, $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (9 : 1), 16 h b) AgNO_3 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:4:1), 8h c) $\text{CuSO}_4/\text{Ascorbate}$, $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (9 : 1) d) TBAF, THF anhydre

Schéma 18 : Synthèse d'un *tris*-triazole par trois cycloadditions successives

Le châssis moléculaire **20** a été couplé avec un équivalent de phénylacétylène en présence de cuivre (I) pour fournir **21** de façon quantitative, le groupe TES de **21** est coupé sélectivement par protiodésilylation catalysée à l'argent (Schéma 18, Figure 42).

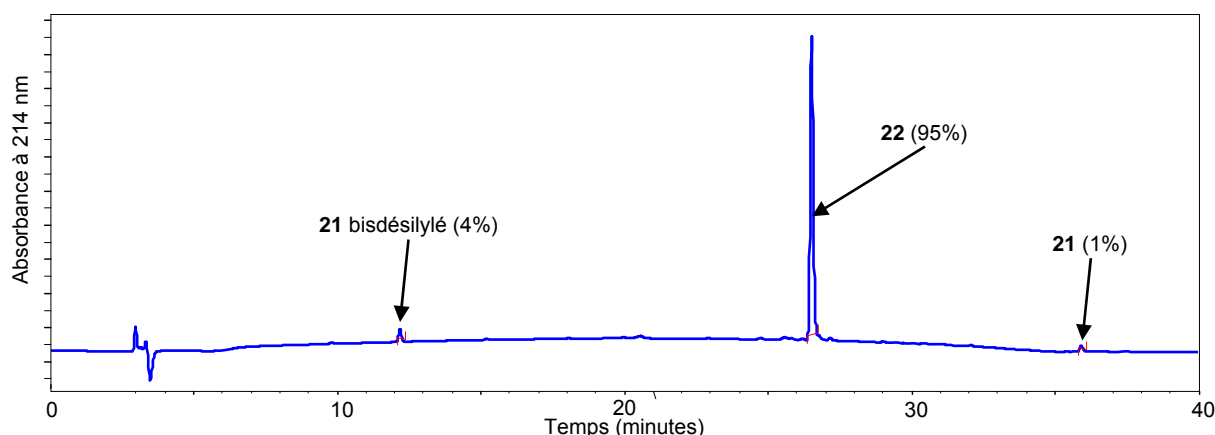


Figure 42 : Analyse chromatographique de la déprotection sélective de **21** par protiodésilylation (gradient d'analyse A)

Les analyses par HPLC du mélange réactionnel mettent en évidence la sélectivité de la déprotection. En effet, la déprotection de l'alkyne de triéthylsilyle est très largement favorisée par rapport à la coupure du TIPS.

Une deuxième cycloaddition en présence d'un excès d'un azoture dérivé de la glucosamine acétylée, obtenue par des méthodes décrites dans la littérature,¹⁴⁸ fournit **23** (Figure 43). L'excès d'azoture est éliminé par ajout d'un excès d'une résine fonctionnalisée par un alcyne suivi d'une filtration.

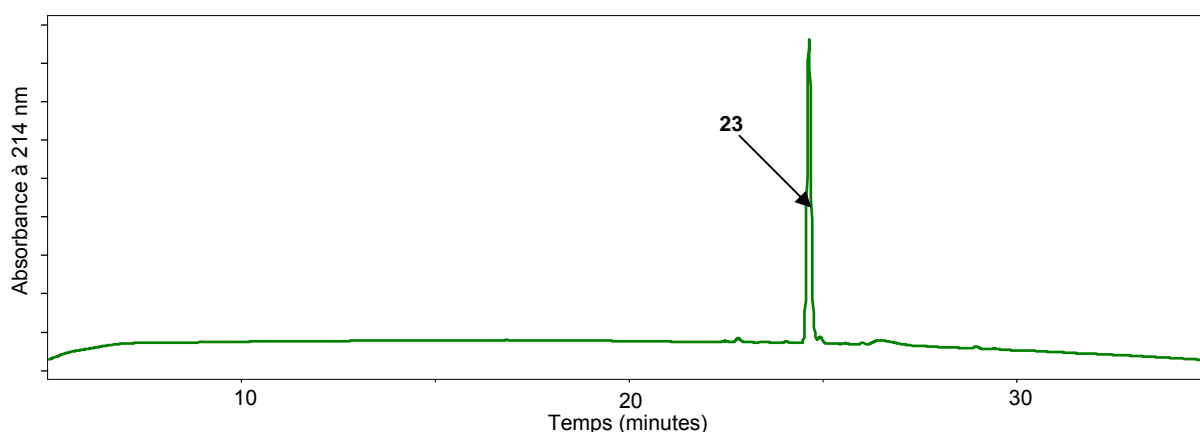


Figure 43 : Analyse chromatographique du milieu réactionnel lors de la cycloaddition d'un azidoglycoside avec **22** (gradient d'analyse A)

L'alkyne **24** est obtenu par coupure du groupe silylé restant par le trihydrate de fluorure de tétrabutylammonium (Figure 44).

¹⁴⁸ Macmillan, D.; Blanc, J. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2847-2850

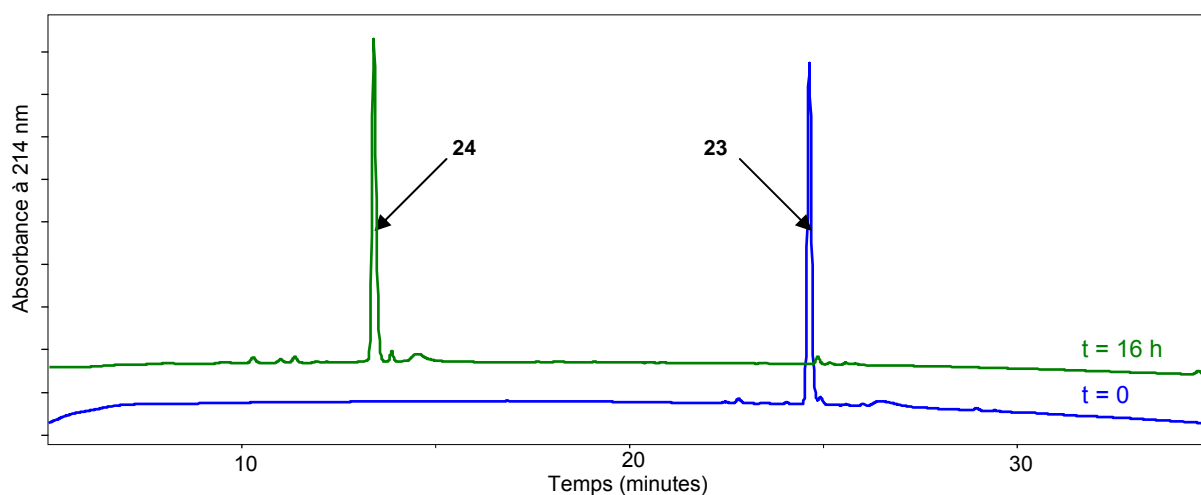


Figure 44 : Analyse chromatographique de la coupure sélective du groupe TIPS (gradient d'analyse A)

Le *tris*-triazole **25** est obtenu après une troisième CuAAC avec l'azoture de phényléthyle.¹⁴⁹ Après une purification par chromatographie sur gel de silice, **25** est obtenu avec un rendement global de 72 % sur 5 étapes en partant de **20** sans purifications intermédiaires.

IV-5.C – Conclusion

L'étude de la stabilité et de la déprotection des alcynes silylés nous a permis de mettre au point une stratégie générale de modification successive et sélective d'alcynes présents sur un même substrat grâce à l'utilisation de groupes protecteurs silylés et à leur déprotection en conditions douces et chimiosélectives, compatibles avec une très large gamme de substrats.

En appliquant cette stratégie à la CuAAC successive, nous avons synthétisé le composé *tris*-triazole **25**. La robustesse des protections, la sélectivité des réactions employées et l'utilisation de méthodes de purification innovantes nous ont permis réaliser la synthèse du *tris*-triazole **25** avec un rendement de 72% sur 5 étapes. Ces résultats ont donné lieu à une publication dans Tetrahedron.

¹⁴⁹ Smith, P. A. S.; Brown, B. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2435-2437

PARTIE V – SYNTHÈSE D'UN ANALOGUE DE PROTÉINE PAR LIGATIONS TRIAZOLES SUCCESSIVES

V-1 – Problématique

Nous venons de montrer l'efficacité de la multi-CuAAC successive avec une large gamme de substrats en milieu organique. Nous voulons maintenant étendre l'utilisation de cette approche à des substrats solubles dans l'eau tels que les peptides pour assembler une protéine par ligation triazole successive. Dans ce volet, nous avons d'abord concentré nos efforts sur l'introduction de chacun des partenaires de ligature, l'azoture et l'alcyne, dans des peptides à des positions bien précises de façon à mimer une liaison peptidique (Figure 45).

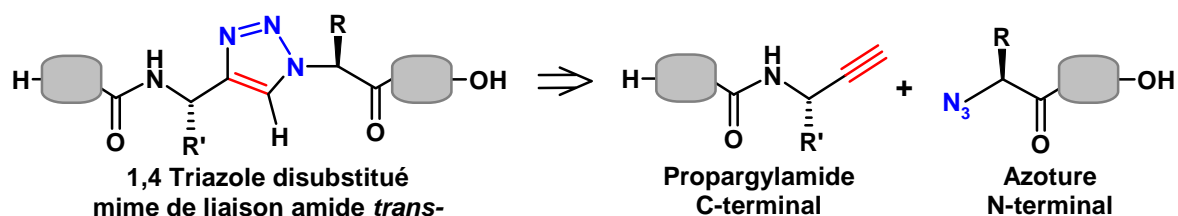


Figure 45 : Déconvolution rétrosynthétique de la liaison triazole pseudo-peptidique

- l'azoture doit être placé en extrémité N-terminale du peptide C-terminal de la protéine (Figure 45).
- l'alcyne terminal et/ou triisopropylsilylé doivent être introduits en extrémité C-terminale du peptide N-terminal de la protéine (Figure 45).

Une fois ces méthodes décrites, nous avons procédé à la synthèse d'une cible protéique, l'analogue *bis*-triazole d'un inhibiteur de protéases à cystéine de 98 acides aminés, la stéfine A par double ligature triazole dont l'activité *in vitro* et *in vivo* a été évaluée.

V-2 – Développement d'une stratégie générale pour l'introduction des partenaires de ligature triazole dans les peptides

V-2.A – Introduction d'azotures en extrémité N-terminale

L'introduction d'azotures en extrémité N-terminale d'un peptide produit par Fmoc-SPPS peut s'effectuer facilement par couplage en fin de synthèse d'un acide α -azoturé, dont la chaîne

latérale aura été préalablement protégée par un groupe protecteur acido-labile compatible avec la stratégie Fmoc/tBu.

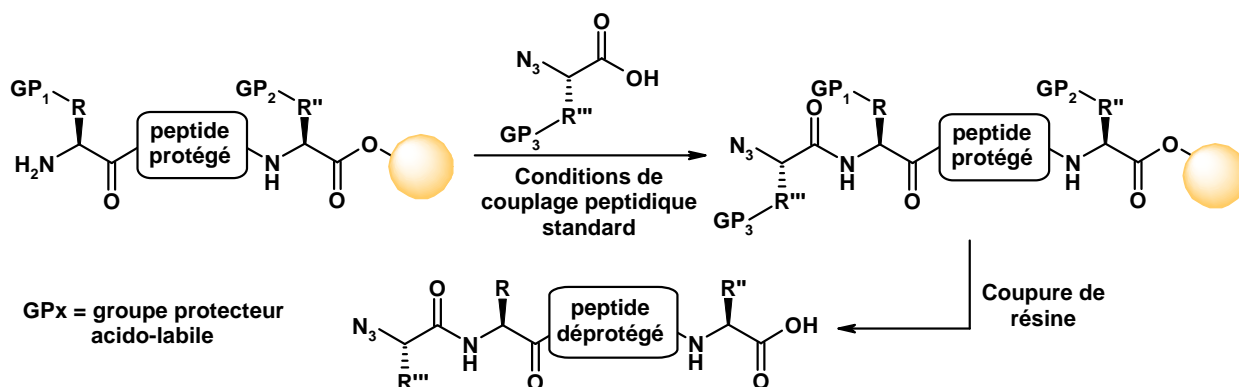


Figure 46 : Introduction d'un azote en extrémité N-terminale d'un peptide

V-2.A.a – Le transfert de diazo

Parmi les méthodes de synthèse d'azido-acides envisageables, le transfert de diazo sur les amines nous a semblé être la méthode la plus appropriée. La catalyse par un métal de transition permet la transformation chimiosélective des amines primaires en azotures dans des conditions douces, compatibles avec les groupes protecteurs baso- et acido-labiles couramment utilisés en Fmoc-SPPS avec de hauts rendements (Figure 47).¹⁵⁰

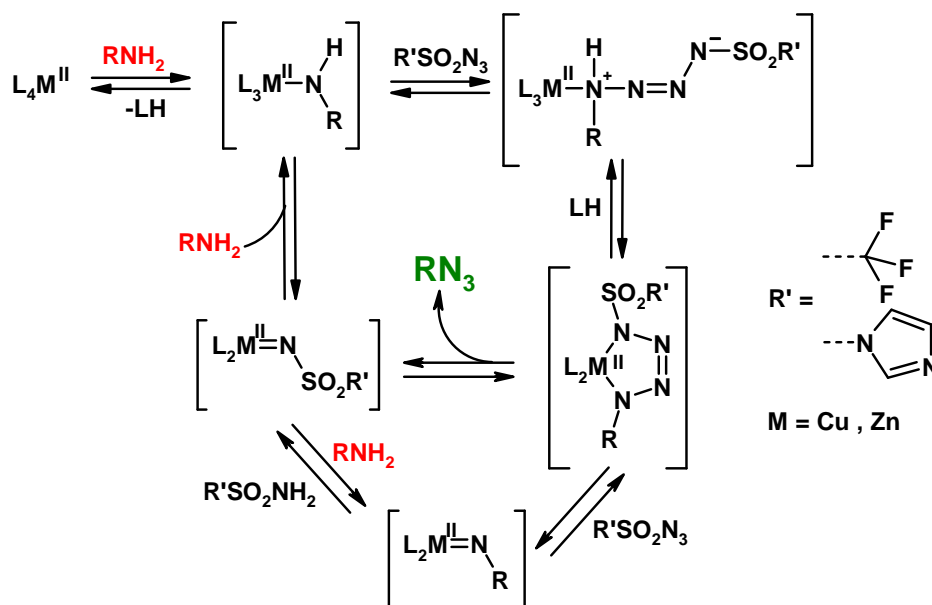


Figure 47 : Proposition de mécanisme du transfert de diazo métallo-catalysé d'après Nyffeler et al.¹⁵¹

¹⁵⁰ Lundquist, J. T.; Pelletier, J. C. *Org. Lett.* **2001**, 3, 781-783

¹⁵¹ Nyffeler, P. T.; Liang, C.; Koeller, K. M.; Wong, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10773-10778

L'azoture de triflyle est utilisé dans environ 75% des transferts de diazo de la littérature (source : Beilstein v. 04/2009) en raison de sa grande efficacité. Toutefois, son utilisation a des désavantages puisqu'il est explosif, onéreux et requiert d'être fraîchement préparé. En 2007, Stick et Goddard-Borger ont rapporté leur découverte d'un nouveau réactif, l'azoture d'imidazolysulfonyle, aux performances équivalentes mais bon marché, cristallisable, stable à température ambiante et non-explosif.¹⁵²

V-2.A.b – Synthèse d'azido-acides par transfert de diazo

Nous avons synthétisé plusieurs azido-acides en utilisant ces deux réactifs. (Schéma 19, Tableau 16)

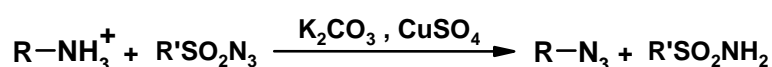


Schéma 19 : Conversion d'une amine en azoture par transfert de diazo catalysé par le cuivre (II)

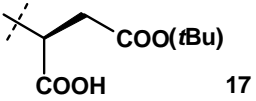
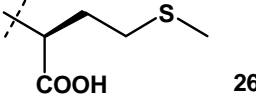
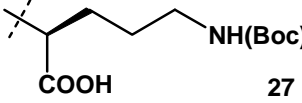
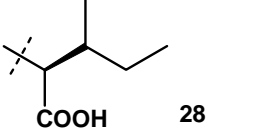
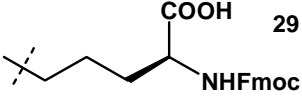
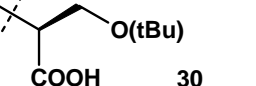
Acide aminé correspondant	R	Rdt. (%)	
		R' = trifluorométhyle [lit.]	R' = N-imidazolyle
1 H-Asp(OtBu)-OH	 17	71 [82]	88
2 H-Met-OH	 26	76 [86]	-
3 H-Lys(Boc)-OH	 27	28 [66]	75
4 H-Ile-OH	 28	76 [89]	-
5 Fmoc-Lys-OH	 29	79	-
6 H-Ser(tBu)-OH	 30	-	90

Tableau 16 : Synthèse d'acides α-azoturés, substrats et rendements

¹⁵² Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V. *Org. Lett.* **2007**, 9, 3797-3800

La plupart des acides α -azotés servant à introduire le partenaire azoture pour la CuAAC ont été synthétisés avec succès avec des rendements acceptables. Toutefois, le rendement d'obtention du dérivé de la lysine **27** s'est révélé médiocre lorsque la réaction est effectuée avec l'azoture triflique. Ces résultats, en désaccord avec la littérature,¹⁵⁰ ont été améliorés par utilisation de l'azoture d'imidazolysulfonyle (Tableau 16 entrée 3).

Les protocoles de transfert de diazo avec ce nouveau réactif sont plus simples, rapides et reproductibles qu'avec l'azoture de triflyle. En effet, en plus des avantages cités précédemment, il est important de mentionner que le co-produit de la réaction, le sulfonamide dérivé de l'azoture d'imidazolysulfonyle, (schéma 19) est séparable de l'azoture par simple extraction liquide-liquide. Par conséquent, l'obtention des azotures ne nécessite pas une purification par chromatographie sur gel de silice. En raison de tous ses avantages, l'azoture d'imidazolysulfonyle a été adopté de façon définitive, pour la synthèse d'acides azotés, au laboratoire.

V-2.B – Introduction de *N*-propargylamides en extrémité C-terminale

Avant de décider d'une stratégie, il convient de choisir le résidu qu'on souhaite mimer. En effet, le choix d'un résidu de déconvolution est arbitraire en ligation triazole du moment où on possède la propargylamine adéquate (substituée par la chaîne latérale correspondante à l'amide qu'on souhaite mimer).^{153,154} Dans le cadre de ce travail, nous avons souhaité limiter notre choix à la déconvolution aux résidus Gly-Xaa (Figure 48).

- Premièrement, parce que les composés qui permettent de synthétiser des peptides *N*-propargylamides mimant des glycines (la propargylamine commerciale et la propargylamine triisopropylsilylée) sont déjà en notre possession (cf. IV-2.B.b, p.48).
- Deuxièmement, parce que la glycine reste un des acides aminés les plus abondants dans les protéines (abondance relative $\sim 7,1\%$).³⁷ En somme, notre déconvolution, bien qu'elle semble restrictive au premier abord, donne accès à un très grand nombre de cibles potentielles.

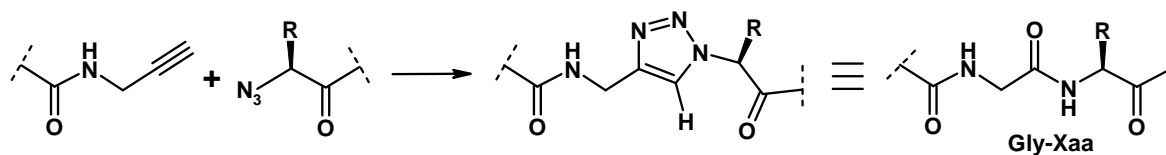


Figure 48 : Le triazolyl méthylamine comme mème de résidu glycyle

¹⁵³ Dickson, H. D.; Smith, S. C.; Hinkle, K. W. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5597-5599

¹⁵⁴ Detz, R. J.; Delville, M.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3777-3780

V-2.B.a – Choix d'une stratégie pour la synthèse de *N*-propargylamides en extrémité C-terminale

Il existe plusieurs stratégies pour la synthèse de peptides *N*-alkylamides C-terminaux,

- La stratégie (A) (Figure 49) consiste à introduire la modification en début de synthèse (avant l'élongation du peptide). Elle est réservée à l'introduction d'une fonctionnalité pouvant résister aux conditions d'élongation en Fmoc-SPPS et permet de synthétiser une variété de peptides avec la même modification.

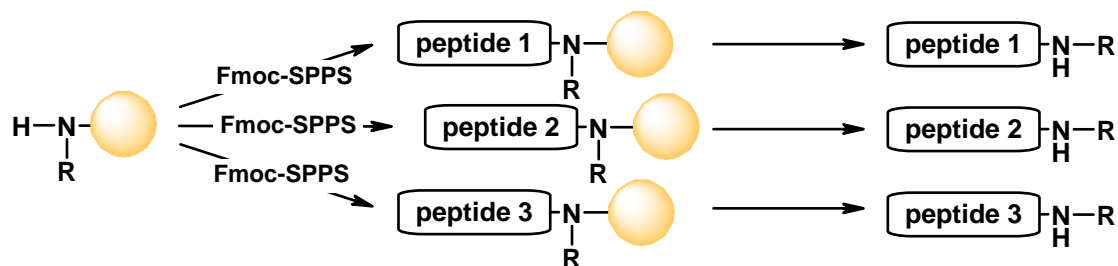


Figure 49 : Principe de la stratégie (A), l'introduction d'une modification en début de synthèse permet la synthèse d'une multitude de peptides modifiés identiquement

- La stratégie (B) (Figure 50) consiste à introduire la modification dans les dernières étapes, avant ou pendant le décrochage du peptide de la résine. Cette stratégie est utilisée pour introduire une ou plusieurs fonctionnalités sensibles aux conditions d'élongation en Fmoc-SPPS ou pour introduire une variété de modifications sur un même peptide.

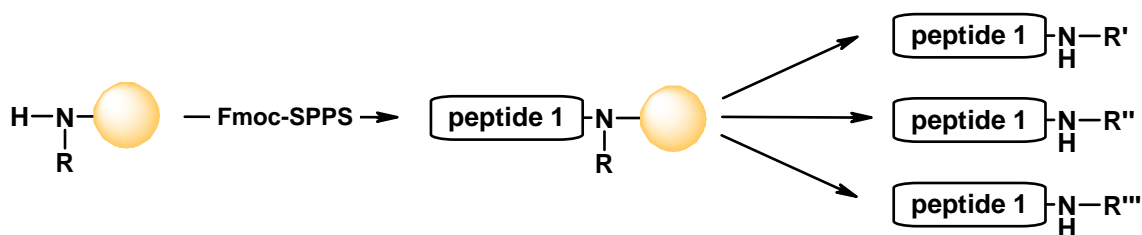


Figure 50 : Principe de la stratégie (B), l'introduction d'une modification en fin de synthèse permet la synthèse d'un peptide portant des modifications différentes

Nous avons choisi la stratégie (A) en fonction de deux facteurs :

- Nous souhaitons introduire une modification qui nous permettra de mimer un résidu, le glycyle, sur les peptides de notre choix. Il est donc beaucoup plus judicieux d'utiliser la stratégie A.
- Les *N*-propargylamides sont stables en conditions d'élongation de Fmoc-SPPS. Nous pouvons donc introduire cette modification en début de synthèse.

V-2.B.b – Le Backbone Amide Linker¹⁵⁵

La méthode que nous avons jugée comme étant la plus simple à mettre en œuvre pour synthétiser des peptides alkylamides, est la stratégie du « BAL » ou *Backbone Amide Linker* qui consiste à utiliser des bras de type benzylamine substituée.

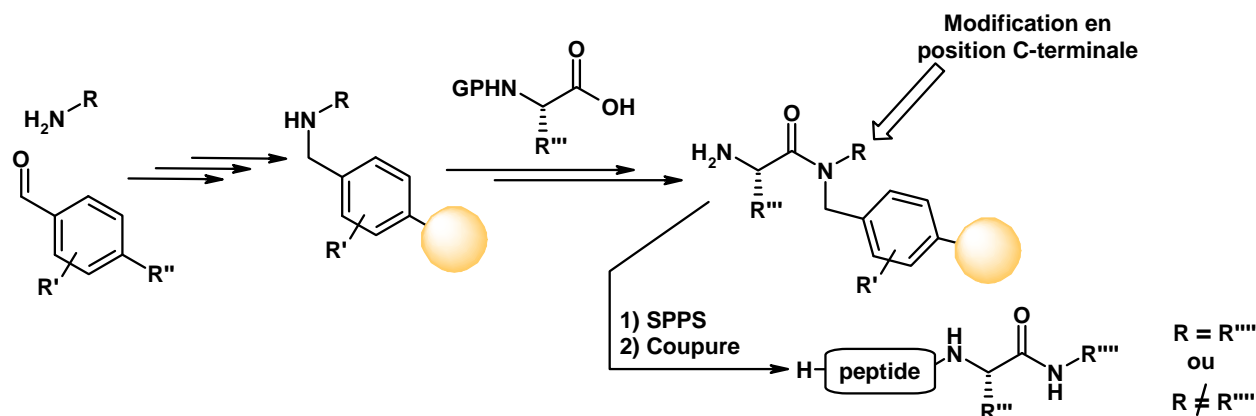


Figure 51 : Schéma de principe d'une stratégie BAL

L'étape-clé de cette stratégie est une amination réductrice permettant d'obtenir une benzylamine qui sert de point d'ancrage au peptide sur la résine. La réduction est suivie d'une acylation de l'amine secondaire formée. Ainsi, la chaîne peptidique en croissance est accrochée, non pas par l'acide carboxylique en position C-terminale, mais sur l'azote de la liaison peptidique, donnant ainsi accès, en principe, à n'importe quelle modification de la fonction C-terminale.

Il existe deux méthodes pour commencer une synthèse en stratégie BAL :

- immobiliser sur résine le précurseur aldéhydique du bras pour ensuite réaliser l'amination réductrice sur support solide (Figure 52 méthode A).¹⁵⁶ Cette méthode est préconisée si on souhaite faire varier les substituants en extrémité C-terminale du peptide.
- réaliser l'amination réductrice et protéger l'amine en solution pour ensuite immobiliser la benzylamine (Figure 52 méthode B).¹⁵⁷

¹⁵⁵ Boas, U.; Brask, J.; Jensen, K. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2092-2118

¹⁵⁶ Alsina, J.; Jensen, K. J.; Albericio, F.; Barany, G. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2787-2795

¹⁵⁷ Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vagner, J.; Albericio, F.; Barany, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5441-5452

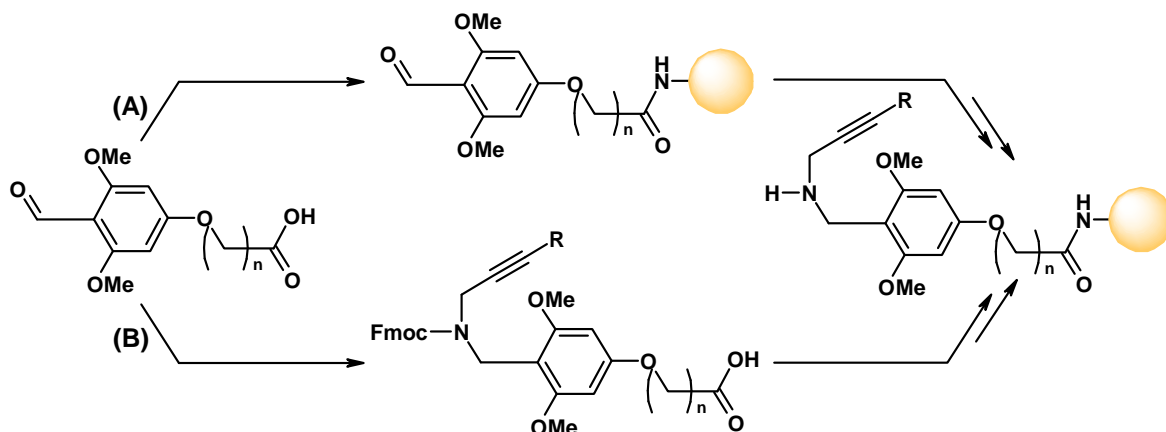


Figure 52 : Deux voies possibles de fonctionnalisation d'une résine selon la stratégie de Barany¹⁵⁷

Lorsque l'amination réductrice est effectuée sur résine (Figure 52 méthode A), le rendement de synthèse du peptide dépend fortement du succès de cette étape qui demande souvent une optimisation en fonction de l'amine (réducteur, solvants...). La méthode B est plus adaptée à nos besoins. En effet, cette dernière approche possède l'avantage de permettre le contrôle l'étape d'amination réductrice avant la fonctionnalisation de la résine. De plus, dans notre cas, nous souhaitons mimer un seul résidu, le glycyle. Par conséquent, n'avons besoin que de deux composés différents pour synthétiser de multiples protéines, l'un comportant la propargylamine, l'autre la propargylamine silylée.

V-2.B.c – Synthèse de bras de type propargylamine benzylque

Nous avons réalisé la synthèse des bras nécessaires pour la suite de notre travail. Les bras **31** et **32** ont été synthétisés en deux étapes, sans purifications intermédiaires (Schéma 20). Lors d'une première étape, l'acide 4-(4-formyl-3,5-diméthoxy-phénoxy)butyrique réagit avec les propargylamines pour donner une imine qui est réduite *in situ* par le cyanoborohydrure de sodium. L'amine secondaire obtenue est ensuite acylée par le *N*-(9-fluorénylméthoxycarbonyloxy)succinimide pour fournir les bras **31** et **32** directement utilisables en Fmoc-SPPS.

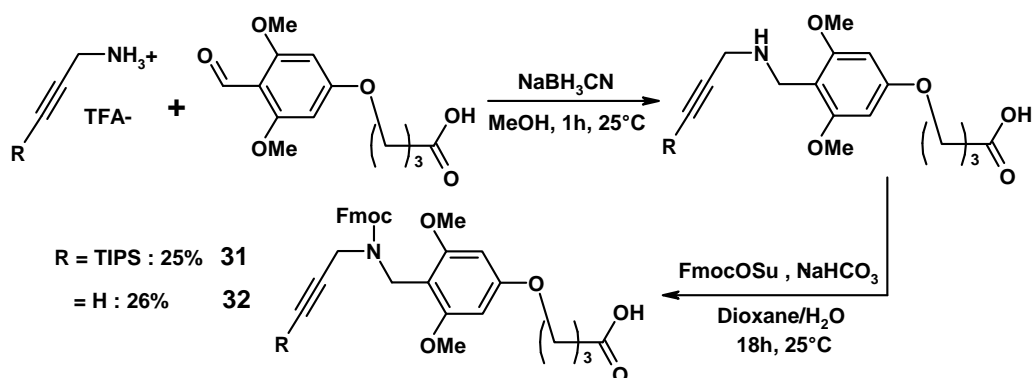


Schéma 20 : Préparation de bras de type propargylamide benzylique pour la synthèse de peptides N-propargylamides

Les rendements de la réaction restent modestes et les tentatives de les optimiser se sont révélées infructueuses. L'étape limitante semble être l'amination réductrice et les paramètres à étudier pour l'optimiser la réaction sont nombreux (réducteur, solvant, température, additifs). Toutefois, rappelons que notre stratégie fournit les produits désirés à partir de produits commerciaux ou disponibles au laboratoire à l'échelle de plusieurs grammes dans des délais relativement courts. Par conséquent, dans notre cas, l'optimisation de la synthèse n'est pas une étape cruciale.

V-2.C – Choix de la résine

En synthèse de peptides sur phase solide, le choix du support polymérique est aussi important que le choix d'un solvant en synthèse en phase liquide. Grâce à la littérature et l'expérience de l'équipe dans la synthèse de peptides difficiles, nous avons jugé que pour la synthèse de séquences peptidiques longues dont la synthèse n'a jamais été décrite, il était judicieux de s'orienter pour des résines polaires à base de polyéthylène glycol (PEG), plutôt que pour celles plus classiques à base de polystyrène, de façon à maximiser les chances de succès de la synthèse.^{158,159} En effet, les support à base de PEG sont connus pour minimiser les interactions intra- et intermoléculaires des chaînes polypeptidiques en croissance qui sont à l'origine de la plupart des couplages difficiles.

¹⁵⁸ Cremer, G.; Tariq, H.; Delmas, A. F. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 437-442

¹⁵⁹ García-Martín, F.; White, P.; Steinauer, R.; Côté, S.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. *Pept. Sci.* **2006**, *84*, 566-575

Des supports de type entièrement PEG disponibles sur le marché, nous avons choisi la résine ChemMatrix^{®160} qui possède la meilleure stabilité mécanique comparée à la PEGA utilisée en routine au sein du laboratoire.

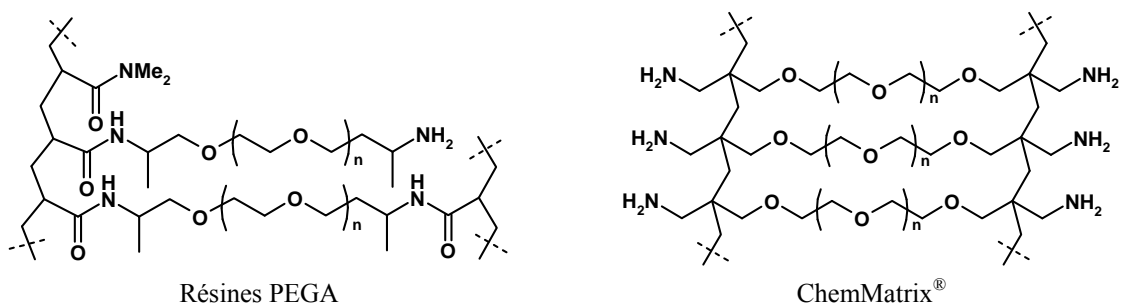


Figure 53 : Structure de deux résines à base de PEG

¹⁶⁰ Garcia-Martin, F.; Quintanar-Audelo, M.; Garcia-Ramos, Y.; Cruz, L. J.; Gravel, C.; Furic, R.; Cote, S.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 213-220

V-3 – Synthèse d'un analogue de protéine par double ligation triazole

Pour valider notre approche, nous avons choisi de synthétiser une protéine d'une centaine de résidus, non glycosylée, sans cystéines (donc difficilement accessible par *NCL*), dont l'activité biologique est facile à évaluer, la stéfine A (Figure 54).

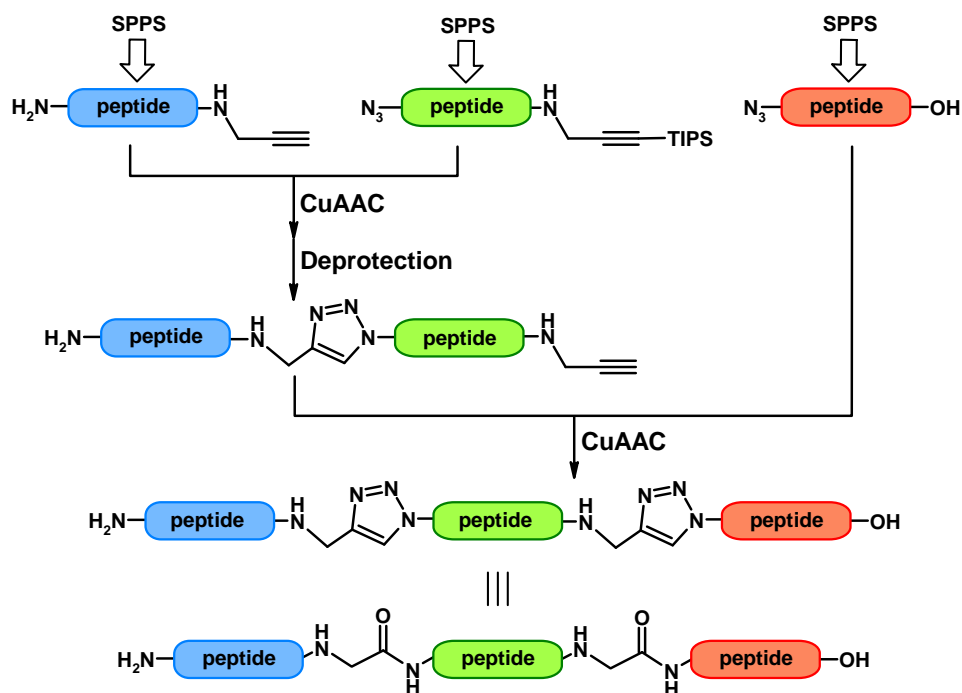


Figure 54 : Stratégie synthétique pour la préparation d'un analogue d'une protéine par double CuAAC successive entre trois fragments peptidiques

V-3.A – Choix de la cible

V-3.A.a – Les stéfines

Les stéfines sont des membres de la superfamille des cystatines, qui sont de puissants inhibiteurs réversibles des protéases à cystéine. La famille des stéfines est formée de protéines non glycosylées, sans ponts disulfures, d'une masse moléculaire avoisinant les 11 kDa qui inhibent les endopeptidases à l'échelle picomolaire ($K_i = 0,05-130$ pM) et les exopeptidases à l'échelle nanomolaire ($K_i = 0,3-100$ nM).¹⁶¹ Ces inhibiteurs sont impliqués dans le contrôle des mécanismes responsables de la dégradation protéique et on suppose qu'ils aident à protéger les cellules et l'organisme d'une protéolyse endogène inappropriée ou d'une protéolyse exogène.

¹⁶¹ Turk, V.; Bode, W. *FEBS Lett.* **1991**, 285, 213-219

En raison de la spécificité des stéfines pour l'inhibition des cathepsines à cystéine, ces protéines pourraient constituer une thérapie efficace pour les pathologies impliquant une dérégulation de l'activité des protéases à cystéines.¹⁶² La balance protéase/inhibiteur de protéases est particulièrement importante dans la physiopathologie des maladies pulmonaires et dans la migration tumorale dans la formation de métastases.^{163,164} En outre, un autre intérêt majeur que présente cette famille de protéines est celui du traitement des infections parasitaires où les protéases présentent un des principaux moyens de pénétration et survie dans l'organisme hôte et leur inhibition pourrait constituer une nouvelle voie thérapeutique.^{165,166}

V-3.A.b – La stéfine A humaine : séquence, structure et mode d'action.

La séquence de la stéfine A (Tableau 17) a été déterminée en 1983,¹⁶⁷ c'est une protéine de 98 acides aminés et d'une masse molaire de 11006 g/mol.

1	10	20	30	40	50
MIPGGLSEAK	PATPEIQEIV	DKVKPQLEEK	TNETYGKLEA	VQYKTQVVAG	
	60	70	80	90	98
TNYYIKVRAG	DNKYMHLKVF	KSLPGQNE DL	VL TGYQVDKN	KDDEL TGF	

Tableau 17 : Séquence de la stéfine A

Sa structure tridimensionnelle en solution consiste en cinq feuillets β antiparallèles qui enveloppent une hélice α longue de cinq tours (Figure 55).¹⁶⁸

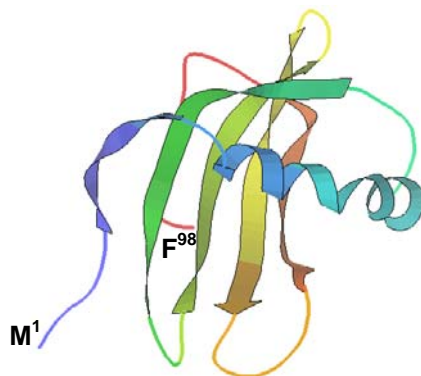


Figure 55 : Structure tridimensionnelle en solution de la stéfine A à pH = 5,5 et à 308° K d'après Martin et al.¹⁶⁸

¹⁶² Kos, J.; Lah, T. T. *Oncol. Rep* **1998**, *5*, 1349-1361

¹⁶³ Veillard, F.; Lecaille, F.; Lalmanach, G. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **2008**, *40*, 1079-1094

¹⁶⁴ Joyce, J. A.; Hanahan, D. *Cell Cycle* **2004**, *3*, 1516-1619

¹⁶⁵ Lecaille, F.; Kaleta, J.; Bromme, D. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459-4488

¹⁶⁶ McKerrow, J. H.; Engel, J. C.; Caffrey, C. R. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 639-644

¹⁶⁷ Machleidt, W.; Borchart, U.; Fritz, H.; Brzin, J.; Ritonja, A.; Turk, V. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* **1983**, *364*, 1481-1486

¹⁶⁸ Martin, J. R.; Craven, J. C.; Jerala, R.; Kroon-Zitko, L.; Zerovnik, E.; Turk, V.; Waltho, J. P. *J. Mol. Biol.* **1995**, *246*, 331-343

Dans la partie inférieure de la protéine (Figure 55), on observe l'extrémité N-terminale (en bleu) en forme désordonnée et deux boucles en tête d'épingle (en vert et orange). Cet ensemble quasi aligné, confère à la structure globale de l'inhibiteur une forme de coin (décrit littéralement comme un *tripartite wedge*) qui vient se loger dans le site actif des cathepsines à cystéine tel qu'on peut le voir sur la Figure 56 avec la papaïne, l'archétype des protéases à cystéine.^{169,170,171}

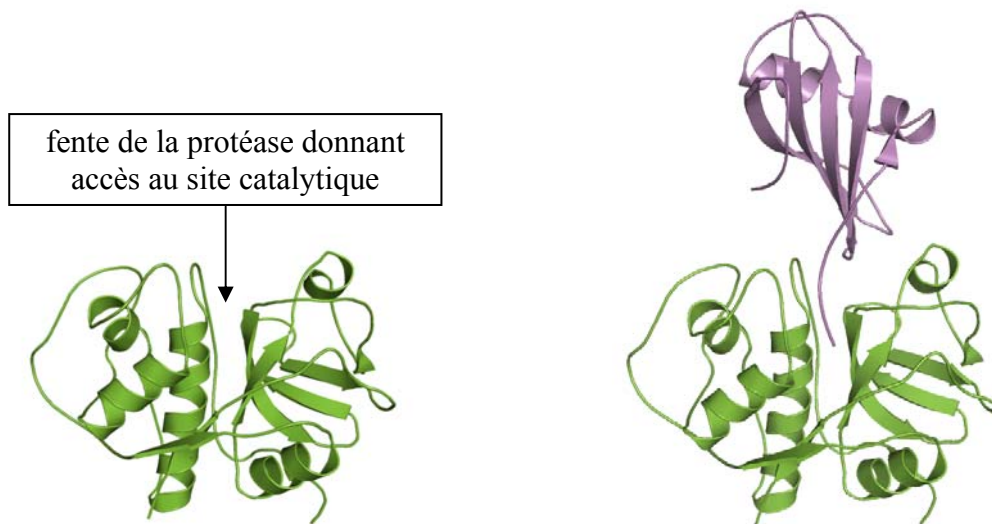


Figure 56 : a) Vue tridimensionnelle de la papaïne b) Structure du complexe stéfine B-papaïne carboxyméthylée d'après Stubbs et al.¹⁷¹

La stéfine A, de par sa séquence, sa structure et sa fonction biologique, semble la cible idéale pour démontrer l'applicabilité de notre stratégie.

¹⁶⁹ Jenko, S.; Dolenc, I.; Guncar, G.; Dobersek, A.; Podobnik, M.; Turk, D. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 875-885

¹⁷⁰ Bode, W.; Engh, R.; Musil, D.; Thiele, U.; Huber, R.; Karshikov, A.; Brzin, J.; Kos, J.; Turk, V. *EMBO J.* **1988**, *7*, 2593-2599

¹⁷¹ Stubbs, M. T.; Laber, B.; Bode, W.; Huber, R.; Jerala, R.; Lenarcic, B.; Turk, V. *EMBO J.* **1990**, *9*, 1939-1947

V-3.B – Synthèse des différents fragments peptidiques

Nous avons choisi de synthétiser la stéfine A à partir de trois fragments de longueur équivalente synthétisés par SPPS. Chacun des fragments est substitué par un ou deux partenaires pour la ligation triazole.

- Le fragment N-terminal est substitué par un propargylamide en extrémité C-terminale (symbolisé par **X³⁶**, Figure 57).
- Le fragment médian porte un azoture en extrémité N-terminale (sur le résidu **K³⁷** marqué en bleu, Figure 57) et est fonctionnalisé par un propargylamide silylé **X⁶⁰** en extrémité C-terminale.
- Le fragment C-terminal porte un azoture en extrémité N-terminale **D⁶¹** (Figure 57).

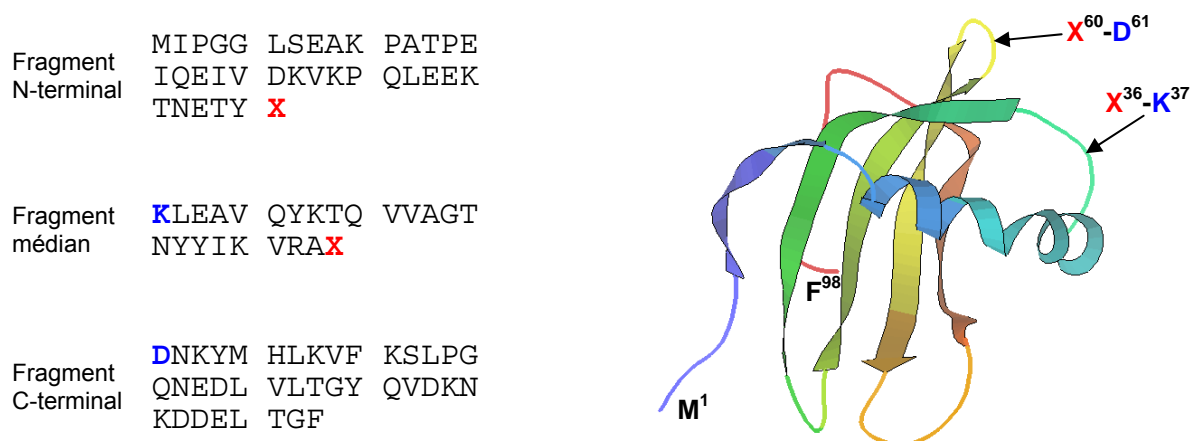


Figure 57 : Déconvolution de la stéfine A

Une étude du mode d'action des stéfinines sur les cathepsines à cystéine nous permet de constater que notre déconvolution, située à l'opposé des sites d'interaction avec les protéases, a peu de chance de modifier l'activité de l'inhibiteur synthétique.

V-3.B.a – Synthèse du fragment médian

Le fragment médian modifié pour la ligation est composé de 23 acides aminés (Figure 58) :

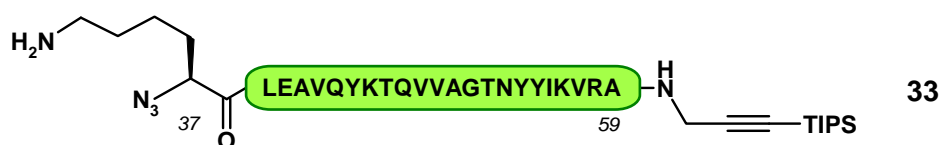


Figure 58 : Structure du fragment médian

En extrémité N-terminale, la lysine 37 est remplacée par son analogue α -azoturé tandis qu'en extrémité C-terminale, le carbonyle du résidu alanyl 59 est fonctionnalisé par un propargylamide triisopropylsilylé.

V-3.B.a.1 – Rappels du vocabulaire propre à la SPPS

La synthèse de ce fragment a été réalisée de la façon suivante :

- Les couplages sont automatisés. Ils sont effectués avec 10 équivalents d'acide aminé protégé et 10 équivalents HBTU. En cas de couplage qu'on sait lent et/ou difficile, la réaction est répétée après une brève étape de lavage de la résine à la fin d'un premier cycle de couplage. On parle alors de « double couplage ». Chaque cycle de couplage (ou de double couplage) est suivi par une acétylation, ceci afin de faciliter la purification finale en arrêtant l'élongation de peptides qui n'ont pas réagi sous forme d'acétamide.
- Histogramme de déprotection : Les déprotections automatisées du *N*- α -Fmoc sont réalisées avec de la pipéridine dans la NMP. La solution d'adduit fluorénylméthyl-pipéridine issue de la déprotection est analysée par spectrophotométrie de façon à évaluer l'efficacité de l'étape de couplage et de déprotection précédentes. Ces mesures d'absorbance, habituellement présentées sous forme d'histogramme, sont un outil précieux pour l'optimisation des synthèses sur phase solide comme on va le voir par la suite.¹⁵⁸
- Il n'est pas envisageable de mettre en œuvre les couplages automatiques qui utilisent 10 équivalents de composé à coupler avec les composés non commerciaux ou coûteux tels que **26** et **31** qu'il convient d'utiliser avec parcimonie. Pour le couplage de ce type de composé, nous avons préféré suivre une procédure dite de « couplage manuel » faisant appel à seulement 2 équivalents de ces composés avec 2 équivalents d'un réactif de couplage plus efficace que l'HBTU comme l'HATU.¹⁷²
- Chaque couplage manuel est vérifié systématiquement par test de Kaiser¹⁷³ (si l'amine à acyler est primaire) ou par test au chloranile (si l'amine est secondaire),¹⁷⁴ qui permettent de détecter de faibles quantités d'amines sur support polymérique par coloration de la résine. Si le test est positif, la réaction est répétée. Si le test est négatif, le couplage est suivi d'une acétylation puis, de la coupure du groupe protecteur Fmoc à l'aide d'une solution de 20% de pipéridine dans le DMF. Cette déprotection est accompagnée du dosage de l'absorbance de l'adduit fluorénylméthyl-pipéridine

¹⁷² Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398

¹⁷³ Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598

¹⁷⁴ Vojkovsky, T. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 236-237

contenu de la solution issue de la déprotection, de façon à quantifier avec précision l'efficacité du couplage. Le rendement d'élongation est le rapport entre l'absorbance de la solution issue de la dernière déprotection et l'absorbance de la solution issue de la première déprotection.

V-3.B.a.2 – Vers la première synthèse de **33**

La stratégie initiale pour la synthèse de ce fragment a consisté à coupler manuellement le bras **31** sur la résine. Après vérification de l'efficacité du couplage, le groupe protecteur est coupé et le dérivé protégé de l'alanine est fixé par couplage manuel. En effet, la benzylamine sur laquelle nous voulons coupler le résidu est secondaire et, par conséquent, considérée comme moins réactive. Ce protocole de fonctionnalisation de la résine et de substitution du bras par le premier résidu est quantitatif. Après ces deux étapes, la synthèse est poursuivie de façon automatisée. Le résidu N-terminal azoturé est introduit par couplage manuel (Schéma 21).

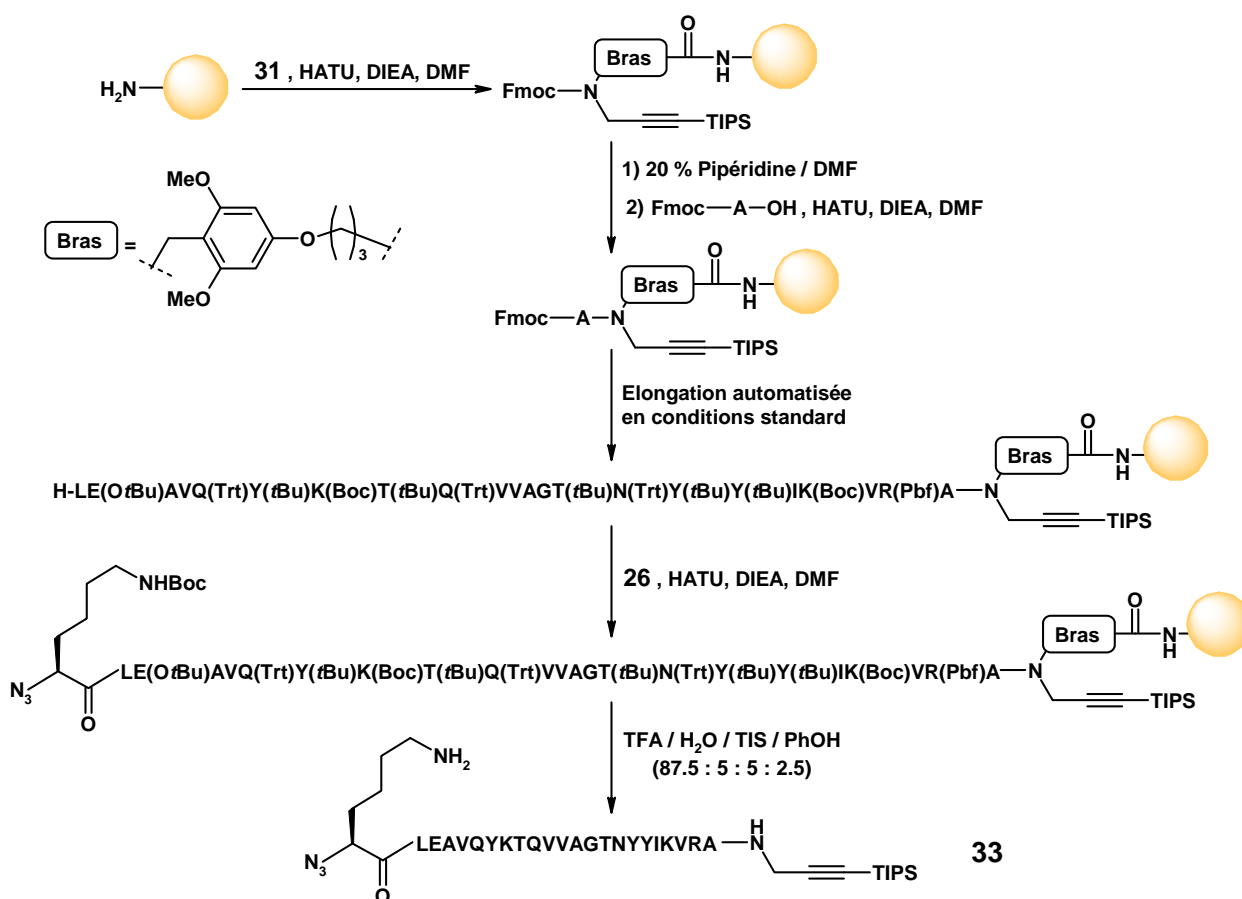


Schéma 21: Stratégie initiale de synthèse du fragment médian **33**

L'histogramme permettant le suivi de déprotection du *N*- α -Fmoc de chaque acide aminé par mesure de l'absorbance de la solution de déprotection ($\lambda_{\max} = 301 \text{ nm}$, $\epsilon = 7800$) est présenté Figure 59.

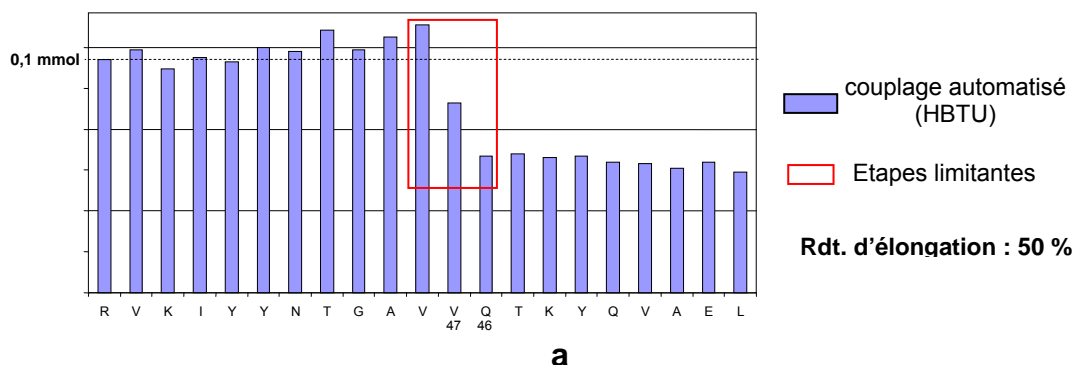


Figure 59 : Histogramme représentant la déprotection du *N*- α -Fmoc de chaque acide aminé

On aperçoit nettement des couplages difficiles au niveau de la valine 47 et la glutamine 46 et qui entraînent une chute du rendement d'élongation d'approximativement 50% (Figure 59).

Un échantillon de la résine a été traité par une solution de TFA avant le couplage de **26**. L'analyse par HPLC et spectrométrie de masse du mélange de peptides obtenu révèle que les peptides issus de la synthèse ont des temps de rétention similaires, probablement en raison de la grande apolarité apportée par le substituant triisopropylsilyle. Il est donc très difficile de séparer le composé cible du reste des co-produits de la synthèse. D'autre part, nous avons pu constater que le mélange de peptides obtenus n'est pas soluble dans les solvants compatibles avec l'analyse par HPLC, eau et acétonitrile, ce qui peut rendre très difficile la purification du peptide par HPLC semi-préparative. Ces observations, nous ont motivé pour effectuer une synthèse quasi-quantitative du fragment médian de façon à pouvoir l'utiliser directement pour la réaction de ligation.

V-3.B.a.3 – Deuxième stratégie de synthèse de **33**

Une nouvelle stratégie de synthèse a été définie en fonction des résultats obtenus précédemment. Nous avons d'abord remarqué que la valine 47 correspondant aux couplages difficiles se situe dans une séquence de résidus hydrophobes qui, dans la protéine naturelle, adopte une conformation en coude. Cette observation a fait naître l'hypothèse que les couplages difficiles provenaient peut-être d'une structuration du peptide sur la résine stabilisée par formation de liaisons faibles intra- et intermoléculaires.

Nous avons conçu une nouvelle stratégie de synthèse de **33** en fonction de cette hypothèse et nous avons décidé d'utiliser des dipeptides pseudo-proline (Figure 60). En effet, les pseudo-

prolines ont la propriété de tordre la chaîne peptidique en croissance, défavorisant ainsi la structuration de celle-ci pendant la synthèse et interdisant la formation de liaisons hydrogène.^{175,176} Ces composés et les résidus hydrophobes ont été couplés manuellement avec de l'HATU pour assurer l'efficacité du couplage.

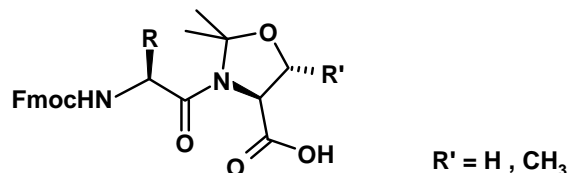


Figure 60 : Structure d'un dipeptide pseudo-proline (Ψ -Pro)

Comme indiqué précédemment, la synthèse commence par la fonctionnalisation de la résine avec le bras **31** et par la substitution de celui-ci avec un résidu alanyle au moyen de couplages et de déprotections manuelles. La synthèse est poursuivie de façon automatique (Figure 61), les résidus de 45 à 52 ont été couplés manuellement de façon très satisfaisante, les résidus 50 et 51 ont été introduits sous forme d'un dipeptide pseudo-proline. La synthèse automatisée a été reprise une fois que le couplage des résidus hydrophobes a été réalisé avec succès.

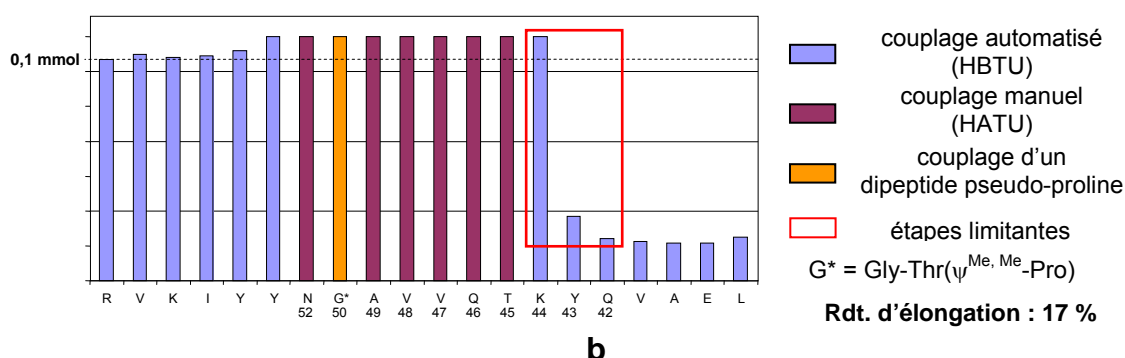


Figure 61 : Histogramme représentant la déprotection du N- α -Fmoc de chaque acide aminé

L'histogramme **b** (Figure 61) correspond à celui de la deuxième synthèse de **33**, on constate nettement que, malgré l'amélioration de notre stratégie initiale, le couplage du résidu 43 avec la stratégie que nous avons conçue est difficile (alors qu'il ne l'était pas dans le cadre de la stratégie précédente). Compte tenu des objectifs que nous nous sommes fixés, la synthèse a été abandonnée et les informations obtenues ont servi à redéfinir une troisième stratégie de synthèse.

¹⁷⁵ Mutter, M.; Nefzi, A.; Sato, T.; Sun, X.; Wahl, F.; Wöhr, T. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 145-153

¹⁷⁶ Wöhr, T.; Wahl, F.; Nefzi, A.; Rohwedder, B.; Sato, T.; Sun, X.; Mutter, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218-9227

V-3.B.a.4 – Troisième stratégie de synthèse de **33**

Grâce à l'histogramme **b** (Figure 61), qui met en évidence la descente brutale du rendement d'élongation au cours d'une seule étape, nous avons redéfini une nouvelle stratégie pour obtenir **33** de façon quantitative. En effet, une chute brutale du rendement de couplage est souvent caractéristique d'une structuration du peptide sur la résine (cf. V-3.B.a.2 p.81), nous avons opté par une approche entièrement automatisée en incorporant les résidus 49/50 et 44/45 sous forme de pseudo-prolines en espérant éviter la structuration du peptide sur la résine.

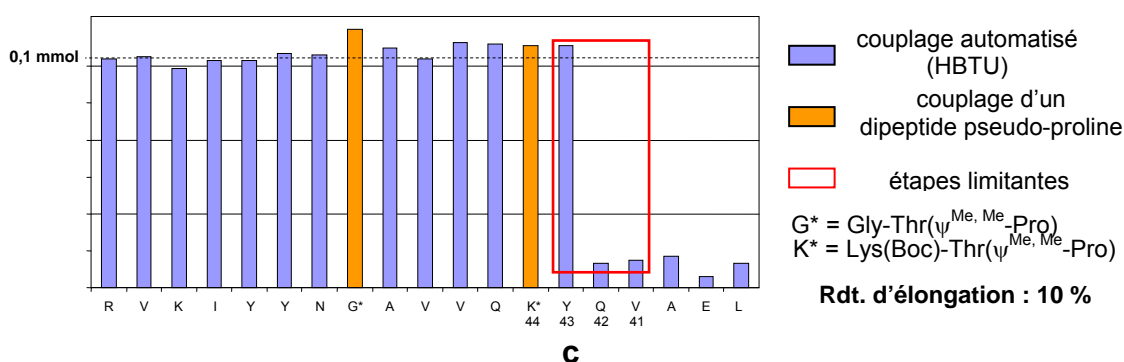


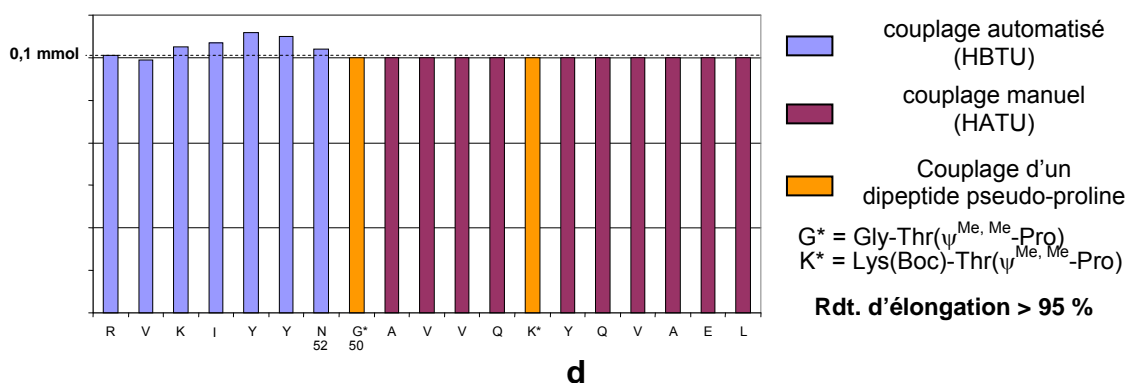
Figure 62 : Histogramme représentant la déprotection du N- α -Fmoc de chaque acide aminé

L'histogramme de cette synthèse, rapporté dans l'encadré **c** (Figure 62) témoigne du fait que l'utilisation d'une pseudo-proline en position 44 permet de surmonter l'étape limitante de la synthèse **b**. Toutefois, le couplage du résidu 42 s'avère être très difficile et provoque une chute de rendement d'élongation d'environ 90%. En raison de la chute du rendement d'élongation, la synthèse a été abandonnée. Néanmoins, il faut souligner que les couplages quantitatifs des résidus 58 à 43 ont été réalisés de façon automatisée, ce qui constitue une amélioration très considérable par rapport à la stratégie précédente.

V-3.B.a.5 – Quatrième stratégie de synthèse de **33**

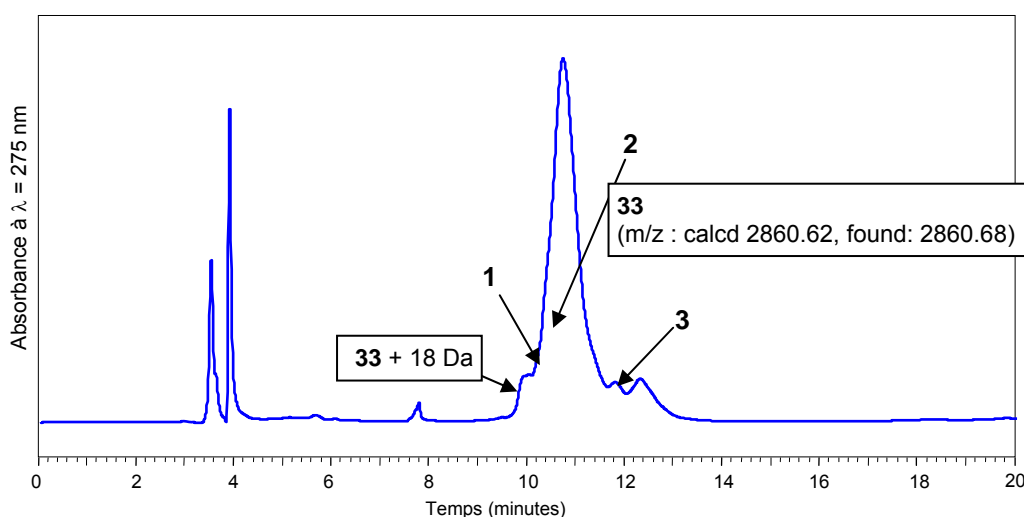
La difficulté du couplage du résidu 42 lors de la troisième synthèse de **33** est très surprenante étant donnée la proximité avec la pseudo-proline (Figure 60) et nous n'avons pas d'explication pour la chute de rendement observée. Nous avons donc opté pour réaliser une synthèse automatisée du fragment 59-43 puis de poursuivre la synthèse manuellement, de façon à pouvoir nous assurer de l'efficacité de chaque couplage.

En raison d'une panne du synthétiseur automatique de peptides en cours de synthèse, nous avons commencé les couplages manuels à partir du résidu 51.


 Figure 63 : Histogramme représentant la déprotection du N- α -Fmoc de chaque acide aminé

L'histogramme ci-dessus (Figure 63) met en évidence l'efficacité de la dernière stratégie de synthèse, qui nous a permis d'atteindre le but qu'on s'était fixé, soit un rendement d'élongation estimé à plus de 95%.

Le chromatogramme du mélange de peptides après coupure de la résine et déprotection met en évidence qu'un peptide est obtenu de façon majoritaire, la pureté estimée par intégration de l'aire du pic majoritaire HPLC est de 80% (Figure 64).


 Figure 64 : Chromatogramme HPLC du mélange de peptides issu de la synthèse de **33** avant purification (gradient d'analyse B)

pic	M	Attribué à
1	2045,3	Ac-KTQVVAGTNYYIKVRA-NHCH ₂ CCSi(Pr) ₃
1	2336,4	Ac-QYKTQVVAGTNYYIKVRA-NHCH ₂ CCSi(Pr) ₃
1	2706,3	H-LEAVQYKTQVVAGTNYYIKVRA-NHCH ₂ CCSi(Pr) ₃
2	2208,3	Ac-YKTQVVAGTNYYIKVRA-NHCH ₂ CCSi(Pr) ₃
2	2860,7	33
3	1589,0	Ac-VAGTNYYIKVRA-NHCH ₂ CCSi(Pr) ₃
3	2748,5	Ac-LEAVQYKTQVVAGTNYYIKVRA-NHCH ₂ CCSi(Pr) ₃

 Tableau 18 : Masses détectées lors de l'analyse par HPLC de **33** et structures peptidiques associées

Le succès de la synthèse a été confirmé par analyse par spectrométrie de masse des produits obtenus (Tableau 18). Nous pouvons observer la présence d'un peptide qu'on suspecte issu de l'hydratation de l'alcyne silylé (masse observée = M+18). Ce résultat est à mettre en relation avec l'étude de stabilité des alcynes silylés en conditions acides (cf. IV-3.B p.51).

Le nombre de peptides tronqués à différentes positions de la séquence témoigne de la difficulté de la synthèse. Toutefois, la présence de ces impuretés est tout à fait acceptable puisque seul le produit majoritaire porte à son extrémité un azoture et donc, il est le seul susceptible de réagir lors de l'étape de ligation triazole. Plutôt que de purifier le mélange issu de la coupure de la résine, nous pouvons l'utiliser directement dans la ligation.

Les propriétés physico-chimiques du produit majoritaire se sont avérées tout à fait surprenantes.

- Sa solubilité dans l'eau est très inférieure à 1 mg/ml (0,35 mM) ce qui a rendu difficile sa manipulation et sa caractérisation dans un premier temps
- De façon plus surprenante, son décrochage quantitatif de la résine en fin de synthèse a nécessité une quantité anormalement importante d'acide trifluoroacétique, ce qui laisse supposer que le produit majoritaire est également peu soluble dans ce milieu.

La raison de cette insolubilité dans des solvants habituellement compatibles avec les peptides déprotégés semble être due aussi bien à une tendance à l'agrégation du peptide déprotégé qu'à la présence du groupe hydrophobe triisopropylsilyle.

V-3.B.b – Synthèse du fragment N-terminal

La structure du fragment N-terminal est rappelée Figure 65. Ce fragment est composé de 35 acides aminés et comporte une seule modification, un propargylamide en extrémité C-terminale du résidu tyrosyle 35.



Figure 65 : Séquence du fragment N-terminal **34a**

V-3.B.b.1 Première stratégie de synthèse de **34**

La stratégie de synthèse est similaire à celle présentée précédemment. La synthèse commence par la fonctionnalisation de la résine par le bras **32** et l'introduction du premier acide aminé

par couplage manuel de façon quantitative. Puis le reste de l'élargissement a été réalisé de façon automatique par le synthétiseur de peptides (Figure 66).

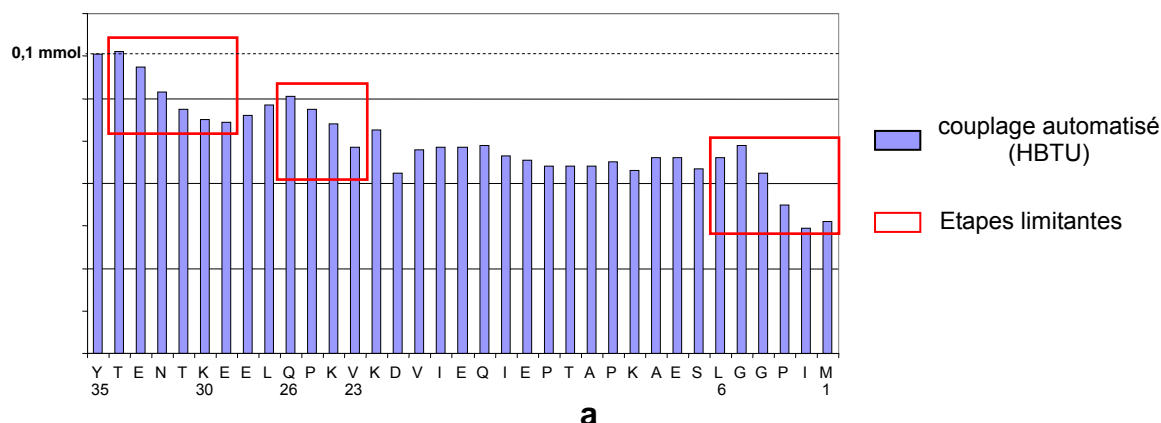


Figure 66 : Histogramme représentant la déprotection du N-α-Fmoc de chaque acide aminé

V-3.B.b.2 Deuxième stratégie de synthèse de **34**

La méthode d'optimisation de la synthèse est la même que précédemment. La première synthèse a servi pour identifier toutes les étapes de couplage limitantes de la synthèse (Figure 66 encadrés rouges). Trois modifications de la stratégie initiale ont suffi pour réaliser une synthèse optimale **b** (Figure 2). Le couplage des résidus 35 à 30 a été réalisé de façon manuelle. Bien que ça ne nous ait pas semblé indispensable, nous avons introduit les résidus 31/30 sous forme d'un dipeptide pseudo-proline étant donné que le composé est déjà en notre possession (cf. V-3.B.a.2 p.81). Les résidus 29 à 4 ont été introduits de façon automatisée, et les résidus dont le couplage lors de la première synthèse a été jugé insuffisant ont été introduits au moyen de doubles couplages.

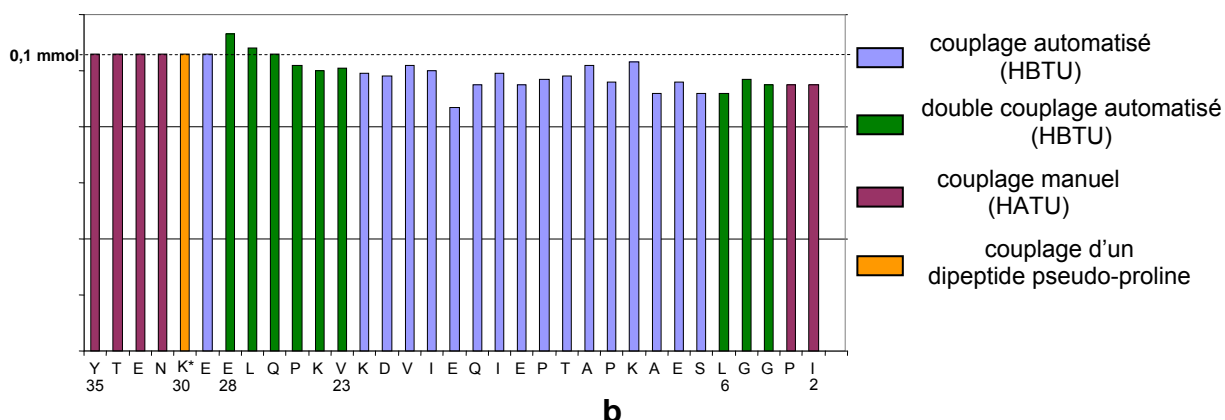


Figure 67 : Optimisation d'une synthèse sur phase solide : histogramme représentant la déprotection du N-α-Fmoc de chaque acide aminé

Le rendement d'élargissement obtenu grâce à cette nouvelle stratégie est de 90% comme en témoigne le suivi de synthèse **b**. Le dernier acide aminé a été couplé et déprotégé

manuellement. Le peptide a ensuite été déprotégé et coupé de la résine. Le mélange de peptides coupés de la résine a été analysé par HPLC (Figure 68).

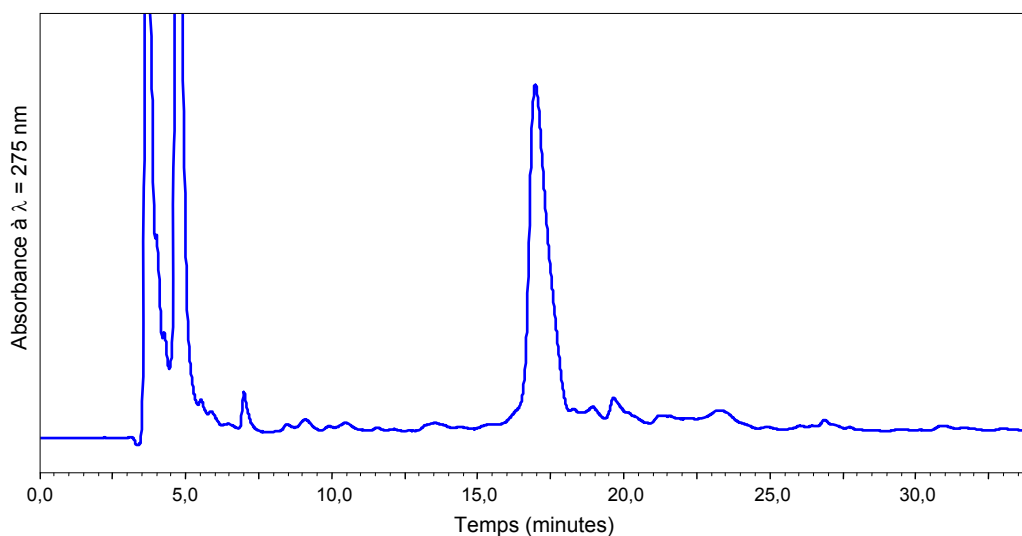


Figure 68 : Chromatogramme HPLC du mélange de peptides issus de la synthèse de **34** avant purification (gradient d'analyse C)

Une brève étape de purification par HPLC semi-préparative nous a permis d'obtenir le peptide prêt pour l'étape de ligation à l'échelle de dizaines de milligrammes (Figure 69).

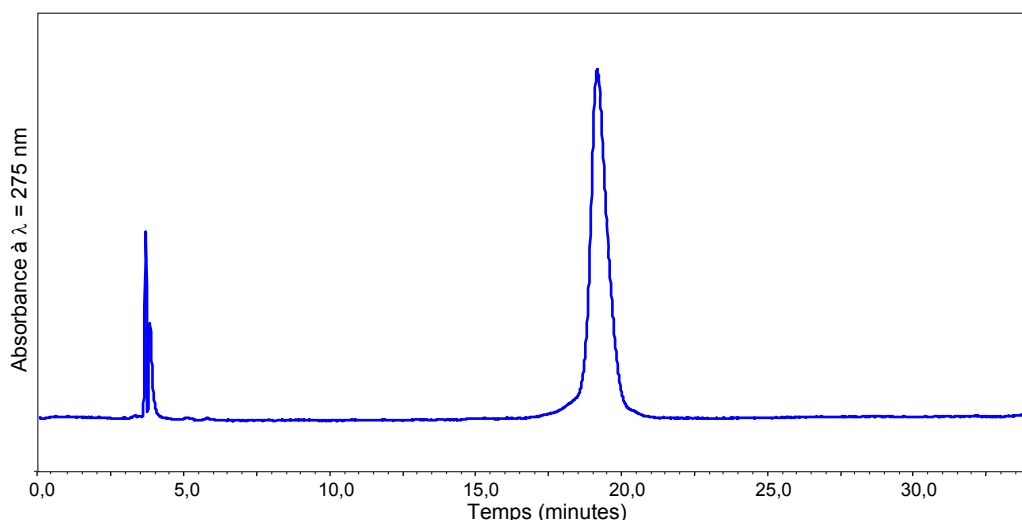


Figure 69 : Chromatogramme HPLC du peptide N-terminal **34** pur après purification (gradient d'analyse D)

Comme tous les produits issus de la coupure de la résine sont susceptibles de porter un alcyne et donc de réagir lors de la ligation, l'obtention d'un peptide de grande pureté est importante dans le cas de ce fragment.

V-3.B.c – Synthèse du fragment C-terminal

La structure du fragment C-terminal **35** est rappelée ci-dessous (Figure 70).

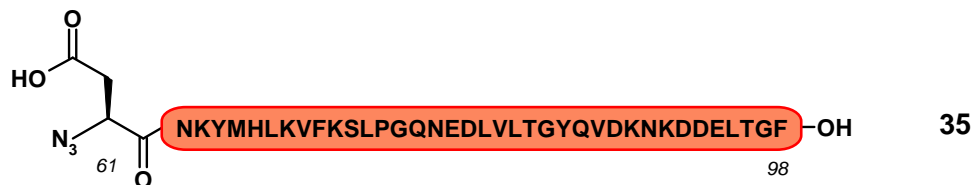


Figure 70 : Structure du fragment C-terminal

Le peptide à synthétiser est constitué de 37 acides aminés et est modifié en extrémité N-terminale, le résidu aspartyle 61 est remplacé par son analogue α -azoturé.

La synthèse de ce fragment s'est révélée plus facile que les précédentes, puisque notre première tentative a donné accès au peptide cible avec un rendement d'élongation jugé acceptable de 70% (Figure 71).

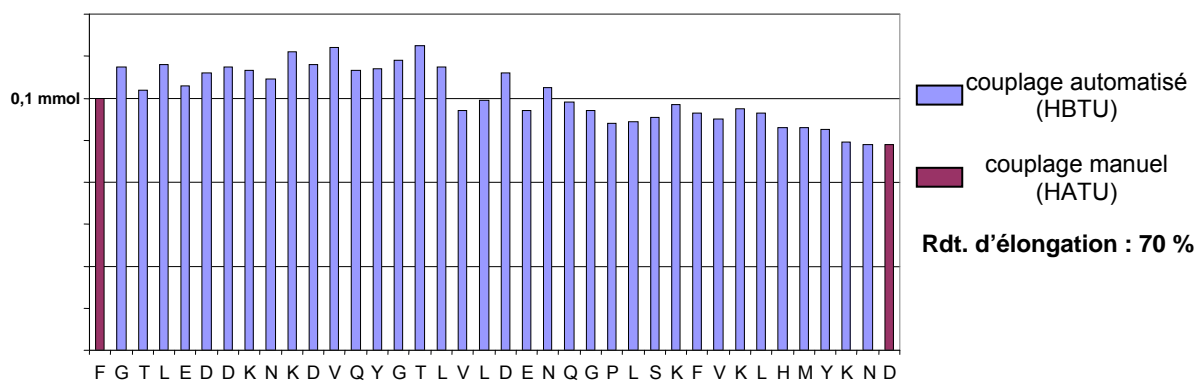


Figure 71 : Suivi UV de la déprotection du N- α -Fmoc de chaque acide aminé par la pipéridine à 301 nm

La coupure de la résine fournit un mélange de peptides (Figure 72) contenant un produit majoritaire possédant la masse attendue (Tableau 19).

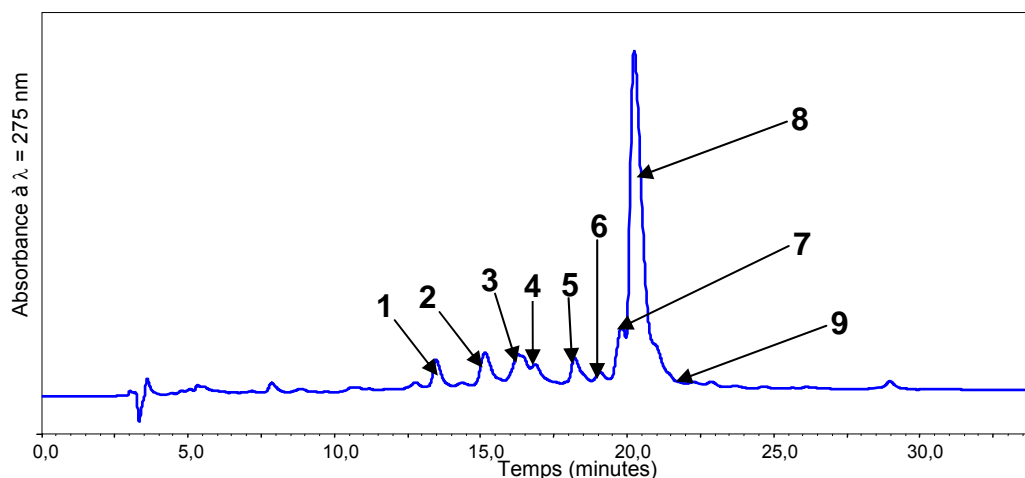
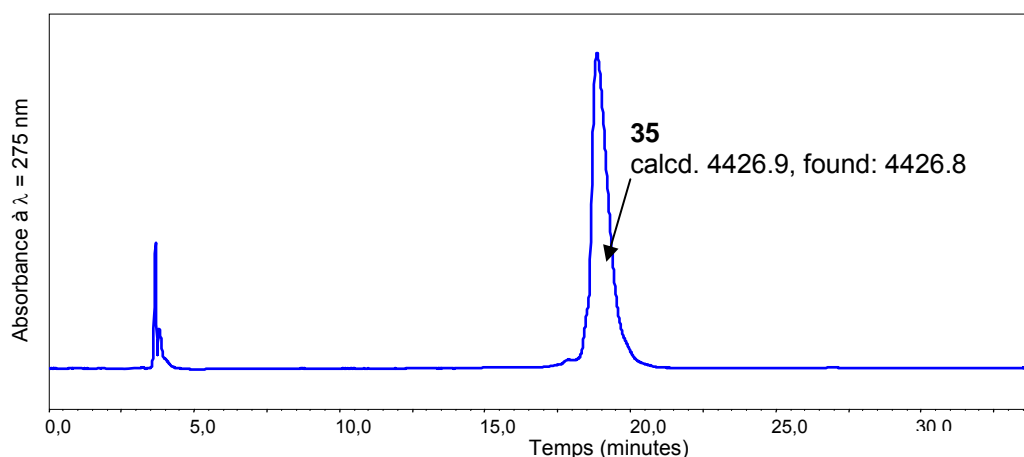


Figure 72 : Chromatogramme HPLC du mélange de peptides issus de la synthèse de **35** (gradient d'analyse C)

Pic	M	Séquence attribuée
1	2198,60	Ac-LVLTGYQVDKNKDELDTGF-OH
1	2557,14	Ac-QNEDLVLTGYQVDKNKDELDTGF-OH
2	3040,16	Ac-SLPGQNEDLVLTGYQVDKNKDELDTGF-OH
3	2314,01	Ac-DLVLTGYQVDKNKDELDTGF-OH
3	2443,19	Ac-EDLVLTGYQVDKNKDELDTGF-OH
3	3542,13	Ac-KYMHLKVFKSLPGQNEDLVLTGYQVDKNKDELDTGF-OH
3	4287,26	H-NKYMHLKVFKSLPGQNEDLVLTGYQVDKNKDELDTGF-OH
4	3792,56	Ac-HLKVFKSLPGQNEDLVLTGYQVDKNKDELDTGF-OH
5	4328,61	Ac-NKYMHLKVFKSLPGQNEDLVLTGYQVDKNKDELDTGF-OH
7	4214,50	Ac-KYMHLKVFKSLPGQNEDLVLTGYQVDKNKDELDTGF-OH
8	4427,58	35
9	3655,38	Ac-LKVFKSLPGQNEDLVLTGYQVDKNKDELDTGF-OH
9	4086,92	Ac-YMHLKVFKSLPGQNEDLVLTGYQVDKNKDELDTGF-OH

Tableau 19 : Masses détectées lors de l'analyse par HPLC de **35** et structures peptidiques associées

Le mélange de peptides a été purifié par HPLC semi-préparative pour fournir un peptide pur à 99% à l'échelle de la dizaine de milligramme (Figure 73).

Figure 73 : Chromatogramme HPLC du peptide C-terminal pur **35** après purification (gradient d'analyse C)

Comme nous l'avons déjà fait remarquer, les peptides portant un azoture en extrémité N-terminale sont les seuls à réagir et le mélange de peptides obtenu après la synthèse pourrait être engagé directement dans une réaction de ligation, toutefois nous avons fait le choix de séparer **35** des co-produits de la synthèse pour faciliter la quantification de ce fragment lors des réactions de ligation et pouvoir contrôler finement sa stœchiométrie.

V-3.C – Synthèse d'un analogue de la stéfine A humaine par double ligation triazole successive

Une fois chaque fragment en main, nous avons décidé de les assembler selon la stratégie suivante (Figure 74)

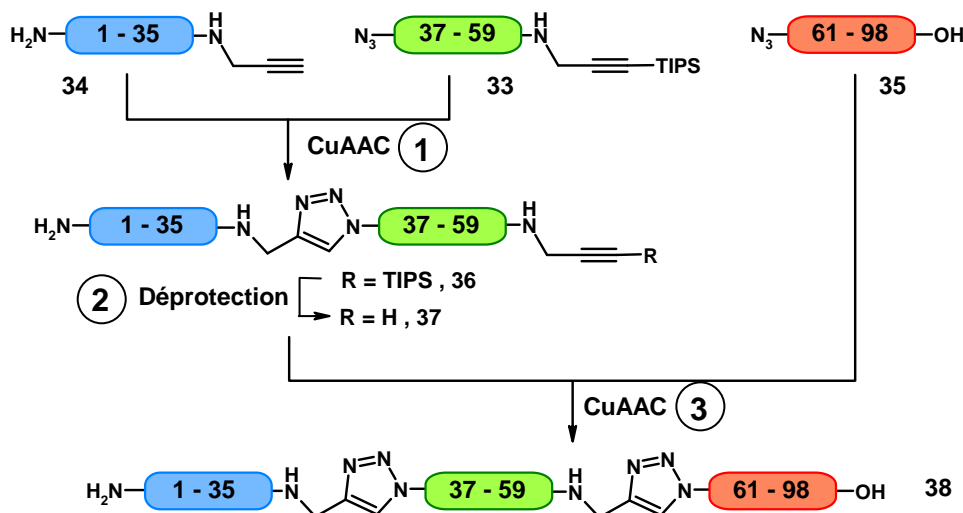


Figure 74 : Stratégie pour l'assemblage de l'analogue de stéfine A 38 par double ligation triazole successive

V-3.C.a – Etape 1 : Ligation entre le fragment N-terminal et le fragment médian

V-3.C.a.1 – Conditions réactionnelles pour la ligation de peptides

La concentration d'alcyne ou d'azoture utilisée lors de la synthèse du composé *tris*-triazole **25** (Schéma 18) est de 0,1 M (cf. IV-5.B p.64). Pour un peptide de 30 acides aminés, une concentration molaire de 0,1 M correspond à une concentration massique d'environ 300 mg/mL. Compte tenu de la solubilité des peptides dans l'eau, qui est de l'ordre de 1 à 20 mg/mL, nous avons considéré que les conditions de CuAAC utilisées précédemment sont inapplicables. En outre, la CuAAC implique la rencontre de plusieurs atomes de Cu(I) complexant un ou plusieurs alcynes, des événements très défavorisés à basse concentration en alcynes et en cuivre (cf. III-2.A p.26). Avant la préparation de ce manuscrit, la plus basse concentration en alcynes à avoir été utilisée en CuAAC est l'ordre du μ M.

Nous avons essayé d'effectuer la CuAAC à une concentration usuelle pour la ligation de peptides, comprise entre 2 et 10 mg/mL et correspondant à une concentration molaire de 0,6 à 3 mM (pour un peptide de 3000 g/mol), qui semble être un bon compromis pour que les deux partenaires de ligation soient solubles et pour que la CuAAC ait lieu.

V-3.C.a.2 – Choix d'un solvant

L'eau est le solvant idéal pour la ligation de protéines puisque la plupart des peptides et des protéines sont solubles dans l'eau. De plus, étant donné que la réaction de CuAAC est fortement influencée par le pH, il est important de stabiliser celui-ci à l'aide d'un tampon à des pH proches de la neutralité. Une autre raison pour laquelle on doit utiliser un tampon aqueux est qu'on souhaite utiliser le sulfate de cuivre (II) réduit *in situ* comme source de cuivre (I) puisque cette source s'avère plus active et plus soluble que les sels d'halogénure de cuivre.

Or, le partenaire azoture **33** est extrêmement peu soluble dans l'eau pure.

- Dans un premier temps, nous avons mené, sans succès, des essais de solubilisation du fragment **33** et de ligation avec **34** dans un tampon aqueux additionné de co-solvants comme le DMF ou l'acétonitrile à différentes concentrations (Tableau 20).

Solvant	concentration	solubilité de 33	rdt. de CuAAC (%)
Tampon aqueux	0,1 mg/mL	totale	0
Tampon aqueux	10 mg/mL	nulle	0
Tampon aqueux /MeCN (1 :1)	10 mg/mL	partielle	0
Tampon aqueux /DMF (9 :1)	10 mg/mL	partielle	0

Tableau 20 : Essais de cycloaddition entre les deux fragments peptidiques **33** et **34**. Le tampon aqueux est un tampon phosphate 100 mM pH = 8.0, **34** est totalement soluble dans toutes les conditions décrites

- La structure du fragment **33** dans la stéfine A humaine naturelle, est en épingle à cheveux β . En partant de l'hypothèse que l'insolubilité du fragment provienne d'une structuration inter- et/ou intramoléculaire, nous avons alors tenté d'observer l'effet d'une dénaturation sur la solubilité de **33**. Deux agents dénaturants sont couramment utilisés en solution aqueuse, l'urée (8M) et le chlorure de guanidinium (6M). Ce dernier a été écarté car nous avons jugé qu'une forte concentration en ions chlorure serait néfaste pour la CuAAC*. Le peptide **33** est soluble à 10 mg/mL dans une solution d'urée à 8M. Une tentative de cycloaddition dans ce milieu n'a pas fourni le produit de ligation désiré et des analyses de spectrométrie de masse suggèrent une carbamoylation du peptide **34** (+43 Da) dans ces conditions.

* cette hypothèse a été écartée récemment (Lee, D. J.; Mandal, K.; Harris, P. W. R.; Brimble, M. A.; Kent, S. B. H. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5270-5273)

- L'hexafluoro-*iso*-propanol (HFIP) est un solvant connu pour sa lipophilie, comme un excellent donneur de liaison hydrogène,¹⁷⁷ et qui a la capacité de déstabiliser la structure tertiaire des protéines. Ce solvant a pu solubiliser le fragment **33** à haute concentration (20 mg/mL). L'addition de tampon phosphate à hauteur de 50% dans le HFIP ne déclenche pas la précipitation de **33**.

V-3.C.a.3 – Première ligation des fragments **33** et **34**

Les deux fragments **33** et **34a** ont été dissous dans un mélange de HFIP/tampon phosphate à 10 mg/mL et nous avons réalisé la ligation de ces deux fragments par ajout d'un demi-équivalent de CuSO₄ et d'un équivalent d'ascorbate de sodium (Schéma 22).

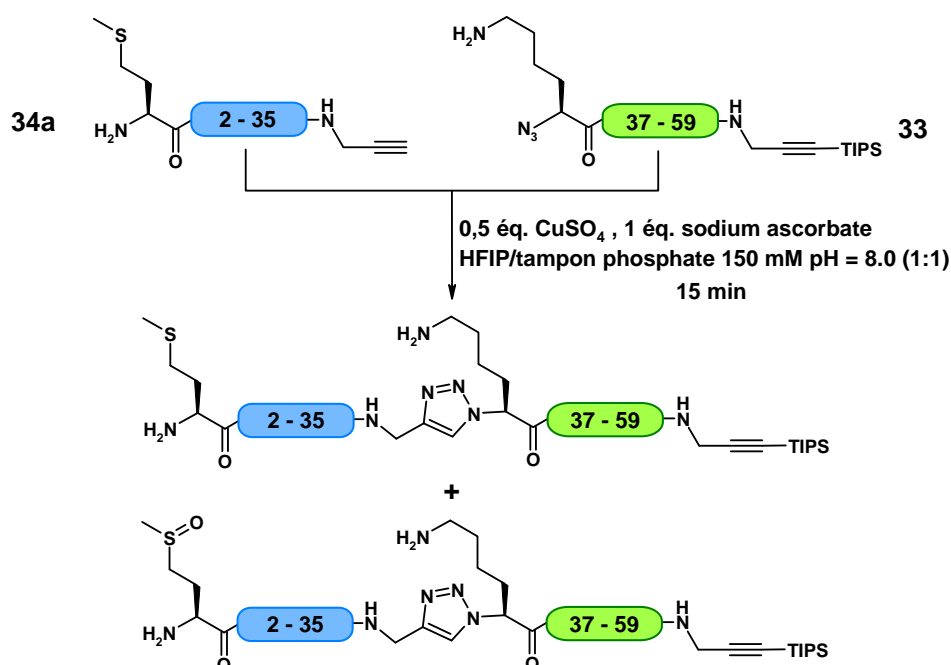


Schéma 22 : Ligation entre le peptide N-terminal **34a** et le peptide médian **33**

Lors de cette première ligation, le mélange réactionnel évolue rapidement de marron (cuivre (I)) à bleu (cuivre (II)). Nous en avons déduit que :

- Dans ces conditions, le temps de vie du catalyseur est trop court puisqu'une oxydation totale du cuivre (I) a lieu avant que le couplage soit fini.
- Deuxièmement, il se produit une oxydation de certains résidus pendant la réaction. Des analyses par spectrométrie de masse nous ont permis de distinguer clairement deux espèces issues, l'une issue de la mono-oxydation de **34a** (M+16), et l'autre de

¹⁷⁷ Narita, M.; Honda, S.; Umeyama, H.; Obana, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 281-284

la mono-oxydation du produit de couplage attribué à l'oxydation du thioéther de la méthionine en sulfoxyde.

Pour éviter d'être confrontés à cette réaction secondaire tout au long de l'optimisation de la ligation, nous avons opté par la substitution classique de la Met1 par son isostère, la norleucine. Nous avons donc synthétisé le fragment N-terminal sous sa nouvelle forme non oxydable **34b** (Figure 75).

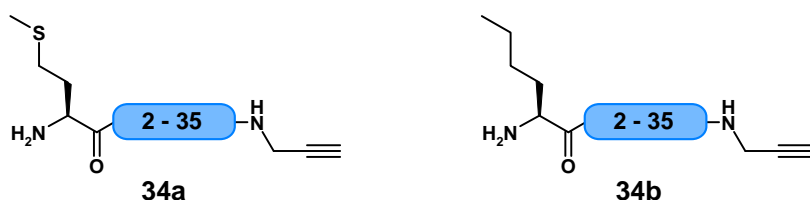


Figure 75 : Différentes séquences synthétisées du fragment N-terminal, formes soufrée et non soufrée

La synthèse par Fmoc-SPPS de **34b** est la même que celle de **34a** à l'exception du couplage du résidu 1, au cours duquel nous avons couplé une Boc-Nle-OH à la place d'une Fmoc-Met-OH. Le fragment **34b** a été obtenu à l'échelle de dizaines de milligrammes.

V-3.C.a.4 – Deuxième ligation des fragments **33** et **34**

L'essai suivant a été réalisé avec des solutions des solutions déoxygenées avec un excès de cuivre (I) de façon à ce que le couplage quantitatif entre **34b** et **33** par CuAAC se produise plus vite que l'oxydation du cuivre (I) (Schéma 23).

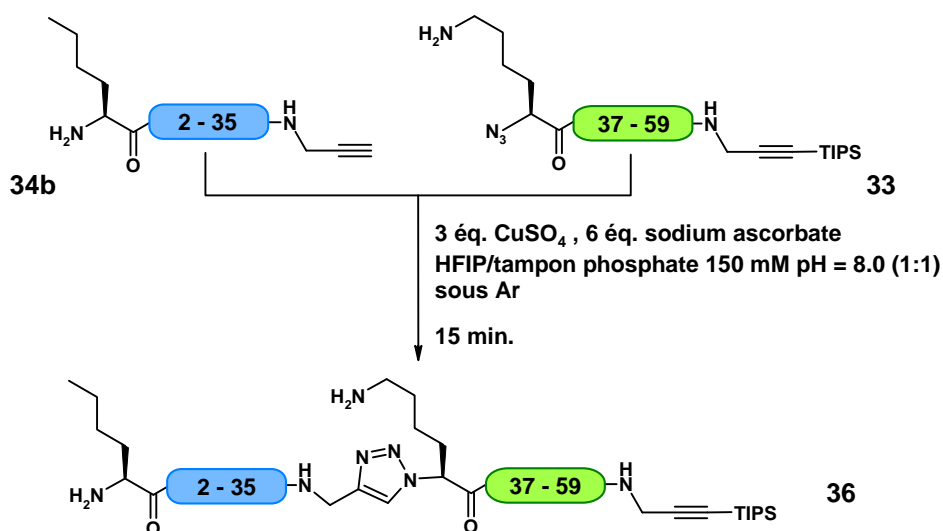


Schéma 23 : Ligation entre le peptide N-terminal et le peptide médian

Dans ces conditions, la cycloaddition est quantitative en 15 minutes (Figure 76). Le chromatogramme confirme la sélectivité de la réaction puisque les impuretés issues de la

synthèse de **33** (Figure 76, encadré orange) ne subissent aucune modification pendant la ligation.

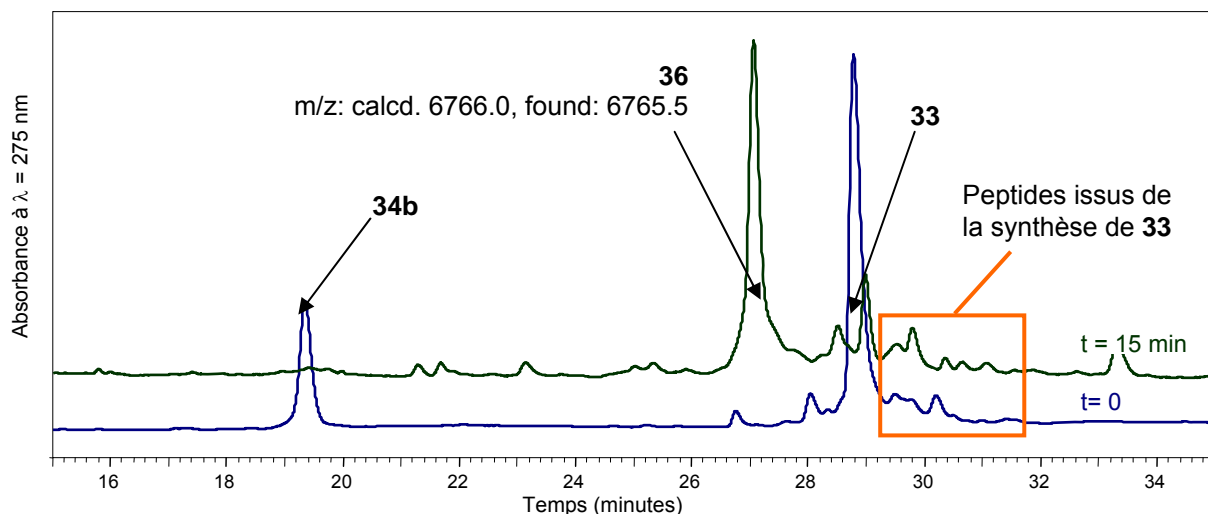


Figure 76 : Chromatogrammes du suivi de la ligation entre le peptide N-terminal et le peptide médian (gradient d'analyse E)

Dès la fin de la réaction, le milieu réactionnel devient trouble et il se produit une précipitation spécifique de notre produit. Nos tentatives pour solubiliser le produit de couplage ont été infructueuses et nous avons décidé de tirer parti de cette précipitation pour isoler **36**. Le lavage par un agent chélatant comme l'EDTA est indispensable pour retirer le cuivre présent dans le milieu et dont la présence se détecte visuellement.

V-3.C.b – Etape 2 : Désilylation chimiosélective du produit de couplage **36**

Comme nous l'avons vu lors de notre étude de déprotection des groupes protecteurs silylés (partie IV-4.A), la cinétique de désilylation par les fluorures est plus lente en présence d'eau, ce qui ajouté à l'insolubilité de **36**, peut s'avérer problématique. Nous avons donc choisi de lyophiliser le produit de la réaction afin d'éliminer toute trace d'eau et favoriser la coupure du groupe triisopropylsilyle. Le DMF a été retenu comme solvant pour la désilylation puisque c'est généralement un bon solvant pour les peptides et qui, étant aprotique, stabilise peu le fluorure. La désilylation de **36** a donc été réalisée avec le fluorure de tétrabutylammonium à 1 mg/mL (100 μ M) dans le DMF (Schéma 24).

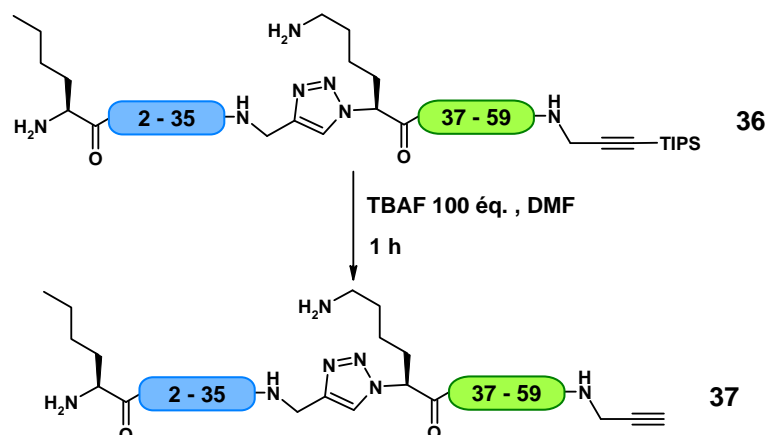


Schéma 24 : Désilylation du fragment de couplage **36**

Bien que le produit de ligation **36** soit principalement insoluble dans le milieu réactionnel, celui-ci a été désilylé quantitativement en une heure en présence de 100 équivalents de TBAF (Figure 77). Le groupe TIPS semble jouer un rôle dans l'insolubilité de **36** puisque la suspension initiale devient limpide au fur et à mesure de la désilylation. Celle-ci se produit sur tous les peptides portant un groupe triisopropylsilyle, une étape de purification par HPLC semi-préparative est donc nécessaire avant d'effectuer la ligation suivante.

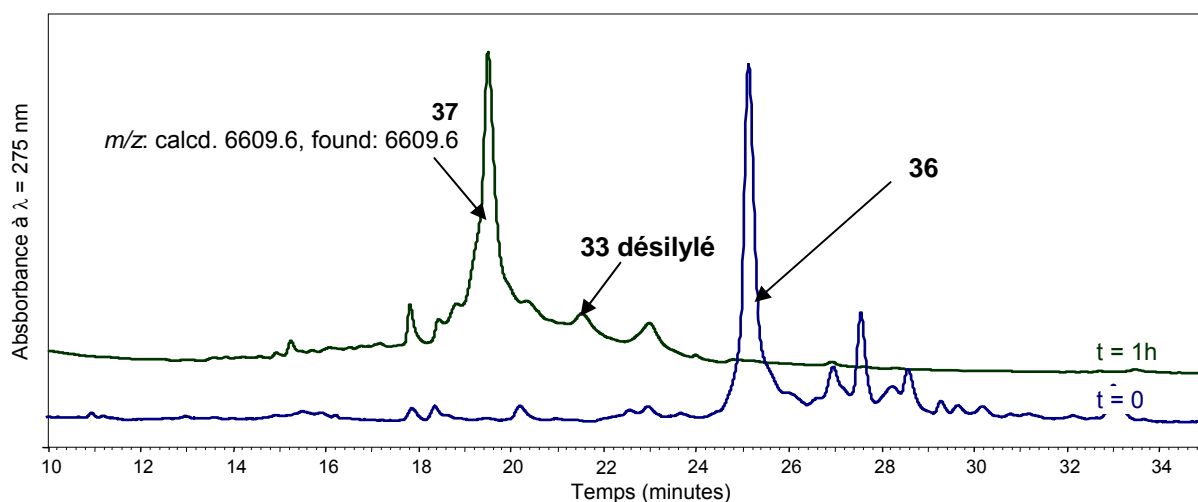


Figure 77 : Chromatogrammes de suivi de la désilylation de **36** (gradient d'analyse E)

Nous avons envisagé deux méthodes pour cette purification, la chromatographie d'exclusion stérique ou la chromatographie en phase inverse. La première méthode est un moyen simple de séparer les produits de ligation des produits de départ grâce à leur différence de masse molaire, cependant, la faible reproductibilité des séparations et la résolution insuffisante de la phase choisie n'ont pas fourni des résultats acceptables. Nous avons préféré utiliser l'HPLC en phase inverse. La purification par cette méthode permet d'obtenir le peptide désiré avec 47% de rendement sur deux étapes à partir de **34b** à l'échelle d'une dizaine de milligrammes.

V-3.C.c – Etape 3 : Ligation finale

Avec chacun de nos partenaires en main, nous avons décidé d'entreprendre le dernier couplage achevant ainsi notre séquence de double ligation triazole successive. Les deux fragments peptidiques **35** et **37** sont solubles dans un tampon phosphate 150 mM à pH = 8,0 préalablement dégazé à une concentration de 10 mg/mL par rapport à **37** (approximativement 1 μ M pour chacun). La ligation a lieu en présence d'un léger excès de **35** par ajout de 3 équivalents de CuSO_4 et 6 équivalents d'ascorbate de sodium (Schéma 25). La cinétique de la réaction de ligation a été suivie par HPLC.

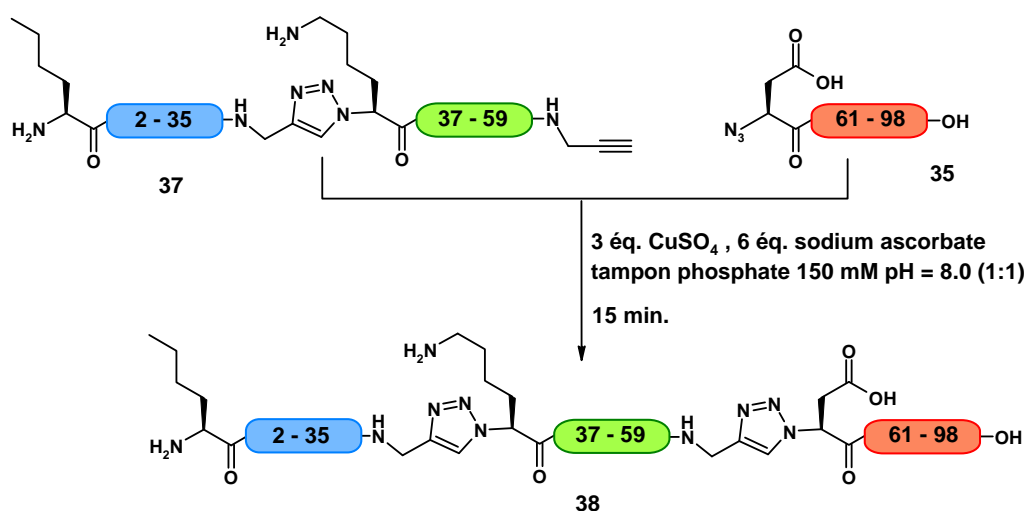


Schéma 25 : Ligation entre les fragments 35 et 37

Après introduction du catalyseur, la réaction est quantitative en 15 minutes (disparition de **37**) comme en témoignent les chromatogrammes de suivi de la réaction (Figure 78). Les analyses par spectrométrie de masse confirment les résultats obtenus par chromatographie (Figure 79).

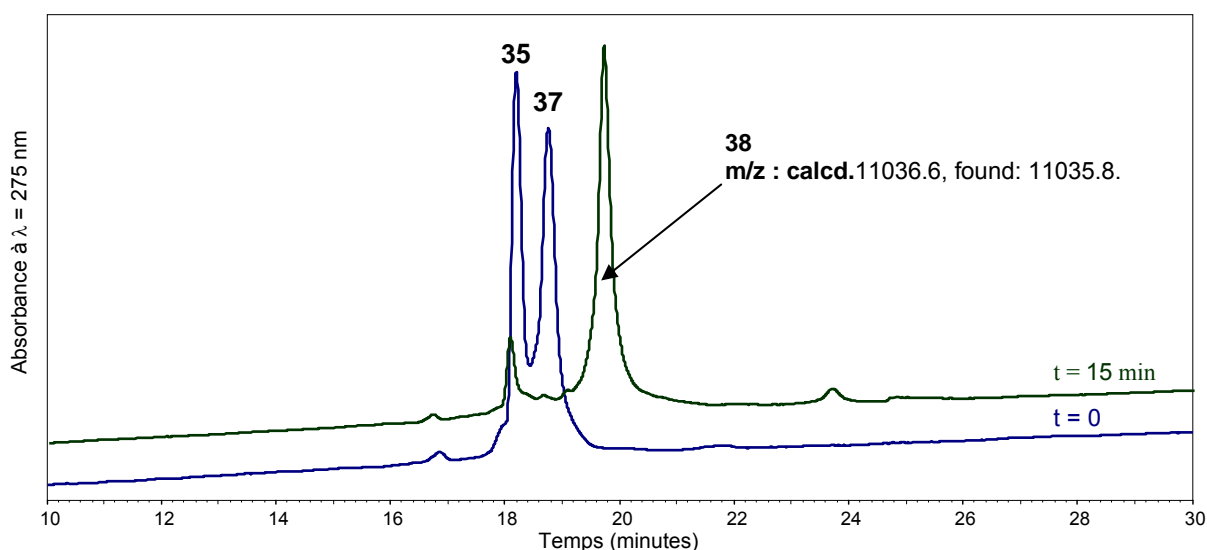


Figure 78 : Chromatogrammes de suivi de la ligation entre le fragment 35 et 37 (Gradient d'analyse G à 55°C)

Il est intéressant de souligner que, si nous avons constaté des oxydations de la méthionine 1 sur **34a**, ce n'est plus le cas lors de cette étape de cycloaddition sur la méthionine 65 et l'histidine 66 de **35**.

Ce couplage fournit la *bis*-triazolo stéfine A **38** avec 57 % de rendement après purification par HPLC semi-préparative à partir de **37**.

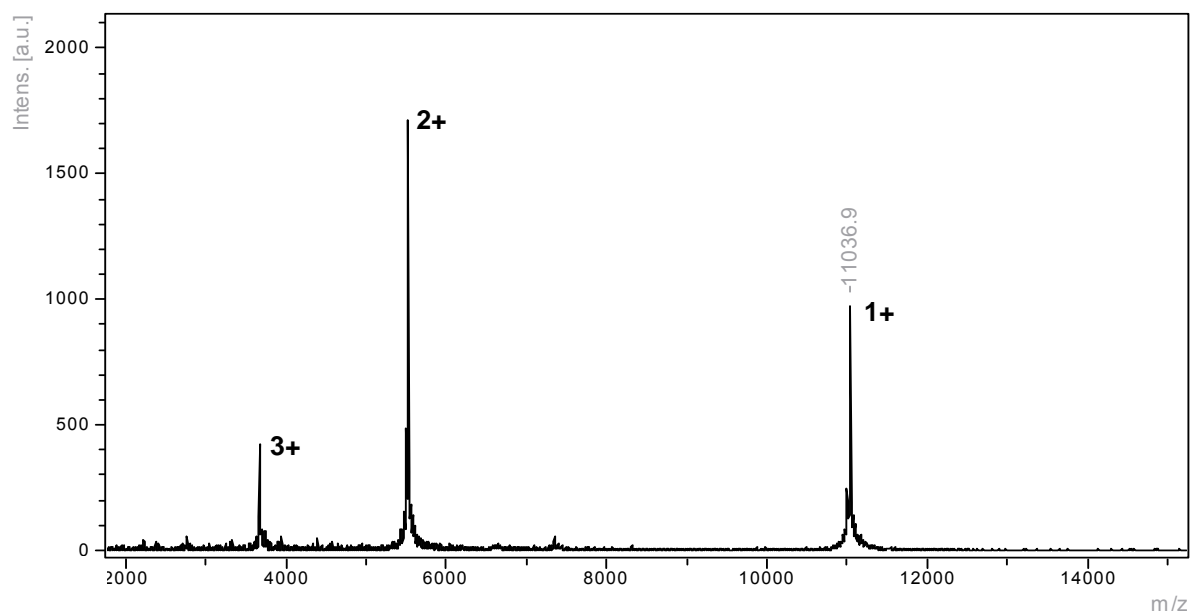


Figure 79 : Spectre de masse (MALDI-TOF) de **38**

V-4 – Activité de la bis-triazole protéine 38

Pour exercer son activité biologique, notre bis-triazolo protéine **38** doit adopter un repliement proche de celui de la stéfine A native.

V-4.A Le repliement des protéines

Le repliement d'une protéine est un processus complexe, impliquant formation de structure secondaire et tertiaire, accompagné, de façon simultanée ou successive, des isomérisations de liaisons amides, des formations de liaisons hydrogène, des formations ou des échanges de ponts disulfures etc...

Le processus de repliement d'une protéine dénaturée peut être décomposé en une somme d'étapes distinctes pouvant être caractérisées par des constantes cinétiques (Figure 80).

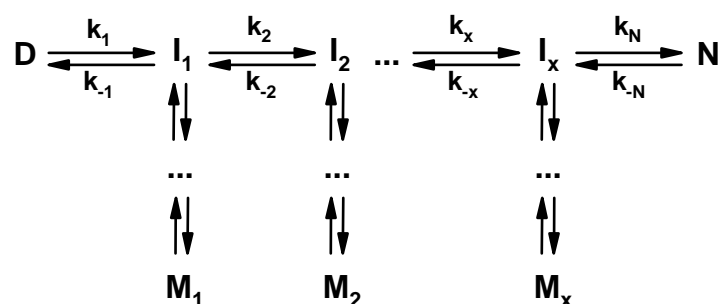


Figure 80 : Représentation théorique du repliement d'une protéine

Une protéine sous forme dénaturée (**D**) mise en conditions de repliement, peut atteindre sa forme native (**N**) en passant par différentes formes intermédiaires (**I**). Le nombre d'espèces intermédiaires dépend du nombre de modifications conformationnelles que doit subir la chaîne peptidique avant d'atteindre la forme native, considérée comme étant le conformère le plus stable thermodynamiquement (**N**). Pour chaque intermédiaire, il peut exister une voie alternative de repliement suivant un processus cinétiquement favorisé donnant lieu à des protéines ayant une forme non-native (**M**) on parle alors de *misfold*.¹⁷⁸

¹⁷⁸ Matthews, C. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 653-683

V-4.B – Méthodes de repliement et de mesure d'activité de **38**

V-4.B.a – Méthodes de repliement de la stéfine A humaine

Le cas du repliement de la stéfine A est plus simple. Cette protéine est réputée pour posséder une structure tertiaire très stable. Zerovnik *et al.* décrivent le processus de dénaturation et de renaturation comme réversible écartant totalement la possibilité de *misfoldings*.¹⁷⁹

En nous basant sur ces résultats, nous avons envisagé deux méthodes distinctes pour replier la molécule (Figure 81).

- Nous avons dans un premier temps essayé la méthode **A**, consistant à solubiliser **38** dans une solution aqueuse dénaturante (GuHCl 5M pH 8,0) puis de diluer rapidement cette solution avec un tampon phosphate 100 mM pH 6,0.
- Dans un deuxième temps, en partant du fait que la protéine a un repliement extrêmement rapide et stable, nous avons utilisé la méthode **B**, consistant à dissoudre **38** directement dans un tampon phosphate 100 mM pH 6,0.

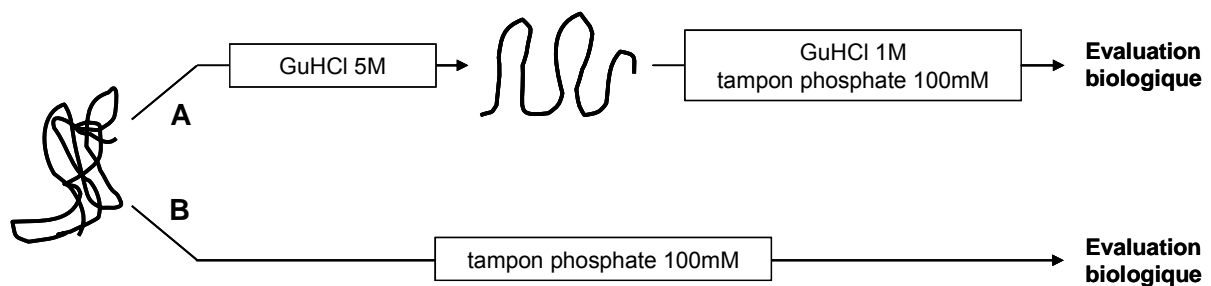


Figure 81 : Stratégies pour le repliement de **38**

Dans le cas de notre protéine synthétique, nous avons suivi son repliement en fonction de son activité biologique d'inhibiteur de protéases à cystéines contre l'archétype des protéases à cystéine, la papaïne.

¹⁷⁹ Zerovnik, E.; Lenarcic, B.; Jerala, R.; Turk, V. *BBA - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1991**, 1078, 313-320

V-4.B.b – Evaluation de l'activité biologique de la stéfine A humaine

L'évaluation de l'activité biologique d'un inhibiteur est réalisée par mesure de la vitesse d'hydrolyse d'un substrat par une protéase à cystéine en absence et en présence de l'inhibiteur.¹⁸⁰ En première approche, nous avons évalué l'activité inhibitrice de **38** vis-à-vis de la papaïne non titrée.

Pour cela, nous avons effectué deux séries de mesures au pH d'activité optimum de la papaïne (Schéma 26) :

- la protéase est incubée à une concentration donnée (1 nM) dans un tampon phosphate 100 mM à pH = 6,0 et 5000 équivalents d'un substrat peptidique dont le produit de protéolyse est fluorescent (le *N*-(carboxybenzyl)-L-Phénylalanyl-L-Arginyl-7-amido-4-méthylcoumarine ou Z-FR-AMC) sont ajoutés.
- la protéase est incubée avec **38** à une concentration donnée (1 nM ou 10 nM) dans un tampon phosphate 100 mM à pH = 6,0 et 5000 équivalents de Z-FR-AMC sont ajoutés.

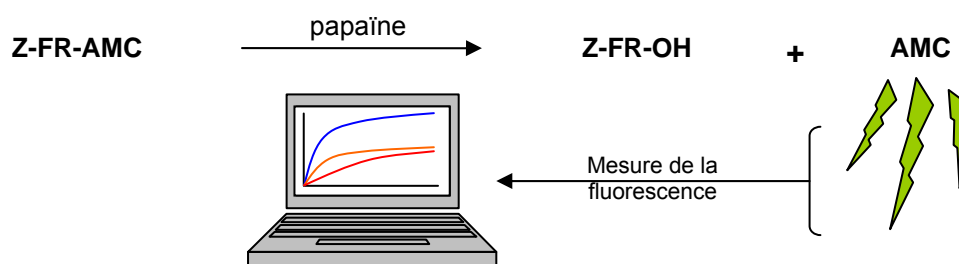


Schéma 26 : Coupure d'un substrat fluorescent par la papaïne

Après l'ajout du substrat, nous avons mesuré la fluorescence de la solution en fonction du temps.

V-4.B.c – Résultats

Nous avons tout d'abord mesuré l'activité protéolytique en absence d'inhibiteur, en présence de 10 équivalents d'inhibiteur replié par la méthode A et en présence de 10 équivalents d'inhibiteur replié par la méthode B (Figure 82).

¹⁸⁰ Sarath, G.; Zeece, M. G.; Penheiter, A. R. Dans *Proteolytic Enzymes 2nd Edition*; Practical Approach; Rob Beynon and Judith S. Bond ; Oxford University Press, 2001; p. 45-76

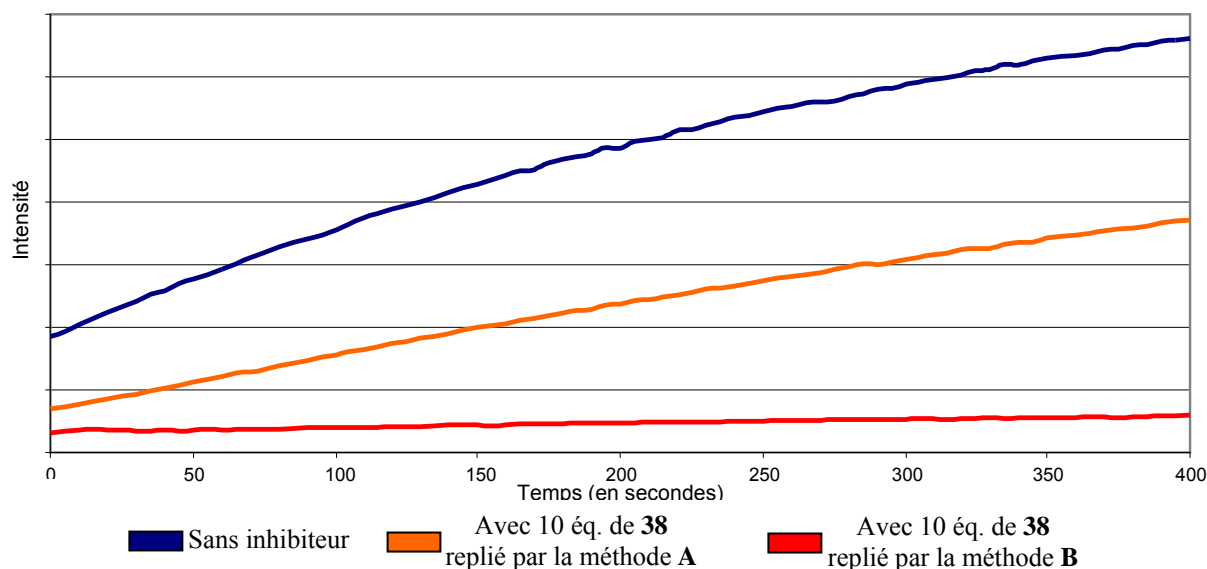


Figure 82 : Cinétique de la coupure d'un substrat fluorescent par la papaïne avec ou sans inhibiteur

Nous avons constaté que notre analogue de protéine synthétique **38** diminue l'activité protéolytique de façon drastique, donc **38** possède bien une activité inhibitrice de la papaïne. Toutefois, **38** est plus actif lorsqu'il est replié par dissolution directe dans le tampon de travail (méthode B).

Nous avons ensuite mesuré l'activité protéolytique en absence d'inhibiteur, en présence de 10 équivalents d'inhibiteur et en présence de 1 équivalent d'inhibiteur (Figure 83) pour apprécier l'effet de la stœchiométrie de notre inhibiteur synthétique replié selon la méthode B.

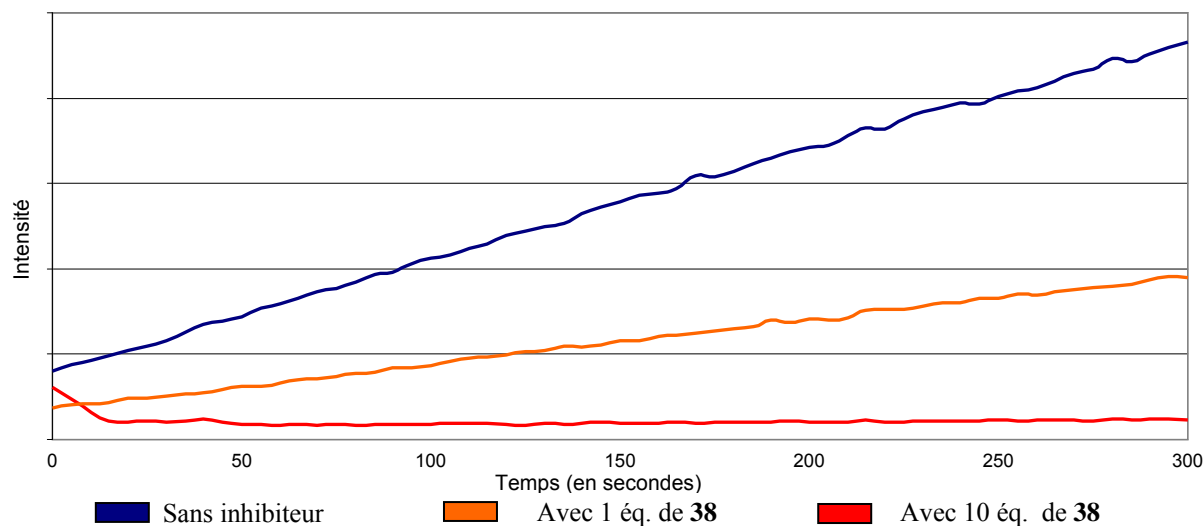


Figure 83 : Cinétique d'hydrolyse de la Z-FR-AMC par la papaïne en fonction de la quantité d'inhibiteur

L'inhibition de la papaïne (1 nM) en présence d'un équivalent de **38** met en évidence que l'activité est dépendante de la concentration et qu'elle est, aux erreurs de mesure près, au moins de l'ordre du nanomolaire.

V-4.C – Evaluation de la structure secondaire par dichroïsme circulaire

Si l'activité biologique est du même ordre de grandeur, il est fort probable que la structure secondaire, et donc tertiaire, de notre analogue soit comparable à celle de la protéine naturelle. Nous avons donc effectué des mesures de dichroïsme circulaire afin de comparer les structures secondaires de **38** et la stéfine A recombinante.

V-4.C.a – Principe du dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (DC) est une technique spectroscopique de choix pour l'évaluation de la structure secondaire de notre analogue. Il s'agit d'un type particulier de spectroscopie d'absorption qui mesure la différence d'absorption d'une lumière polarisée circulairement par un composé chiral. Lorsqu'un composé optiquement actif absorbe différemment la lumière polarisée gauche ou droite, il en résulte une différence d'absorption ΔA caractéristique de la molécule à une longueur d'onde donnée (Équation 2 a).

$$A_{\text{Gauche}} - A_{\text{Droite}} = \Delta A = \Delta \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (\text{a})$$

$$[\theta] = 3298 \cdot \Delta \varepsilon \quad (\text{b})$$

ΔA : différence entre l'absorption de la lumière polarisée circulairement gauche et droite

$\Delta \varepsilon$: différence du coefficient d'extinction molaire de la lumière polarisée circulairement gauche et droite ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

l : longueur du trajet optique

c : concentration de solution ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

$[\theta]$: ellipticité molaire ($\text{degrés} \cdot \text{cm}^2 / \text{décimole}$)

Équation 2 : Relation reliant la différence d'absorption avec l'ellipticité molaire¹⁸¹

Les spectres dichroïques sont souvent décrits en ellipticité molaire $[\theta]$, unité directement reliée à la différence d'absorbance, et exprimée en $\text{degrés} \cdot \text{cm}^2 / \text{décimole}$ (Équation 2 b).

Dans le cadre de l'étude des structures des protéines et des peptides, le dichroïsme est utilisé à deux plages de longueur d'onde distinctes, dans l'UV lointain (190 à 240 nm) et le proche UV (250 à 280 nm). L'étude du dichroïsme dans le proche UV donne des informations sur l'environnement des chaînes aromatiques et des ponts disulfures permettant, par exemple, d'observer des changements dans la structure tertiaire des protéines, comme le suivi de la dénaturation.

Dans notre cas, nous avons étudié le spectre dichroïque dans l'UV lointain. La plage de longueur d'onde de 190 à 240 nm correspond essentiellement à la contribution des liaisons

¹⁸¹ Woody, R. Dans *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*; Gerald D. Fasman, Plenum Press, 1996; p. 69-107

amide et fournit des informations sur les structures secondaires qui composent la protéine étudiée. En effet, chaque type de structure secondaire possède une « signature » (Figure 84).

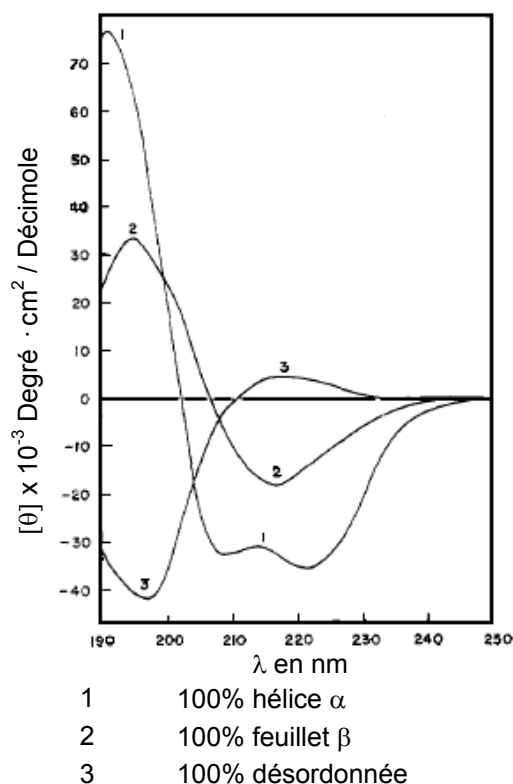


Figure 84 : Spectres dichroïques de la poly-L-lysine en hélice α , feuillet β et structure désordonnée¹⁸²

- Les spectres dichroïques des hélices α présentent deux minima caractéristiques à 222 nm et à 208 nm.
- Le spectre dichroïque des feuillets β ont un minimum caractéristique autour de 216 nm et un maximum autour de 195 nm.
- Les structures en pelote aléatoire ou désordonnées (*random coils*) ont un signal négatif en dessous de 200 nm et, selon les cas, un maximum à 218 nm.

Etant donné que les contributions de chaque structure au spectre sont additives, il devient possible, *via* des algorithmes de calcul, de déterminer la « proportion de domaines » présents dans une protéine dont on étudie le DC.

¹⁸² Greenfield, N. J.; Fasman, G. D. *Biochemistry* **1969**, 8, 4108-4116

V-4.C.b – Spectres dichroïques de **38**

V-4.C.b.1 – Spectre dichroïque de **38** en fonction de la concentration

Les spectres dichroïques de **38** ont été mesurés dans le tampon utilisé pour l'évaluation de son activité biologique à différentes concentrations (Figure 85).

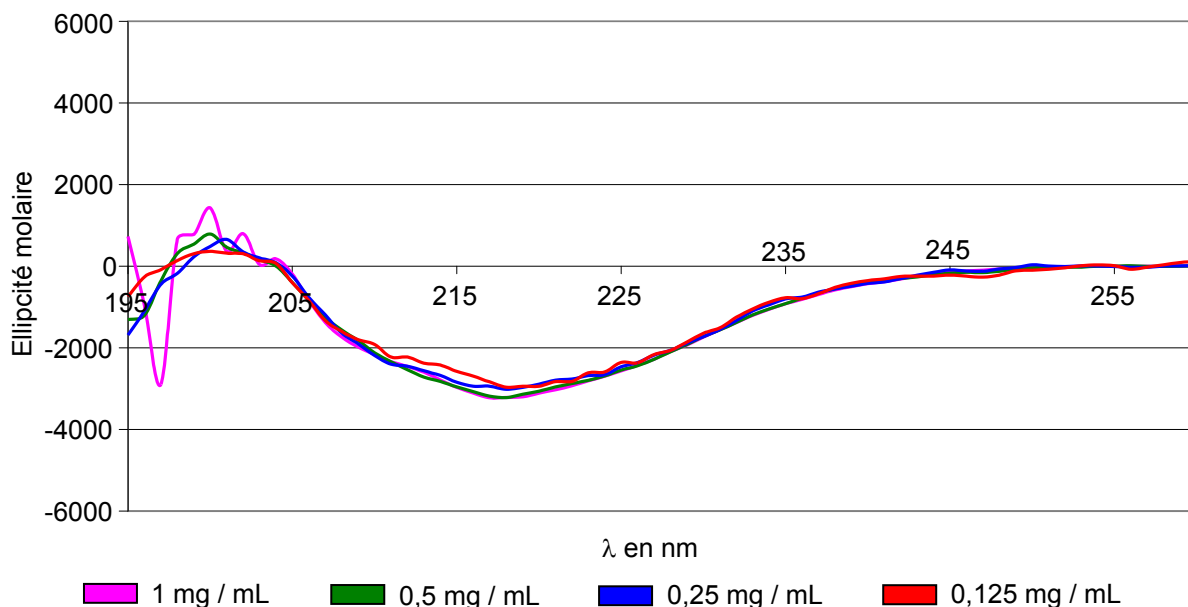


Figure 85 : Spectres dichroïques de **38** en fonction de la concentration dans un tampon phosphate 100mM pH = 6,0

Les spectres montrent un minimum à 217 nm, caractéristique de structures en feuillet β . Ces résultats sont en accord avec la structure tridimensionnelle étudiée par RMN¹⁶⁸ et les mesures de Zerovnik *et al.* qui estiment la structure secondaire de la stéfine A native à environ 17% de structure en hélice et environ 34% en feuillets β .¹⁷⁹ De plus, nous constatons que le profil dichroïque ne varie pas en fonction de la concentration de la molécule ce qui implique que la protéine ne s'agrège pas.

V-4.C.b.2 – Comparaison du spectre dichroïque de **38** et de la stéfine A recombinante

Nous avons comparé le spectre de notre molécule avec celui d'une stéfine A commerciale produite par voie recombinante possédant une étiquette poly-histidine en extrémité N-terminale entre les résidus 1 et 2. Les deux échantillons ont été dissous séparément dans le même tampon (phosphate 100 mM, pH 6,0) et les concentrations des solutions de chaque produit ont été comparées par absorbance UV-visible à 275 nm. Les spectres ont été enregistrés pour une concentration de 0,125 mg/mL (Figure 86).

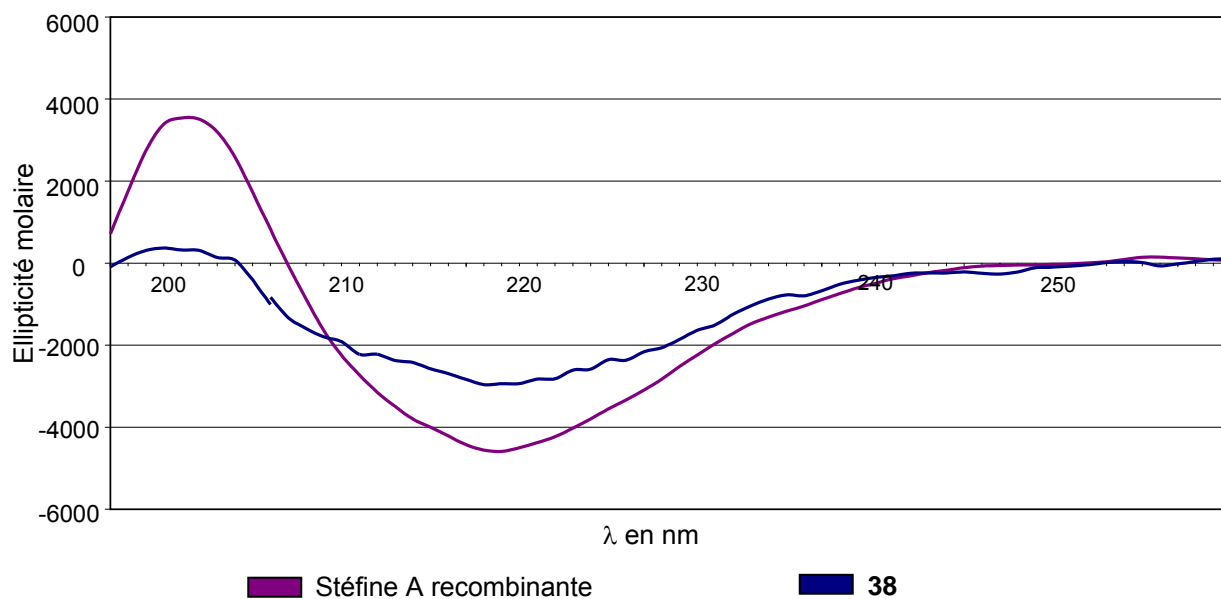


Figure 86 : Spectres dichroïques comparés de la stéfine A recombinante et **38**

Le spectre dichroïque de **38** possède une forme similaire à celui de la stéfine A recombinante, avec un minimum caractéristique à 217 nm, mais d'une intensité plus faible. Cette différence peut être attribuée à la présence l'étiquette 6-histidine de la protéine recombinante ou d'un repliement moins efficace de la triazolo-protéine dans les conditions choisies.

Ces résultats doivent être contrastés avec le fait que nous ne disposons pas du spectre dichroïque de la stéfine A native (ayant une structure primaire non modifiée) et que les spectres dichroïques de la stéfine A recombinante commerciale et de la stéfine A native n'ont jamais été comparés dans des conditions rigoureusement identiques.

V-5 – Caractérisation de l'activité inhibitrice

Cette légère différence des spectres dichroïques de **38** et la stéfine A recombinante nous a poussés à approfondir la caractérisation de l'activité inhibitrice *in vitro* et *in vivo*, en particulier vis-à-vis de cathepsines d'intérêt diagnostique et thérapeutique.

Nous avons donc engagé une collaboration avec G. Lalmanach et F. Lecaille (Inserm U618, équipe Protéases et Pathologies Pulmonaires) spécialistes des cathepsines à cystéines de façon à évaluer de façon précise, l'activité de **38** et de la comparer à celle de la stéfine A recombinante.

V-5.A – Caractérisations *in vitro* : Etude de la stabilité en fonction du pH et de la température

Une caractéristique particulière de la stéfine A est sa stabilité sur une large gamme de pH et sa grande stabilité thermique,¹⁸³ (sa température de dénaturation est de 94,5°C à pH 6,5 et 8,0). Nos collaborateurs ont donc entrepris de mesures de stabilité de notre analogue en fonction du pH et de la température et les ont comparées à celles de la stéfine A recombinante commerciale.

V-5.A.a – Stabilité en fonction du pH

Pour réaliser les mesures qui suivent, les inhibiteurs ont été incubés pendant 1h dans les conditions de pH indiquées en abscisse, puis leur activité résiduelle a été enregistrée de façon analogue a celle présentée en V-4.B.b (p.101) contre la papaïne.

¹⁸³ Zerovnik, E.; Lohner, K.; Jerala, R.; Laggner, P.; Turk, V. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 217-221

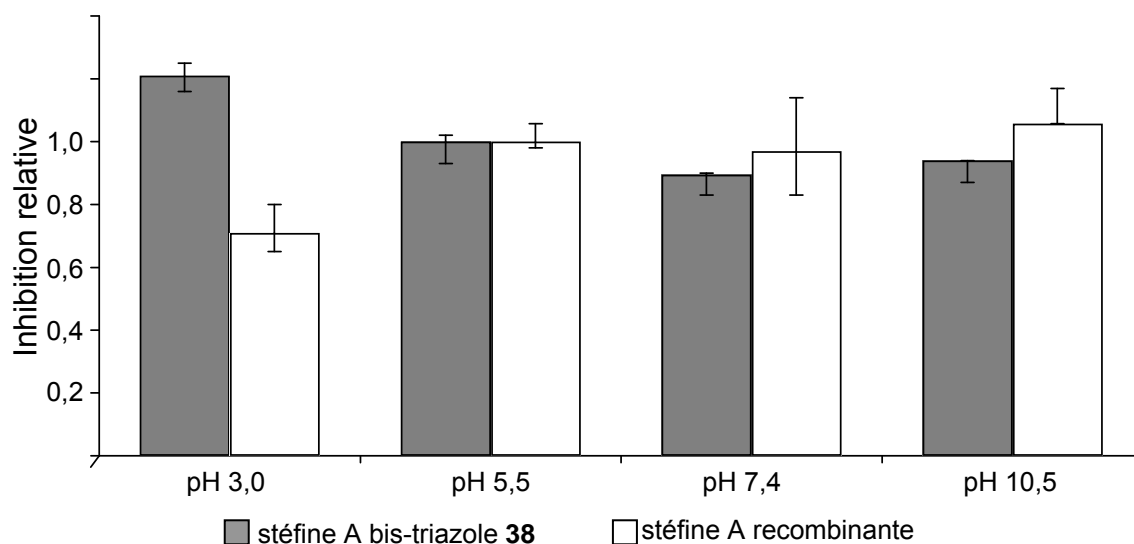


Figure 87 : Comparaison de stabilité en fonction du pH de la bis-triazolo stéfine A 38 et la stéfine A recombinante

A des pH acides, **38** montre une plus grande stabilité que la stéfine A recombinante. A des pH de 5,5, 7,4 et 10,5 les deux inhibiteurs exhibent une activité comparable.

V-5.A.b – Stabilité en fonction de la température

Dans cette étude, chaque stéfine a été pré-incubée pendant 1h aux températures indiquées en abscisse. Les échantillons ont ensuite été refroidis à température ambiante pendant plusieurs minutes et les mesures cinétiques similaires à celles présentées en V-4.B.b (p.101) contre la papaïne ont été enregistrées (Figure 88).

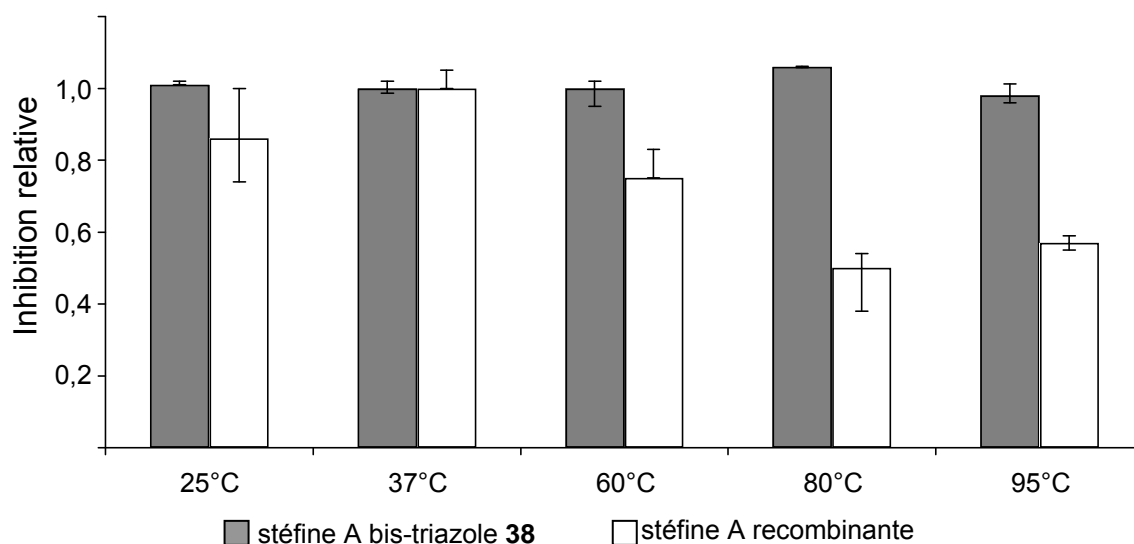


Figure 88 : Comparaison de stabilité en fonction de la température de la bis-triazolo stéfine A 38 et la stéfine A recombinante

Dans ce cas, le comportement des deux stéfine est différent. Notre analogue semble avoir une stabilité thermique supérieure à celle de la stéfine A recombinante et, par conséquent, un comportement très proche de celui de la stéfine A native jusqu'à 80°C.¹⁸⁴

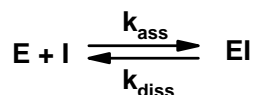
V-5.B – Caractérisations *in vitro* : Mesures de K_i vis-à-vis de cathepsines à cystéine d'intérêt thérapeutique

V-5.B.a – Définition du K_i

Une étape essentielle pour caractériser un inhibiteur réversible d'activité enzymatique est de réaliser des mesures de constante d'inhibition ou K_i .

L'inhibition enzymatique peut classée en deux types principaux : l'inhibition réversible et irréversible. L'inhibition irréversible résulte habituellement de la destruction ou de la modification de un ou plusieurs groupements fonctionnels de l'enzyme alors que l'inhibition réversible est caractérisée par un équilibre rapide entre l'inhibiteur et l'enzyme.

L'inhibition des cathepsines à cystéine par la stéfine A est une inhibition réversible compétitive. Un inhibiteur compétitif se lie au site actif de l'enzyme de façon réversible diminuant ainsi la proportion d'enzyme disponible pour se lier au substrat. Cet équilibre peut être résumé sous forme d'une équation.



Équation 3 : Équilibre ayant lieu entre l'enzyme et un inhibiteur

L'inhibition d'une enzyme est traditionnellement quantifiée par le K_i , représentant l'équilibre de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur.

$$K_i = \frac{k_{\text{diss}}}{k_{\text{ass}}}$$

Équation 4 : Définition de la constante d'inhibition

La mesure d'un K_i est donc essentielle pour caractériser complètement notre analogue de protéine et pouvoir comparer son inhibition à celle de la stéfine naturelle.

¹⁸⁴ Brzin, J.; Popovic, T.; Turk, V.; Borchart, U.; Machleidt, W. *BioChem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *118*, 103-109

V-5.B.b – Mesures du K_i

Pour réaliser de mesures de K_i , nous nous sommes tournés vers l'étude de l'activité biologique de notre analogue synthétique vis-à-vis de protéases à cystéines impliquées dans des processus physio-pathologiques, les cathepsines B, L et H (Tableau 21).

enzymes	stéfine A sauvage	stéfine A recombinante	<i>bis</i> -triazolo stéfine A 38
	K_i (nM) ^{185,186}	K_i (nM)	K_i (nM)
cathepsin B	0,9< K_i <8,2	4	3
cathepsin H	0,3< K_i <0,9	0,4	0,2
cathepsin L	0,0018< K_i <1,3	0,005	0,001

Tableau 21 : Mesures de K_i vis-à-vis des cathepsines B, H et L

De façon remarquable, les mesures mettent en évidence que, pour toutes les cathepsines de l'étude, les K_i de notre analogue *bis*-triazole, sont comparables à ceux de la stéfine A sauvage et à ceux de la stéfine synthétisée par voie recombinante.

V-5.C – Caractérisations *in vivo* : Evaluation de l'inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire

Les stéfines jouent un rôle primordial dans la balance protéase-antiprotéase dans l'organisme. En particulier, l'invasivité des cellules cancéreuses est directement reliée à leur capacité de dégradation de la matrice extracellulaire par différentes protéases dont les protéases à cystéine.^{187,188}

Nos collaborateurs ont donc réalisé des expériences pour évaluer la capacité de notre inhibiteur à freiner la gélatinolyse par des cellules cancéreuses.

Cette gélatinolyse est évaluée par augmentation de la fluorescence après lyse de la gélatine DQ (*Dye Quenched*) présente dans le milieu. La fluorescence verte met en évidence une protéolyse de la matrice tandis que la fluorescence bleue correspond aux noyaux cellulaires marqués au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole).

¹⁸⁵ Auerswald, E. A.; Nägler, D. K.; Schulze, A. J.; Engh, R. A.; Genenger, G.; Machleidt, W.; Fritz, H. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 407-415

¹⁸⁶ Pol, E.; Olsson, S. L.; Estrada, S.; Prasthofer, T. W.; Björk, I. *Biochem. J.* **1995**, *311* (Pt 1), 275-282

¹⁸⁷ Gocheva, V.; Joyce, J. A. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 60-64

¹⁸⁸ Mohamed, M. M.; Sloane, B. F. *Nat Rev Cancer* **2006**, *6*, 764-775

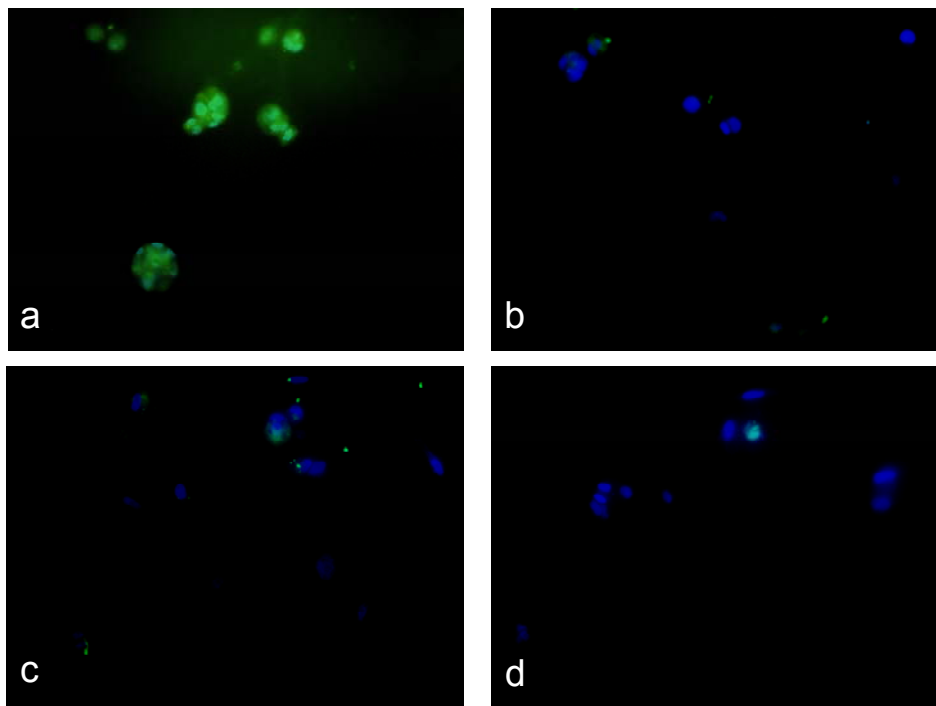


Figure 89 : Inhibition de l'activité gélatinolytique de cellules MDA-MB-231 par des inhibiteurs non spécifiques de cathepsines à cystéine. a) cultures en absence d'inhibiteurs b) cultures en présence de E-64¹⁸⁹ (100 μ M) c) cultures en présence de la bis-triazolo stéfine A **38** (100 nM) d) cultures en présence de la stéfine A recombinante (100 nM)

Les cultures en absence d'inhibiteur montrent une forte fluorescence en raison de la protéolyse de la (DQ) gélatine (Figure 89 a). En revanche, aucune fluorescence n'est détectée en présence d'un inhibiteur irréversible de protéases à cystéine, le E-64 (100 μ M) (Figure 89 b),¹⁸⁹ de la bis-triazolo stéfine A **38** (100 nM) (Figure 89 c) ou de stéfine A recombinante (100 nM) (Figure 89 d) mettant en évidence l'absence d'activité protéolytique.

Ces images montrent que notre bis-triazolo protéine remplit son rôle biologique et se comporte, *in vivo*, de façon identique à la stéfine A recombinante.

¹⁸⁹ Barrett, A. J.; Kembhavi, A. A.; Brown, M. A.; Kirschke, H.; Knight, C. G.; Tamai, M.; Hanada, K. *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189-198

V-6 – Conclusion sur la synthèse d'un *bis*-triazolo analogue de la stéfine A

Dans le but de développer une nouvelle méthode de ligation pseudo-native, nous avons mis au point une méthodologie de CuAAC successive efficace et robuste pour coupler deux fragments peptidiques non protégés de façon à mimer une liaison peptidique native au moyen d'une stratégie basée sur la protection temporaire de la fonction alcyne par un groupe silylé résistant aux conditions de SPPS. Cette approche enrichit le panel très restreint des techniques pouvant donner accès à des protéines synthétisées par voie purement chimique et incorporant des mimes de liaison amide au point de ligation.

Cette synthèse nous a permis de mieux appréhender les paramètres qui gouvernent la cycloaddition de peptides non protégés, la concentration des substrats et la concentration du cuivre (I).

Un atout important de cette approche est la rapidité de la réaction (quantitative en 15 minutes) comparée à d'autres techniques comme la *NCL* (dont les temps de réaction varient de quelques heures à plusieurs jours en fonction de la nature des acides aminés au point de ligation).³⁴ De plus, la chimiosélectivité exceptionnelle de la réaction nous a permis de réaliser une ligation sur un mélange brut de peptides issu de la SPPS et ainsi éviter une étape de purification HPLC coûteuse en produit.

Nous avons également constaté que les chaînes latérales de certains acides aminés pouvaient subir des réactions d'oxydation en conditions de CuAAC. En dépit de ces difficultés, nous avons effectué avec succès une double ligation triazole successive en solution grâce à notre stratégie de masquage des alcynes. Il s'agit, à notre connaissance, du premier exemple de CuAAC utilisée pour coupler des peptides de façon à remplacer une liaison amide.

L'analogue obtenu a été replié et soumis à des analyses *in vitro* afin d'évaluer son efficacité inhibitrice vis-à-vis de ses substrats naturels, les cathepsines à cystéine. Les résultats ont été extrêmement encourageants puisque **38** exhibe une forte activité inhibitrice de la protéolyse. L'évaluation de la structure secondaire par dichroïsme circulaire révèle que **38** a une structure riche en feuillets β , comparable à celle de la protéine native.

Afin de caractériser notre inhibiteur de façon plus précise, nous avons engagé une collaboration avec une équipe de spécialistes des cathepsines à cystéine. Les caractéristiques essentielles de la stéfine A, stabilité thermique et constantes d'inhibition, sont clairement conservées chez notre triazolo-protéine **38**.

Nous disposons maintenant d'une méthode de multi-ligation permettant d'obtenir des multi-triazolo-analogues de protéines qui conservent l'activité biologique de la protéine native.

PARTIE VI – MULTI-CUAAC SUR PHASE SOLIDE

VI-1 – Problématique

Malgré l'efficacité remarquable de la ligation triazole, il subsiste un problème inhérent à l'approche de multi-ligation successive due aux purifications des peptides après chaque étape de ligation. Il découle de ces étapes répétées de purification, un problème de rendement puisque, comme nous l'avons vu pour la synthèse de **38**, même si les couplages sont quantitatifs, l'étape de purification par HPLC semi-préparative peut entraîner des chutes de rendement jusqu'à 50%. Il existe une solution pour surmonter ces problèmes, la ligation chimique sur phase solide,⁷⁰ qui consiste à appliquer les principes qui ont fait le succès de la synthèse de peptides sur phase solide à la ligation chimique de peptides déprotégés.

Nous nous sommes donc proposés de mettre au point une nouvelle méthodologie alliant ligation triazole et synthèse sur phase solide. Cette approche devrait nous permettre de surmonter les limitations d'ordre technique imposées par la ligation en solution et de multiplier le nombre de ligations effectuées, donnant accès à des protéines dépassant la centaine d'acides aminés, y compris des protéines contenant des modifications post-traductionnelles. L'efficacité de la méthode sera illustrée par la synthèse d'un analogue de la glycoprotéine MUC1.

VI-2 – La ligation chimique sur phase solide appliquée à la CuAAC successive

VI-2.A – Principe de la ligation chimique sur phase solide

L'approche de la ligation chimique sur phase solide a été proposée par S. Kent (Figure 90).¹⁹⁰ Un fragment peptidique déprotégé est immobilisé sur un support polymérique hydrophile. Pour continuer l'élongation, on démasque une fonction chimique réactive présente sur la chaîne peptidique principale du dernier fragment lié préparant ainsi le peptide accroché sur la résine pour un nouveau couplage. Le peptide en croissance est purifié par un simple lavage de la résine suivi de filtration et le peptide en excès est récupéré dans le filtrat. La dernière étape consiste en une coupure sélective du peptide de son support pour obtenir la protéine ou le fragment de protéine désiré (Figure 90).

¹⁹⁰ Dawson, P. E.; Kent, S. B. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923-960

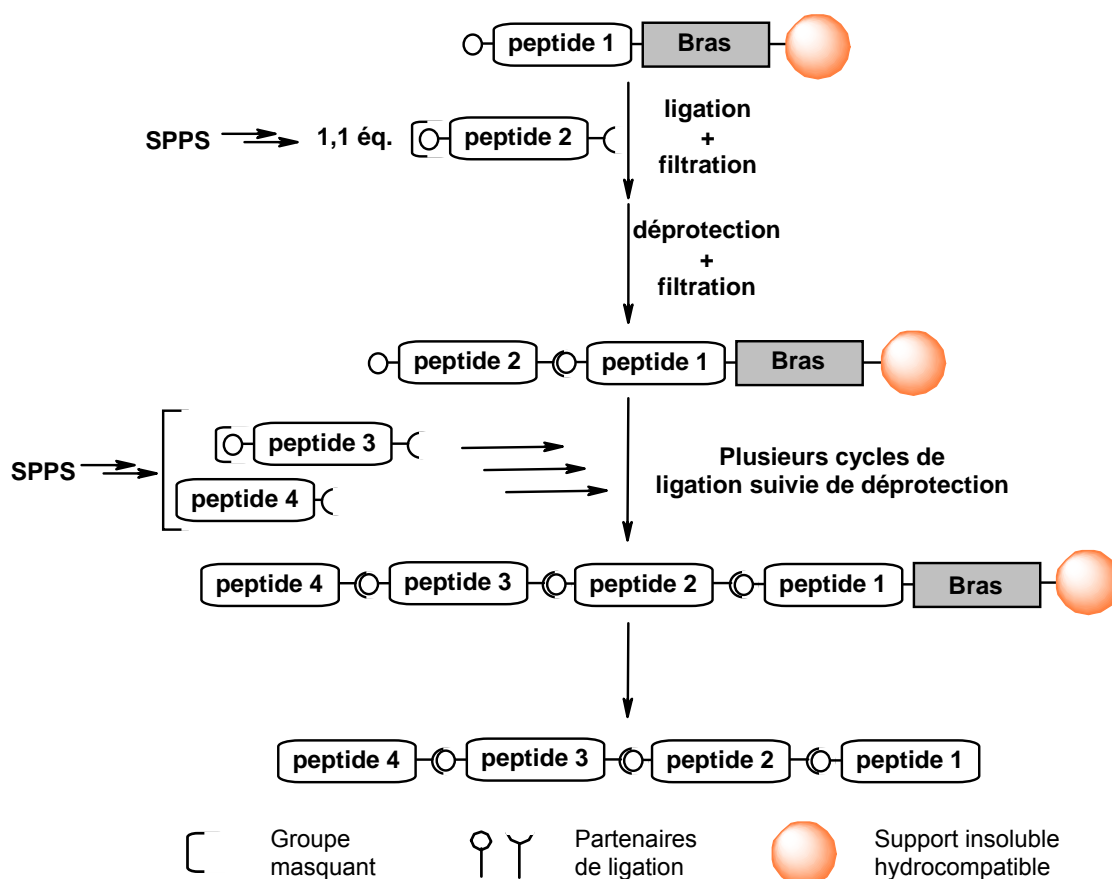


Figure 90 : Schéma de principe de la Ligation Chimique sur Phase Solide

Malgré le fait que cette stratégie d'assemblage linéaire de peptides déprotégés a déjà permis de synthétiser plusieurs protéines dépassant la centaine de résidus,⁷⁰ elle reste, à ce jour, très peu utilisée.

VI-2.B – « C-vers-N » vs. « N-vers-C »

Il convient de souligner les particularités de cette méthode de synthèse de protéines sur phase solide par rapport à la synthèse de peptides sur support solide classique. La ligation sur support solide sert à lier des peptides déprotégés et par conséquent, les réactions de couplage entre fragments de peptides ont donc lieu dans un milieu principalement aqueux. En SPPS, l'élongation de la protéine se fait de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale pour éviter les réactions d'épimérisation. Or, les réactions de ligation sont non-épimérisantes, y compris la NCL,¹⁹¹ et, par conséquent, l'élongation du peptide peut se faire, soit de « N-vers-C » (*i.e.* le peptide en élongation est immobilisé par l'extrémité N-terminale) soit de « C-vers-N » (*i.e.* le peptide en élongation est immobilisé par l'extrémité C-terminale). L'étape clé qui

¹⁹¹ Lu, W.; Qasim, M. A.; Kent, S. B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8518-8523

distingue les deux stratégies d'élongation est donc l'immobilisation du peptide fonctionnalisé avec un partenaire de ligation.

VI-2.B.a – Elongation de « C-vers-N »

La ligation peut être réalisée directement après la SPPS après déprotection sélective des chaînes latérales sans décrocher le peptide. Dans ce cas, le support insoluble sert aussi bien pour la synthèse linéaire du premier fragment de la synthèse, que pour la ligation chimique sur phase solide (Figure 91).⁷¹ Cette stratégie est basée sur l'utilisation de plusieurs orthogonalités entre groupes protecteurs présents sur le peptide.

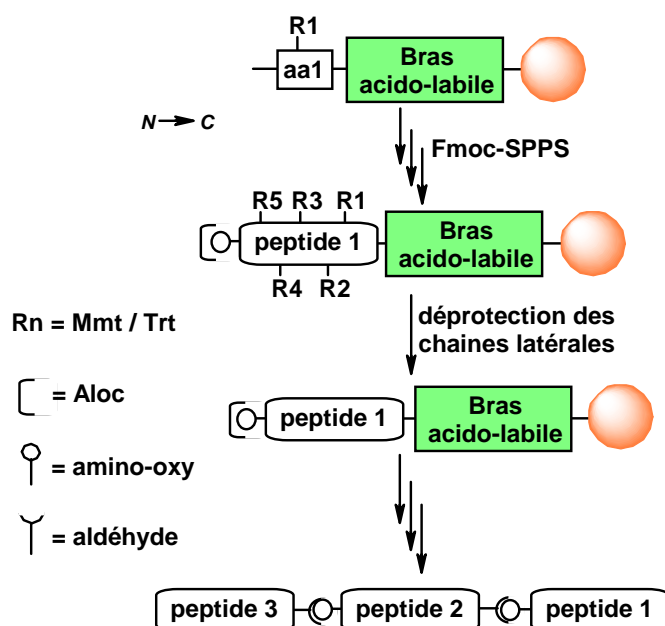


Figure 91 : Stratégie de multi-ligation sur support solide de C vers N

Cette stratégie n'a été exploitée qu'une seule fois à notre connaissance.⁷¹ Les auteurs proposent de synthétiser le premier partenaire de ligation immobilisé sur la résine par Fmoc-SPPS suivie d'une déprotection sélective des chaînes latérales en milieu légèrement acide. Cette stratégie présente l'avantage d'être très simple à mettre en œuvre. Toutefois, cette stratégie est inapplicable aux séquences peptidiques contenant des résidus arginyles puisqu'il n'existe pas, à ce jour de groupe protecteur très acido-labile de la fonction guanidinium. De plus, le rendement final de la ligation est conditionné par le succès de la synthèse du peptide relié au support (Figure 91).

Une autre méthode, permettant de dépasser ces limitations, consiste à synthétiser le peptide en incorporant un bras pour pouvoir l'immobiliser avec un support solide hydrocompatible après déprotection et décrochage du peptide de la résine (Figure 92).^{70,192}

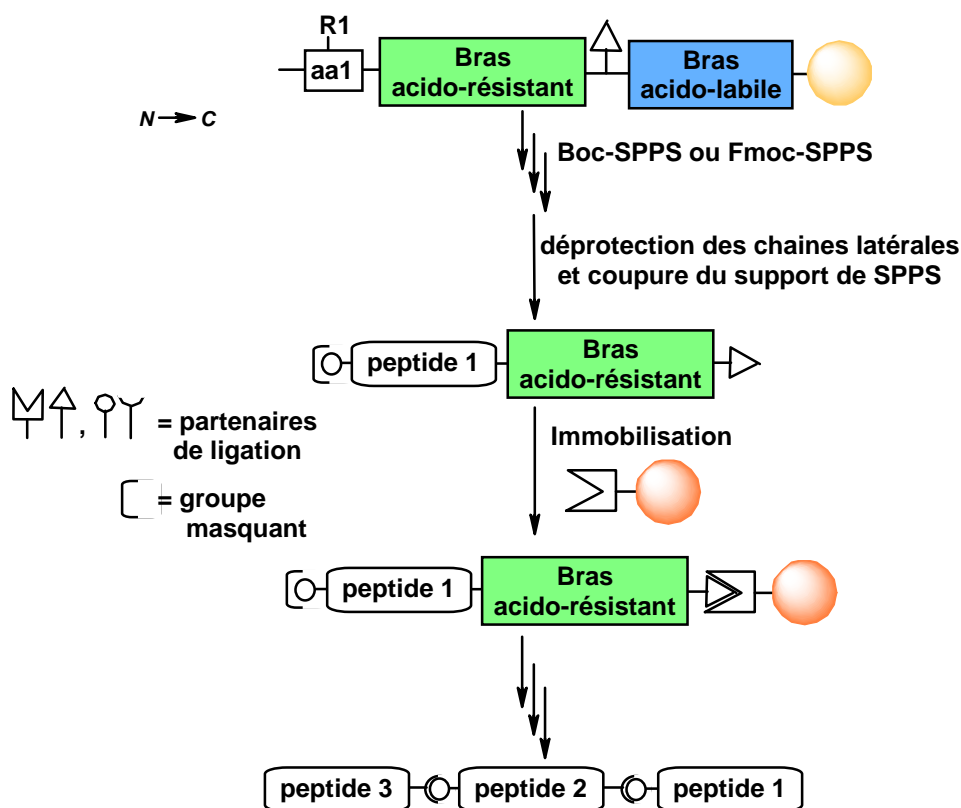


Figure 92 : Stratégie de multi-ligation sur support solide de C vers N

Bras pour l'immobilisation	Bras	Méthode pour l'immobilisation	Méthode de ligation	Coupeure du bras
SCAL ^{192,193}		NCL	NCL successive	Acidolyse réductrice (SiCl ₄ +TFA)
Aminoéthylsulfonylethoxycarbonyl ¹⁹⁴		Ligation oxime	NCL successive	0,25 N NaOH

Tableau 22 : Associations de bras pour l'immobilisation de peptides après SPPS et méthodes de ligation pour la ligation successive sur phase solide de C vers N

Cette stratégie impose l'utilisation, et souvent la conception *de novo*, de bras stables en conditions de Boc- ou de Fmoc-SPPS et dans les conditions d'immobilisation sur la résine et de ligation. Le peu d'exemples trouvés dans la littérature proposent les associations résumées dans le Tableau 22.^{70,192} Dawson et ses collaborateurs ont proposé l'utilisation du bras Safety Catch Anchoring Linkage (SCAL) de type benzyldrylamine *bis*-sulfynylée. Après synthèse

¹⁹² Brik, A.; Keinan, E.; Dawson, P. E. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3829-3835

¹⁹³ Pátek, M.; Lebl, M. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3891-3894

¹⁹⁴ Canne, L. E.; Winston, R. L.; Kent, S. B. H. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3361-3364

de la protéine, le bras est coupé par réduction des fonctions sulfoxydes sur le bras en milieu réducteur acide à 0°C. Kent et ses collaborateurs ont quant à eux opté pour un bras basolabile, coupé en milieu aqueux basique (pH 12-14) en fin d'élongation. Dans chacun des cas, les conditions utilisées semblent soit excessivement agressives ou délétaires pour les peptides. Malgré la complexité apparente de cette méthode, sa versatilité est bien supérieure à la méthode présentée auparavant (Figure 91) puisqu'elle permet la purification du peptide avant le processus de ligation et le choix d'un support adéquat pour la ligation.

VI-2.B.b – Elongation de « N vers C »

La synthèse de « N vers C » d'une protéine sur phase solide implique également l'utilisation de bras capables d'immobiliser un peptide non protégé par l'extrémité N-terminale par réaction chimiosélective avec un support insoluble. Ce type de stratégie est particulièrement adaptée à la synthèse de protéines sur phase solide car l'immobilisation sélective du peptide portant le bras sur le support agit comme une purification rapide du mélange de peptides issu de la SPPS. En effet, au cours d'une SPPS, les peptides acétylés, issus du couplage incomplet d'un acide aminé, peuvent s'accumuler et rendent difficile la purification du peptide qui sera engagé en ligation (Figure 93).

En fixant le peptide par son extrémité N-terminale, nous pouvons, après coupure du mélange de peptides de la résine, fixer sélectivement sur un support insoluble hydrocompatible le peptide d'intérêt parmi tous les produits de la synthèse, grâce à la sélectivité de la réaction qui sert à l'immobilisation.

Ce phénomène de purification concomitant à la ligation sur le support solide est récurrent tout au long de la synthèse de la protéine, de sorte qu'il est possible d'utiliser directement des mélanges bruts de peptides issus de SPPS (Figure 93).

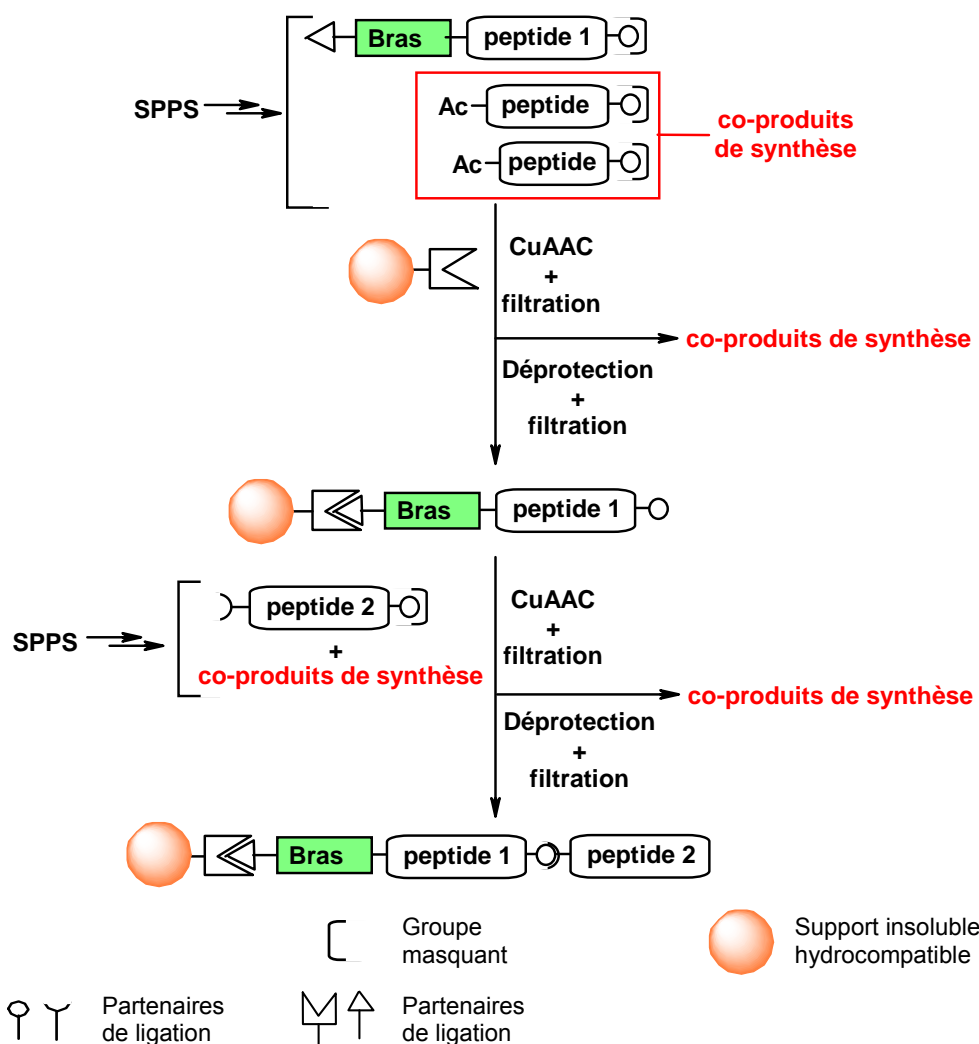


Figure 93 : Avantages de la synthèse de protéines sur phase solide par ligation successive : la ligation suivie de filtration permet d'économiser les étapes de purification des produits de départ et de ligation

La multi-ligation de « N vers C » sur support solide possède donc plusieurs avantages par rapport à la ligation « C vers N » :

- elle permet d'éviter les étapes de chromatographie avant le processus de ligation successive puisque seuls les peptides portant le bras ou le partenaire de ligation en extrémité N-terminale à l'issue de la SPPS réagissent au cours de l'immobilisation ou de la ligation.
- elle permet d'éviter les étapes de chromatographie après la ligation, puisque l'excès de peptide n'ayant pas réagi, est séparé par simple filtration.

VI-2.C – Application de la ligation sur phase solide à la ligation triazole successive

Dans le cadre de la ligation triazole, l'élargissement de « N-vers-C » est parfaitement adaptée, puisque notre partenaire alcyne qu'on sait protéger et déprotéger sélectivement est situé à l'extrémité C-terminale du peptide. De ce fait, on profite au maximum du potentiel de la ligation sur phase solide. Toutefois, l'immobilisation et l'élargissement dans ce sens requiert la mise au point d'un bras particulier pour accrocher notre peptide à un support après sa coupure de la résine (Figure 94).

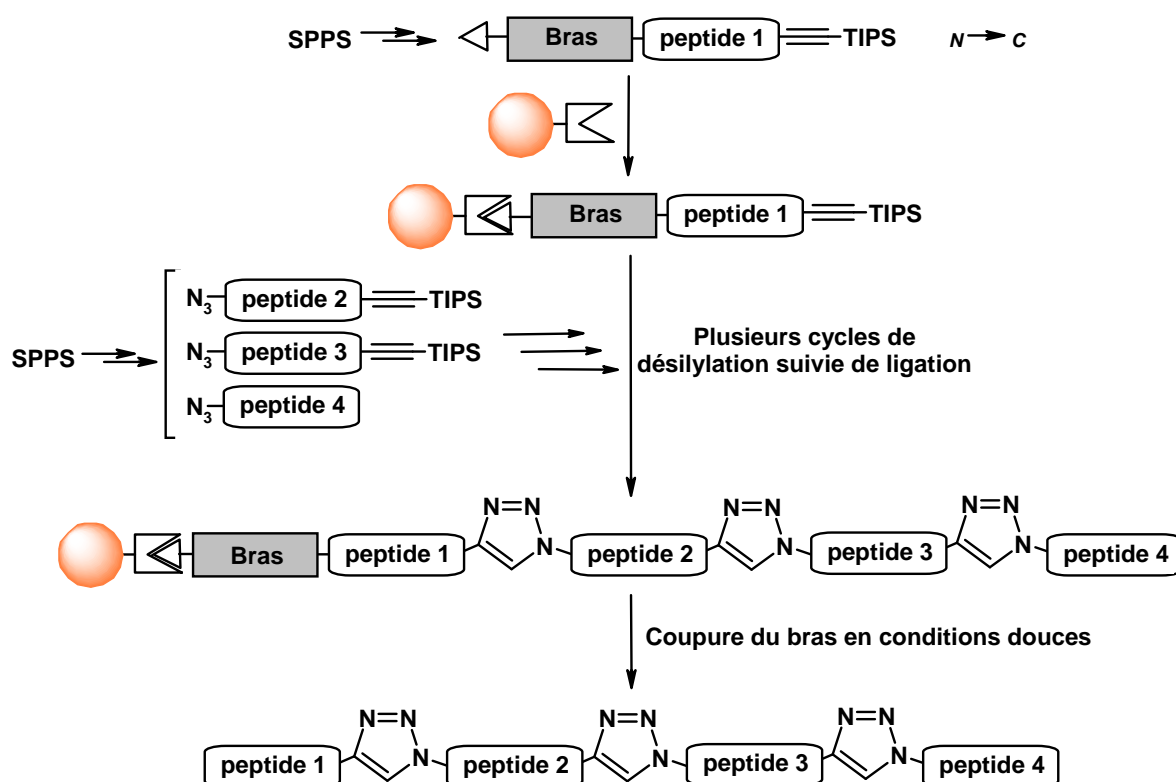


Figure 94 : Principe de multi-ligation triazole sur support solide

VI-2.C.a – Immobilisation de peptides sur support solide

Il existe un certain nombre de bras capables d'immobiliser un peptide sur résine après la SPPS mais les méthodes proposées jusque là sont souvent incompatibles avec la ligation successive de peptides car :

- l'immobilisation est faite au moyen d'interactions non covalentes (avidine-biotine) (Figure 95).¹⁹⁵ Le fait que le lien entre le support et la résine ne soit pas covalent limite

¹⁹⁵ Funakoshi, S.; Fukuda, H.; Fujii, N. *J. Chromatogr. A* **1993**, 638, 21-27

les traitements qu'on peut effectuer sur la résines (agents dénaturants, acides forts, bases, réducteurs etc...).

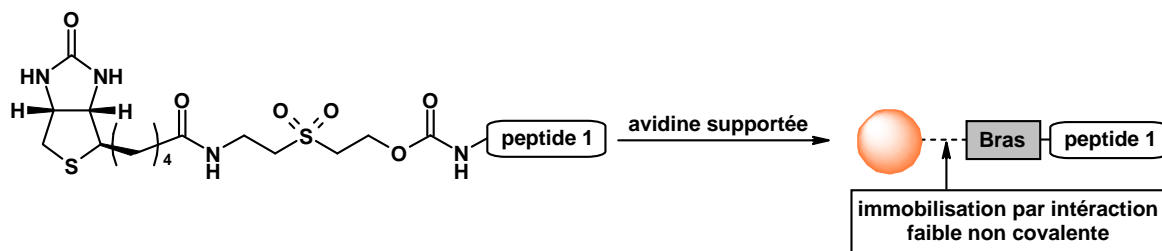


Figure 95 : Immobilisation de peptides issus de SPPS par chromatographie d'affinité¹⁹⁵

– l'immobilisation est faite au moyen de liaisons covalentes réversibles, par exemple à l'aide de ligations de type imine (oximes¹⁹⁴ ou thiazolidine¹⁹⁶, Figure 96) ou au moyen de liaisons covalentes de coordination (mercure-soufre)¹⁹⁷. Il est intéressant de noter que la réversibilité peut être mise à profit de façon à s'affranchir de l'utilisation de bras (Figure 96 B). L'utilisation de cette technique limite également les traitements à utiliser pour le lavage de la résine.

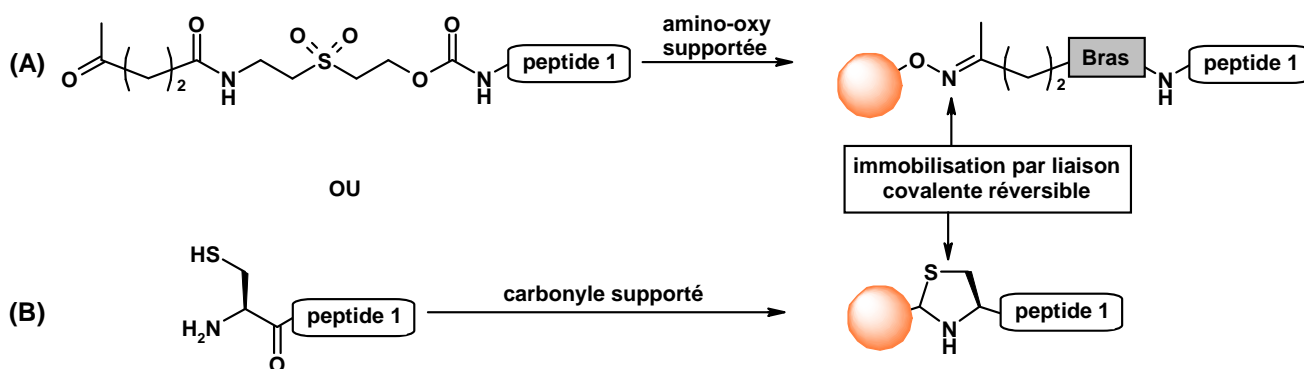


Figure 96 : Immobilisation de peptides issus de SPPS par « capture covalente »^{194,196}

– la réaction d'immobilisation covalente et irréversible est chimiosélective mais inapplicable si les peptides à immobiliser possèdent des cystéines ailleurs qu'en position N-terminale.¹⁹⁸

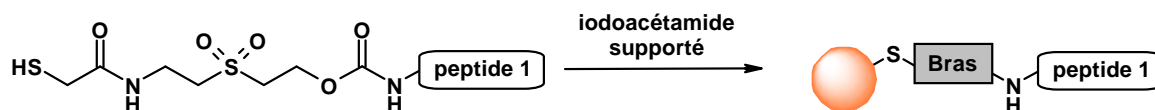


Figure 97 : Immobilisation de peptides issus de SPPS par ligation thioéther d'après Funakoshi et al.¹⁹⁸

¹⁹⁶ Villain, M.; Vizzavona, J.; Rose, K. *Chemistry & Biology* **2001**, 8, 673-679

¹⁹⁷ Krieger, D. E.; Erickson, B. W.; Merrifield, R. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, 73, 3160-3164

¹⁹⁸ Funakoshi, S.; Fukuda, H.; Fujii, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 6981-6985

VI-2.C.b – Le bras Azido-Ethoxyéthylsulfonylethoxycarbone (N_3 -Esoc)

Le bras que nous devons incorporer en extrémité N-terminale de nos peptides doit répondre au cahier des charges suivant :

- le bras doit être introduit *via* une liaison covalente sur l'amine à l'extrémité du peptide, lors d'une étape supplémentaire après élongation du peptide.
- il doit permettre l'immobilisation du peptide déprotéger sur un support au moyen d'une réaction chimiosélective en milieu aqueux, de façon covalente et irréversible.
- le bras devra être résistant aux conditions de coupure et déprotection d'un peptide en stratégie Fmoc/*t*Bu (soit jusqu'à 95% de TFA) mais également résistant aux conditions de cycloaddition successive et aux conditions de démasquage d'un alcyne triisopropylsilylé.
- le bras doit être coupé dans des conditions douces et compatibles avec une petite protéine.

Un bras de type sulfonylethoxycarbone, le 2-[2-(2-azido-éthoxy)-éthanesulfonylethoxycarbone (N_3 -Esoc) a récemment été mis au point au sein du laboratoire et correspond exactement à notre cahier des charges (Figure 98).¹⁹⁹ Le bras N_3 -Esoc se démarque de tous ces prédécesseurs puisque l'immobilisation se fait par CuAAC qui est chimiosélective, covalente et non-réversible et, en raison de la robustesse du triazole, elle est particulièrement appropriée pour réaliser les ligations sur phase solide.

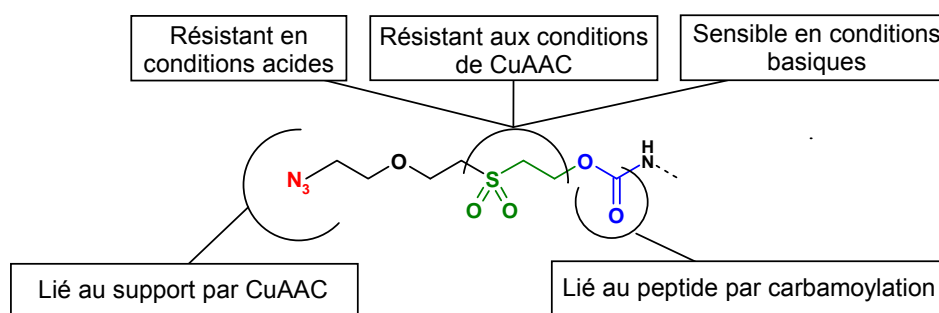


Figure 98 : Conception d'un bras pour l'immobilisation de peptides non protégés sur résine

Le bras comporte un azoture pour pouvoir réaliser l'accrochage du peptide sur un support par simple CuAAC. Le motif éthylène glycol assure une hydrophilie du bras tandis que la fonction sulfonylethoxycarbone détermine les conditions de coupure du peptide du support. Des études réalisées au laboratoire ont permis d'optimiser les meilleures conditions pour la

¹⁹⁹ Aucagne, V.; Delmas, A. Compounds and methods for purifying peptides produced by solid phase peptide synthesis. Application number : EP09306101.8 (16 novembre 2009)

coupure du bras. Le peptide sera décroché du support par simple traitement de la résine par un tampon basique.

VI-2.D – Conclusion

La ligation sur phase solide peut améliorer de façon drastique notre méthodologie de ligation triazole successive en termes d'efficacité et de rapidité de synthèse et tous les outils dont nous avons besoin sont déjà en notre possession.

Pour prouver la validité de notre approche, nous avons choisi de synthétiser une protéine glycosylée dépassant la centaine de résidus. La synthèse de la glycoprotéine MUC1 semble être l'application idéale pour notre nouvelle méthode de multi-CuAAC sur support solide.

VI-3 – MUC1

La mucine MUC1 est une glycoprotéine transmembranaire, présente dans la membrane des cellules épithéliales. Le domaine extracellulaire est constitué de la séquence TAPPAHGVTSAPDTRPAPGS répétée entre 30 et 150 fois. A la surface des cellules saines, cette séquence peptidique, qui comprend cinq sites d'*O*-glycosylation, est recouverte de chaînes de polysaccharides longues et complexes.²⁰⁰ A la surface des cellules épithéliales tumorales, MUC1 est surexprimée et, en raison d'une expression erronée de certaines glycosyltransférases, elle apparaît sous des formes hautement sous-glycosylées. Le résultat de cette glycosylation anormale de la protéine est l'apparition de nouveaux antigènes peptidiques et glycopeptidiques spécifiques à la surface des cellules tumorales (épitopes Tn, TF, Sialyl-Tn, Sialyl-TF) (Figure 99).²⁰¹

²⁰⁰ Gendler, S.; Taylor-Papadimitriou, J.; Duhig, T.; Rothbard, J.; Burchell, J. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 12820-12823

²⁰¹ Hanisch, F.; Muller, S. *Glycobiology* **2000**, *10*, 439-449

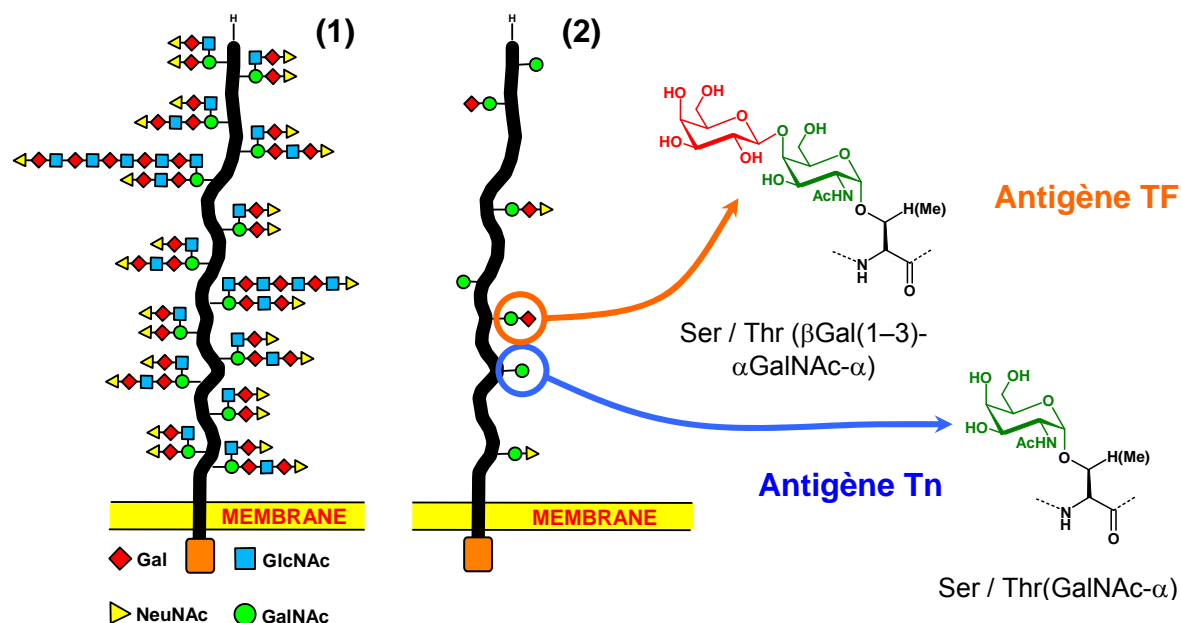


Figure 99 : Représentation schématique des formes de MUC1 dans des cellules saines (1) et tumorales (2)²⁰²

Un grand nombre d'études précliniques et cliniques ont montré que les antigènes saccharidiques associés aux tumeurs induisent la production d'anticorps spécifiques capables d'éliminer les cellules tumorales circulantes et les micro-métastases présentes chez des individus cancéreux. L'utilisation de glycopeptides synthétiques de structure proche de la forme tumorale de MUC1 fait donc l'objet de recherches intenses pour le développement d'immunothérapies anticancéreuses, en tant que complément des thérapies existantes comme la chimiothérapie et la radiothérapie.²⁰³

En ce qui concerne la synthèse de ces peptides immunogènes, l'approche chimique présente un certain nombre d'avantages. Elle permet de fournir des formes glycosylées de façon homogène, ce qui est indispensable pour générer des antigènes spécifiques contre les formes tumorales de la molécule. De plus, les épitopes Tn et TF sont de mauvais immunogènes, il faut donc avoir recours à une stimulation immunitaire additionnelle pour déclencher une réponse immunitaire forte et passer outre la tolérance du système immunitaire envers ces formes auto-antigéniques. Cette stimulation se fait habituellement par couplage chimique d'épitopes T auxiliaires universels comme le PADRE,²⁰⁴ ou avec des protéines telles que la KLH, la BSA,²⁰⁵ ou l'anatoxine tétanique.²⁰⁶

²⁰² Houghton, A. N.; Lloyd, K. O. *Nat. Med* **1998**, *4*, 270-271

²⁰³ Syrigos, K. N.; Karayiannakis, A. J.; Zbar, A. *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 5239-5244

²⁰⁴ Cremer, G.; Bureau, N.; Piller, V.; Kunz, H.; Piller, F.; Delmas, A. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 965-968

²⁰⁵ Dziadek, S.; Kowalczyk, D.; Kunz, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624-7630

²⁰⁶ Kaiser, A.; Gaidzik, N.; Westerlind, U.; Kowalczyk, D.; Hobel, A.; Schmitt, E.; Kunz, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551-7555

La glycoprotéine MUC1 est donc une cible idéale pour tester la ligation triazole sur phase solide. En effet, il s'agit d'unités répétées de la même séquence d'acides aminés, ce qui simplifie notre tâche en SPPS. Elle est glycosylée, ce qui nous permettra de d'étudier la compatibilité de la CuAAC avec les glycopeptides. L'utilisation de la ligation successive permettrait d'évaluer l'immunogénicité en fonction de la longueur du glycopeptide.²⁰⁷ Pour finir, une approche combinatoire de la synthèse sur phase solide de ces glycopeptides faciliterait énormément l'élaboration de chimiothèques de MUC1, qui permettraient d'établir des relations de structure-immunogénicité claires selon la longueur du pseudo-peptide, les immunostimulants et des profils de glycosylation utilisés (Figure 100).²⁰⁸

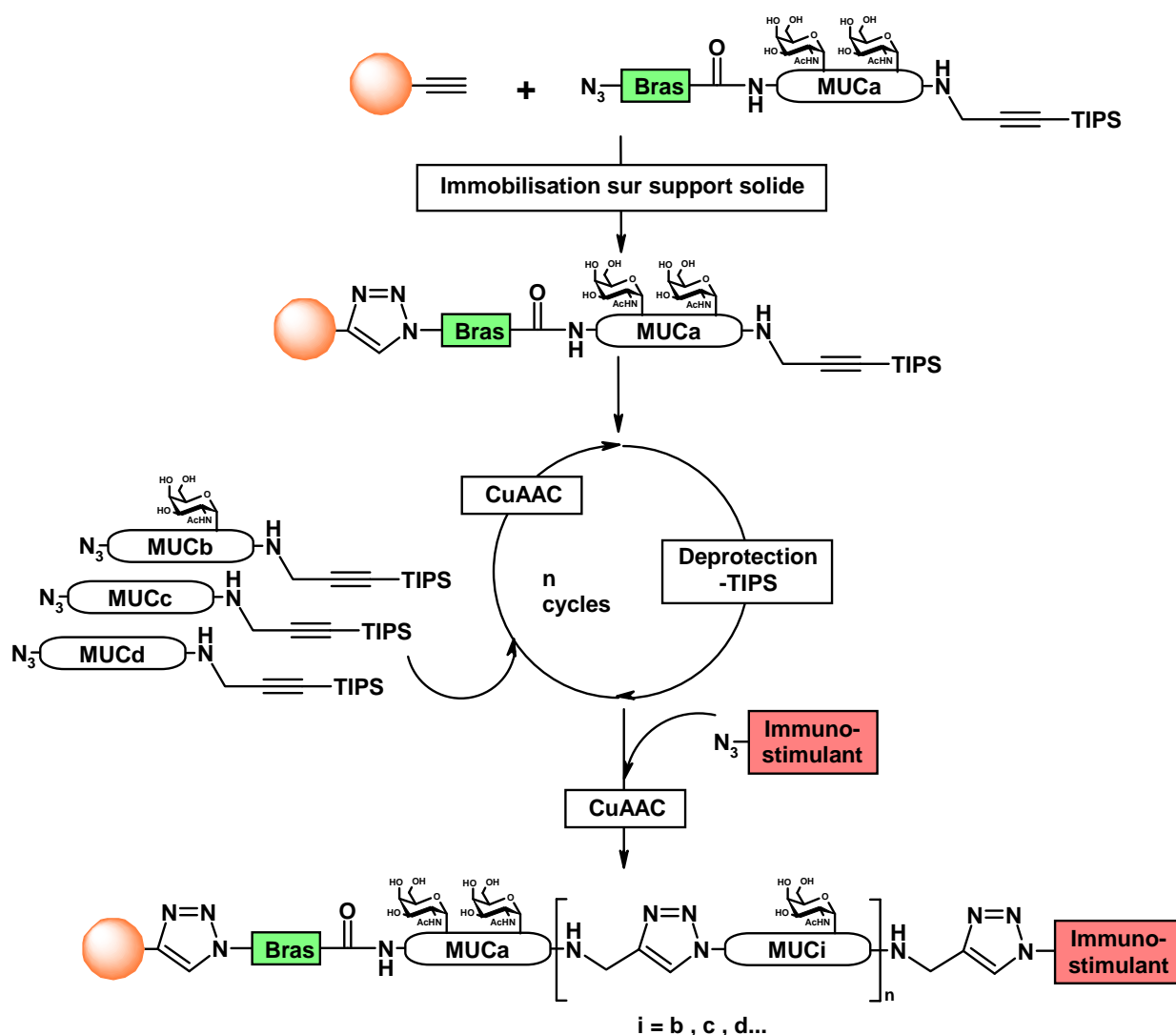


Figure 100 : Stratégie synthétique pour la préparation d'analogues immunogènes de la protéine MUC1 par multi-CuAAC successive sur support

²⁰⁷ Krambovitis, E.; Hatzidakis, G.; Barlos, K. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 10874-10879

²⁰⁸ Karsten, U.; Diotel, C.; Klich, G.; Paulsen, H.; Goletz, S.; Muller, S.; Hanisch, F. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 2541-2549

VI-4 – Synthèse d'un analogue non-glycosylé de MUC1 par multi-ligation triazole sur phase solide

VI-4.A – Synthèses de la séquence répétée non-glycosylée de MUC1

Le squelette protéique de la glycoprotéine MUC1 est une répétition de la séquence TAPPAHGVTSAPDTRPAPGS. La stratégie de multi-ligation triazole, dont nous avons montré l'efficacité dans la partie précédente, nous permet réaliser des ligations au niveau d'un résidu glycyle. Etant donné que la séquence répétée de la mucine comporte deux glycines, nous avons le choix entre deux sites de déconvolution possibles (Figure 101).

(A) STAPPAHGVTSAPDTRPAPG

(B) VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG

Figure 101 : Séquences obtenues par déconvolution aux glycines de la séquence constitutive de MUC1

Or un épitope T auxiliaire a été décrit au niveau de la séquence HGVTSAPDTRPAP,²⁰⁹ nous avons donc choisi de synthétiser nos peptides selon la séquence (A) puisqu'elle est potentiellement plus immunogène que (B).

On a également évoqué que la réponse immune est dépendante de la taille du peptide. En effet, plus le peptide est long, moins il a de chance d'être dégradé et plus la reconnaissance de l'antigène se fera de façon efficace *in vivo* par les cellules du système immunitaire.²¹⁰ De façon à atteindre des édifices peptidiques immunogènes de grande taille avec un minimum de ligations, nous avons décidé d'utiliser comme unité de base pour la construction de ces analogues de MUC1, des peptides contenant deux séquences répétées constitutives de la mucine MUC1 native (Tableau 23).

1 10 20 30
STAPPAHGVTSAPDTRPAPG STAPPAHGVTSAPDTRPAPG

Tableau 23 : Fragment de MUC1 comme unité de base pour la construction d'une pseudo-protéine mime de MUC1 non glycosylé

²⁰⁹ Vlad, A. M.; Muller, S.; Cudic, M.; Paulsen, H.; Otvos, L.; Hanisch, F.; Finn, O. J. *J. Exp. Med* **2002**, *196*, 1435-1446

²¹⁰ Bijker, M. S.; Melief, C. J.; Offringa, R.; van der Burg, S. H. *Exp. Rev. Vaccines* **2007**, *6*, 591-603

VI-4.A.a – Synthèse de **39**

Le peptide **39** (Figure 102) servira de référence dans les études d'immunogénicité de nos pseudo-peptides.



Figure 102 : Structure de **39**

La résine ChemMatrix a fourni d'excellents résultats lors de la synthèse de la synthèse de l'analogue de stéfine A **38** mais cette résine présente parfois des taux de substitution variables. Nous avons décidé d'utiliser une résine de type PEGA, utilisée en routine au sein du laboratoire.

Le peptide a été acétylé en extrémité N-terminale et l'utilisation d'un bras de type diméthoxybenzhydrylamine (dit de Rink²¹¹) permettra d'obtenir, après coupure de la résine et déprotection, un peptide avec une extrémité C-terminale sous forme d'acétamide. Des essais préliminaires de synthèse de **40** ont révélé que le couplage en conditions standard (HBTU) entre les prolines 4 et 5 et les prolines 24 et 25 est lent ou difficile. L'HATU permet d'effectuer le couplage de façon quantitative.

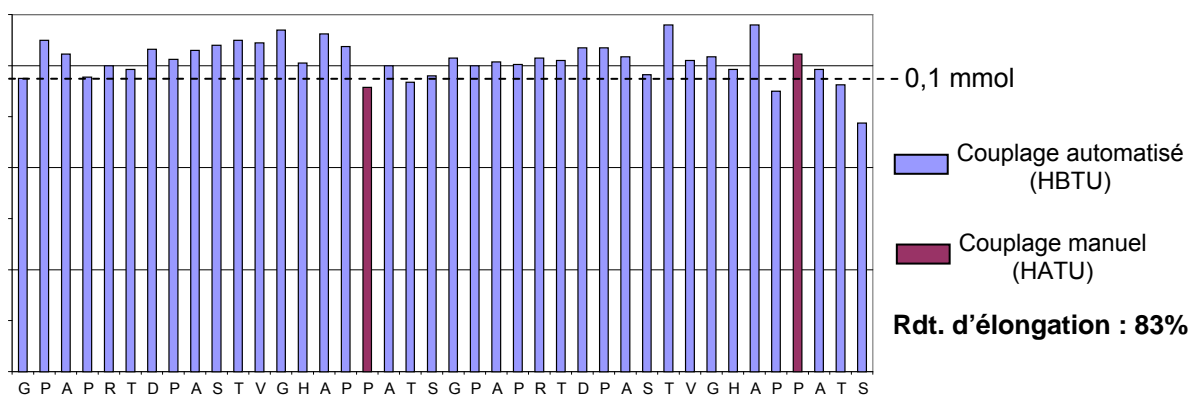


Figure 103 : Synthèse de **39** sur phase solide : suivi UV de la déprotection du N- α -Fmoc de chaque acide aminé par la pipéridine à 301 nm

La synthèse sur phase solide fournit **39** avec un rendement d'élongation d'environ 83% (Figure 103). Le traitement en conditions standard de la résine par une solution de TFA avant l'acétylation finale fournit un mélange de peptides contenant un produit très majoritaire possédant la masse attendue (Figure 104 et Tableau 24).

²¹¹ Rink, H. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 3787-3790

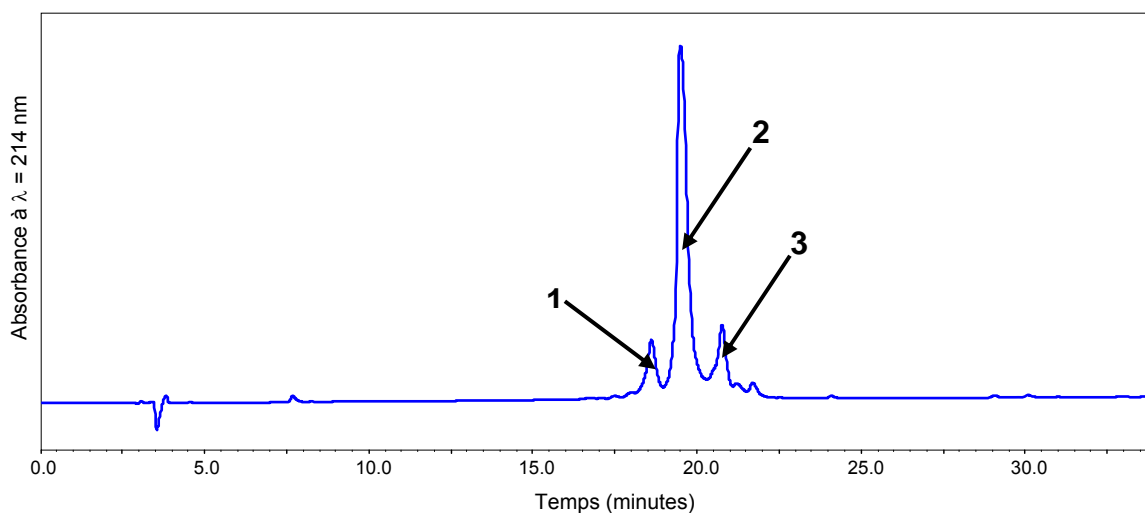


Figure 104 : Chromatogramme HPLC du mélange de peptides brut après coupure de la résine (gradient d'analyse E)

Pic	M	Séquence attribuée
1	1667,94	Ac-PPAHGVTSAPDTRPAPG-NH ₂
2	3752,84	H-STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPG-NH ₂
3	3535,73	Ac-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPG-NH ₂

Tableau 24 : Masses détectées lors de l'analyse par HPLC des produits de la synthèse de **40** et structures peptidiques associées

Comme nous pouvons le constater, le couplage en position 4, 5, 24 et 25 est difficile probablement à cause de la conformation en coude du résidu -Pro-Pro- qui rendrait difficile l'accès à l'amine secondaire.

VI-4.A.b – Synthèse en parallèle de **40** et **41**

La structure des deux peptides modifiés **40** et **41** nécessaires pour la multi-ligation triazole est présentée Figure 105.



Figure 105 : Structure des peptides utilisés pour la synthèse d'un analogue de MUC1 par multi-ligation triazole successive

40 est substitué par un résidu analogue azoturé de la sérine, il comporte également un propargylamide triisopropylsilylé en extrémité C-terminale. Il s'agit du fragment qui nous servira à réaliser « l'élongation » de notre pseudo-protéine.

41 est le fragment situé à l'extrémité N-terminale de la pseudo-protéine. Il est substitué en extrémité N-terminale par le bras N₃-Esoc et par un propargylamide triisopropylsilylé en extrémité C-terminale. Il s'agit du fragment situé en extrémité N-terminale de notre pseudo-protéine.

VI-4.A.b.1 – Synthèse de l'intermédiaire **42**

Les structures de **40** et **41** ne diffèrent que par le résidu N-terminal. Donc la même élongation a servi à synthétiser **40** et **41**. La phase commune de synthèse a conduit au peptide protégé **42** (Schéma 27) dont la synthèse a débuté par le couplage manuel de **31** sur 0,1 mmol de résine PEGA dans les conditions décrites dans la partie V-3.B.a.1.

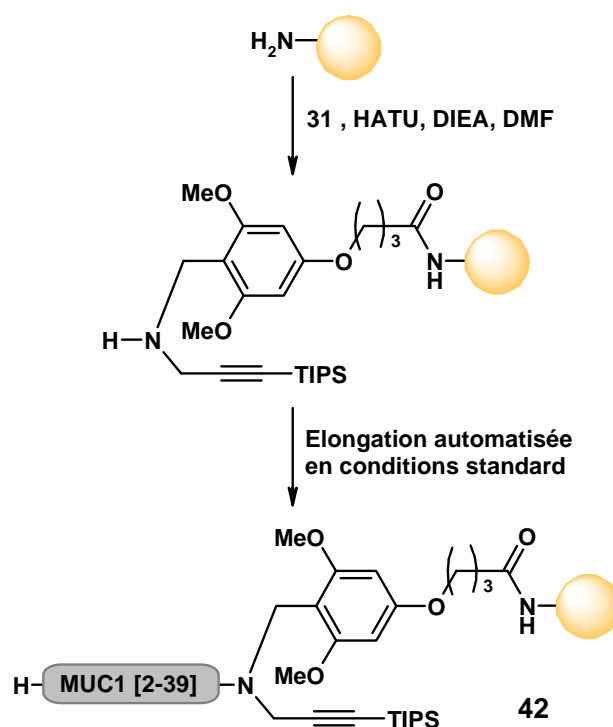
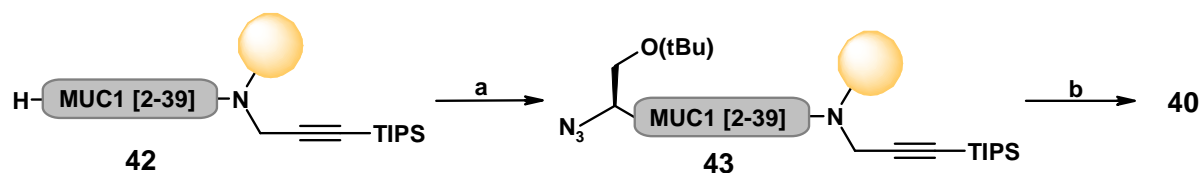


Schéma 27 : Stratégie de synthèse de l'intermédiaire de synthèse **43**

L'élongation du peptidique a été réalisée en conditions automatisées classiques sauf aux résidus prolyles 4,5, 24 et 25 qui sont introduits par double couplage automatisé. Le rendement d'élongation du peptide protégé **42** est estimé à 90%.

VI-4.A.b.2 – Synthèse de **40**

Après le couplage de **30** sur **42** à l'aide de l'HATU, le peptide protégé **43** est coupé de la résine et déprotégé par une solution de TFA pendant 2 heures pour fournir **40** (Schéma 28).



a) **30**, HATU, DIEA, DMF b) TFA/PhOH/H₂O/TIS (85:5:5:5)

Schéma 28 : Synthèse de **40** à partir de **43**

Après traitements, le mélange de peptides obtenu est analysé par HPLC et spectrométrie de masse (Figure 106, Tableau 25).

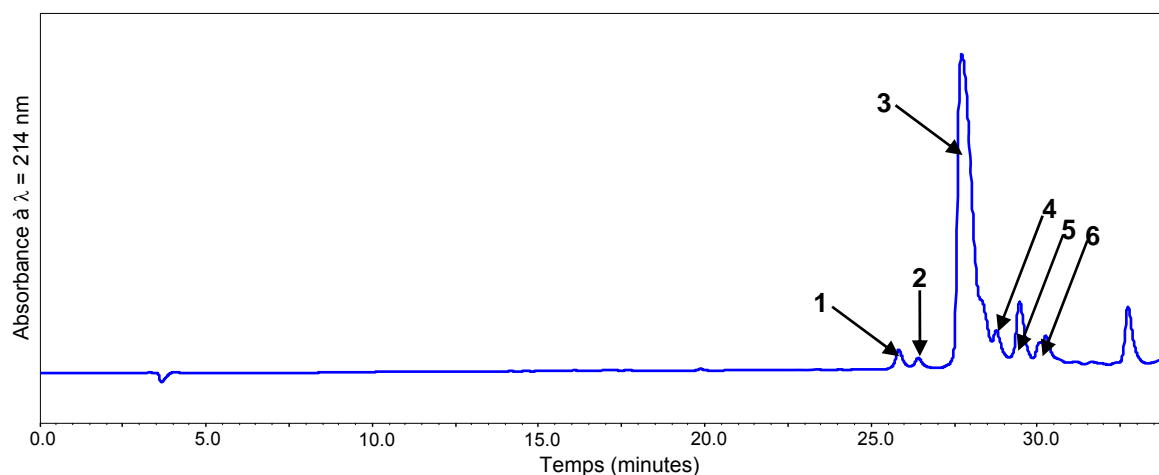


Figure 106 : Chromatogramme HPLC du mélange de peptides brut après coupure de la résine **43** (gradient d'analyse H)

Pic	M	Séquence attribuée
1	3933,92	40 + 18 Da
2	3933,85	40 + 18 Da
3	3915,91	40
4	2386,14	Ac-PGSTAPPAHGVT SAPDTRPAP-NHCH ₂ CCSi(Pr) ₃
4	2855,37	Ac-PDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAP-NHCH ₂ CCSi(Pr) ₃
4	3972,01	40 + 56 Da
5	4168,07	40 + 252 Da
6	4157,99	40 + 242 Da

Tableau 25 : Masses détectées lors de l'analyse par HPLC de **40** et structures peptidiques associées

Nous avons observé à nouveau des produits attribués à l'hydratation de l'alcyne (cf. V-3.B.a.5 p.84, masse observée = M+18, pics 1 et 2), des produits d'acétylation suite à un couplage d'acide aminé incomplet (pic 4) et finalement, des produits issus de la déprotection incomplète des chaînes latérales du peptide (le produit correspondant au pic 5 a une masse identique à **40** substitué par un groupe Pbf et celle du pic 6 correspond à **40** tritylé).

Nous en avons déduit que le temps de déprotection du peptide est insuffisant. Le profil chromatographique du mélange obtenu avec une déprotection prolongée (2h30) est différent et cohérent avec le rendement d'élongation (Figure 107).

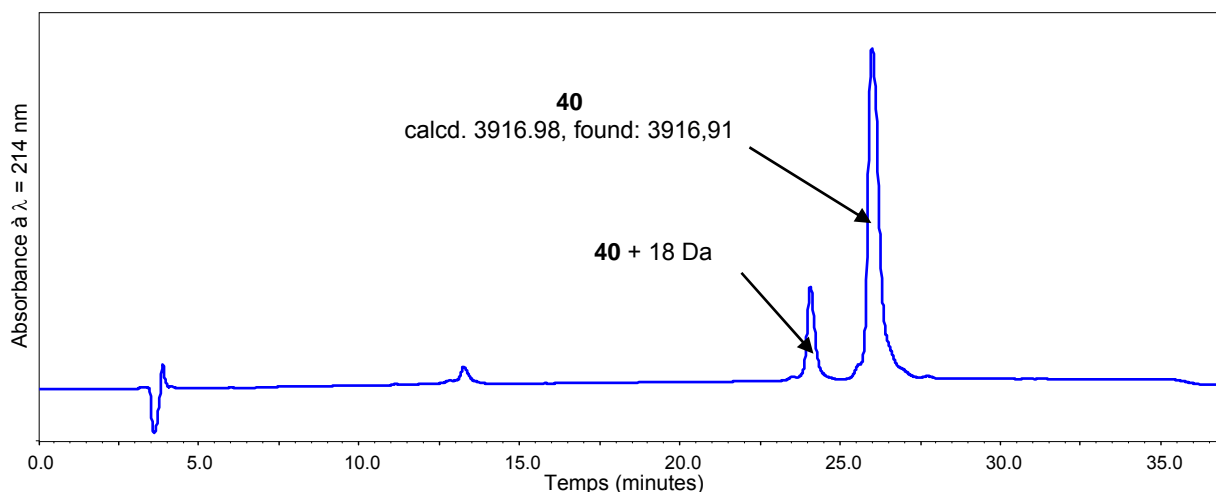
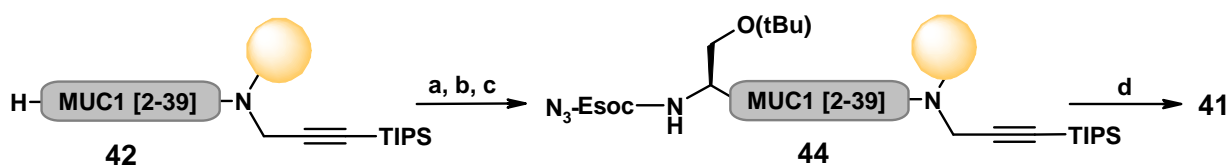


Figure 107 : Chromatogramme HPLC du mélange de peptides brut après coupure de la résine **44** (gradient d'analyse I)

Plus la déprotection est courte, moins l'alcyne est hydraté mais plus le peptide risque d'être incomplètement déprotégé et vice-versa. Il faut donc trouver un compromis entre la déprotection du peptide et l'obtention de ce qui semble être le produit d'hydratation de l'alcyne silylé. Ce produit portant un azoture en extrémité N-terminale, il est indispensable de le séparer de **40** avant de procéder à la ligation sur support.

VI-4.A.b.3 – Synthèse de **41**

Après couplage de la Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH sur **42** et déprotection du *N*- α -Fmoc, le bras N_3 -Esoc est introduit en extrémité N-terminale du peptide protégé **44**, **41** est obtenu de façon quantitative après coupure de la résine et déprotection en conditions classiques (Schéma 29).



- a) Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, HBTU/HOBt, DMF b) Pipéridine/DMF 20% c) N_3 -EsocOPnp, DIEA, DMF
d) TFA/PhOH/H₂O/TIS (85:5:5:5)

Schéma 29 : Synthèse de **41** à partir de **42**

Après traitements, le mélange de peptides obtenu est analysé par HPLC et spectrométrie de masse (Figure 108).

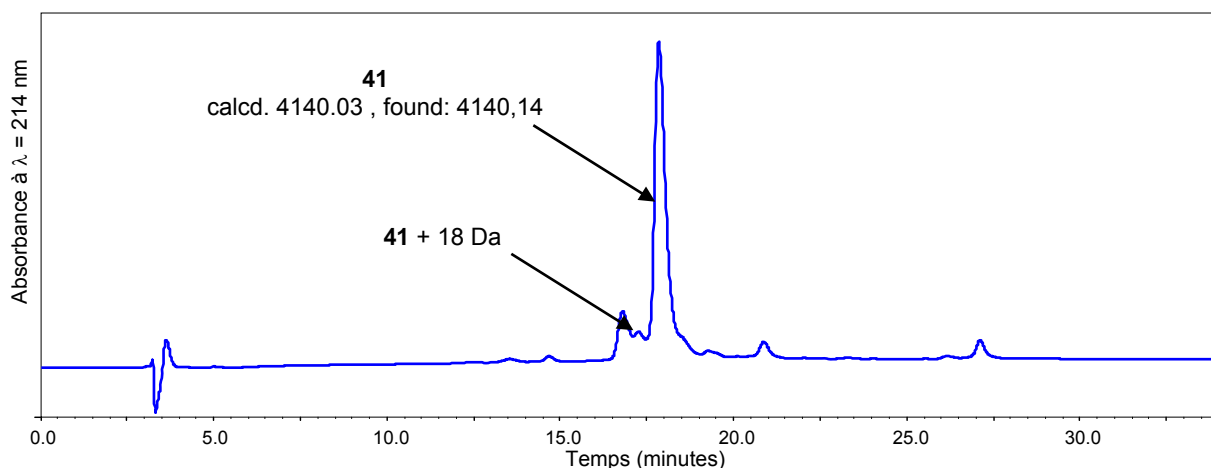


Figure 108 : Chromatogramme HPLC du mélange de peptides brut après coupure de la résine **44** (gradient d'analyse B)

De façon analogue à **40**, la déprotection de **44** s'accompagne de la formation d'un produit d'hydratation de l'alcyne. Toutefois, le mélange de peptides issu de la déprotection de **44** peut être lié au support sans purification préalable puisque la présence du co-produit ne nuira pas à l'élongation de la protéine.

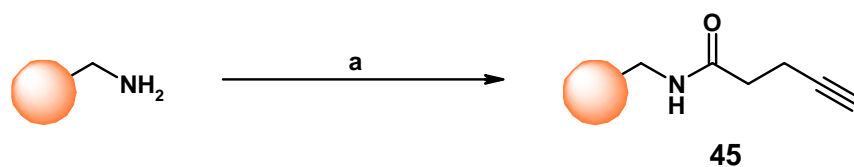
VI-4.B – Etudes préliminaires pour la multi-ligation triazole sur support solide

Notre stratégie de synthèse d'analogues de MUC1, fait appel à une méthodologie dont certains points n'ont pas encore été explorés :

- Les cycloadditions entre un azoture en solution et un alcyne immobilisé sur un support insoluble. Nous nous sommes donc intéressés à la cinétique de la réaction de cycloaddition en phase hétérogène.
- La coupure du groupe triisopropylsilyle compatible avec notre stratégie. Nous nous sommes intéressés à la compatibilité entre les conditions de coupure du groupe TIPS et le bras N₃-Esoc.
- La multi-CuAAC sur support solide et les oxydations de résidus d'acides aminés sensibles.

VI-4.B.a – Immobilisation de **41** sur phase solide par ligation triazole

Des études d'immobilisation de séquences peptidiques modèles par CuAAC ont été réalisées au préalable sur différentes résines afin de déterminer la plus adaptée à la ligation sur phase solide. La résine choisie suite à ce criblage est un polymère de type PEGA de faible substitution (0,2 g/mol) (PEGA 1800).

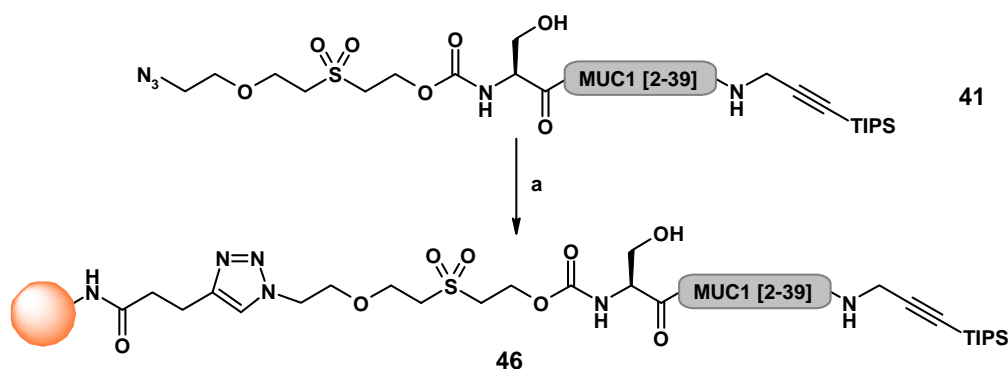


a) acide pent-4-ynoïque, HATU, DIEA, DMF, quantit.

Schéma 30 : Synthèse d'une résine fonctionnalisée par un alcyne vrai

La résine a été fonctionnalisée avec l'acide pentynoïque par acylation pour fournir la résine-alcyne **45** (Schéma 30).

De façon à comparer la CuAAC en solution et en phase solide, nous avons réalisé le couplage de **41** sur **45** dans des conditions identiques à celles décrites pour la synthèse de **38** (Schéma 31). La disparition de **41** du milieu réactionnel est facilement suivie par analyse chromatographique du surnageant de la réaction prélevé après décantation suivie (Figure 109).



a) **45** 1,5 éq., 3 éq. Cu (II), 6 éq. ascorbate de sodium, tampon HEPES 100 mM pH = 7,0 , quantit.

Schéma 31 : Immobilisation d'un peptide azoturé par ligation triazole

La réaction est complète en 3h.

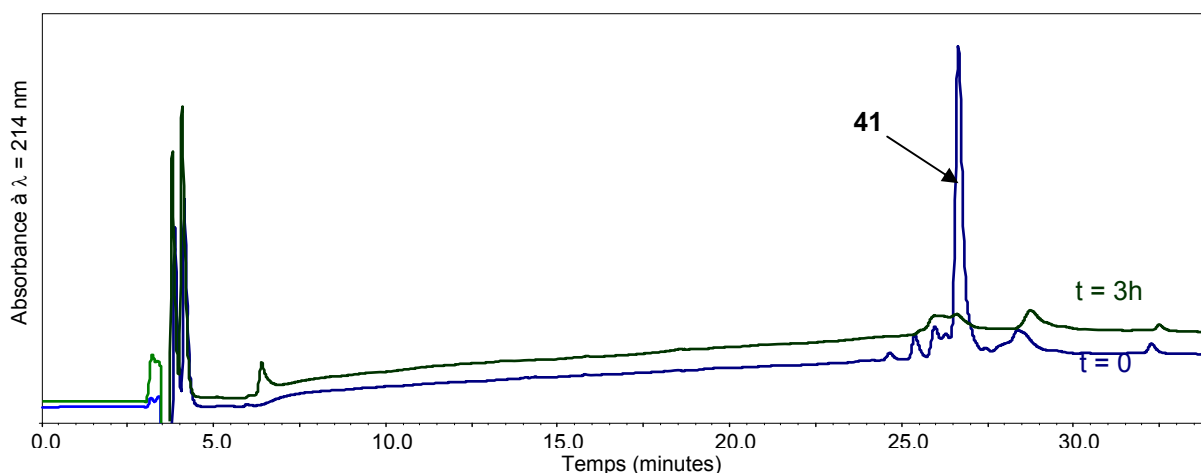


Figure 109 : Analyse chromatographique du surnageant de la réaction d'immobilisation de **41** sur **45** par CuAAC (gradient d'analyse I)

Le temps de couplage est considérablement allongé par rapport à une synthèse en solution, dont le temps de réaction ne dépassait pas les 30 minutes. Il faut toutefois tenir en compte que la réaction est réalisée en phase quasi-hétérogène, ce qui influence fortement la cinétique des réactions chimiques.

VI-4.B.b – Déprotection des alcynes sur résine

La stabilité du bras sulfonylethyle dans les conditions de coupure d'un groupe protecteur triisopropylsilyle n'est pas encore connue. Il existe deux possibilités pour déprotéger un alcyne triisopropylsilylé (Schéma 32) :

- La substitution par l'ion fluorure : Pour cela, le composé **46** est mis dans des conditions de désilylation identiques à celles utilisées pour la désilylation de **36**
- La protiodésilylation par l'ion argent (I) : Pour cela, le composé **46** est traité une solution aqueuse de nitrate d'argent.

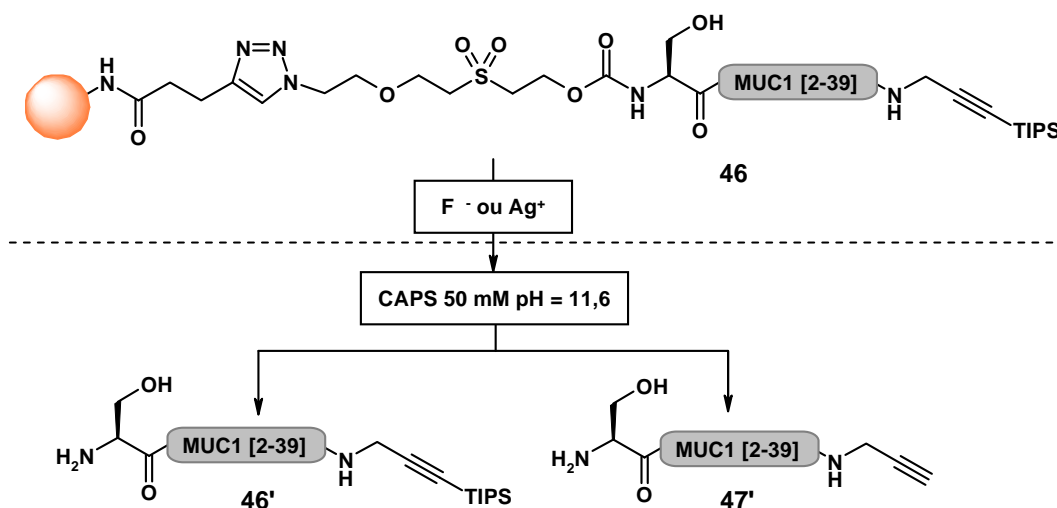


Schéma 32 : Désilylation sur phase solide de **46**

	Conditions réactionnelles	t	Déprotection de l'alcyne	Coupure de la résine
1	46 + 100 éq. TBAF DMF	30 min	0 %	100 %
2	46 + 5000 éq. TBAF + 5000 éq. AcOH, DMF	1 h	11 %	0 %
3	46 + 5000 éq. Ag ⁺ H ₂ O	30 min	86 %	0 %
		1 h	97 %	0 %

Tableau 26 : Stabilité du bras sulfonylethyle en conditions de désilylation sur phase solide

D'une part, la désilylation sur phase solide par le TBAF en conditions classiques est inutilisable puisque le peptide est coupé du support pendant la désilylation (Tableau 26 entrée 1). Ce résultat était prévisible puisque nous savons que le fluorure est basique dans ces conditions. L'addition d'acide acétique de façon à réprimer cette basicité a pour effet de ralentir la réaction de désilylation en dépit de l'utilisation d'un très large excès de fluorure (Tableau 26 entrée 2).

D'autre part, le groupe TIPS est coupé en présence d'un très large excès de sels d'argent sans décrocher le peptide de la résine (Tableau 26 entrée 3).

Nous avons donc décidé d'abandonner l'utilisation des fluorures pour la déprotection de l'alcyne au profit de la désilylation catalysée par l'argent (I).

VI-4.C – Synthèse d'un analogue de la protéine MUC1 par multi-ligation triazole

VI-4.C.a – Stratégie

Avec les deux fragments indispensables à notre ligation itérative sur phase solide et une stratégie optimisée grâce aux études préliminaires, nous avons décidé d'entreprendre la synthèse d'un analogue de MUC1 de 160 acides aminés dont la stratégie est décrite ci-dessous (Schéma 33).

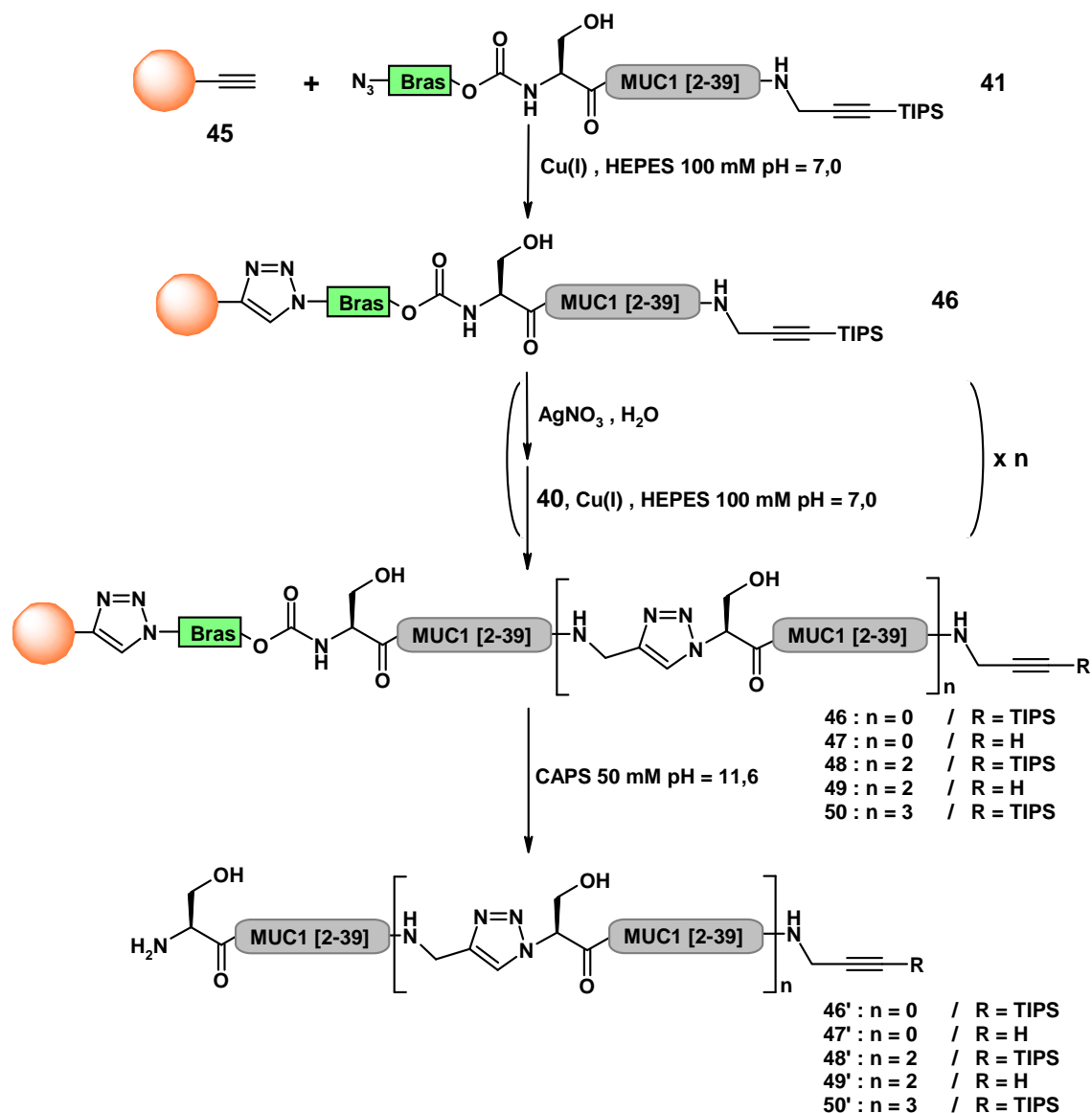


Schéma 33 : Stratégie synthétique pour la préparation d'un analogue non-glycosylé de MUC1 de 160 acides aminés

VI-4.C.b – Cycloadditions successives et oxydations métallo-catalysées

Pendant la synthèse du triazolo-peptide **36a**, les analyses par spectrométrie de masse ont révélé que des réactions d'oxydation, dépendantes de la séquence et de la conformation du peptide, avaient lieu pendant la réaction de CuAAC. Nous avons contourné la difficulté en remplaçant le résidu soufré oxydable par son isostère carboné.

Cependant, ces réactions ont été observées de nouveau sur les séquences dérivées des mucines non glycosylées lors des premières expériences de CuAAC successive menées dans des conditions identiques à celles qui ont servi à la synthèse de **38** (cf. partie V-3.C.c, p.97) comme en témoignent les analyses par spectrométrie de masse ci-dessous (Figure 110).

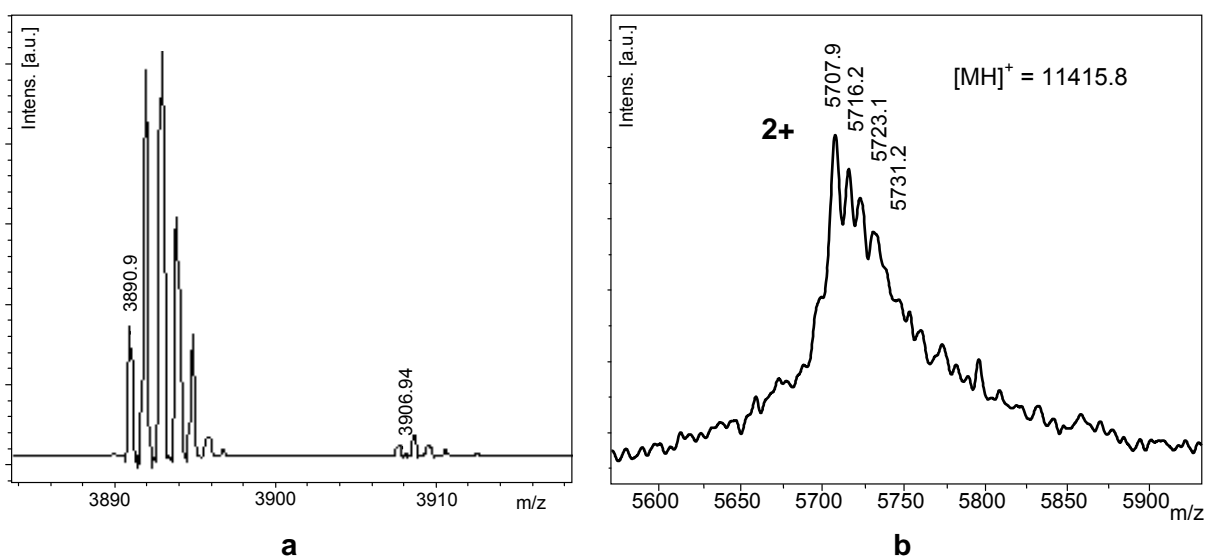


Figure 110 : Effet des cycloadditions métallo-catalysées sur une séquence de MUC1 dans les conditions de CuAAC utilisées dans la partie V. (a) spectre de masse (MALDI-TOF) de **46'** (b) spectre de masse (MALDI-TOF) de **49'**

Dans les conditions de CuAAC utilisées précédemment, nous distinguons clairement l'oxydation du peptide sur la résine dès la première étape de cycloaddition (Figure 110 a). Après trois cycles de couplage, le peptide en croissance présente jusqu'à quatre oxydations (Figure 110 b).

Nous avons évoqué dans la partie III-2.D.b l'effet néfaste du Cu(I) sur l'oxydation de certaines chaînes latérales d'acides aminés. L'addition de ligands du cuivre (II) dans le milieu réactionnel (qui empêchent l'association du cuivre (II) et la protéine) a un effet protecteur vis-à-vis de l'oxydation. L'une des premières possibilités pour protéger les protéines de l'oxydation métallo-catalysée est donc l'utilisation de ligands du cuivre (I), de façon à stabiliser le cuivre (I) pour catalyser la cycloaddition tout en empêchant la fixation spécifique de l'ion métallique par la protéine,²¹² surtout lorsque de larges excès de cuivre sont utilisés. Des essais préliminaires menés au laboratoire nous ont fait pencher pour l'utilisation de ligands de type polytriazole (Figure 111). Cette catégorie de ligands, dont le membre le plus connu est le TBTA,⁸⁹ est sans doute la plus populaire, en raison de leur synthèse aisée, la possibilité de personnalisation et leur efficacité.

²¹² Uchida, K.; Kawakishi, S. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, 52, 1529-1535

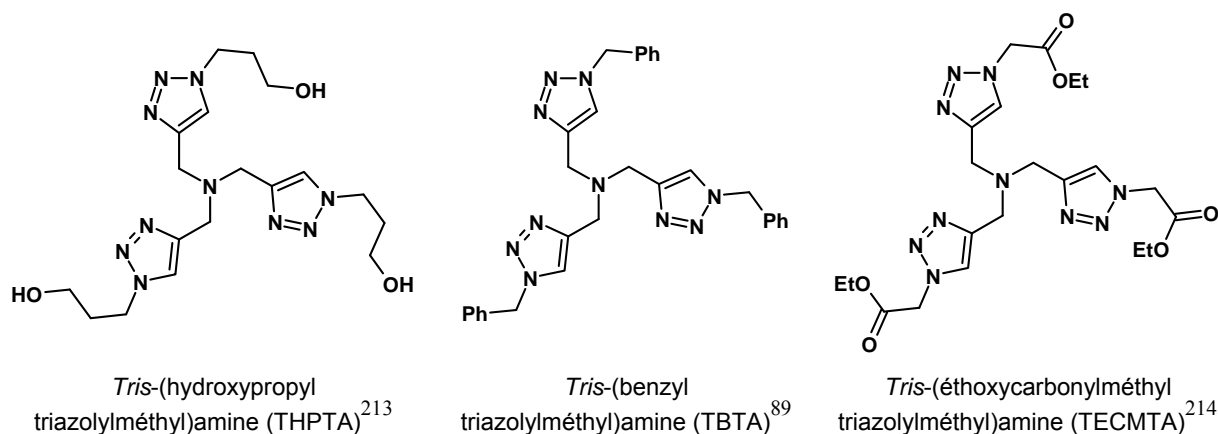


Figure 111 : Ligands de type tris-triazole utilisés en milieu aqueux

Le TBTA commercial est très peu soluble dans nos conditions réactionnelles, ce qui le rend inutilisable. Le THPTA a été synthétisé au sein du laboratoire conformément aux méthodes décrites dans la littérature, et est hautement hydrosoluble.

De plus, il nous a semblé judicieux d'ajouter des pièges de radicaux dans le milieu réactionnel de façon à assurer une protection optimale vis-à-vis des radicaux hydroxyles. Le *tert*-butanol²¹⁵ et l'aminoguanidine²¹⁶ ont été utilisés avec succès comme leurres des espèces réactives de l'oxygène en conditions de CuAAC. Cet effet protecteur a été confirmé par des essais préliminaires conduits au laboratoire et nous avons décidé de changer les conditions de CuAAC initiales. La durée des couplages a été fixée à une heure en présence d'un excès de THPTA et de pièges à radicaux (aminoguanidine et *tert*-butanol) par rapport au cuivre (I). La pertinence dans le choix de ces conditions réactionnelles et des additifs a été confirmée plus tard.²¹⁷

VI-4.C.c – Synthèse d'un analogue de la protéine MUC1 par triple ligation triazole

Le couplage de **41** sur **45** est réalisé de façon quantitative en présence de THPTA et pièges de radicaux. Une fois le couplage fini, le surnageant est récupéré par filtration et la résine est lavée abondamment avec des solutions contenant des agents de chélation des métaux comme l'EDTA afin d'éliminer toute trace de cuivre de la résine. Le produit de ce couplage, **46**, a été

²¹³ Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855

²¹⁴ Zhou, Z.; Fahrni, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8862-8863

²¹⁵ Gierlich, J.; Burley, G. A.; Gramlich, P. M. E.; Hammond, D. M.; Carell, T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642

²¹⁶ a) Giardino, I.; Fard, A. K.; Hatchell, D. L.; Brownlee, M. *Diabetes* **1998**, *47*, 1114-1120 b) Finn, M.G.

Communication personnelle

²¹⁷ Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879-9883

désilylé quantitativement par ajout d'une solution concentrée de nitrate d'argent pour fournir **47** (Figure 112).

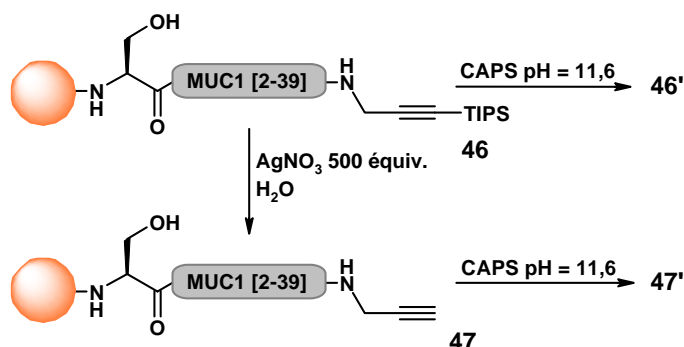


Figure 112 : Contrôle des réactions réalisées sur résine

Une petite portion de résine est prélevée à la fin de chacune de ces deux étapes. Après traitement par un tampon basique, les filtrats contenant les peptides sont analysés par HPLC (Figure 113).

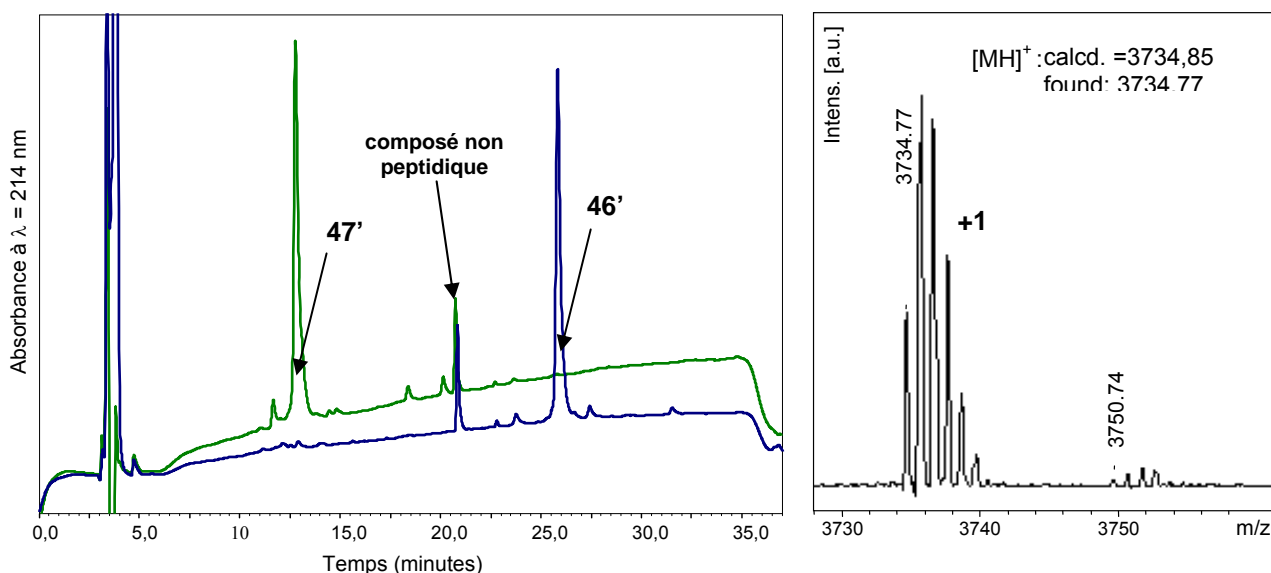


Figure 113 : Analyses chromatographiques du peptide accroché à la résine et spectre de masse (MALDI-TOF) de **47'** (gradient d'analyse I)

On remarque dès maintenant que l'utilisation du ligand et l'ajout de pièges de radicaux ne suffisent pas pour supprimer définitivement les oxydations (Figures 114 et 115). Toutefois nous avons décidé de continuer la synthèse de façon à pouvoir tester l'efficacité de la stratégie et de notre nouveau protocole.

Le cycle de couplage et déprotection décrit précédemment est répété trois fois jusqu'à obtenir un analogue *tris*-triazole de la protéine MUC1 de 160 acides aminés **50**. Les étapes de couplage et désilylation sont répétées si nécessaire, le suivi des réactions se faisant par coupure du peptide d'une petite portion de la résine après une étape de lavage.

Le produit **50'** a été analysé par chromatographie et spectrométrie de masse (Figure 114).

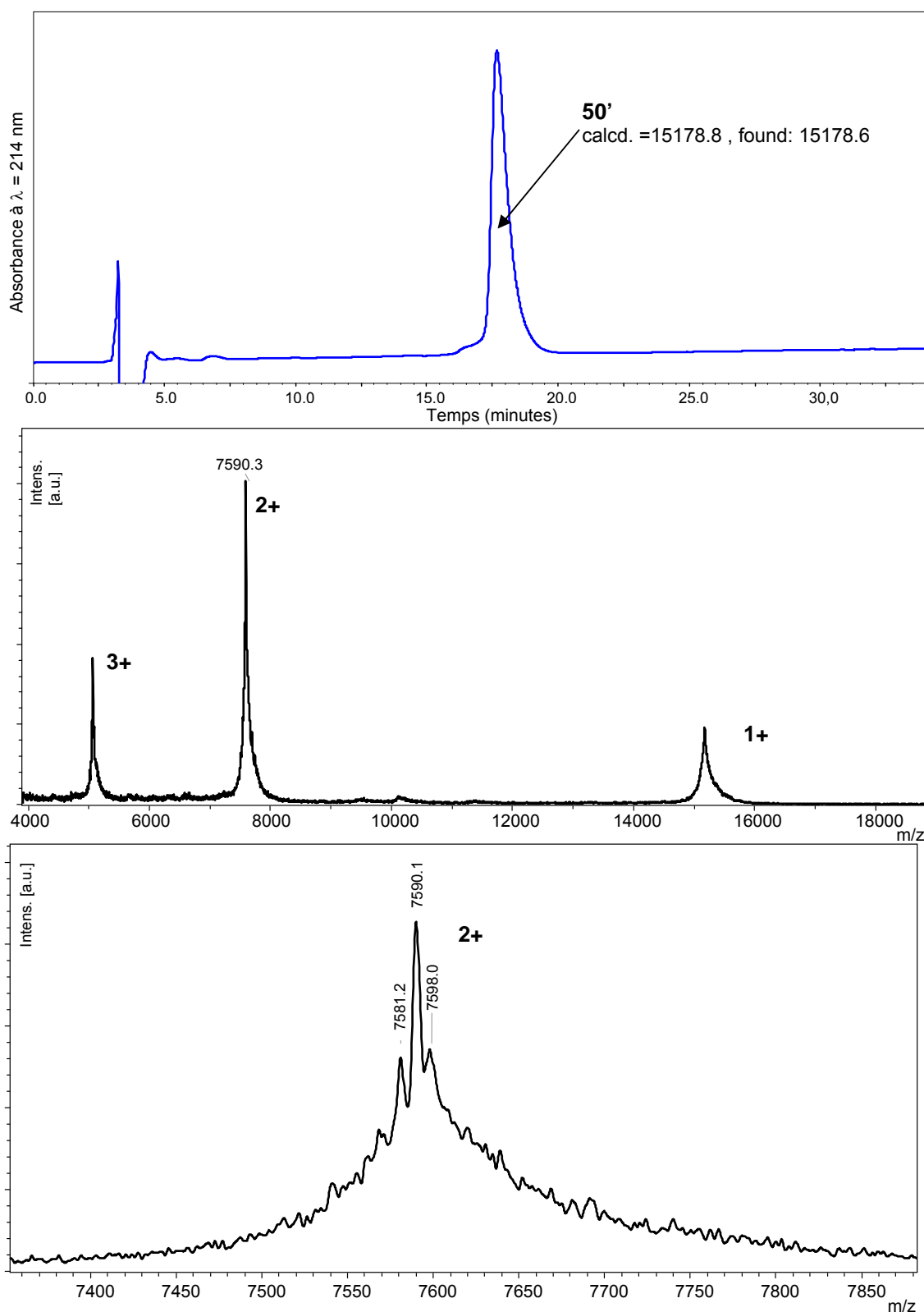


Figure 114 : Chromatogramme HPLC (gradient J) et spectres de masse (MALDI-TOF) du produit final **50'**

VI-4.C.d – Bilan

Nous avons synthétisé avec succès un analogue de la protéine MUC1 de 160 acides aminés par triple ligation triazole. Les conditions réactionnelles ayant servi à la synthèse d'un analogue de la stéfine A ont été optimisées de façon à minimiser les réactions d'oxydation métallo-catalysées. Les avantages de cette méthode sont la simplicité et la rapidité de la mise en œuvre des réactions puisque les réactifs en excès (comme le cuivre ou le partenaire de ligation) sont enlevés par simple filtration (évitant ainsi 7 purifications intermédiaires).

Toutefois, certaines difficultés subsistent, puisque même si les réactions d'oxydation ont été diminuées de façon significative, il est évident qu'elles continuent d'avoir lieu malgré nos efforts. Ceci met en évidence que notre protocole de couplage par CuAAC doit encore subir des améliorations. L'aspect le plus important de cette optimisation est de trouver un temps de couplage faible et une concentration en Cu(I) en solution la plus basse possible. Ce compromis peut être atteint par changement de la source de cuivre, l'utilisation de meilleurs ligands du cuivre (I), de meilleurs pièges de radicaux et de meilleurs protocoles d'élimination de l'oxygène dissous.^{217,218}

VI-5 – Vers la synthèse d'un analogue glycosylé de MUC1 par multi-ligation triazole sur phase solide

VI-5.A – Synthèse d'acides aminés glycosylés

Pour synthétiser un analogue glycosylé de **50** par multi-ligation triazole, il est nécessaire d'avoir des analogues glycosylés de **40** et **41**. Il existe plusieurs façons d'introduire le résidu glycosidique, la première consiste à conjuguer le motif saccharidique avec le peptide,²¹⁹ tandis que la deuxième consiste à introduire un acide aminé glycosylé lors de l'assemblage de du peptide par SPPS.²²⁰ Dans notre cas, nous souhaitons pouvoir observer la réponse immunitaire en fonction des profils de glycosylation de MUC1. Afin de limiter notre tâche, nous introduirons uniquement des antigènes Tn (Figure 115) sous la forme du dérivé thréonylé, de façon à n'avoir que 3 sites de glycosylation possibles par séquence répétée en tandem de MUC1.

²¹⁸ Özçubukçu, S.; Ozkal, E.; Jimeno, C.; Pericàs, M. A. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4680-4683

²¹⁹ Cohen-Anisfeld, S. T.; Lansbury, P. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10531-10537

²²⁰ Arsequell, G.; Valencia, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2839-2876



2-acétamido-2-déoxy- α -D-galactopyranoside de sérinyle 2-acétamido-2-déoxy- α -D-galactopyranoside de thréonyle

Figure 115 : Structure de l'antigène Tn

VI-5.A.a – Généralités sur le couplage glycosidique, activation et stéréosélectivité

Un couplage *O*-glycosidique est la formation d'une liaison de type acétalique de manière régio- et stéréocontrôlée entre deux partenaires ; l'un est dit « donneur de glycosyle », il s'agit d'un saccharide dont la position anomérique est substituée par un groupement partant ou activant qui fournira, en présence d'un promoteur, un cation oxycarbénium susceptible de subir une attaque nucléophile de la part de l'autre partenaire, dit « accepteur de glycosyle ». Autant que possible, il faudra que l'addition se fasse avec une stéréosélectivité optimale de façon à obtenir le diastéréoisomère désiré dans les meilleurs rendements (Figure 116).

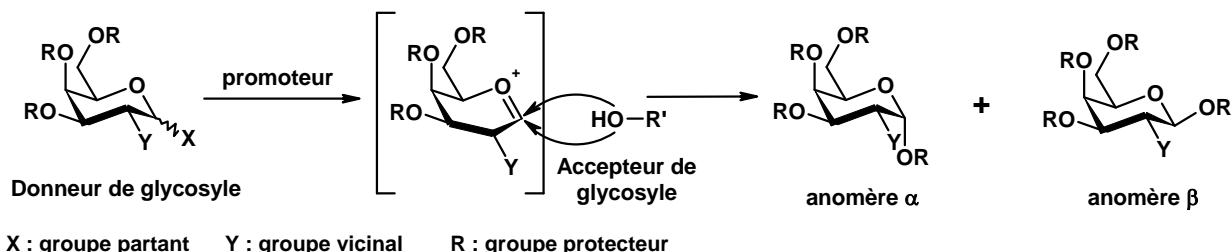


Figure 116 : Principe général de la glycosylation par voie chimique

La stéréosélectivité de l'addition peut être contrôlée par divers facteurs comme la présence d'un groupe protecteur participant en position vicinale, la nature du promoteur, la température, la nature du solvant ou la présence d'un groupe protecteur induisant une rigidité de cycle.

Les groupes protecteurs participants en position vicinale favorisent l'addition en 1,2-*trans* (Figure 117). Ainsi, lorsque le substituant en position 2 est protégé par un groupe à effet participant (acétyle, benzoyle...), en série glucose ou galactose, le produit majoritaire de glycosylation est l'anomère β alors qu'en série mannose, le produit majoritaire de glycosylation sera l'anomère α .

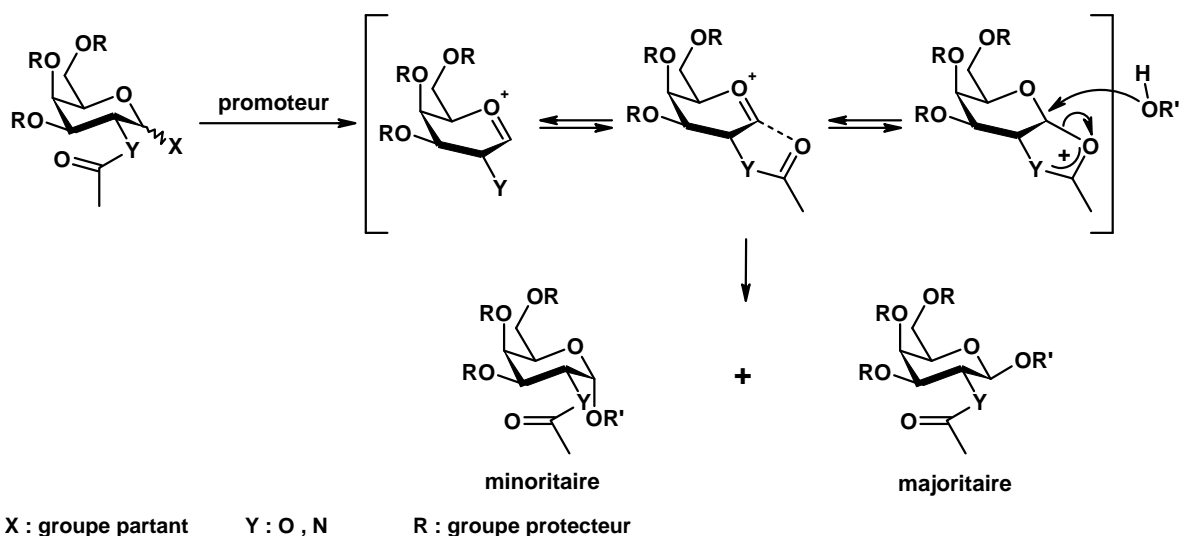


Figure 117 : Effet de groupe participant sur la diastéréosélectivité de la réaction de glycosylation

Si le groupe vicinal **Y** n'est pas participant, la formation de l'anomère α est favorisée puisque c'est le produit thermodynamique de la réaction. Cette plus grande stabilité de l'anomère axial découle de l'effet anomère. Cet effet s'explique par l'interaction des orbitales non liantes de l'oxygène intra-cyclique et de l'orbitale anti-liante σ^* de la liaison entre le carbone anomérique et l'accepteur de glycosyle. Lorsque le substituant est en position axiale, l'interaction entre ces orbitales est maximale, et la conformation est donc plus stable. L'effet anomère influence donc le rapport α/β en faveur de la forme axiale lors des *O*- et *S*-glycosylations ainsi que pour la formation d'halogénures de glycosyle.

L'une des premières étapes quand on réalise des glycosylations est donc le choix du groupe protecteur de l'hydroxyle en position 2 en fonction de la configuration de l'anomère qu'on souhaite obtenir. Dans notre cas, il faut protéger l'amine en position 2 de la galactosamine par un groupe protecteur non participant. Paulsen *et al.* ont donné accès aux α -glycosylamines en proposant l'azoture pour la protection temporaire de l'amine.²²¹

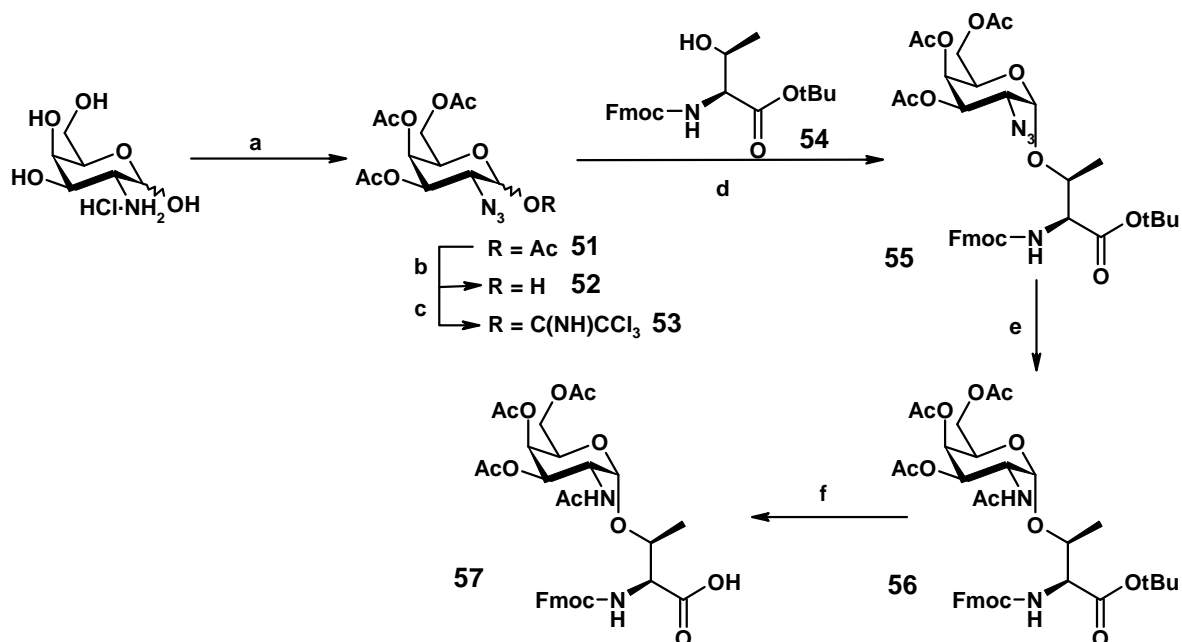
Une autre étape particulièrement importante est le choix du couple groupe partant/promoteur qui sert à activer la position anomérique. Parmi la multitude de choix, la recherche dans le domaine de la synthèse des glycopeptides a déjà fourni d'excellentes bases de travail qui ont orienté notre choix vers des donneurs de type trichloroacétimide en raison de leur facilité de préparation, leur stabilité et l'efficacité du couplage.²²²

²²¹ Paulsen, H.; Kolár, C.; Stenzel, W. *Chem. Ber.* **1978**, *111*, 2358-2369

²²² Cudic, M.; Burstein, G. D. Dans *Peptide-Based Drug Design*; Methods in Molecular Biology; Humana Press, 2008; Vol. 494, p. 187-208

VI-5.A.b – Synthèse d'un acide aminé glycosylé pour utilisation en SPPS

Grâce à nos acquis et une étude de la littérature, nous avons pu concevoir notre stratégie de synthèse (Schéma 34).^{223,224,225}



a) 1) ImSO_2N_3 , MeOH 2) Ac_2O , Pyridine, 71% sur 2 étapes b) $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{AcOH}$, DMF, 99% c) Cl_3CCN , K_2CO_3 , CH_2Cl_2 , 94% d) TMSOTf, 4 Å MS, CH_2Cl_2 , (α/β) : 6/4, 42% e) 1) Zn, AcOH 2) Ac_2O , Pyridine, 88% sur deux étapes f) TFA, CH_2Cl_2 , 94%

Schéma 34 : Voie de synthèse de 57

La synthèse débute par une réaction de transfert de diazo suivie d'acétylation sur le chlorhydrate de galactosamine commercial qui fournit **51**. Après déacétylation anomérique par l'acétate d'hydrazine, la réaction de l'hémi-acétal **52** avec le trichloroacétonitrile en présence du carbonate de potassium permet d'obtenir le donneur de glycosyle **53** avec un rendement de 66% sur 4 étapes en partant de la galactosamine. La réaction de glycosylation entre **53** et **54**²²⁶ s'est effectuée en présence de triflate de triméthylsilyle de façon quasi-quantitative avec un rapport α/β de 6 :4. Les tentatives d'améliorer la diastéréosélectivité de l'addition par contrôle de la température ou l'addition d'un solvant à effet participatif comme l'éther se sont avérées sans résultat et **55** a été obtenu avec un rendement de 42%.

L'étape de réduction et acétylation de l'azoture a fait l'objet d'une optimisation. Parmi les possibilités qui s'offraient à nous, on compte l'utilisation d'acide thioacétique,^{227,228,229} de

²²³ Xu, R.; Hanson, S. R.; Zhang, Z.; Yang, Y.; Schultz, P. G.; Wong, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15654-15655

²²⁴ Koeller, K. M.; Smith, M. E. B.; Wong, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1017-1025

²²⁵ Paulsen, H.; Adermann, K. *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *1989*, 751-769

²²⁶ Kunz, H. Dans *Preparative Carbohydrate Chemistry*; Hanessian, S., 1997; p. 265-281

²²⁷ Rakotomanomana, N.; Lacombe, J.; Pavia, A. A. *Carbohydr. Res.* **1990**, *197*, 318-323

réduction par le zinc²³⁰ ou réaction de Staudinger avec une phosphine.^{151,231} La réduction par l'acide thioacétique nécessite l'usage de grandes quantités de ce solvant particulièrement nauséabond. La réduction de l'azoture par les trialkylphosphines est accompagnée de la formation de l'oxyde correspondant qui peut s'avérer difficile à séparer de notre produit d'acétylation. Finalement, les résultats de la réduction et acétylation en *one-pot* décrits dans la littérature n'ont pas pu être reproduits entre nos mains dans des rendements satisfaisants. Toutefois, Seitz et Wong ont proposé un protocole analogue, réalisé en deux temps,²³² qui fournit l'ester de *tert*-butyle **56** avec un bon rendement. La déprotection finale de l'ester fournit le précurseur de l'épitope Tn **57** à l'échelle du gramme prêt à être utilisé en SPPS. Malheureusement, les acides aminés glycosylés n'ont pas pu être utilisés dans la synthèse d'un glycopeptide par manque de temps.

²²⁸ Rosen, T.; Lico, I. M.; Chu, D. T. W. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1580-1582

²²⁹ Kolakowski, R. V.; Shangguan, N.; Sauer, R. R.; Williams, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5695-5702

²³⁰ Meinjohanns, E.; Meldal, M.; Schleyer, A.; Paulsen, H.; Bock, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 985-993

²³¹ Lucas, R.; Hamza, D.; Lubineau, A.; Bonnaffé, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2107-2117

²³² Seitz, O.; Wong, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8766-8776

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La synthèse de protéines par voie chimique est une remarquable méthode alternative à la production par voie recombinante. Elle permet d'introduire avec une précision atomique des acides aminés non naturels, des outils pour la caractérisation spectroscopique, des modifications post-traductionnelles... Toutefois, les méthodes traditionnelles de synthèse de protéines par voie chimique sont généralement limitées. La synthèse de protéines sur phase solide et la condensation de fragments peptidiques protégés sont restreintes principalement pour des raisons d'ordre technique qui limitent considérablement leur applicabilité pour la synthèse totale de protéines. Ces quinze dernières années, de nouvelles approches de ligation chimique, consistant à condenser des peptides complètement déprotégés obtenus par SPPS en milieu aqueux, ont été développées. Toutefois, très peu de ces méthodes peuvent être exécutées de façon successive, afin d'obtenir des édifices protéiques dépassant la centaine d'aminés.

La cycloaddition entre les alcynes terminaux et les azotures catalysée par le cuivre (CuAAC) possède toutes les caractéristiques d'une excellente méthode de ligation, chimiosélectivité et régiosélectivité, mais n'a jamais été utilisée en tant que telle. De plus, l'hétérocycle résultant de la cycloaddition est robuste, non-hydrolysable et est considéré comme un excellent mime de la liaison amide. Dans ce contexte, l'objectif du travail qui a été présenté était d'exploiter les avantages exceptionnels de la CuAAC pour la mise au point d'une nouvelle méthode de ligation successive et pseudo-native pour la synthèse de mimes de protéines.

Une étude de la stabilité de différents groupes silylés couramment utilisés pour la protection des alcynes terminaux nous a permis d'identifier le triisopropylsilyle comme un groupe protecteur adéquat pour réaliser une ligation successive de peptides, stable aux conditions de SPPS et déprotégé en conditions douces. L'étude approfondie des conditions de déprotection des différents alcynes a mis évidence une sélectivité dans la coupure en conditions douces du groupe triéthylsilyle par rapport au groupe triisopropylsilyle. Ce résultat a été valorisé en permettant la mise au point d'un protocole de triple cycloaddition robuste, fiable et applicable à un très grand nombre de substrats.

Cette méthodologie de CuAAC successive basée sur la protection temporaire d'un alcyne a ensuite été extrapolée avec succès à la synthèse du *bis*-triazolo analogue de protéine, la stéfine A humaine. Pour cela, nous avons d'abord mis au point des stratégies pour introduire les partenaires réactionnels, azotures et alcynes, en extrémité N- et C-terminale respectivement de

façon à ce le cycle 1,2,3-triazole mime parfaitement une liaison peptidique. La stéfine A humaine a été déconvoluée au niveau de deux résidus glycylyle et les fragments peptidiques obtenus ont été synthétisés par SPPS en y incorporant les partenaires de ligation aux extrémités adéquates. Nous avons adapté avec succès la réaction de CuAAC, principalement utilisée en milieu organique, à la ligation de peptides non protégés pour réaliser la synthèse d'une *bis*-triazoloprotéine analogue de la stéfine A humaine. Les analyses de structure secondaire et d'évaluation de son activité biologique après repliement mettent en évidence que notre inhibiteur retient la structure, la stabilité et l'activité biologique que la stéfine A native.

Afin d'améliorer les performances de notre méthode de ligation nous avons mis au point des ligations triazoles successives sur support solide, une approche qui permet d'économiser plusieurs étapes de purification, inévitables, longues et fastidieuses lorsque la ligation est réalisée en solution. Une stratégie récemment développée au laboratoire permettant d'immobiliser des peptides issus de la SPPS par leur extrémité N-terminale a été appliquée à la ligation successive de peptides et de nouvelles conditions de CuAAC plus douces ont été utilisées lors de la synthèse d'un analogue non-glycosylé de la glycoprotéine MUC1 dépassant les 15 kDa par quadruple ligation triazole et une seule étape de purification. La synthèse d'analogues glycosylés de MUC1 n'a pas pu être réalisée par manque de temps mais les acides aminés glycosylés indispensables à leur synthèse sont disponibles au laboratoire.

Bien au-delà de simplifier la synthèse de protéines de grande taille, la synthèse de mimes de protéines sur phase solide par multi-ligation triazole permet de réaliser l'assemblage de chimères glycoprotéiques de façon modulaire. Cette stratégie de synthèse faciliterait énormément l'élaboration de chimiothèques de MUC1, qui permettraient d'établir des relations de structure-immunogénicité claires selon la longueur du pseudo-peptide, les immunostimulants et des profils de glycosylation utilisés. Ce projet est couramment poursuivi au laboratoire par un élève ingénieur.

Concernant la synthèse d'analogues de protéines sur support solide, le problème lié aux oxydations des résidus sensibles n'a pas été entièrement résolu faute de temps, ceci est indispensable pour exploiter la technique serait de trouver des conditions réactionnelles de CuAAC non oxydantes. Ce point fait, en ce moment, l'objet de recherches par un chercheur postdoctoral.

De plus, la stratégie utilisée actuellement exploite un bras baso-labile. Nous pourrions envisager la mise au point de bras pour la ligation sur phase solide qui puissent être coupés

dans des conditions universellement compatibles avec les peptides, par exemple acido- et photo-labiles. Ce projet est couramment poursuivi au laboratoire par un élève ingénieur.

En plus de fournir un accès rapide et simplifié à des protéines faites sur mesure, l'introduction de triazoles, qui sont de bons mimes non hydrolysables de liaisons peptidiques, dans une structure protéique peut s'avérer un atout non négligeable, particulièrement vis-à-vis des protéases, lors des études *in vivo*. Il serait donc particulièrement intéressant de mettre au point des méthodes de synthèse de propargylamines chirales silylées de façon à augmenter le nombre de résidus pouvant être mimés.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Human Genome Sequencing Consortium International Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **2004**, *431*, 931-945.
- (2) European Bioinformatics Institute IPI Statistics. *International Protein Index v.10/12/2010*.
- (3) Boeckmann, B.; Blatter, M.; Famiglietti, L.; Hinz, U.; Lane, L.; Roechert, B.; Bairoch, A. Protein variety and functional diversity: Swiss-Prot annotation in its biological context. *C. R. Biol* **2005**, *328*, 882-899.
- (4) Link, A. J.; Mock, M. L.; Tirrell, D. A. Non-canonical amino acids in protein engineering. *Curr. Opin. Biotech.* **2003**, *14*, 603-609.
- (5) Neumann, H.; Wang, K.; Davis, L.; Garcia-Alai, M.; Chin, J. W. Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome. *Nature* **2010**, *464*, 441-444.
- (6) Kiick, K. L.; Hest, J. C. M. V.; Tirrell, D. A. Expanding the Scope of Protein Biosynthesis by Altering the Methionyl-tRNA Synthetase Activity of a Bacterial Expression Host. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2148-2152.
- (7) Link, A. J.; Vink, M. K. S.; Tirrell, D. A. Presentation and Detection of Azide Functionality in Bacterial Cell Surface Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10598-10602.
- (8) Wang, L.; Xie, J.; Schultz, P. G. Expanding the genetic code. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 225-249.
- (9) Dougherty, D. A. Unnatural amino acids as probes of protein structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 645-652.
- (10) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- (11) Kent, S. B. H. Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957-989.
- (12) Hudson, D. Matrix Assisted Synthetic Transformations: A Mosaic of Diverse Contributions. I. The Pattern Emerges. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 333-360.
- (13) Hudson, D. Matrix Assisted Synthetic Transformations: A Mosaic of Diverse Contributions. II. The Pattern Is Completed. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 403-457.
- (14) Valeur, E.; Bradley, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631.
- (15) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455-2504.
- (16) Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. Linkers and Cleavage Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis and Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2158.
- (17) Albericio, F. Developments in peptide and amide synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 211-221.
- (18) Nishiuchi, Y.; Inui, T.; Nishio, H.; Bódi, J.; Kimura, T.; Tsuji, F. I.; Sakakibara, S. Chemical synthesis of the precursor molecule of the Aequorea green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13549-13554.
- (19) Bray, B. L. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 587-593.
- (20) Blake, J.; Li, C. H. New segment-coupling method for peptide synthesis in aqueous solution: application to synthesis of human [Gly17]- β -endorphin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4055-4058.

- (21) Blake, J.; Li, C. H. Total synthesis of human β -lipotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 1556-1559.
- (22) Hojo, H.; Aimoto, S. Polypeptide synthesis using the S-alkyl thioester of a partially protected peptide segment. Synthesis of the DNA-binding domain of c-Myb protein(142-193)-NH₂. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 111-117.
- (23) Payne, R. J.; Ficht, S.; Greenberg, W. A.; Wong, C. Cysteine-Free Peptide and Glycopeptide Ligation by Direct Aminolysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4411-4415.
- (24) Aimoto, S. Polypeptide synthesis by the thioester method. *Pept. Sci.* **1999**, *51*, 247-265.
- (25) Crich, D.; Sharma, I. Triblock Peptide and Peptide Thioester Synthesis With Reactivity-Differentiated Sulfonamides and Peptidyl Thioacids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7591-7594.
- (26) Tan, Z.; Shang, S.; Halkina, T.; Yuan, Y.; Danishefsky, S. J. Toward Homogeneous Erythropoietin: Non-NCL-Based Chemical Synthesis of the Gln78–Arg166 Glycopeptide Domain. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5424-5431.
- (27) Katayama, H.; Hojo, H.; Ohira, T.; Nakahara, Y. An efficient peptide ligation using azido-protected peptides via the thioester method. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5492-5494.
- (28) Kurpiers, T.; Mootz, H. D. Bioorthogonal Ligation in the Spotlight. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1729-1731.
- (29) Araújo, A. D. D.; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Köhn, M.; Schröder, H.; Wacker, R.; Niemeyer, C.; Alexandrov, K.; Waldmann, H. Diels-Alder Ligation and Surface Immobilization of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 296-301.
- (30) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- (31) Chalker, J. M.; Wood, C. S. C.; Davis, B. G. A Convenient Catalyst for Aqueous and Protein Suzuki–Miyaura Cross-Coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346-16347.
- (32) Lin, Y. A.; Chalker, J. M.; Floyd, N.; Bernardes, G. J. L.; Davis, B. G. Allyl Sulfides Are Privileged Substrates in Aqueous Cross-Metathesis: Application to Site-Selective Protein Modification. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9642-9643.
- (33) Johnson, E. C. B.; Kent, S. B. H. Insights into the Mechanism and Catalysis of the Native Chemical Ligation Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640-6646.
- (34) Hackeng, T. M.; Griffin, J. H.; Dawson, P. E. Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10068-10073.
- (35) Dawson, P.; Muir, T.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- (36) Severinov, K.; Muir, T. W. Expressed Protein Ligation, a Novel Method for Studying Protein-Protein Interactions in Transcription. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16205-16209.
- (37) Swiss Institute of Bioinformatics; UniProtKB/Swiss-Prot Release 57.13 Swiss-Prot Statistics.
- (38) Yan, L. Z.; Dawson, P. E. Synthesis of Peptides and Proteins without Cysteine Residues by Native Chemical Ligation Combined with Desulfurization. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526-533.
- (39) Bang, D.; Makhatadze, G. I.; Tereshko, V.; Kosiakoff, A. A.; Kent, S. B. Total Chemical Synthesis and X-ray Crystal Structure of a Protein Diastereomer: [D-Gln 35]Ubiquitin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3852-3856.
- (40) Wan, Q.; Danishefsky, S. Free-Radical-Based, Specific Desulfurization of Cysteine: A Powerful Advance in the Synthesis of Polypeptides and Glycopolypeptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248-9252.

- (41) Haase, C.; Rohde, H.; Seitz, O. Native Chemical Ligation at Valine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6807-6810.
- (42) Crich, D.; Banerjee, A. Native Chemical Ligation at Phenylalanine. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10064-10065.
- (43) Nishide, K.; Shigeta, Y.; Obata, K.; Inoue, T.; Node, M. Reductive desulfurization using the raney nickel -- Sodium hypophosphite combination system without racemization of a secondary alcohol. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2271-2274.
- (44) Smith, M. B.; March, J. Dans *March's Advanced Organic Chemistry- Reactions, Mechanisms, and Structure*; Wiley, 2007; p. 1848-1850.
- (45) Garner, J.; Jolliffe, K. A.; Harding, M. M.; Payne, R. J. Synthesis of homogeneous antifreeze glycopeptides via a ligation-desulfurisation strategy. *Chem. Commun.* **2009**, 6925-6927.
- (46) Botti, P.; Carrasco, M. R.; Kent, S. B. Native chemical ligation using removable N[α](1-phenyl-2-mercaptoethyl) auxiliaries. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1831-1833.
- (47) Offer, J.; Dawson, P. E. Na-2-Mercaptobenzylamine-Assisted Chemical Ligation. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 23-26.
- (48) Chatterjee, C.; McGinty, R.; Pellois, J.; Muir, T. Auxiliary-Mediated Site-Specific Peptide Ubiquitylation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2814-2818.
- (49) Wu, B.; Chen, J.; Warren, J. D.; Chen, G.; Hua, Z.; Danishefsky, S. J. Building Complex Glycopeptides: Development of a Cysteine-Free Native Chemical Ligation Protocol. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4116-4125.
- (50) Nagaike, F.; Onuma, Y.; Kanazawa, C.; Hojo, H.; Ueki, A.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. Efficient Microwave-Assisted Tandem N- to S-Acyl Transfer and Thioester Exchange for the Preparation of a Glycosylated Peptide Thioester. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4465-4468.
- (51) Köhn, M.; Breinbauer, R. The Staudinger Ligation - A Gift to Chemical Biology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106-3116.
- (52) Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. A "Traceless" Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.
- (53) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. Staudinger Ligation: A Peptide from a Thioester and Azide. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941.
- (54) Staudinger, H.; Meyer, J. Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- (55) Soellner, M. B.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T. Reaction Mechanism and Kinetics of the Traceless Staudinger Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8820-8828.
- (56) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- (57) Bode, J. W.; Fox, R. M.; Baucom, K. D. Chemoselective Amide Ligations by Decarboxylative Condensations of *N*-Alkylhydroxylamines and α -Ketoacids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248-1252.
- (58) Englebretsen, D. R.; Garnham, B. G.; Bergman, D. A.; Alewood, P. F. A Novel Thioether Linker: Chemical Synthesis of a HIV-1 Protease Analogue by Thioether Ligation. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8871-8874.
- (59) Schnolzer, M.; Kent, S. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease. *Science* **1992**, *256*, 221-225.

- (60) Liu, C. F.; Tam, J. P. Peptide segment ligation strategy without use of protecting groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6584-6588.
- (61) Liu, C.; Tam, J. P. Chemical Ligation Approach To Form a Peptide Bond between Unprotected Peptide Segments. Concept and Model Study. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4149-4153.
- (62) Liu, C.; Rao, C.; Tam, J. P. Orthogonal Ligation of Unprotected Peptide Segments through Pseudoproline Formation for the Synthesis of HIV-1 Protease Analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 307-312.
- (63) Cadene, M.; Fenyo, D. *Communication personnelle basée sur une analyse algorithmique de l'International Protein Index v.19/12/2009*.
- (64) Canne, L. E.; Ferre- D'Amare, A. R.; Burley, S. K.; Kent, S. B. H. Total Chemical Synthesis of a Unique Transcription Factor-Related Protein: cMyc-Max. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2998-3007.
- (65) Tam, J. P.; Yu, Q.; Yang, J. Tandem Ligation of Unprotected Peptides through Thiaproyl and Cysteinyl Bonds in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2487-2494.
- (66) Bang, D.; Kent, S. B. H. A One-Pot Total Synthesis of Crambin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534-2538.
- (67) Kochendoerfer, G. G.; Chen, S.; Mao, F.; Cressman, S.; Traviglia, S.; Shao, H.; Hunter, C. L.; Low, D. W.; Cagle, E. N.; Carnevali, M.; Gueriguian, V.; Keogh, P. J.; Porter, H.; Stratton, S. M.; Wiedeke, M. C.; Wilken, J.; Tang, J.; Levy, J. J.; Miranda, L. P.; Crnogorac, M. M.; Kalbag, S.; Botti, P.; Schindler-Horvat, J.; Savatski, L.; Adamson, J. W.; Kung, A.; Kent, S. B. H.; Bradburne, J. A. Design and Chemical Synthesis of a Homogeneous Polymer-Modified Erythropoiesis Protein. *Science* **2003**, *299*, 884-887.
- (68) Bang, D.; Chopra, N.; Kent, S. B. H. Total Chemical Synthesis of Crambin. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1377-1383.
- (69) Durek, T.; Torbeev, V. Y.; Kent, S. B. H. Convergent chemical synthesis and high-resolution x-ray structure of human lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 4846-4851.
- (70) Canne, L. E.; Botti, P.; Simon, R. J.; Chen, Y.; Dennis, E. A.; Kent, S. B. H. Chemical Protein Synthesis by Solid Phase Ligation of Unprotected Peptide Segments. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8720-8727.
- (71) Decostaire, I. Ligation chimique sur support solide : vers la préparation d'analogues de la protéine MUC1, Université d'Orléans, 2008.
- (72) Milton, R.; Milton, S.; Kent, S. Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show reciprocal chiral substrate specificity. *Science* **1992**, *256*, 1445-1448.
- (73) Tornøe, C. W.; Meldal, M. Dans *Peptides 2001*; American Peptide Society and Kluwer Academic Publishers: San Diego, 2001; Vol. Peptides 2001, p. 263-264.
- (74) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- (75) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- (76) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- (77) Rodionov, V. O.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. Mechanism of the Ligand-Free Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2210-2215.

- (78) Aucagne, V.; Berna, J.; Crowley, J. D.; Goldup, S. M.; Hanni, K. D.; Leigh, D. A.; Lusby, P. J.; Ronaldson, V. E.; Slawin, A. M. Z.; Viterisi, A.; Walker, D. B. Catalytic "Active-Metal" Template Synthesis of [2]Rotaxanes, [3]Rotaxanes, and Molecular Shuttles, and Some Observations on the Mechanism of the Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne 1,3-Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11950-11963.
- (79) Straub, B. F. μ -Acetylide and μ -alkenylidene ligands in "click" triazole syntheses. *Chem. Commun.* **2007**, 3868-3870.
- (80) Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952-3015.
- (81) Humenik, M.; Huang, Y.; Wang, Y.; Sprinzl, M. C-Terminal Incorporation of Bio-Orthogonal Azide Groups into a Protein and Preparation of Protein-Oligodeoxynucleotide Conjugates by Cu(I)-Catalyzed Cycloaddition. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1103-1106.
- (82) Tornøe, C. W.; Sanderson, S. J.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Meldal, M. Combinatorial Library of Peptidotriazoles: Identification of [1,2,3]-Triazole Inhibitors against a Recombinant *Leishmania mexicana* Cysteine Protease. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 312-324.
- (83) Angelo, N. G.; Arora, P. S. Nonpeptidic Foldamers from Amino Acids: Synthesis and Characterization of 1,3-Substituted Triazole Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17134-17135.
- (84) Angelo, N. G.; Arora, P. S. Solution- and Solid-Phase Synthesis of Triazole Oligomers That Display Protein-Like Functionality. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7963-7967.
- (85) Franke, R.; Doll, C.; Eichler, J. Peptide ligation through click chemistry for the generation of assembled and scaffolded peptides. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4479-4482.
- (86) Wan, Q.; Chen, J.; Chen, G.; Danishefsky, S. J. A Potentially Valuable Advance in the Synthesis of Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines through Extended Cycloaddition Chemistry. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8244-8249.
- (87) Lin, H.; Walsh, C. T. A Chemoenzymatic Approach to Glycopeptide Antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13998-14003.
- (88) Lin, P.; Ueng, S.; Tseng, M.; Ko, J.; Huang, K.; Yu, S.; Adak, A. K.; Chen, Y.; Lin, C. Site-Specific Protein Modification through Cu(I)-Catalyzed 1,2,3-Triazole Formation and Its Implementation in Protein Microarray Fabrication. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4286-4290.
- (89) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193.
- (90) Stadtman, E. R. Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 797-821.
- (91) Shinar, E.; Navok, T.; Chevion, M. The Analogous Mechanisms of Enzymatic Inactivation Induced by Ascorbate and Superoxide in the Presence of Copper. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 14778-14783.
- (92) Khan, M. M. T.; Martell, A. E. Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. I. Cupric and ferric ion catalyzed oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4176-4185.
- (93) Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278-308.
- (94) Purcell, W. P.; Singer, J. A. Electronic and molecular structure of selected unsubstituted and dimethyl amides from measurements of electric moments and nuclear magnetic resonance. *J. Phys. Chem.* **1967**, *71*, 4316-4319.
- (95) Bock, V. D.; Perciaccante, R.; Jansen, T. P.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. Click Chemistry as a Route to Cyclic Tetrapeptide Analogues: Synthesis of cyclo-[Pro-Val- ψ (triazole)-Pro-Tyr]. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 919-922.

- (96) Borg, S.; Estenne-Bouhtou, G.; Luthman, K.; Csoeregh, I.; Hesselink, W.; Hacksell, U. Synthesis of 1,2,4-Oxadiazole-, 1,3,4-Oxadiazole-, and 1,2,4-Triazole-Derived Dipeptidomimetics. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3112-3120.
- (97) Bock, V. D.; Speijer, D.; Hiemstra, H.; Maarseveen, J. H. V. 1,2,3-Triazoles as peptide bond isosteres: synthesis and biological evaluation of cyclotetrapeptide mimics. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 971-975.
- (98) Appendino, G.; Bacchiega, S.; Minassi, A.; Cascio, M. G.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. The 1,2,3-Triazole Ring as a Peptido- and Olefinomimetic Element: Discovery of Click Vanilloids and Cannabinoids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9312-9315.
- (99) Brik, A.; Alexandratos, J.; Lin, Y.; Elder, J. H.; Olson, A. J.; Wlodawer, A.; Goodsell, D. S.; Wong, C. 1,2,3-Triazole as a Peptide Surrogate in the Rapid Synthesis of HIV-1 Protease Inhibitors. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1167-1169.
- (100) Lee, T.; Cho, M.; Ko, S.; Youn, H.; Baek, D. J.; Cho, W.; Kang, C.; Kim, S. Synthesis and Evaluation of 1,2,3-Triazole Containing Analogues of the Immunostimulant α -GalCer. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 585-589.
- (101) Horne, W. S.; Yadav, M. K.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. Heterocyclic Peptide Backbone Modifications in an α -Helical Coiled Coil. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366-15367.
- (102) Dirksen, A.; Dawson, P. E. Expanding the scope of chemoselective peptide ligations in chemical biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 760-766.
- (103) Scriven, E. F. V.; Turnbull, K. Azides: their preparation and synthetic uses. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 297-368.
- (104) Lu, G.; Lam, S.; Burgess, K. An iterative route to "decorated" ethylene glycol-based linkers. *Chem. Commun.* **2006**, 1652-1654.
- (105) Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Fréchet, J. M. J.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Efficiency and Fidelity in a Click-Chemistry Route to Triazole Dendrimers by the Copper(I)-Catalyzed Ligation of Azides and Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3928-3932.
- (106) Cheshev, P.; Marra, A.; Dondoni, A. First synthesis of 1,2,3-triazolo-linked (1,6)- α -D-oligomannoses (triazolomannoses) by iterative Cu(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3225-3227.
- (107) Holub, J. M.; Jang, H.; Kirshenbaum, K. Clickity-click: highly functionalized peptoid oligomers generated by sequential conjugation reactions on solid-phase support. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1497-1502.
- (108) Xie, J.; Seto, C. T. A two stage click-based library of protein tyrosine phosphatase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 458-473.
- (109) Wu, P.; Chen, X.; Hu, N.; Tam, U.; Blixt, O.; Zettl, A.; Bertozzi, C. Biocompatible Carbon Nanotubes Generated by Functionalization with Glycodendrimers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5022-5025.
- (110) Ornelas, C.; Ruiz Aranzaes, J.; Cloutet, E.; Alves, S.; Astruc, D. Click Assembly of 1,2,3-Triazole-Linked Dendrimers, Including Ferrocenyl Dendrimers, Which Sense Both Oxo Anions and Metal Cations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 872-877.
- (111) Li, Y.; Flood, A. H. Strong, Size-Selective, and Electronically Tunable C-H \cdots Halide Binding with Steric Control over Aggregation from Synthetically Modular, Shape-Persistent [34]Triazolophanes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12111-12122.
- (112) Müller, S.; Liepold, B.; Roth, G. J.; Bestmann, H. J. An Improved One-pot Procedure for the Synthesis of Alkynes from Aldehydes. *Synlett* **1996**, 521-522.

- (113) Nuzzi, A.; Massi, A.; Dondoni, A. Model Studies Toward the Synthesis of Thymidine Oligonucleotides with Triazole Internucleosidic Linkages Via Iterative Cu(I)-Promoted Azide-Alkyne Ligation Chemistry. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1191-1199.
- (114) Ortega-Muñoz, M.; Lopez-Jaramillo, J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. Synthesis of Glyco-Silicas by Cu(I)-Catalyzed "Click-Chemistry" and their Applications in Affinity Chromatography. *Adv. Syn. Catal.* **2006**, *348*, 2410-2420.
- (115) Aucagne, V.; Leigh, D. A. Chemoselective Formation of Successive Triazole Linkages in One Pot: "Click-Click" Chemistry. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4505-4507.
- (116) Montagnat, O. D.; Lessene, G.; Hughes, A. B. Synthesis of azide-alkyne fragments for 'click' chemical applications; formation of oligomers from orthogonally protected trialkylsilyl-propargyl azides and propargyl alcohols. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6971-6974.
- (117) Meudtner, R. M.; Ostermeier, M.; Goddard, R.; Limberg, C.; Hecht, S. Multifunctional "Clickates" as Versatile Extended Heteroaromatic Building Blocks: Efficient Synthesis via Click Chemistry, Conformational Preferences, and Metal Coordination. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9834-9840.
- (118) Ito, H.; Arimoto, K.; Sensul, H.; Hosomi, A. Direct alkynyl group transfer from silicon to copper: New preparation method of alkynylcopper (I) reagents. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3977-3980.
- (119) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. Dans *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis 4th Edition*; John Wiley & Sons, 2007; p. 927-933.
- (120) Davidsohn, W. E.; Henry, M. C. Organometallic Acetylenes of the Main Groups III-V. *Chem. Rev.* **1967**, *67*, 73-106.
- (121) Andreev, A. A.; Konshin, V. V.; Komarov, N. V.; Rubin, M.; Brouwer, C.; Gevorgyan, V. Direct Electrophilic Silylation of Terminal Alkynes. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 421-424.
- (122) Taniguchi, Y.; Inanaga, J.; Yamaguchi, M. Use of 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene in Preparation of Trimethylsilyl Enol Ethers and Trimethylsilylacetylenes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, *54*, 3229-3230.
- (123) Halbes-Letinois, U.; Weibel, J.; Pale, P. The organic chemistry of silver acetylides. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 759-769.
- (124) Letinois-Halbes, U.; Pale, P.; Berger, S. Ag NMR as a Tool for Mechanistic Studies of Ag-Catalyzed Reactions: Evidence for in Situ Formation of Alkyn-1-yl Silver from Alkynes and Silver Salts. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9185-9190.
- (125) Malkoch, M.; Thibault, R. J.; Drockenmuller, E.; Messerschmidt, M.; Voit, B.; Russell, T. P.; Hawker, C. J. Orthogonal Approaches to the Simultaneous and Cascade Functionalization of Macromolecules Using Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14942-14949.
- (126) Jones, A. C.; Sanders, A. W.; Bevan, M. J.; Reich, H. J. Reactivity of Individual Organolithium Aggregates: A RINMR Study of n-Butyllithium and 2-Methoxy-6-(methoxymethyl)phenyllithium. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3492-3493.
- (127) Gessner, V. H.; Däschlein, C.; Strohmam, C. Structure Formation Principles and Reactivity of Organolithium Compounds. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3320-3334.
- (128) Mallan, J. M.; Bebb, R. L. Metalations by organolithium compounds. *Chem. Rev.* **1969**, *69*, 693-755.
- (129) Corriu, R. J. P.; Huynh, V.; Iqbal, J.; Moreau, J. J. E.; Vernhet, C. Silylamines in organic synthesis. Facile synthetic routes to unsaturated protected primary amines. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 6231-6244.
- (130) Wipf, P.; Aoyama, Y.; Benedum, T. E. A Practical Method for Oxazole Synthesis by Cycloisomerization of Propargyl Amides. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3593-3595.
- (131) Myers, A. G.; Harrington, P. M.; Kuo, E. Y. Enantioselective synthesis of the epoxy diyne core of neocarcinostatin chromophore. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 694-695.

- (132) Carpita, A.; Mannocci, L.; Rossi, R. Silver(I)-Catalysed Protiodesilylation of 1-(Trimethylsilyl)-1-alkynes. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1859-1864.
- (133) Orsini, A.; Viterisi, A.; Bodlener, A.; Weibel, J.; Pale, P. A chemoselective deprotection of trimethylsilyl acetylenes catalyzed by silver salts. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 2259-2262.
- (134) Clayden; Greeves; Warren; Wethers Dans *Organic Chemistry*; Oxford University Press, 2000; p. 1279-1312.
- (135) Clark, J. H. Fluoride ion as a base in organic synthesis. *Chem. Rev.* **1980**, 80, 429-452.
- (136) Nishikawa, T.; Urabe, D.; Yoshida, K.; Iwabuchi, T.; Asai, M.; Isobe, M. Stereocontrolled Synthesis of 8,11-Dideoxytetrodotoxin, Unnatural Analogue of Puffer Fish Toxin. *Org. Lett.* **2002**, 4, 2679-2682.
- (137) Wiel, M. K. J. T.; Odermatt, S.; Schanen, P.; Seiler, P.; Diederich, F. 1,3-Diethynylallenes: Stable Monomers, Length-Defined Oligomers, Asymmetric Synthesis, and Optical Resolution. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 3449-3462.
- (138) Albert, A.; Goldacre, R.; Phillips, J. 455. The strength of heterocyclic bases. *J. Chem. Soc.* **1948**, 2240-2249.
- (139) Jung, M. E.; Hagenah, J. A. Synthetic approach to aklavinone using 2-oxo-2H-pyran-5-carboxylate (coumalate) intermediates. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 1889-1902.
- (140) Schmidt, H. M.; Arens, J. Cleavage of Carbon-Silicon bond in 1-alkynyl-silanes by Silver Nitrate - Protection of a terminal triple bond in hydrogenation reactions with trimethylsilyl group. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1967**, 86, 1138-1142.
- (141) Halbes-Létinois, U.; Vasiliev, A.; Pale, P. Regio- and Chemoselective Coupling of Polyalkynes: A Convenient Access to Polyarylacetylenes and Polyenyynes. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2828-2834.
- (142) Manini, P.; Amrein, W.; Gramlich, V.; Diederich, F. Expanded Cubane: Synthesis of a Cage Compound with a C₅₆ Core by Acetylenic Scaffolding and Gas-Phase Transformations into Fullerenes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4339-4343.
- (143) Mössinger, D.; Chaudhuri, D.; Kudernac, T.; Lei, S.; De Feyter, S.; Lupton, J. M.; Höger, S. Large All-Hydrocarbon Spoked Wheels of High Symmetry: Modular Synthesis, Photophysical Properties, and Surface Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 0.
- (144) Bohner, T. V.; Beaudegnies, R.; Vasella, A. Oligosaccharide Analogues of Polysaccharides, Part 16, Cross-Coupling of Partially Protected Dialkynyl Monosaccharides. *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82, 143-160.
- (145) Gramlich, P. M.; Warncke, S.; Gierlich, J.; Carell, T. Click-Click-Click: Single to Triple Modification of DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3442-3444.
- (146) Opsteen, J. A.; Hest, J. C. M. V. Modular synthesis of block copolymers via cycloaddition of terminal azide and alkyne functionalized polymers. *Chem. Commun.* **2005**, 57-59.
- (147) Urbani, C. N.; Bell, C. A.; Lonsdale, D. E.; Whittaker, M. R.; Monteiro, M. J. Reactive Alkyne and Azide Solid Supports To Increase Purity of Novel Polymeric Stars and Dendrimers via the "Click" Reaction. *Macromolecules* **2007**, 40, 7056-7059.
- (148) Macmillan, D.; Blanc, J. A novel neoglycopeptide linkage compatible with native chemical ligation. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 2847-2850.
- (149) Smith, P. A. S.; Brown, B. B. The Synthesis of Heterocyclic Compounds from Aryl Azides. I. Bromo and Nitro Carbazoles. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 2435-2437.
- (150) Lundquist, J. T.; Pelletier, J. C. Improved Solid-Phase Peptide Synthesis Method Utilizing α -Azide-Protected Amino Acids. *Org. Lett.* **2001**, 3, 781-783.

- (151) Nyffeler, P. T.; Liang, C.; Koeller, K. M.; Wong, C. The Chemistry of Amine–Azide Interconversion: Catalytic Diazotransfer and Regioselective Azide Reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10773-10778.
- (152) Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V. An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3797-3800.
- (153) Dickson, H. D.; Smith, S. C.; Hinkle, K. W. A convenient scalable one-pot conversion of esters and Weinreb amides to terminal alkynes. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5597-5599.
- (154) Detz, R. J.; Delville, M.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. Enantioselective Copper-Catalyzed Propargylic Amination. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3777-3780.
- (155) Boas, U.; Brask, J.; Jensen, K. J. Backbone Amide Linker in Solid-Phase Synthesis. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2092-2118.
- (156) Alsina, J.; Jensen, K. J.; Albericio, F.; Barany, G. Solid-Phase Synthesis with Tris(alkoxy)benzyl Backbone Amide Linkage (BAL). *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2787-2795.
- (157) Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vagner, J.; Albericio, F.; Barany, G. Backbone Amide Linker (BAL) Strategy for Solid-Phase Synthesis of C-Terminal-Modified and Cyclic Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5441-5452.
- (158) Cremer, G.; Tariq, H.; Delmas, A. F. Combining a polar resin and a pseudo-proline to optimize the solid-phase synthesis of a "difficult sequence". *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 437-442.
- (159) García-Martín, F.; White, P.; Steinauer, R.; Côté, S.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. The synergy of ChemMatrix resin® and pseudoproline building blocks renders Rantes, a complex aggregated chemokine. *Pept. Sci.* **2006**, *84*, 566-575.
- (160) Garcia-Martin, F.; Quintanar-Audelo, M.; Garcia-Ramos, Y.; Cruz, L. J.; Gravel, C.; Furic, R.; Cote, S.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. ChemMatrix, a Poly(ethylene glycol)-Based Support for the Solid-Phase Synthesis of Complex Peptides. *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 213-220.
- (161) Turk, V.; Bode, W. The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* **1991**, *285*, 213-219.
- (162) Kos, J.; Lah, T. T. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol. Rep.* **1998**, *5*, 1349-1361.
- (163) Veillard, F.; Lecaille, F.; Lalmanach, G. Lung cysteine cathepsins: intruders or unorthodox contributors to the kallikrein-kinin system? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 1079-1094.
- (164) Joyce, J. A.; Hanahan, D. Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. *Cell Cycle* **2004**, *3*, 1516-1619.
- (165) Lecaille, F.; Kaleta, J.; Bromme, D. Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459-4488.
- (166) McKerrow, J. H.; Engel, J. C.; Caffrey, C. R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 639-644.
- (167) Machleidt, W.; Borchart, U.; Fritz, H.; Brzin, J.; Ritonja, A.; Turk, V. Protein inhibitors of cysteine proteinases. II. Primary structure of stefin, a cytosolic protein inhibitor of cysteine proteinases from human polymorphonuclear granulocytes. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1983**, *364*, 1481-1486.
- (168) Martin, J. R.; Craven, J. C.; Jerala, R.; Kroon-Zitko, L.; Zerovnik, E.; Turk, V.; Waltho, J. P. The Three-dimensional Solution Structure of Human Stefin A. *J. Mol. Biol.* **1995**, *246*, 331-343.
- (169) Jenko, S.; Dolenc, I.; Guncar, G.; Dobersek, A.; Podobnik, M.; Turk, D. Crystal Structure of Stefin A in Complex with Cathepsin H: N-terminal Residues of Inhibitors can Adapt to the Active Sites of Endo- and Exopeptidases. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 875-885.

- (170) Bode, W.; Engh, R.; Musil, D.; Thiele, U.; Huber, R.; Karshikov, A.; Brzin, J.; Kos, J.; Turk, V. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J.* **1988**, *7*, 2593-2599.
- (171) Stubbs, M. T.; Laber, B.; Bode, W.; Huber, R.; Jerala, R.; Lenarcic, B.; Turk, V. The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *EMBO J.* **1990**, *9*, 1939-1947.
- (172) Carpino, L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- (173) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- (174) Vojtkovsky, T. Detection of Secondary amines on Solid Phase. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 236-237.
- (175) Mutter, M.; Nefzi, A.; Sato, T.; Sun, X.; Wahl, F.; Wöhr, T. Pseudo-prolines (psi Pro) for accessing "inaccessible" peptides. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 145-153.
- (176) Wöhr, T.; Wahl, F.; Nefzi, A.; Rohwedder, B.; Sato, T.; Sun, X.; Mutter, M. Pseudo-Prolines as a Solubilizing, Structure-Disrupting Protection Technique in Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218-9227.
- (177) Narita, M.; Honda, S.; Umeyama, H.; Obana, S. Designs of 3-Dimensional Structures of Peptides and Proteins and the Synthetic Route for Peptides and Proteins .10. The Solubility of Peptide Intermediates in Organic Solvents - Solubilizing Potential of Hexafluoro-2-propanol. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 281-284.
- (178) Matthews, C. Pathways of Protein Folding. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 653-683.
- (179) Zerovnik, E.; Lenarcic, B.; Jerala, R.; Turk, V. Folding studies of the cysteine proteinase inhibitor -- human stefin A. *BBA - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1991**, *1078*, 313-320.
- (180) Sarath, G.; Zeece, M. G.; Penheiter, A. R. Dans *Proteolytic Enzymes 2nd Edition*; Practical Approach; Rob Beynon and Judith S. Bond ; Oxford University Press, 2001; p. 45-76.
- (181) Woody, R. Dans *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*; Gerald D. Fasman, Plenum Press, 1996; p. 69-107.
- (182) Greenfield, N. J.; Fasman, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108-4116.
- (183) Zerovnik, E.; Lohner, K.; Jerala, R.; Laggner, P.; Turk, V. Calorimetric measurements of thermal denaturation of stefins A and B. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 217-221.
- (184) Brzin, J.; Popovic, T.; Turk, V.; Borchart, U.; Machleidt, W. Human cystatin, a new protein inhibitor of cysteine proteinases. *BioChem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *118*, 103-109.
- (185) Auerswald, E. A.; Nägler, D. K.; Schulze, A. J.; Engh, R. A.; Genenger, G.; Machleidt, W.; Fritz, H. Production, Inhibitory Activity, Folding and Conformational Analysis of an N-terminal and an Internal Deletion Variant of Chicken Cystatin. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 407-415.
- (186) Pol, E.; Olsson, S. L.; Estrada, S.; Prasthofer, T. W.; Björk, I. Characterization by spectroscopic, kinetic and equilibrium methods of the interaction between recombinant human cystatin A (stefin A) and cysteine proteinases. *Biochem. J.* **1995**, *311 (Pt 1)*, 275-282.
- (187) Gocheva, V.; Joyce, J. A. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 60-64.
- (188) Mohamed, M. M.; Sloane, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* **2006**, *6*, 764-775.
- (189) Barrett, A. J.; Kembhavi, A. A.; Brown, M. A.; Kirschke, H.; Knight, C. G.; Tamai, M.; Hanada, K. L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189-198.

- (190) Dawson, P. E.; Kent, S. B. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923-960.
- (191) Lu, W.; Qasim, M. A.; Kent, S. B. H. Comparative Total Syntheses of Turkey Ovomuroid Third Domain by Both Stepwise Solid Phase Peptide Synthesis and Native Chemical Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8518-8523.
- (192) Brik, A.; Keinan, E.; Dawson, P. E. Protein Synthesis by Solid-Phase Chemical Ligation Using a Safety Catch Linker. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3829-3835.
- (193) Pátek, M.; Lebl, M. Safety-catch anchoring linkage for synthesis of peptide amides by Boc/Fmoc strategy. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3891-3894.
- (194) Canne, L. E.; Winston, R. L.; Kent, S. B. H. Synthesis of a versatile purification handle for use with Boc chemistry solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3361-3364.
- (195) Funakoshi, S.; Fukuda, H.; Fujii, N. Affinity purification method using a reversible biotinylating reagent for peptides synthesized by the solid-phase technique. *J. Chromatogr. A* **1993**, *638*, 21-27.
- (196) Villain, M.; Vizzavona, J.; Rose, K. Covalent capture: a new tool for the purification of synthetic and recombinant polypeptides. *Chemistry & Biology* **2001**, *8*, 673-679.
- (197) Krieger, D. E.; Erickson, B. W.; Merrifield, R. B. Affinity purification of synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 3160-3164.
- (198) Funakoshi, S.; Fukuda, H.; Fujii, N. Chemoselective one-step purification method for peptides synthesized by the solid-phase technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 6981-6985.
- (199) Aucagne, V.; Delmas, A. Compounds and methods for purifying peptides produced by solid phase peptide synthesis.
- (200) Gendler, S.; Taylor-Papadimitriou, J.; Duhig, T.; Rothbard, J.; Burchell, J. A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 12820-12823.
- (201) Hanisch, F.; Muller, S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology* **2000**, *10*, 439-449.
- (202) Houghton, A. N.; Lloyd, K. O. Stuck in the MUC on the long and winding road. *Nat. Med* **1998**, *4*, 270-271.
- (203) Syrigos, K. N.; Karayiannakis, A. J.; Zbar, A. Mucins as immunogenic targets in cancer. *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 5239-5244.
- (204) Cremer, G.; Bureaud, N.; Piller, V.; Kunz, H.; Piller, F.; Delmas, A. Synthesis and Biological Evaluation of a Multiantigenic Tn/TF-Containing Glycopeptide Mimic of the Tumor-Related MUC1 Glycoprotein. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 965-968.
- (205) Dziadek, S.; Kowalczyk, D.; Kunz, H. Synthetic Vaccines Consisting of Tumor-Associated MUC1 Glycopeptide Antigens and Bovine Serum Albumin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624-7630.
- (206) Kaiser, A.; Gaidzik, N.; Westerlind, U.; Kowalczyk, D.; Hobel, A.; Schmitt, E.; Kunz, H. A Synthetic Vaccine Consisting of a Tumor-Associated Sialyl-Tn-MUC1 Tandem-Repeat Glycopeptide and Tetanus Toxoid: Induction of a Strong and Highly Selective Immune Response. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551-7555.
- (207) Krambovitis, E.; Hatzidakis, G.; Barlos, K. Preparation of MUC-1 Oligomers Using an Improved Convergent Solid-phase Peptide Synthesis. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 10874-10879.
- (208) Karsten, U.; Diotel, C.; Klich, G.; Paulsen, H.; Goletz, S.; Muller, S.; Hanisch, F. Enhanced Binding of Antibodies to the DTR Motif of MUC1 Tandem Repeat Peptide Is Mediated by Site-specific Glycosylation. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 2541-2549.

- (209) Vlad, A. M.; Muller, S.; Cudic, M.; Paulsen, H.; Otvos, L.; Hanisch, F.; Finn, O. J. Complex carbohydrates are not removed during processing of glycoproteins by dendritic cells: processing of tumor antigen MUC1 glycopeptides for presentation to major histocompatibility complex class II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 1435-1446.
- (210) Bijker, M. S.; Melief, C. J.; Offringa, R.; van der Burg, S. H. Design and development of synthetic peptide vaccines: past, present and future. *Exp. Rev. Vaccines* **2007**, *6*, 591-603.
- (211) Rink, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.
- (212) Uchida, K.; Kawakishi, S. Selective Oxidation of Tryptophan and Histidine Residues in Protein through the Copper-catalyzed Autoxydation of L-Ascorbic Acid. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 1529-1535.
- (213) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- (214) Zhou, Z.; Fahreni, C. J. A Fluorogenic Probe for the Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Ligation Reaction: Modulation of the Fluorescence Emission via $3(n,\pi^*)-1(\pi,\pi^*)$ Inversion. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8862-8863.
- (215) Gierlich, J.; Burley, G. A.; Gramlich, P. M. E.; Hammond, D. M.; Carell, T. Click Chemistry as a Reliable Method for the High-Density Postsynthetic Functionalization of Alkyne-Modified DNA. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642.
- (216) Giardino, I.; Fard, A. K.; Hatchell, D. L.; Brownlee, M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* **1998**, *47*, 1114-1120.
- (217) Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G. Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879-9883.
- (218) Özçubukçu, S.; Ozkal, E.; Jimeno, C.; Pericàs, M. A. A Highly Active Catalyst for Huisgen 1,3-Dipolar Cycloadditions Based on the Tris(triazolyl)methanol-Cu(I) Structure. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4680-4683.
- (219) Cohen-Anisfeld, S. T.; Lansbury, P. T. A practical, convergent method for glycopeptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10531-10537.
- (220) Arsequell, G.; Valencia, G. O-glycosyl α -amino acids as building blocks for glycopeptide synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2839-2876.
- (221) Paulsen, H.; Kolár, C.; Stenzel, W. Bausteine von Oligosacchariden, XI: Synthese α -glycosidisch verknüpfter Disaccharide der 2-Amino-2-desoxy-D-galactopyranose. *Chem. Ber.* **1978**, *111*, 2358-2369.
- (222) Cudic, M.; Burstein, G. D. Dans *Peptide-Based Drug Design*; Methods in Molecular Biology; Humana Press, 2008; Vol. 494, p. 187-208.
- (223) Xu, R.; Hanson, S. R.; Zhang, Z.; Yang, Y.; Schultz, P. G.; Wong, C. Site-Specific Incorporation of the Mucin-Type N-Acetylgalactosamine- α -O-threonine into Protein in Escherichia coli. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15654-15655.
- (224) Koeller, K. M.; Smith, M. E. B.; Wong, C. Chemoenzymatic synthesis of PSGL-1 glycopeptides: sulfation on tyrosine affects glycosyltransferase-catalyzed synthesis of the O-glycan. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1017-1025.
- (225) Paulsen, H.; Adermann, K. Synthese von O-Glycopeptid-Sequenzen des N-Terminus von Interleukin-2. *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *1989*, 751-769.
- (226) Kunz, H. Dans *Preparative Carbohydrate Chemistry*; Hanessian, S., 1997; p. 265-281.
- (227) Rakotomanana, N.; Lacombe, J.; Pavia, A. A. Réduction-acétylation sélective des azido-sucres par le mélange acide thioacétique-thioacétate de potassium. *Carbohydr. Res.* **1990**, *197*, 318-323.

- (228) Rosen, T.; Lico, I. M.; Chu, D. T. W. A convenient and highly chemoselective method for the reductive acetylation of azides. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1580-1582.
- (229) Kolakowski, R. V.; Shangguan, N.; Sauers, R. R.; Williams, L. J. Mechanism of Thio Acid/Azide Amidation. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5695-5702.
- (230) Meinjohanns, E.; Meldal, M.; Schleyer, A.; Paulsen, H.; Bock, K. Efficient syntheses of core 1, core 2, and core 3 and core 4 building blocks for SPS of mucin *O*-glycopeptides based on the *N*-Dts-method. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 985-993.
- (231) Lucas, R.; Hamza, D.; Lubineau, A.; Bonnaffé, D. Synthesis of Glycosaminoglycan Oligosaccharides - An Unexpected Inhibitory Effect of a Remote *N*-Acetyl Group upon Trichloroacetimidate-Mediated Couplings. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2107-2117.
- (232) Seitz, O.; Wong, C. Chemoenzymatic Solution- and Solid-Phase Synthesis of *O*-Glycopeptides of the Mucin Domain of MAdCAM-1. A General Route to *O*-LacNAc, *O*-Sialyl-LacNAc, and *O*-Sialyl-Lewis-X Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8766-8776.

MODES OPÉRATOIRES

General information	166
Part IV	168
Part V	185
Part VI	206

This experimental methods section describes the synthesis and characterization of most of the products mentioned in the PhD Thesis. However, some products were not isolated or fully characterized:

- *Bis-N*-trimethylsilyl intermediates **8**, **9** and **10** were desilylated during workup and thus, not isolated or characterized.
- Intermediates **21** to **24** were isolated on an analytical HPLC scale sufficient for MS characterization.
- **29** has already been described in the literature. However, its NMR description didn't completely fit with our observations due to the presence of a mixture of rotamers. Full ^1H and ^{13}C characterization and copy of the spectra are available.
- Peptidyl-resins **47** to **51** were characterized through their "released" equivalents **47'** to **51'**.

General information

Unless stated otherwise, all reagents and anhydrous solvents were purchased from Aldrich Chemicals and used without further purification.

Fmoc- and Boc- amino acids, pseudoproline dipeptides, aminomethyl ChemMatrix[®] resin, 4-(4-Formyl-3,5-dimethoxyphenoxy)butyric acid, HBTU and D-(+)-galactosamine hydrochloride were purchased from Merck Biosciences (Nottingham, UK). Fmoc-Phe-[4-(oxymethyl)-phenoxy-propan-3-oic acid] was purchased from NeomPS (Strasbourg, France). Aminomethyl PEGA[®] 800 resin (0.4 mmol/g) and PEGA[®] 1900 (0.2 mmol/g) were purchased from Polymer Laboratories. Peptide synthesis grade DMF and HATU was obtained from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France). All other chemicals were from Sigma Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France) and solvents from SDS-Carlo Erba (Val de Reuil, France). Polypropylene syringes fitted with polypropylene frits and a polypropylene plunger were obtained from Torviq (Niles, MI, USA) and Teflon taps from Chromoptic (Courtaboeuf, France).

Unless stated otherwise, all CuAAC ligation experiences were carried out under argon atmosphere in oxygen-free solvents.

Glycosylation experiences were exclusively performed in amylene-stabilized dichloromethane purchased from SDS-Carlo Erba (Val de Reuil, France) freshly distilled over P₂O₅.

Flash column chromatographies were carried out using Kiesegel C60 (Merck, Germany) as the stationary phase, and TLC were performed on precoated silica gel plates (0.25 mm thick, 60F²⁵⁴, Merck, Germany) and observed under UV light at 254 nm.

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker AV500 instrument, at a constant temperature of 25 °C. Chemical shifts are reported in parts per million from low to high field and referenced to TMS. Coupling constants (*J*) are reported in hertz (Hz). Standard abbreviations indicating multiplicity were used as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, br = broad.

HPLC analysis were carried out on either the Elite LaChrom system composed of a Hitachi L-2130 pump and Hitachi L-2455 diode array detector with auto-sampler Hitachi L-2200, or LaChrom 7000 equipped with a Merck-Hitachi L-7100 pump and a Merck-Hitachi L-7455 diode array detector with a Merck-Hitachi D-7000 interface, which was also used for semi-preparative purification. The machines were equipped with C18 reversed-phase columns, Nucleosil, 300 Å, 5 µm, 250 × 4.6 mm for the analytical separations, or 250 × 10.5 mm for purification. HPLC solvents A and B were 0.1% solutions of TFA in H₂O and MeCN respectively.

Optical rotations were measured at 20°C with a Perkin-Elmer model 141 polarimeter.

Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) analyses were performed on a triple quadrupole mass spectrometer (Quattro II, Micromass, Manchester, UK). MALDI-TOF mass spectrometry was performed on an Autoflex instrument using either the dry droplet or the thin layer method (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and HRMS was performed on a Q-Tof micro (Waters).

General procedure A for automated standard solid-phase peptide synthesis:

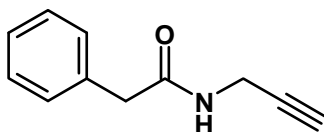
Solid-phase peptide synthesis (SPPS) was run on an automated synthesizer 433A from Applied Biosystems using standard Fmoc/*t*Bu chemistry at a 0.1 mmol scale with HBTU/HOBt as coupling reagents and 20% piperidine in NMP as deprotection reagent. The elongation was carried out automatically using a 10-fold excess of protected amino acids and coupling reagents. The side-chain protecting groups used were Arg(Pbf), Asn(Trt), Asp(*O**t*Bu), Gln(Trt), Glu(*O**t*Bu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(*t*Bu), Thr(*t*Bu), Trp(Boc), Tyr(*t*Bu). The 0.1 mmol scale program purchased from the manufacturer was used, with a single coupling or double coupling followed by capping with acetic anhydride.

General procedure B for manual coupling with HATU:

The Fmoc-protected amino acid (2 equiv., 0.2 mmol) was manually coupled onto the resin (0.1 mmol) in a syringe fitted with a polypropylene frit and a teflon tap in the presence of HATU (76 mg, 2 equiv., 0.2 mmol) and DIEA (86 μ l, 5 equiv., 0.5 mmol) in DMF for 2 h. The completion of the reaction was checked by the Kaiser or the chloranil test and repeated if necessary.

Part IV

2-phenyl-*N*-[prop-2-ynyl]acetamide (**2**) (CAS n° 174217-39-7)

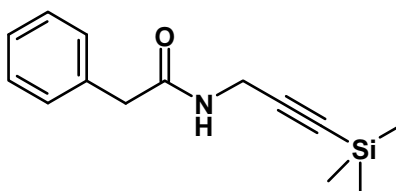


White amorphous solid (77%)

Spectrometric data were found to be identical to literature data.¹

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.39-7.27 (m, 5H, Ph), 5.60 (br t, 1H, NH), 4.02 (dd, 2H, *J*_{CH₂-CH} = 2.5 Hz, *J*_{CH₂-NH} = 5.0 Hz, CH₂NH), 3.61 (s, 2H, CH₂Ph), 2.19 (t, 1H, CH).

2-phenyl-*N*-[3-(trimethylsilyl)prop-2-ynyl]acetamide (**3**)



To a suspension of AgNO₃ (23 mg, 0.144 mmol, 0.1 equiv.) in CH₂Cl₂ (5mL) were consecutively added *N*-propargylphenylacetamide **2** (250 mg, 1.44 mmol), chlorotrimethylsilane (258 μL, 1.73 mmol, 1.2 equiv.) and DBU (258 μL, 1.73 mmol, 1.2 equiv.) and the solution was allowed to stir under reflux for 24h. The solution was diluted with CH₂Cl₂ (10 mL) and washed consecutively with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (3 x 5mL), a 1M HCl solution (3 x 5mL) and water (1 x 5mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: petroleum ether/EtOAc 9:1) to afford the product **3** as an amorphous white solid (210 mg, 60% yield).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.39-7.28 (m, 5H, Ph), 5.50 (br t, 1H, NH), 4.04 (d, 2H, *J*_{CH₂-NH} = 5.5 Hz, CH₂NH), 3.59 (s, 2H, CH₂Ph), 0.15 (s, 9H, CH₃).

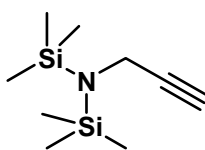
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.5 (C), 134.6 (C), 129.6 (CH), 129.2 (CH), 127.6 (CH), 101.2 (C), 88.6 (C), 43.87 (CH₂), 30.5 (CH₂), -0.07 (CH₃).

ESI-HRMS: *m/z* = 246.1318 (calcd. for C₁₄H₂₀NOSi, 246.1314).

¹ Walters, M. A.; Hoem, A. B.; McDonough, C. S. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 55-62

***N,N*-bis(trimethylsilyl)propargylamine (4) (CAS n° 91375-25-6)**

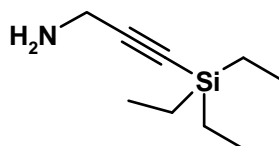
Prepared following experimental procedures described in the literature.²



A mixture of 1.01 g (18.3 mmol) of propargylamine, 4.80 mL (37.8 mmol) of chlorotrimethylsilane, and 9.70 mL (55.2 mmol) of DIEA in 30 mL of CH₂Cl₂ was stirred at rt for 12 h, quenched with brine (50 mL), and extracted with CH₂Cl₂ (2 x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure to give 2.10 g (57%) of **4** as a pale yellow oil.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 3.49 (d, 2H, *J*_{CH₂-CH} = 2.5 Hz, CH), 3.00 (t, 1H, CH), 0.11 (s, 18H, CH₃).

Spectrometric data were found to be identical to literature data.³

3-(triethylsilyl)prop-2-yn-1-amine (6)

Method 1 : A solution of *N,N*-bis(trimethylsilyl)propargylamine **4** (500 mg, 2.5 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was cooled to -78°C, *n*-BuLi was added dropwise (1 mL, 2.5 M in hexanes, 2.5 mmol, 1 equiv.). The solution was allowed to stir at -78°C for 15 min, then was warmed to 0°C and TES-Cl (509 μL, 3 mmol, 2 equiv.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 2h at RT then quenched with a 1M aqueous HCl solution (15 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 5 mL) then its pH was basified to 9-10 with an aqueous NaHCO₃ saturated solution. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 10 mL), the combined organic fractions were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to give pure **6** as an orange oil (187 mg, 44% yield). (No chromatography needed, as compared to general procedure A)

Method 2 : A solution of propargylamine (368 mg, 6.7 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was cooled to -78°C. *n*-BuLi (2.6 mL, 2.5 M in hexanes, 6.7 mmol, 1 equiv.) was added dropwise. The solution was allowed to stir for 15 min at -78°C, then was warmed to 0°C and TESCl (1.34 mL, 8 mmol, 1.2 equiv.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 2h at RT then quenched with an aqueous NH₄Cl solution (15 mL). After removal of THF by evaporation under vacuum, the aqueous slurry was diluted with a 1 M HCl solution and EtOAc. The aqueous phase was then extracted with EtOAc (3 x 10 mL) then pH was adjusted to 10 with an aqueous NaHCO₃ saturated solution. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 10 mL), the combined organic fractions were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to give pure **6** as an orange oil (447.4 mg, 40%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.45 (s, 2H, CH₂NH₂), 0.99 (t, 9H, *J*_{CH₃-CH₂} = 8.0 Hz, CH₃), 0.60 (q, 6H, CH₂CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 108.6 (C), 84.1 (C), 32.6 (CH₂), 7.6 (CH₃), 4.6 (CH₂).

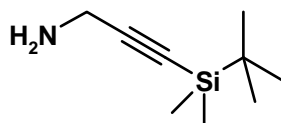
ESI-HRMS: *m/z* = 170.1356 (calcd. for C₉H₂₀NSi, 170.1365).

² Wipf, P.; Aoyama, Y.; Benedum, T. E. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3593-3595

³ Corriu, R. J. P.; Huynh, V.; Iqbal, J.; Moreau, J. J. E.; Vernhet, C. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 6231-6244

General procedure C for the synthesis of trialkylsilylpropargylamines from 4

A solution of *N,N*-bis(trimethylsilyl)propargylamine **4** (500 mg, 2.5 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was cooled to -78°C , *n*-BuLi was added dropwise (1 mL, 2.5 M in hexanes, 2.5 mmol, 1 equiv.). The solution was allowed to stir at -78°C for 15 min, then was warmed to 0°C and a solution of TBDMS-Cl (452 mg, 3 mmol, 2 equiv.) in anhydrous THF (2mL) or TBDPS-Cl (780 μL , 3 mmol, 2 equiv.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 2h at RT then quenched with a 1M aqueous HCl solution (15 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 5 mL) then its pH was adjusted to 9-10 with an aqueous NaHCO_3 saturated solution. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 10 mL), the combined organic fractions were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo* to give a pale oil. The residue was then purified by column chromatography flash chromatography on silica gel.

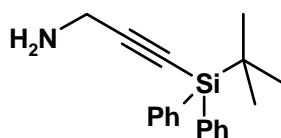
3-(*tert*-butyl(dimethyl)silyl)prop-2-yn-1-amine (8)

Obtained in 76% yield after purification following procedure C (eluent: petroleum ether/EtOAc 95:5 then 1:1).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 3.45 (s, 2H, CH_2), 0.94 (s, 9H, *t*Bu), 0.10 (s, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 108.1 (C), 84.9 (C), 32.6 (CH_2), 26.2 (CH_3), 16.7 (C), - 4.4 (CH_3).

ESI-HRMS: $m/z = 170.1351$ (calcd. for $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{NSi}$, 170.1365).

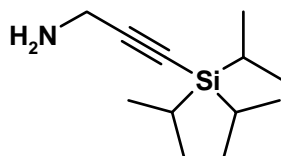
3-(*tert*-butyl(diphenyl)silyl)prop-2-yn-1-amine (10)

Obtained in 65% yield after purification following procedure C (eluent: petroleum ether/EtOAc 95:5 then 1:1).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.80-7.37 (m, 10H, Ph), 3.62 (s, 2H, CH_2), 1.00 (s, 9H, *t*Bu).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 135.8 (C), 133.6 (C), 129.7 (CH), 127.9 (CH), 111.5 (C), 82.1 (C), 32.8 (CH_2), 27.3 (CH_3), 18.6 (C).

ESI-HRMS : $m/z = 294.1668$ (calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NSi}$, 294.1678).

3-(triisopropylsilyl)prop-2-yn-1-amine (11)

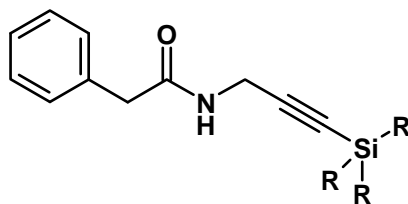
A solution of propargylamine (864 mg, 16 mmol) in anhydrous THF (40 mL) was cooled to -78°C . *n*-BuLi (6.4 mL, 2.5 M in hexanes, 16 mmol, 1 equiv.) was added dropwise. The solution was allowed to stir for 15 min at -78°C , then was warmed to 0°C and TIPS-Cl was added dropwise (4 mL, 19 mmol, 1.2 equiv.). The reaction mixture was stirred for 2h at RT then quenched with an aqueous NaHCO_3 saturated solution (15 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 20 mL), the combined organic fractions were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was then purified by flash chromatography on silica gel (eluent: petroleum ether/EtOAc 95:5 then 1:1) to give **11** as an orange oil (2.73g, 82%).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 3.44 (s, 2H, CH_2), 1.76-1.28 (m, 21H, *i*Pr).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 109.4 (C), 82.7 (C), 32.7 (CH_2), 18.8 (CH_3), 11.5 (CH).

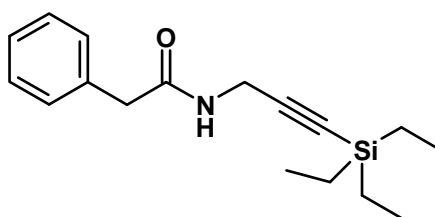
ESI-HRMS: $m/z = 212.1827$ (calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{NSi}$, 212.1835).

General procedure D for the synthesis of 2-phenyl-N-[3-(trialkylsilyl)prop-2-ynyl]acetamides



To an ice cooled solution of propargylamine (500 mg, 2,3 mmol) and DIEA (618 μ L, 3,5 mmol, 1.5 equiv.) in CH_2Cl_2 (25 mL) was added phenylacetyl chloride (472 μ L, 3.5 mmol, 1.5 equiv.) dropwise and the solution was allowed to stir at RT for 2h. After completion of the reaction, the solution was diluted with EtOAc and washed consecutively with an aqueous NaHCO_3 saturated solution (2 x 10 mL) and brine (2 x 10 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was then purified by flash chromatography on silica gel to furnish the desired product.

2-phenyl-N-[3-(triethylsilyl)prop-2-ynyl]acetamide (12)



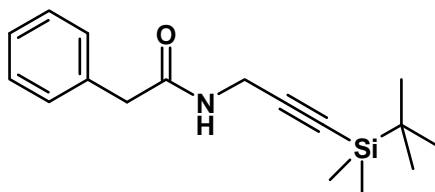
Obtained as a white amorphous solid (70 %) following procedure D (p.172).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.38-7.26 (m, 5H, Ph), 5.52 (br t, 1H, NH), 4.05 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{-NH}} = 5.0$ Hz, CH₂NH), 3.60 (s, 2H, CH₂Ph), 0.952 (t, 9H, $J_{\text{CH}_3\text{-CH}_2} = 8.0$ Hz, CH₃), 0.57 (q, 6H, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}_3} = 8.0$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.5 (CH), 134.7 (CH), 129.6 (CH), 129.2 (CH), 127.6 (CH), 102.4 (C), 86.1 (C), 43.8 (CH₂), 30.6 (CH₂), 7.5 (CH₃), 4.4 (CH₂).

ESI-HRMS: $m/z = 288.1791$ (calcd. for C₁₇H₂₆NOSi, 288.1784).

2-phenyl-N-[3-(tert-butyl(dimethyl)silyl)prop-2-ynyl]acetamide (13)



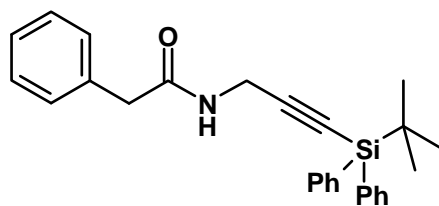
Obtained as a white amorphous solid (65 %) following procedure D (p.172).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.39-7.26 (m, 5H, Ph), 5.48 (br t, 1H, NH), 4.04 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{-NH}} = 5.0$ Hz, CH₂NH), 3.60 (s, 2H, CH₂Ph), 0.90 (s, 9H, *t*Bu), 0.07 (s, 6H, CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.5 (C), 134.7 (C), 129.6 (CH), 129.3 (CH), 127.7 (CH), 101.8 (C), 87.0 (C), 43.8 (CH₂), 30.6 (CH₂), 26.2 (CH₃), 16.6 (C), -4.6 (CH₃).

ESI-HRMS: $m/z = 288.1784$ (calcd. for C₁₇H₂₆NOSi, 288.1784).

2-phenyl-N-[3-(tert-butyl(diphenyl)silyl)prop-2-ynyl]acetamide (14)



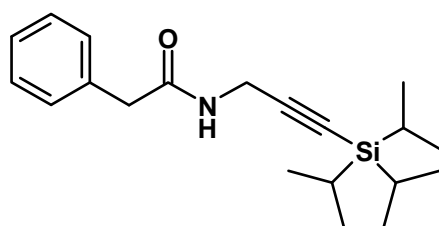
Obtained as a white amorphous solid (73 %) following procedure D (p.172).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.73-7.71 (m, 5H, Ph), 7.43-7.27 (m, 10H, 2Ph), 5.61 (br t, 1H, NH), 4.21 (d, 2H, *J*_{CH₂-NH} = 5.0 Hz, CH₂NH), 3.64 (s, 2H, CH₂Ph), 1.05 (s, 9H, *t*Bu).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.5 (C), 135.7 (CH), 134.6 (C), 133.0 (C), 129.7 (CH), 129.6 (CH), 129.4 (CH), 128.9 5 (CH), 127.9 (CH), 127.7 (CH), 105.3 (C), 84.1 (C), 43.7 (CH₂), 30.7 (CH₂), 27.1 (CH₃), 18.7 (C).

ESI-HRMS: *m/z* = 412.2104 (calcd. for C₂₇H₃₀NOSi, 412.2097).

2-phenyl-N-[3-(triisopropylsilyl)prop-2-ynyl]acetamide (15)



Obtained as a white amorphous solid (95 %) following procedure D (p.172).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.38-7.26 (m, 5H, Ph), 5.48 (br t, 1H, NH), 4.06 (d, 2H, *J*_{CH₂-NH} = 5.0 Hz, CH₂NH), 3.61 (s, 2H, CH₂Ph), 1.03 (s, 21H, *i*Pr).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.5 (C), 134.7 (C), 129.6 (CH), 129.4 (CH), 129.3 5 (CH), 129.1 (CH), 127.7 (CH), 103.0 (C), 84.9 (C), 43.8 (CH₂), 30.7 (CH₂), 18.7 (CH₃), 11.3 (CH).

ESI-HRMS: *m/z* = 330.2256 (calcd. for C₂₀H₃₂NOSi, 330.2253).

Stability screening for silyl-protected model compounds 3 and 12 to 15

All reactions from table 1 were conducted at 0.01 M using standard quality solvents unless specified. RP-HPLC analyses were performed after an aqueous work up.

Workup for reactions in basic conditions

The reaction was diluted with EtOAc and quenched by addition of a 1M HCl aqueous solution. The aqueous phase was extracted with EtOAc. The organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was then dissolved in a CH₃CN/H₂O mixture (1:1) and analyzed by HPLC.

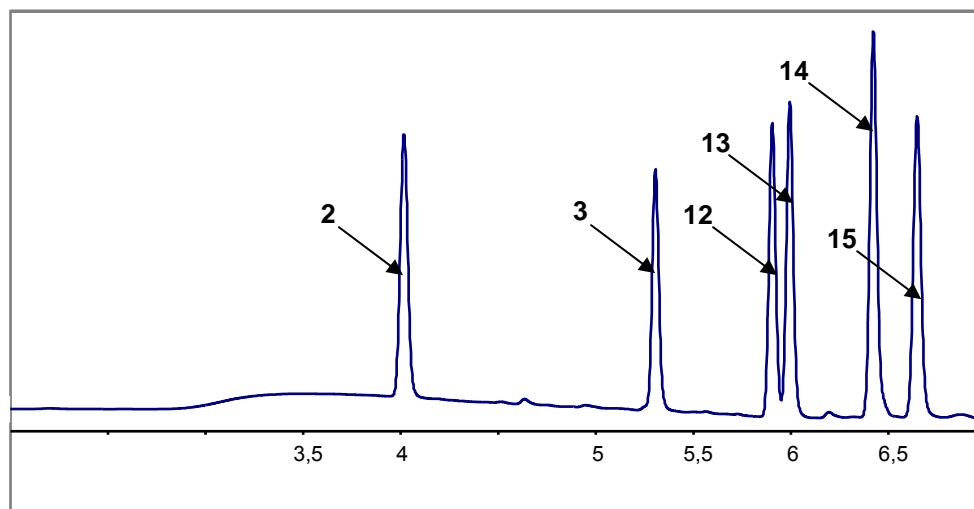
Work-up for reactions in acidic conditions

The reaction was diluted with EtOAc and quenched by addition of a saturated NaHCO₃ aqueous solution. The aqueous phase was extracted with EtOAc. The organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was then dissolved in a CH₃CN/H₂O mixture (1:1) and analyzed by HPLC.

Work-up for reactions involving silver nitrate mediated deprotection of alkynes

The reaction was diluted with CH₂Cl₂ and quenched by addition of a saturated NH₄Cl aqueous solution. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂. The organic phases were dried over MgSO₄, filtered over celite and concentrated under vacuum. The residue was then dissolved in a CH₃CN/H₂O mixture (1:1) and analyzed by HPLC.

Typical RP-HPLC trace of a mixture of the six different silylated alkynes



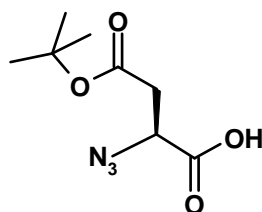
Gradient: 20-95% CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA over 7 minutes

General procedure E for preparation of azido-modified amino acids using TfN₃⁴

Triflyl azide⁴ preparation : A solution of sodium azide (10 equiv., 40 mmol) was dissolved in distilled H₂O (6.5 mL) with CH₂Cl₂ (10 mL) and cooled on an ice bath. Triflyl anhydride (2 equiv., 8 mmol) was added slowly over 5 min while stirring continued for 2 h. The mixture was placed in a separatory funnel and the CH₂Cl₂ phase removed. The aqueous portion was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 5 mL). The organic fractions, containing the triflyl azide, were pooled and washed once with saturated Na₂CO₃ and used without further purification. Amine (4 mmol) was combined with K₂CO₃ (1.5 equiv., 6 mmol), CuSO₄ pentahydrate (0.1 equiv. 0.4 mmol), distilled H₂O (12 mL), and CH₃OH (25 mL). The triflyl azide in CH₂Cl₂ (20 mL) was added, and the mixture was stirred at ambient temperature overnight. Subsequently, the organic solvents were removed under reduced pressure, and the aqueous slurry was diluted with H₂O (70 mL). This suspension was acidified to pH = 6 with concentrated HCl and diluted with 0.25 M, pH 6.2 phosphate buffer (100 mL) and extracted with EtOAc (4 x) to remove sulfonamide byproduct. The aqueous phase was then acidified to pH = 2 with concentrated HCl. The product was obtained from EtOAc extractions (3 x). The organic phases were pooled, dried over MgSO₄, and evaporated to dryness.

General procedure F for preparation of azido-modified amino acids using ImSO₂N₃⁵

Imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride⁵ (1.2 equiv) was added to the amine (1 equiv.), K₂CO₃ (2.7 equiv.) and CuSO₄ pentahydrate (0.01 equiv.) in MeOH (0.2 M) and the mixture was stirred 18h at rt. The mixture was concentrated, diluted with H₂O, the aqueous phase was acidified to pH = 1 with a 1M HCl solution and extracted three times with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was added an aqueous 2% NaHCO₃ solution and the suspension was extracted with diethyl ether. The aqueous phase was acidified to pH = 1 with a concentrated HCl solution and extracted three times with CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford the desired azido amino acids without any additional purification.

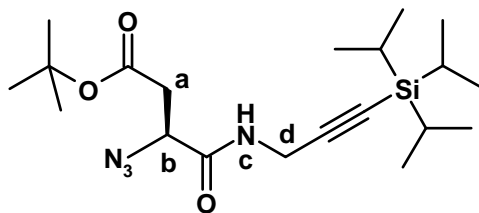
(S)-2-Azido-succinic acid 4-*tert*-butyl ester (17) (CAS n° 333366-23-7)

17 was prepared from commercial (S)-2-amino-succinic acid 4-*tert*-butyl ester (**16**) following both procedure E (71 % yield) and procedure F (88% yield). The product was obtained as a yellowish oil in. ¹H data were identical to the reported in the literature.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4.38 (dd, 1H, *J*_{CH-CH₂a} = 5.5 Hz, *J*_{CH-CH₂b} = 7.0 Hz), 2.83 (dd, 1H, *J*_{CH₂a-CH₂b} = 16.5 Hz), 2.72 (dd, 1H), 1.47 (s, 9H)

⁴ Lundquist, J. T.; Pelletier, J. C. *Org. Lett.* **2001**, 3, 781-783

⁵ Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V. *Org. Lett.* **2007**, 9, 3797-3800

(S)-3-tert-butyl 3-azido-4-oxo-4-[[3-(triisopropylsilyl)prop-2-ynyl]amino]butanoate (18)

To an ice cooled solution of 2-azido-4-*tert*-butoxy-4-oxobutanoic acid **17** (500 mg, 2.32 mmol), **11** (737 mg, 3.48 mmol, 1.5 equiv.), HOBt (532 mg, 3.48 mmol, 1.5 equiv.) and *i*-Pr₂NEt (810 μL, 4.64 mmol, 2 equiv.) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added EDCI portionwise (668 mg, 3.48 mmol, 1.5 equiv.) and the solution was allowed to stir overnight. The solution was then diluted with EtOAc and washed consecutively with a 1M HCl solution (3 x 5 mL), a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (3 x 5 mL), and water (1 x 5 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: petroleum ether/EtOAc (8:2)) to afford **18** as a yellowish oil (210 mg, 60% yield).

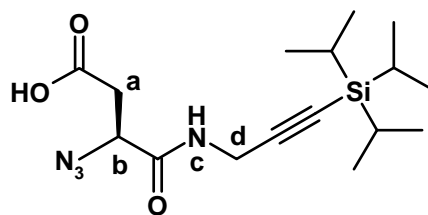
$[\alpha]_D^{20}$ -21.0 (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.63 (s, 1H, Hc), 4.40 (dd, 1H, *J*_{CH-CH} = 3.5 Hz, *J*_{CH-CH} = 9.0 Hz, Hb), 4.14 (dd, 1H, *J*_{CH-CH} = 17.7 Hz, *J*_{CH-NH} = 5.3 Hz, Hd), 4.10 (dd, 1H, *J*_{CH-CH} = 17.7 Hz, *J*_{CH-NH} = 5.3 Hz, Hd), 3.06 (dd, 1H, *J*_{CH-CH} = 17.5 Hz, *J*_{CH-CH} = 3.5 Hz, Ha), 2.62 (dd, 1H, *J*_{CH-CH} = 17.5 Hz, *J*_{CH-CH} = 9.0 Hz, Ha), 1.49 (s, 18H, *i*Pr), 1.07 (s, 9H, *t*Bu).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 169.5 (C), 168.0 (C), 102.2 (C), 85.6 (C), 82.2 (C), 60.6 (CH), 38.6 (CH₂), 30.7 (CH₂), 28.2 (CH₃), 18.7 (CH₃), 11.1 (CH).

ESI-HRMS: *m/z* = 431.2438 (calcd. for C₂₀H₃₆N₄O₃Si, 431.2454).

(S)-3-azido-4-oxo-4-[[3-(triisopropylsilyl)prop-2-ynyl]amino]butanoic acid (19)



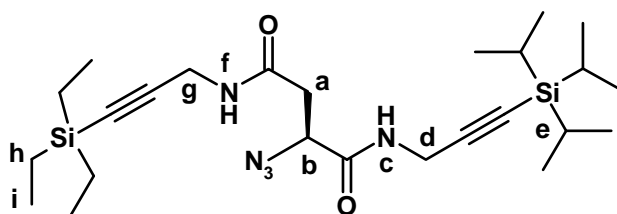
To **18** (137 mg, 0.332 mmol) was slowly added pure TFA at 0°C and the solution was allowed to stir at 0°C for 5 minutes. TFA was then removed under *vacuo* at 0°C to afford the desired product **19** as a yellowish oil (117 mg, 100%).

$[\alpha]_D^{20}$: -37.5 (*c* 1.0, CHCl₃).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.72 (t, 1H, $J_{\text{CH}_2\text{-NH}} = 5.0$ Hz, Hc), 4.46 (dd, 1H, $J_{\text{CH-CH}_2} = 3.5$ Hz, $J_{\text{CH-CH}_2} = 9.0$ Hz, Hb), 4.16 (dd, 1H, $J_{\text{CH}_2\text{-NH}} = 18.0$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{-NH}} = 5.0$ Hz, Hd), 4.10 (dd, 1H, $J_{\text{CH}_2\text{-NH}} = 18.0$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{-NH}} = 5.0$ Hz, Hd), 3.19 (dd, 1H, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}} = 18.0$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}} = 3.5$ Hz, Ha), 2.75 (dd, 1H, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}} = 18.0$ Hz, $J_{\text{CH-CH}_2} = 9.0$ Hz, Ha), 1.07 (s, 18H, *i*Pr).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 174.9 (C), 167.9 (C), 101.9 (C), 85.9 (C), 60.1 (CH), 37.1 (CH₂), 30.9 (CH₂), 18.7 (CH₃), 11.3 (CH).

ESI-HRMS: $m/z = 353.2008$, (calcd. for C₁₆H₂₉N₄O₃Si, 353.2009).

(S)-3-azido-2-N-4-(3-triethylsilyl-prop-2-ynyl)-N-1-(3-triisopropylsilyl-prop-2-ynyl)-succinamide (20)

To an ice cooled solution of **19** (88 mg, 0.25 mmol), **6** (62.7 mg, 0.37 mmol, 1.5 equiv.), HOBt (56.6 mg, 0.37 mmol, 1.5 equiv.), and *i*-Pr₂NEt (87 μ L, 0.5 mmol, 2 equiv.) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added EDCI portionwise (71 mg, 0.37 mmol, 1.5 equiv.) and the solution was allowed to stir at RT overnight. The solution was then diluted with EtOAc and washed consecutively with a 1M HCl solution (3 x 5 mL), a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (3 x 5 mL), and water (1 x 5 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (eluent: petroleum Ether/EtOAc (8:2)) to afford **20** as a yellowish oil (100 mg, 80%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +3.5 (*c* 1.0, CHCl₃).

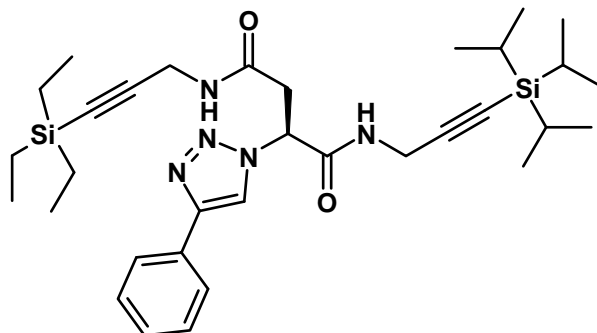
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.80 (br t, 1H, $J_{\text{CH}_2\text{-NH}} = 5.0$ Hz, H_f), 6.04 (br t, 1H, H_f), 4.47 (dd, 1H, $J_{\text{CH-CH}_2} = 4.0$ Hz, $J_{\text{CH-CH}_2} = 8.0$ Hz, H_b), 4.18-4.05 (m, 4H, H_g, H_d), 3.00 (dd, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}} = 15.5$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}} = 4.0$ Hz, H_{aa}), 2.56 (dd, 1H, $J = 15.5$ Hz, $J_{\text{CH-CH}_2} = 8.0$ Hz, H_{ab}), 1.80 (s, 18H, H_e), 0.98 (t, 9H, $J_{\text{CH}_3\text{-CH}_2} = 15.5$ Hz, H_i), 0.60 (q, 6H, H_h).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 168.6 (C), 168.4 (C), 102.1 (C), 101.8 (C), 86.6 (C), 85.7 (C), 60.2 (CH), 38.8 (CH₂), 18.8 (CH₃), 11.3 (CH), 7.6 (CH₃), 4.4 (CH₂).

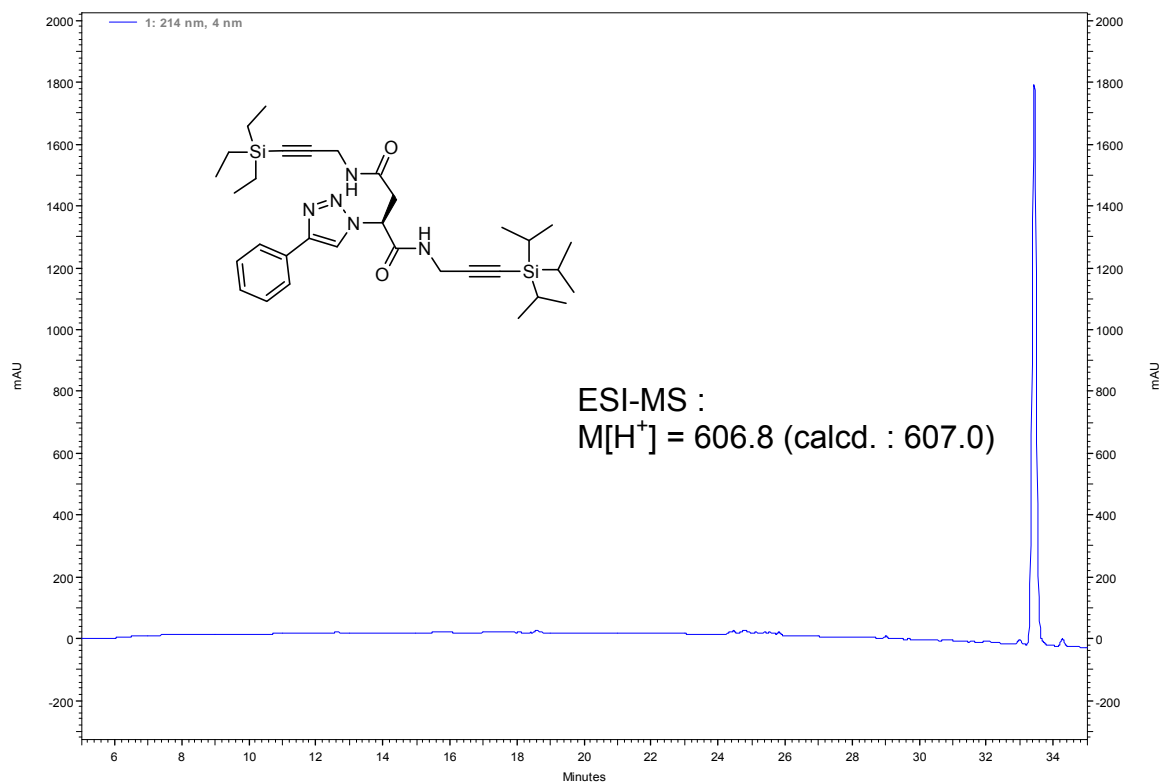
ESI-HRMS: $m/z = 504.3184$ (calcd. for C₂₅H₄₆N₃O₂Si₂, 504.3190).

Compounds **21** to **24** were not purified by chromatography nor fully characterized. However, the crude reaction mixtures were analyzed by analytical HPLC followed by MS.

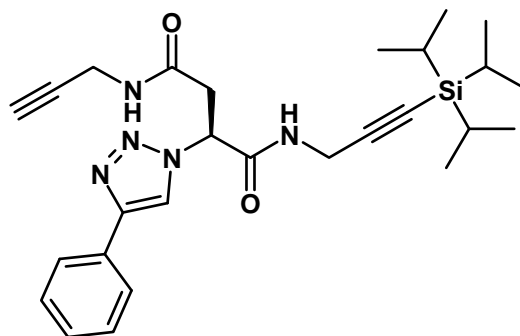
(S)-2-(4-phenyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-N-4-(3-triethylsilyl-prop-2-ynyl)-N-1-(3-triisopropylsilyl-prop-2-ynyl)-succinamide (21)



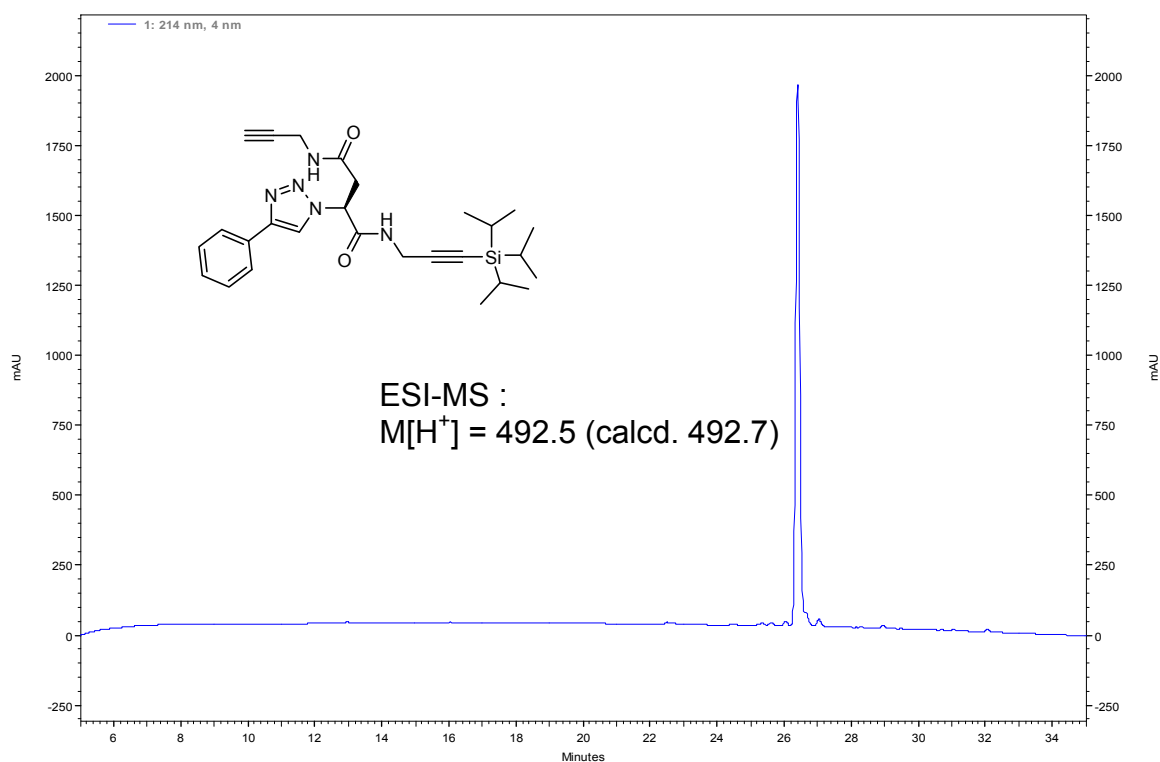
To a solution of **20** (96 mg, 0.19 mmol) and phenylacetylene (59 mg, 0.29 mmol, 1.5 equiv.) in *tert*-butanol (1.9 mL) was added a solution of sodium ascorbate (38 mg, 0.19 mmol, 1 equiv.) in water (0.2 mL) and a solution of CuSO₄ (24 mg, 0.095 mmol, 0.5 equiv.) in water (0.2 mL) consecutively and the solution was allowed to stir for 16 h. The solution was then diluted with EtOAc and washed consecutively with a 1M HCl solution (3 x 5 mL), a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (3 x 5 mL), and a saturated solution of aqueous EDTA (1 x 5 mL). The organic phase was filtered, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to remove excess phenylacetylene (TLC) and afford the desired product **21**.



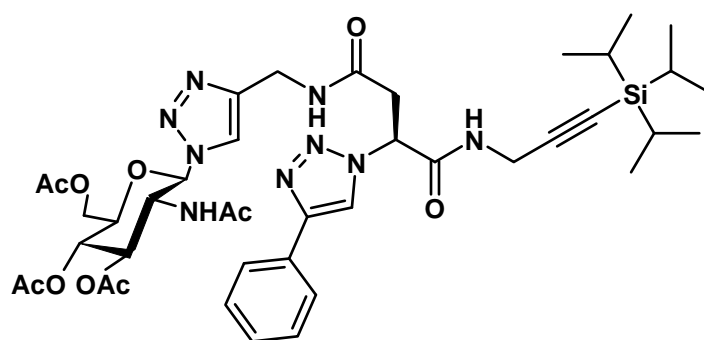
Gradient: 20-95% of B over 30 minutes

(S)-2-(4-Phenyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-N-4-prop-2-ynyl-N-1-(3-triisopropylsilyl-prop-2-ynyl)-succinamide (22)

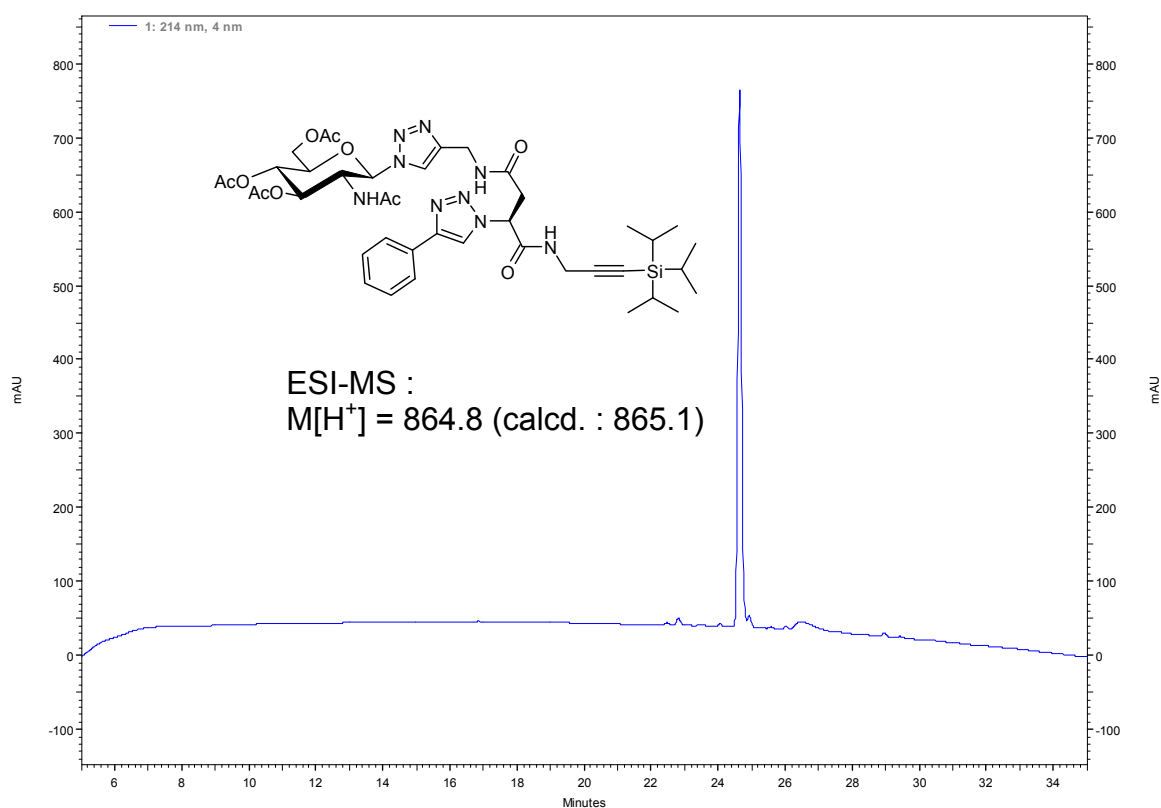
Crude **21** (assumed 0,19 mmol) in CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (7:4:1) (14 mL) was added a solution of silver nitrate (327 mg, 1.9 mmol, 10 equiv.) in the same solvent mixture (5 mL). The resulting mixture was then stirred at room temperature for 8h. An aqueous saturated solution of NH₄Cl (5 mL/mmol) was added. The resulting mixture was then extracted three times with CH₂Cl₂ (5 mL/mmol). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, filtered over celite and concentrated in *vacuo*.



Gradient: 20-95% of B over 30 minutes

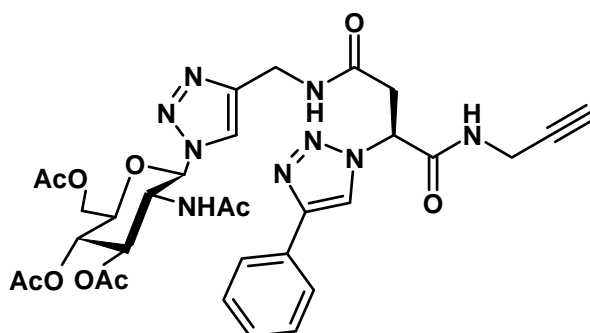
(S)-N-4-(1-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucosylamine]-[1,2,3]triazol-4-ylmethyl)-2-(4-phenyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-N-1-(3-triisopropylsilyl-prop-2-ynyl)-succinamide (23)

To a solution of **22** (assumed 0.19 mmol) and azidoglycoside (106 mg, 1.5 equiv.) in *tert*-butanol (1,8 mL) was added a solution of sodium ascorbate (38 mg, 0.19 mmol, 1 equiv.) in water (0.2 mL) and a solution of CuSO₄ (24 mg, 0.095 mmol, 0.5 equiv.) in water (0.2 mL) consecutively. The solution was allowed to stir for 4h at RT. An alkyne-derivatized resin, prepared through standard HATU/DIEA/DMF coupling of pentynoic acid with amino PEGA[®] 1900 (substitution: 0.6 mmol/g) was added (667 mg, 0.57 mmol/g, 0.19 mmol, 1 equiv) and the reaction mixture stirred for 16 h at RT. The solution was filtrated, then diluted with EtOAc and washed consecutively with a 1M HCl solution (3 x 5 mL), a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (3 x 5 mL), and a saturated solution of aqueous EDTA (1 x 5 mL). The organic phase was filtered, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to afford the crude desired product **23**.

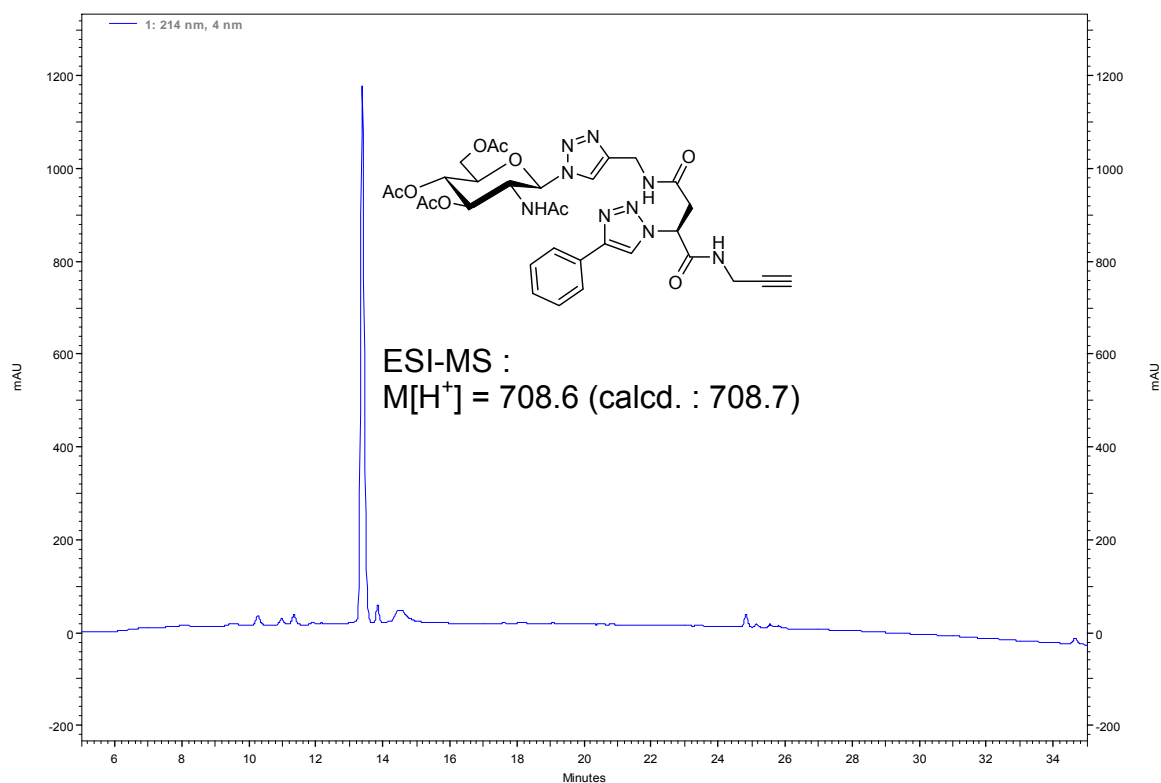


Gradient: 20-95% of B over 30 minutes

(S)-N-4-(1-[2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucosylamine]-[1,2,3]triazol-4-ylmethyl)-2-4-(phenyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-N-1-prop-2-ynyl-succinamide (24)

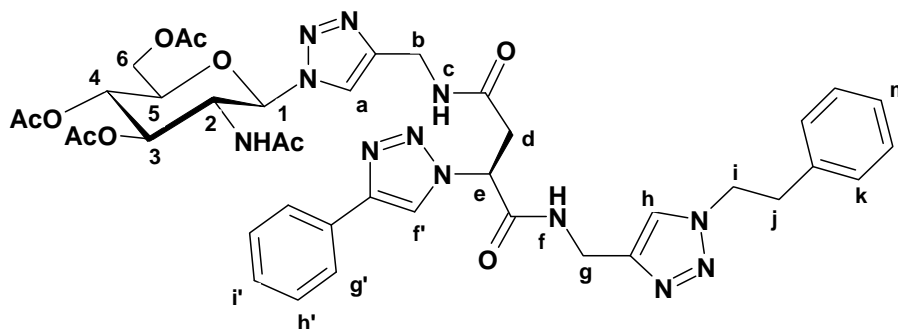


To a solution of **23** (assumed 0.19 mmol) in anhydrous THF (1.5 ml) was added a solution of TBAF trihydrate (90 mg, 0.29 mmol, 1.5 equiv.) in anhydrous THF (0.4 ml) and the mixture was allowed to stir 16 h at RT. The solution was diluted with a 0.1 M HCl solution (5 mL) then extracted with a CHCl₃/*i*PrOH (3:1) mixture (5 x 3 mL). The organic phase was filtered, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. Crude **24** was directly engaged in the next step.



Gradient: 20-95% of B over 30 minutes

***N*-4-(1-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucosylamine]-[1,2,3]triazol-4-ylmethyl)-*N*-1-(1-phenethyl-1H-[1,2,3]triazol-4-ylmethyl)-2-(*S*)-(4-phenyl-[1,2,3]triazol-1-yl)-succinamide (25)**



To a solution of **24** (assumed 0.19 mmol) and (2-azidoethyl)benzene (42 mg, 0.29 mmol, 1.5 equiv.) in *tert*-butanol (1,8 mL) was added a solution of sodium ascorbate (38 mg, 0.19 mmol, 1 equiv.) in water (0.2 mL) and a solution of CuSO₄ (24 mg, 0.095 mmol, 0.5 equiv.) in water (0.2 mL) consecutively and the solution was allowed to stir for 4 h. An alkyne-derivatized resin, was added (667 mg, 0.57 mmol/g, 0.19 mmol, 1 equiv) and the reaction mixture stirred for 16 h at RT. The solution was filtrated, then diluted with EtOAc (15 mL) and washed consecutively with a 1M HCl solution (5 mL), a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (5 mL), and a saturated solution of aqueous EDTA (5 mL). The organic phase was filtered, dried over MgSO₄ and concentrated to afford the crude desired product. Short path flash chromatography on silica gel (eluent : gradient of MeOH in CH₂Cl₂, from 5% to 12%) finally furnished the pure *tris*-triazolo compound **25** as a white amorphous solid (117 mg, 72 % over 5 steps).

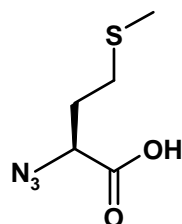
$[\alpha]_D^{20}$ -19.9 (*c* 0.8, CHCl₃/MeOH 1:1).

¹H NMR (500 MHz, (CD₃)₂SO): δ 9.01 (br t, 1H, $J_{\text{CH}_2\text{-NH}} = 5.0$ Hz, H_c or H_f), 8.63 (br t, 1H, $J_{\text{CH}_2\text{-NH}} = 5.0$ Hz, H_f or H_c), 8.58 (s, 1H, H_{f'}), 8.07 (d, 1H, $J_{\text{H}_2\text{-NH}} = 9.0$ Hz, NHAc), 8.049 (s, 0.53H, H_{h_M} or H_{a_M}), 8.035 (s, 0.47H, H_{h_m} or H_{a_m}), 7.86 (br d, 2H, $J_{\text{H_{g'}-H_{h'}}} = 7.5$ Hz, H_{g'}), 7.85 (s, 1H, H_a or H_h), 7.45 (br dd, 2H, $J_{\text{H_{h'}-H_{i'}}} \sim J_{\text{H_{h'}-H_{g'}}} = 7.5$ Hz, H_{h'}), 7.34 (t, 1H, H_{i'}), 7.25 (br t, 2H, $J_{\text{H_l-H_k}} = J_{\text{H_l-H_m}} = 7.0$ Hz, H_l), 7.19 (t, 1H, H_m), 7.17 (br d, 2H, H_k), 6.083 (d, 0.53H, $J_{\text{H₁-H₂}} = 9.5$ Hz, H_{1_M}), 6.078 (d, 0.47H, $J_{\text{H₁-H₂}} = 9.5$ Hz, H_{1_m}), 5.72 (br dd, 1H, $J_{\text{H_e-H_d}} = 7.5$ Hz, H_e), 5.352 (dd, 0.53H, $J_{\text{H₃-H₄}} \sim J_{\text{H₃-H₂}} = 9.5$ Hz, H_{3_M}), 5.347 (dd, 0.47H, $J_{\text{H₃-H₄}} \sim J_{\text{H₃-H₂}} = 9.5$ Hz, H_{3_m}), 5.065 (dd, 0.53H, $J_{\text{H₄-H₅}} = 9.5$ Hz, H_{4_M}), 5.059 (dd, 0.47H, $J_{\text{H₄-H₅}} = 9.5$ Hz, H_{4_m}), 4.55 (br t, 1H, $J_{\text{H_i-H_j}} = 7.0$ Hz, H_i), 4.57-4.48 (m, 1H, H₂), 4.35-4.16 (m, 3H, H_b or H_g, H₅), 4.31 (br t, 2H, H_g or H_b), 4.128 (dd, 0.53H, $J_{\text{H_{6a}-H₅}} = 5.0$ Hz, $J_{\text{H_{6a}-H_{6b}}} = 12.0$ Hz, H_{6a_M}), 4.122 (dd, 0.47H, $J_{\text{H_{6a}-H₅}} = 5.0$ Hz, $J_{\text{H_{6a}-H_{6b}}} = 12.0$ Hz, H_{6a_m}), 4.01 (br dd, 1H, $J_{\text{H_{6b}-H₅}} = 7.0$ Hz, H_{6b}), 3.17 (br dd, 1H, $J_{\text{H_{da}-H_{db}}} = 16.0$ Hz, H_{da}), 3.12-3.06 (m, 1H, H_{db}), 3.11 (t, 2H, H_j), 2.01 (s, 3H, AcO), 1.97 (s, 3H, AcO), 1.94 (s, 3H, AcO), 1.58 (s, 3H, AcNH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO): δ 170.0 (C), 169.6 (C), 169.51 and 169.50 (CO), 169.3 (C), 168.0 and 167.9 (CO), 167.10 and 167.08 (CO), 146.1 (C), 144.8 (C), 144.0 (C), 137.6 (C), 130.6 (C), 128.9 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 127.9 (CH), 126.6 (CH), 125.1 (CH), 122.8 (CH), 121.65 and 121.57 (CH), 121.05 and 120.99 (CH), 84.6 (C1), 73.4 (C5), 72.4 (C3), 68.0 (C4), 61.8 (C6), 59.6 (CH), 52.2 (C2), 50.4 (CH₂), 36.9 (CH₂), 35.7 (CH₂), 34.7 (CH₂), 34.1 (CH₂), 22.4 (CH₃), 20.5 (CH₃), 20.4 (CH₃), 20.3 (CH₃).

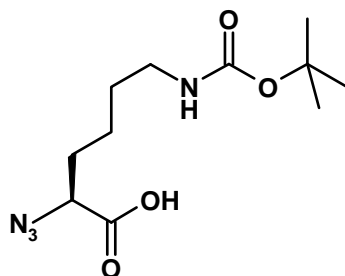
ESI-HRMS: $m/z = 855.3546$, (calcd. for C₄₀H₄₇N₁₂O₁₀, 855.3538).

Part V

(S)-2-azido-4-methylsulfanyl-butyric acid (26) (CAS n° 329281-35-8)

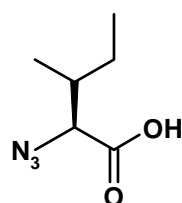
26 was prepared following the procedure E (p.176) with commercial methionine as the amine. The product was obtained as a yellowish oil in 76 % yield. ^1H and ^{13}C data were identical to the reported in the literature.⁴

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 4.24 (dd, 1H, $J_{\text{CH-CH}_a} = 4.5$ Hz, $J_{\text{CH-CH}_b} = 9.0$ Hz), 2.75-2.59 (m, 2H), 2.20-2.03 (m, 2H), 2.12 (s, 3H)

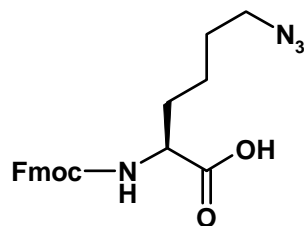
(S)-2-azido-6-tert-butyloxycarbonylamino-hexanoic acid (27) (CAS n° 333366-32-8)

27 was prepared following both procedure E (p.176) (28% yield) and procedure F (p.176) (75% yield) with commercial (S)-2-amino-6-tert-butyloxycarbonylamino-hexanoic acid as the amine. The product was obtained as a yellowish oil. ^1H and ^{13}C data were identical to the reported in the literature.⁴

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 3.92 (t, 1H, $J_{\text{CH-CH}_2} = 5.0$ Hz), 3.16-3.08 (m, 2H), 2.10-1.80 (m, 2H), 1.57-1.45 (m, 4H), 1.44 (s, 9H)

(S)-2-azido-3-methyl-pentanoic acid (28) (CAS n° 159407-40-6)

28 was prepared following the procedure E (p.176) and commercial isoleucine as the amine. The product was obtained as a yellowish oil in 76 % yield. ^1H and ^{13}C data were identical to the reported in the literature.⁴

(S)-6-azido-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-hexanoic acid (29)

A solution of Fmoc-Lys(*t*Boc)-OH (10 g, 16 mmol) was stirred in a mixture of TFA (20 mL, 260 mmol) and CH₂Cl₂ (20 mL) and stirred for 2 hours. The solution was evaporated to dryness to quantitatively furnish the product as an amorphous solid.

L-Fmoc-Lys-OH·TFA (9.3 g, 19.2 mmol) was combined with DIEA (8.4 mL, 47.9 mmol) and CuSO₄ pentahydrate (47.9 mg, 0.19 mmol) distilled H₂O (50 mL) and MeOH (100 mL). The solution of triflyl azide in CH₂Cl₂ (100 mL) was added and the mixture was stirred at RT overnight. Subsequently, the organic solvents were removed under reduced pressure and the aqueous slurry was diluted with a 1M HCl aqueous solution. The aqueous phase was then extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified using flash column chromatography on silica gel (eluent: CH₂Cl₂/MeOH gradient from 99/1 to 98/2) to give the desired product as an oil in 79% yield. (5.89 g).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +10.3 (*c* 1.0, CHCl₃).

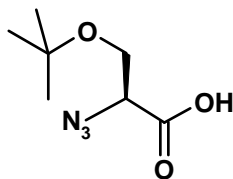
The pure compound shows two rotamers which can be seen by NMR, both have been described. M subscript refers to Major rotamer and m subscript refers to minor rotamer.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.76 (d, 2H, *J*_{CH-CH} = 7.5 Hz, H15), 7.59 (d, 2H, *J*_{CH-CH} = 7.5 Hz, 12H_M), 7.55 (br d, 2H, 12H_m), 7.40 (t, 2H, *J*_{CH-CH} = 7.5 Hz, H14), 7.31 (t, 2H, *J*_{CH-CH} = 7.5 Hz, H13), 6.13 (br d, 1H, H7_m), 5.35 (d, 1H, *J*_{CH-CH} = 6.6 Hz, H7_M), 4.55 (br d, 2H, H9_m), 4.43 (d, 3H, *J*_{CH-CH} = 6.6 Hz, H9_M, H2_M), 4.22 (t, 2H, *J*_{CH-CH} = 6.6 Hz, H10_M, H10_m), 3.98 (br t, 1H, H2_m), 3.28 (t, 2H, *J*_{CH-CH} = 6.6 Hz, H6_M), 3.21 (br t, 2H, H6_m), 1.93 (m, 1H, H3_{aM}), 1.92 (m, 1H, H3_{bM}), 1.63 (m, 4H, H4_M, H2_m), 1.47 (m, 4H, H3_M, H4_m), 1.31 (m, 2H, H3_m).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 176.8 (C_M), 176.2 (C_m), 156.9 (C_m), 156.1 (C_M), 143.7 (C_m), 143.6 (C_M), 141.3 (C), 127.7 (CH), 127.0 (CH), 125.0 (CH), 124.6 (CH), 120.0 (CH), 67.5 (CH_{2m}), 67.1 (CH_{2M}), 54.0 (CH_{2m}), 53.6 (CH_{2M}), 51.0 (CH₂), 47.1 (CH), 31.8 (CH₂), 28.3 (CH₂), 22.4 (CH_{2M}), 22.2 (CH_{2m}).

ESI-HRMS: [M+Na]⁺ = 417.1538 (calcd. for 417.1539).

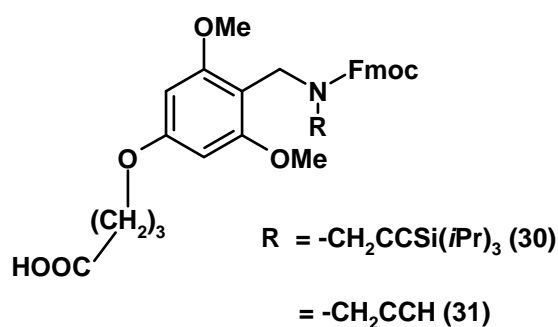
(S)-2-Azido-3-tert-butoxy-propionic acid (30) (CAS n° 333366-25-9)



30 was prepared following the procedure F (p.176) and commercial (S)-2-amino-3-*tert*-butoxy-propionic acid as the amine. The product was obtained as a yellowish oil in 90 % yield. ¹H and ¹³C data were identical to the reported in the literature.⁴

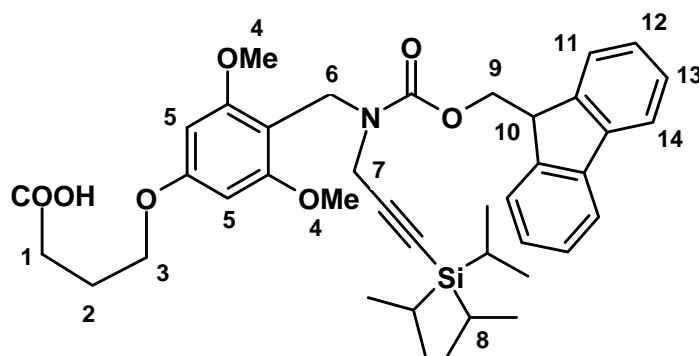
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.99 (dd, 1H, $J_{\text{CH-CH}_2\text{a}} = 5.0$ Hz, $J_{\text{CH-CH}_2\text{b}} = 4.5$ Hz), 3.82 (dd, 1H, $J_{\text{CH-CH}_2\text{a}} = 5.0$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a-CH}_2\text{b}} = 9.0$ Hz), 3.80 (dd, 1H, $J_{\text{CH-CH}_2\text{b}} = 4.5$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{a-CH}_2\text{b}} = 9.5$ Hz), 1.23 (s, 9H)

General procedure G for the preparation of BAL handles 30 and 31 by solution phase reductive amination:



To an ice-cooled solution of 4-(4-Formyl-3,5-dimethoxyphenoxy)butyric acid (500 mg, 1.9 mmol), amine (1 equiv., 1.9 mmol) and TFA (138 μL , 1 equiv., 1.9 mmol) in MeOH (20 mL) was added NaBH_3CN (117 mg, 1 equiv., 1.9 mmol) and the solution was allowed to stir for 1h at RT. The mixture was evaporated to dryness *in vacuo*, and the residue was dissolved in dioxane- H_2O (1:1, 15 mL). NaHCO_3 (475 mg, 3 equiv., 5.7 mmol) was added, the suspension was cooled in an ice bath, and Fmoc-OSu (961 mg, 1.5 equiv., 2.85 mmol) in dioxane (5 mL) was added. The mixture was stirred for 90 min at 0°C , then 18h at RT. The suspension was concentrated *in vacuo*, diluted with EtOAc (150 mL) and washed with a 1M HCl aqueous solution (3 x 50 mL). The organic phase was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was then purified by flash chromatography on silica gel (eluent: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ gradient 99:1 to 98:2) to give the desired product.

4-(4-[[9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-(3-triisopropylsilyl-prop-2-ynyl)-amino]-methyl]-3,5-dimethoxy-phenoxy)-butyric acid (31)



Compound **31** was obtained using procedure G (p.188) using (3-(triisopropylsilyl)prop-2-yn-1-amine, which was prepared as previously described. **31** was obtained in 25% yield as a pale oil.

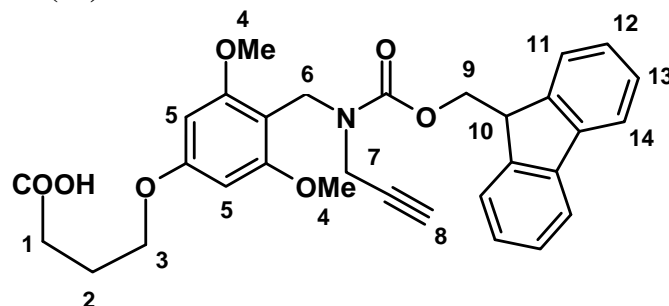
The pure compounds show two rotamers in a 55:45 ratio which can be discriminated by NMR. In the description of the ^1H NMR, M subscript refers to Major rotamer and m subscript refers to minor rotamer.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.76 (d, 2H, $J_{\text{CH-CH}} = 7.5$ Hz, H14), 7.67 (d, 2H, $J_{\text{CH-CH}} = 7.5$ Hz, H11), 7.39 (t, 2H, $J_{\text{CH-CH}} = 7.5$ Hz, H13), 7.29 (t, 2H, $J_{\text{CH-CH}} = 7.5$ Hz, H12), 6.11 (s, 2H, H5), 4.76 (m, 0.9H, H6_m), 4.70 (m, 1.1H, H6_M), 4.38 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}} = 7.0$ Hz, H9), 4.29 (t, 1H, $J_{\text{CH-CH}_2} = 7.0$ Hz, H10), 4.03 (t, 2H, $J_{\text{CH-CH}} = 7.0$ Hz, H1), 4.03 (s, 2H, H7), 3.79 (s, 3.3H, H4_M), 3.72 (s, 2.7H, H4_m), 2.61 (t, 2H, $J_{\text{CH-CH}} = 7.0$ Hz, H3), 2.13 (q, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}_2} = 7.0$ Hz, H2), 1.06 (s, 21H, H8).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 178.1 (C), 160.5 (C), 144.6 (C), 141.5 (C), 127.8 (CH), 127.3 (CH), 125.6 (CH), 120.1 (CH), 105.8 (C), 104.5 (C), 91.2 (C), 83.1 (C), 68.2 (CH_M), 67.9 (CH_m), 66.8 (CH₂), 56.0 (CH₃), 47.7 (CH), 38.6 (CH_{2M}), 38.4 (CH_{2m}), 36.5 (CH_M), 36.1 (CH_m), 30.5 (CH₂), 24.6 (CH₂), 18.9 (CH₃), 11.5 (CH).

ESI-HRMS : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $m/z = 708.3327$ (calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{51}\text{NO}_7\text{NaSi}$, 708.3333)

4-(4-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-prop-2-ynyl-amino]-methyl-3,5-dimethoxy-phenoxy)-butyric acid (32)



Compound **32** was prepared using procedure G (p.188) with commercial propargylamine as the amine. The desired product was obtained as a pale oil in 26% yield.

The pure compounds show two rotamers in a 55:45 ratio which can be discriminated by NMR. In the description of the ^1H NMR, M subscript refers to Major rotamer and m subscript refers to minor rotamer.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.76 (d, 2H, $J_{\text{CH-CH}} = 7.5$ Hz, H14), 7.67 (d, 2H, $J_{\text{CH-CH}} = 7.5$ Hz, H11), 7.39 (t, 2H, $J_{\text{CH-CH}} = 7.5$ Hz, H13), 7.29 (t, 2H, $J_{\text{CH-CH}} = 7.5$ Hz, H12), 6.12 (s, 2H, H5), 4.74 (s, 1.2H, H6_M), 4.68 (s, 0.8H, H6_m), 4.41 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}} = 7.0$ Hz, H9), 4.31 (t, 1H, $J_{\text{CH-CH}_2} = 7.0$ Hz, H10), 4.04 (t, 1H, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}_2} = 7.0$ Hz, H1), 3.96 (s, 2H, H7), 3.79 (s, 2.7H, H4_m), 3.3 (s, 3.6H, H4_M), 2.61 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}_2} = 6.5$ Hz, H3), 2.13 (dt, 2H, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}_2} = 6.5$ Hz, H2), 2.12 (s, 1H, H8).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 178.4 (C), 160.7 (C), 144.5 (C), 141.5 (C), 127.8 (CH), 127.2 (CH), 125.6 (CH), 120.1 (CH), 105.3 (C), 91.1 (C), 80.5 (C), 70.3 (C), 68.2 (CH_2M), 68.0 (CH_2m), 66.8 (CH_2), 55.9 (CH_3), 47.7 (CH), 38.7 (CH_2), 35.3 (CH_2M), 34.9 (CH_2m), 30.5 (CH_2), 24.5 (CH_2).

ESI-HRMS : $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 552.2009$ (calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{NO}_7$, 552.1998)

Fragment (37-59) 33



Compound **31** (2.5 equiv., 0.25 mmol) was loaded on the aminomethyl ChemMatrix[®] resin (179 mg, 0.1 mmol, 0.56 mmol/g) by manual coupling using HATU (95 mg, 0.25 mmol) and DIEA (86 μ l, 0.5 mmol) in DMF for 2 h. The completion of the reaction was checked by the Kaiser test.

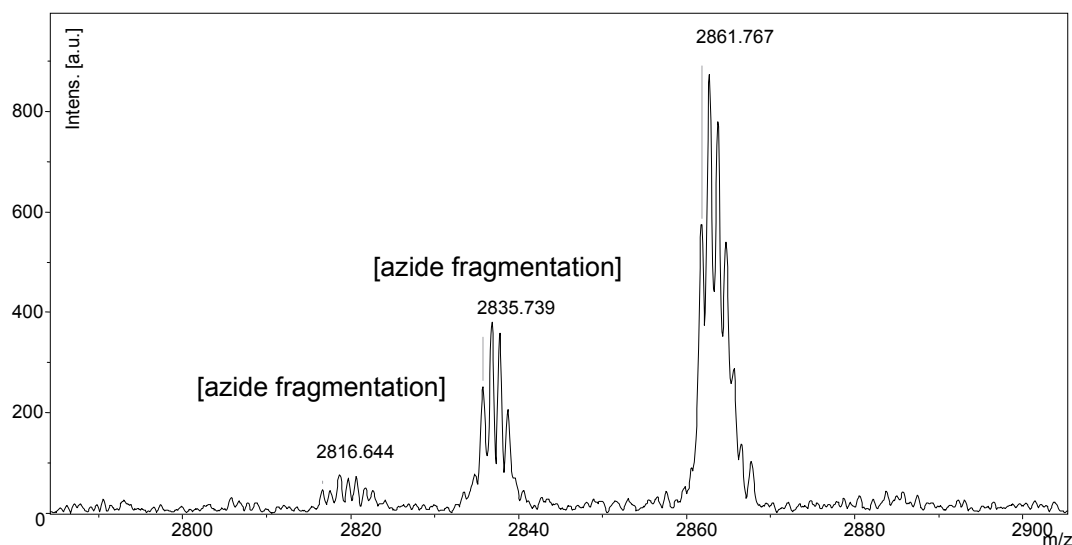
Amino acids 37, 46 to 49 and 59 were coupled manually with HATU (procedure B p.167). Amino acids 44-45 (Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ -pro)-OH) and 50-51 (Fmoc-Gly-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ -pro)-OH) were coupled manually as commercially available pseudoproline dipeptides building blocks following the procedure B (p.167). Amino acids from 58 to 52 and 43 to 38 were coupled by automated solid phase peptide synthesis (procedure A p.167).

The peptide resin was then cleaved and deprotected by a standard 3h treatment with a mixture of TFA/H₂O/TIS/PhOH (87.5:5:2.5:5), and the peptide was precipitated with ice-cold diethyl ether, recovered by centrifugation and washed twice with cold diethyl ether. The precipitate was lyophilised to obtain azido alkyne peptide **33** as a white powder in 80% (not purified).

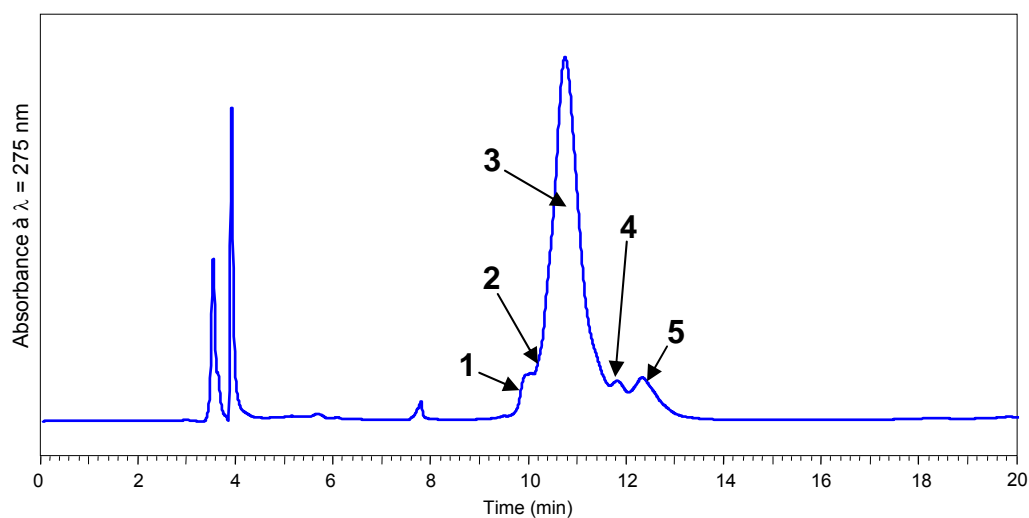
MALDI-TOF calcd for C₁₃₃H₂₁₇N₃₅O₃₃Si [M+H]⁺ *m/z*: 2860.62, found: 2860.68

HPLC analytical gradient : 30-60% B/A over 30 minutes at a 1mL/min flow

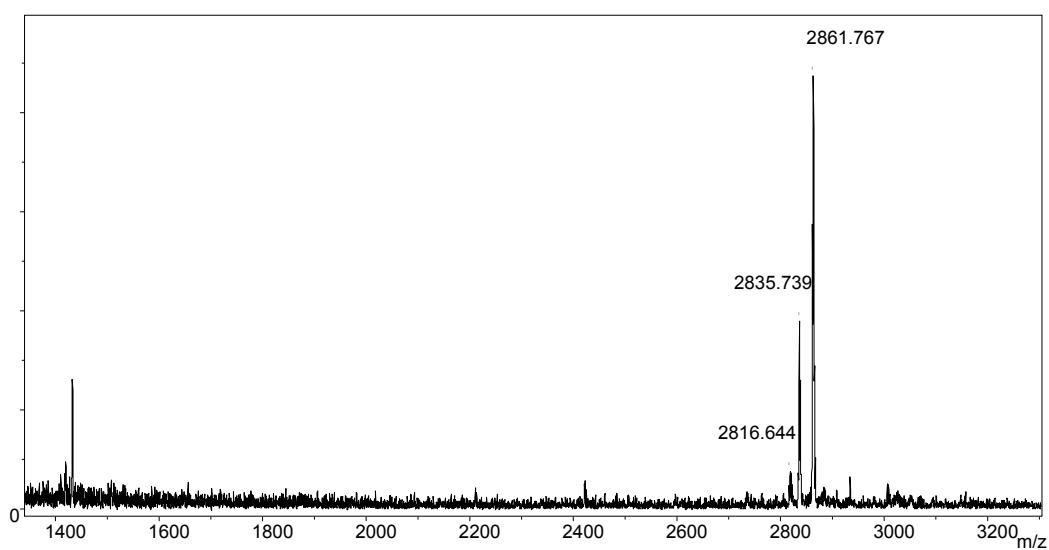
retention time: 10.707 min



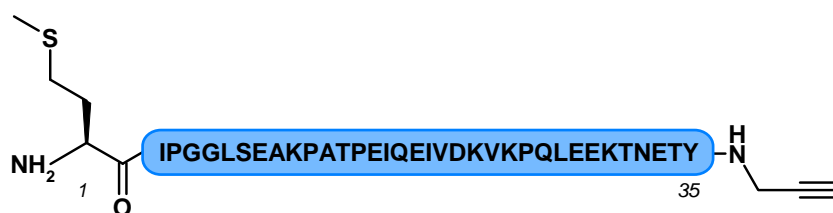
M	pic	Attribué à
2816,7	3	33 – 45 Da
2835,7	3	33 – 26 Da (azide fragmentation)
2861,7	3	33



M	peak	Attribué à
2879,84	1	33 + 18 Da
2046,30	2	Ac-KTQVVAGTNYIYIKVRA-NHCH ₂ CCSi(<i>i</i> Pr) ₃
2337,39	2	Ac-QYKTQVVAGTNYIYIKVRA-NHCH ₂ CCSi(<i>i</i> Pr) ₃
2707,29	2	H-LEAVQYKTQVVAGTNYIYIKVRA-NHCH ₂ CCSi(<i>i</i> Pr) ₃
2814,95	3	33 – 46 Da (azide fragmentation)
2838,71	3	33 – 26 Da (azide fragmentation)
2861,70	3	33
1590,01	4	Ac-VAGTNYIYIKVRA-NHCH ₂ CCSi(<i>i</i> Pr) ₃
2749,52	4	Ac-LEAVQYKTQVVAGTNYIYIKVRA-NHCH ₂ CCSi(<i>i</i> Pr) ₃



HPLC traces and MS spectra of compound of **33**; gradient G

Fragment (1-35) **34a**

Compound **32** (2.5 equiv., 0.25 mmol) was loaded on the aminomethyl ChemMatrix[®] resin (179 mg, 0.1 mmol, 0.56 mmol/g) by manual coupling using HATU (95 mg, 0.25 mmol) and DIEA (86 μ l, 0.5 mmol) in DMF for 2 h. The completion of the reaction was checked by the Kaiser test.

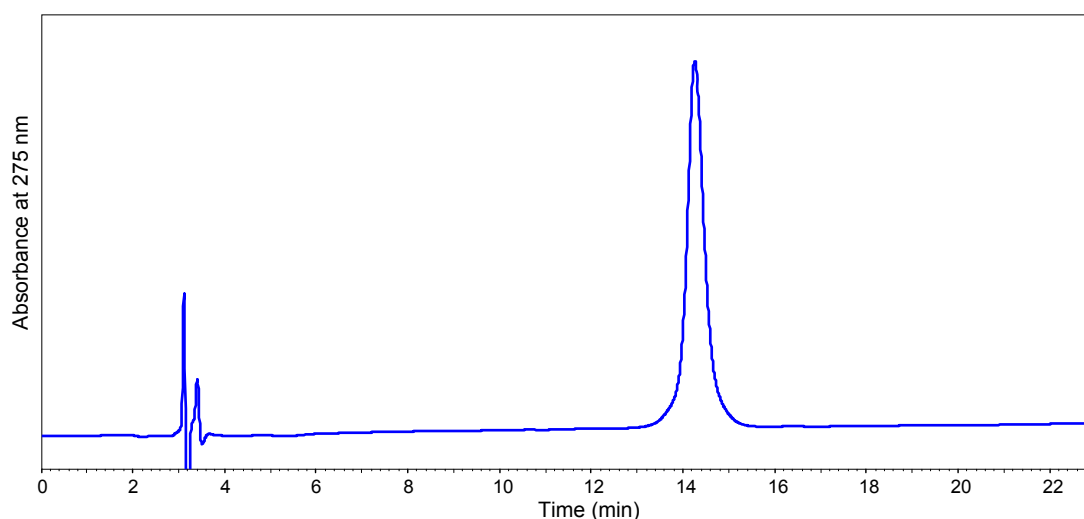
Amino acids 35 to 32 and 3 to 1 were coupled manually with HATU (procedure B p.167). Amino acids 31 and 30 were coupled manually as the commercially available pseudoproline dipeptide building block (Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\psi^{\text{Me, Me}}$ -Pro)-OH) following the procedure B (p.167). Amino acids from 29 to 4 were coupled by automated solid phase peptide synthesis (procedure A p.167). During the automated synthesis, amino acids 28 to 23, 16, 6 to 4 were coupled twice following the automated program for double couplings.

The peptide resin was then cleaved and deprotected by a standard 2h treatment with a mixture of TFA/H₂O/TIS/PhOH (87.5:5:2.5:5), and the peptide was precipitated with ice-cold diethyl ether, recovered by centrifugation and washed twice with cold diethyl ether. The resulting solid was purified by semi-preparative HPLC using a 24-30% B/A gradient over 30 min at 3 mL/min flow to give the C-terminal propargylamide peptide **34a** as a white powder in a yield estimated to 45% yield.

MALDI-TOF calcd for C₁₇₄H₂₈₃N₄₃O₅₇S [M+H]⁺ *m/z*: 3920.03, found: 3920.42

HPLC analytical gradient : 27-37% B/A over 20 minutes at a 1mL/min flow

retention time: 14.26 min



HPLC traces of compound of **34a**; gradient C

Fragment (1-35) **34b****X = Norleucine ((S)-2-aminohexanoic acid)**

Compound **32** (2.5 equiv., 0.25 mmol) was loaded on the aminomethyl ChemMatrix[®] resin (179 mg, 0.1 mmol, 0.56 mmol/g) by manual coupling using HATU (95 mg, 0.25 mmol) and DIEA (86 μ l, 0.5 mmol) in DMF for 2 h. The completion of the reaction was checked by the Kaiser test.

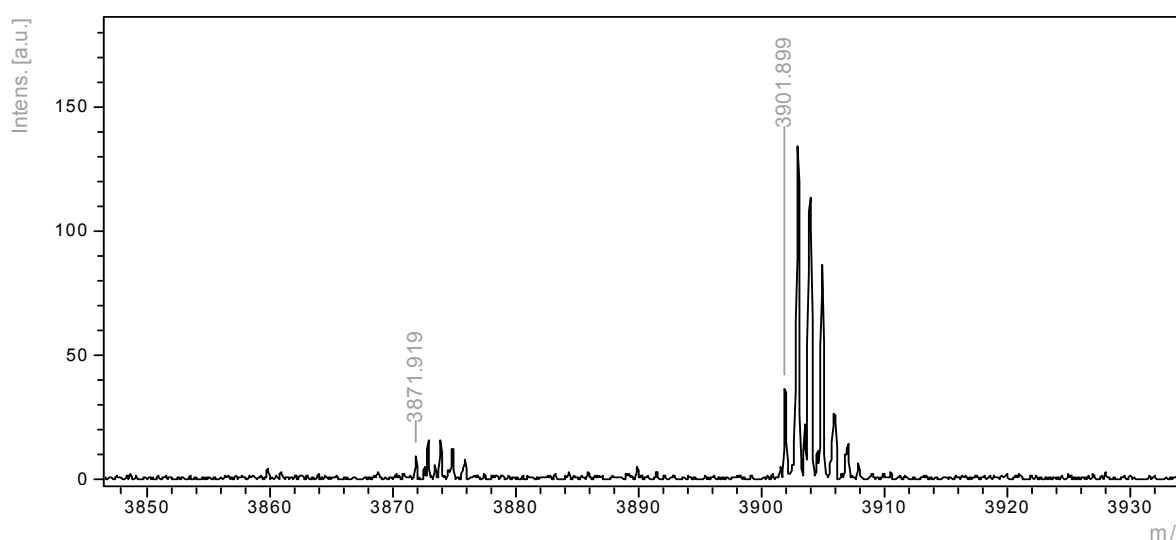
Amino acids 35 to 32 and 3 to 1 were coupled manually with HATU (procedure B p.167). Amino acids 31 and 30 were coupled manually as the commercially available pseudoproline dipeptide building block (Fmoc-Lys(Boc)-Thr($\psi^{Me, Me}$ -Pro)-OH) following the procedure B (p.167). Amino acids from 29 to 4 were coupled by automated solid phase peptide synthesis (procedure A p.167). During the automated synthesis, amino acids 28 to 23, 16, 6 to 4 were coupled twice following the automated program for double couplings.

The peptide resin was then cleaved and deprotected by a standard 2h treatment with a mixture of TFA/H₂O/TIS/PhOH (87.5:5:2.5:5), and the peptide was precipitated with ice-cold diethyl ether, recovered by centrifugation and washed twice with cold diethyl ether. The resulting solid was purified by semi-preparatory HPLC using a 24-30% B/A gradient over 30 min at 3 mL/min flow to give the C-terminal propargylamide peptide **34b** as a white powder in a yield estimated to 45% yield.

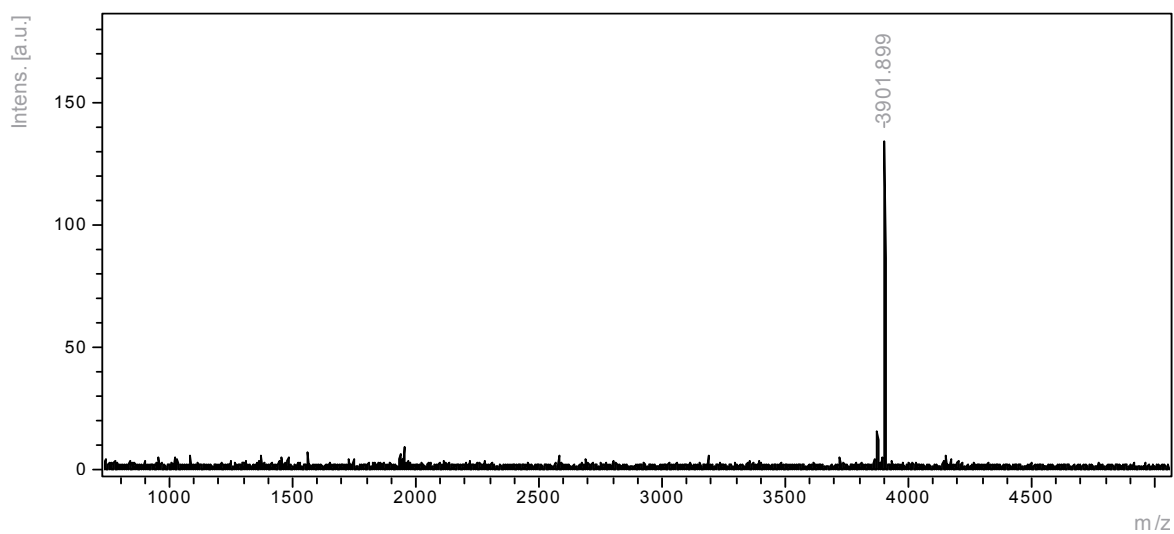
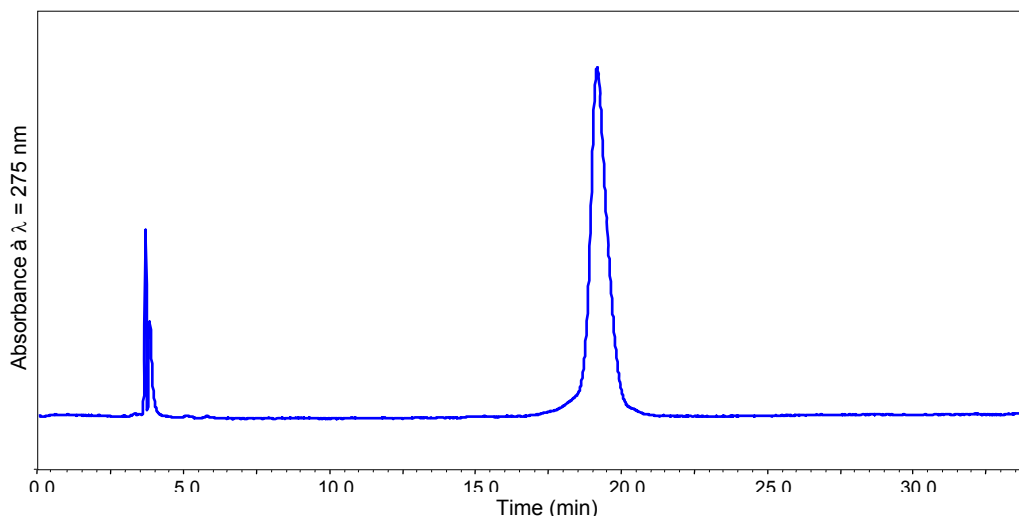
MALDI-TOF calcd for C₁₇₅H₂₈₅N₄₃O₅₇ [M+H]⁺ *m/z*: 3901.07, found: 3901.01

HPLC analytical gradient : 26-36% B/A over 30 minutes at a 1mL/min flow

retention time: 19.15 min



M	Structure
3870.92	34b – 30 Da
3900.90	34b



HPLC traces and MS spectra of compound of **34b**; gradient D

Synthesis of fragment (61-98) 35



Fmoc-Phe-[4-(oxymethyl)-phenoxy-propan-3-oic acid] (2.5 equiv., 0.25 mmol) was loaded to the aminomethyl ChemMatrix[®] resin (179 mg, 0.1 mmol, 0.56 mmol/g) by manual coupling using HATU (95 mg, 0.25 mmol) and DIEA (86 μ l, 0.5 mmol) in DMF for 2 h. The completion of the reaction was checked by the Kaiser test.

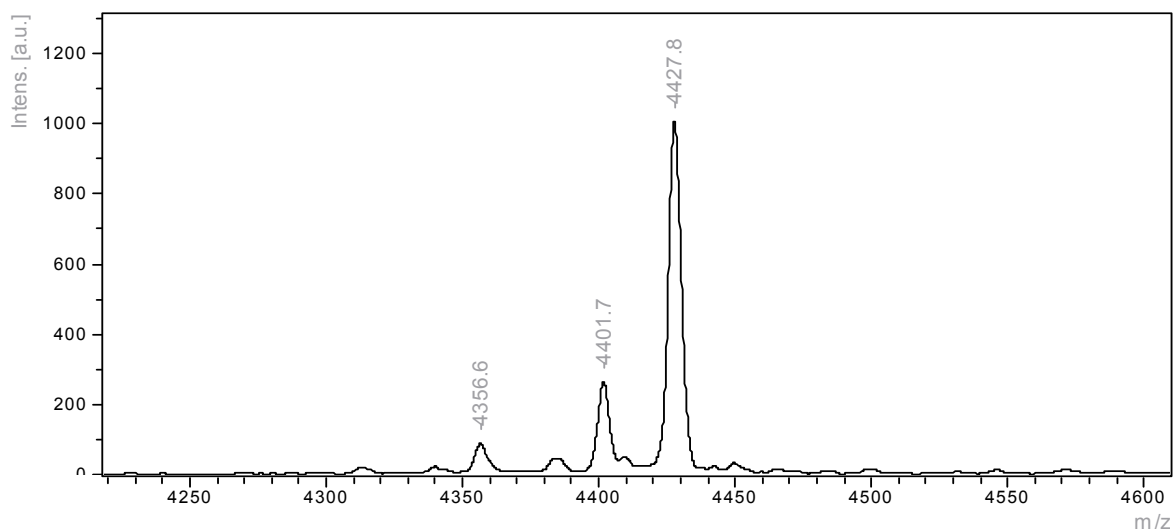
The azidoamino acid 61 was coupled manually with HATU (procedure B p.167). Amino acids from 62 to 67 were coupled by double coupling procedure and amino acids from 98 to 68 were coupled by automated solid phase peptide synthesis following the procedure A (p.167).

The peptide resin was then cleaved and deprotected by a standard 2h treatment with a mixture of TFA/H₂O/*i*Pr₃SiH /phenol (87.5:5:2.5:5), and the peptide was precipitated and washed twice with ice-cold diethyl ether. The resulting solid was purified by semi-preparatory HPLC with a 28-30% B/A gradient over 30 min at 3 mL/min flow to give the N-terminally modified azido peptide as a white powder in 30% yield.

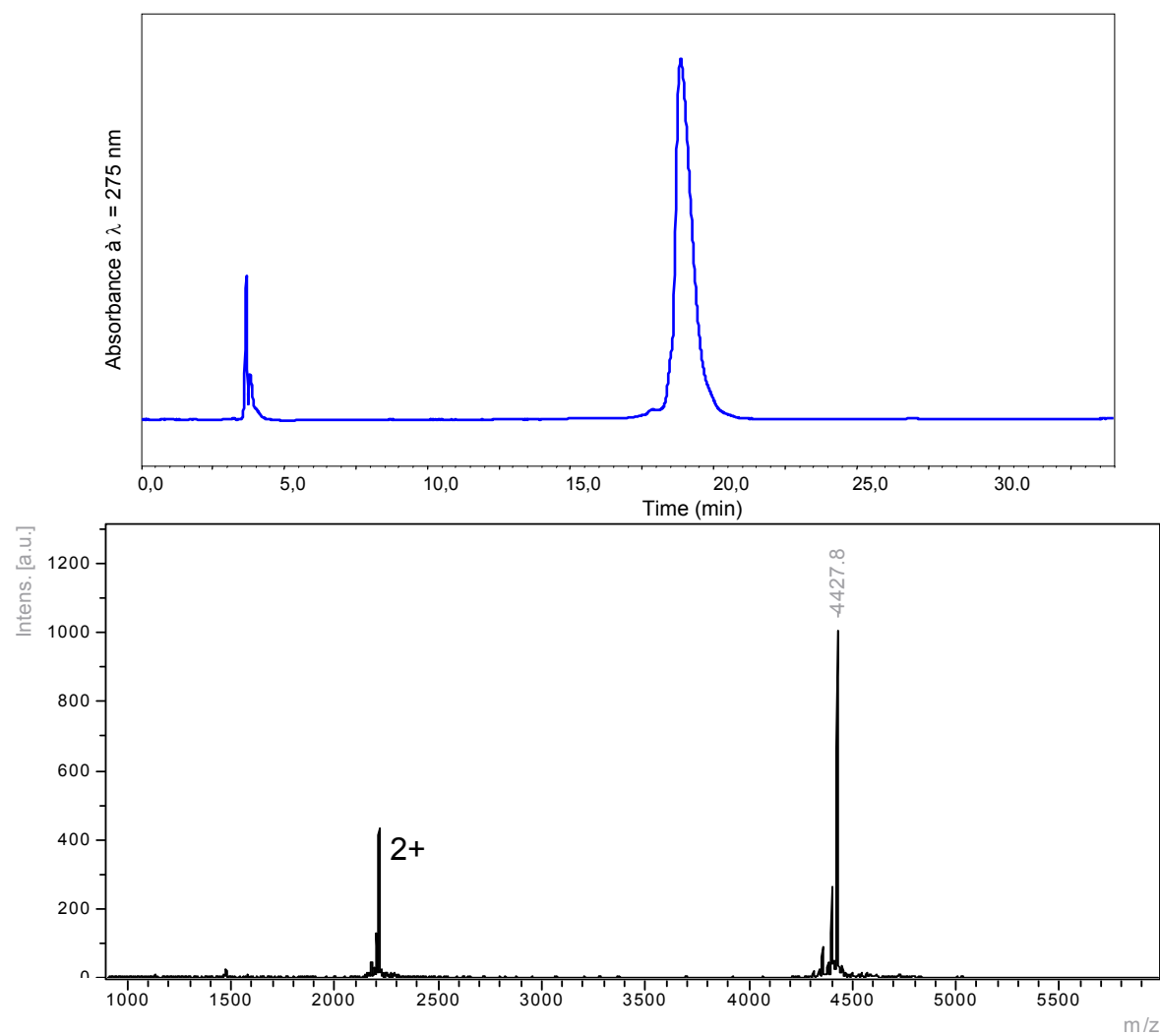
MALDI-TOF calcd for C₁₉₆H₃₀₂N₅₂O₆₃S [M+H]⁺ *m/z*: 4426.9, found: 4426.8

HPLC analytical gradient : 26-36% B/A over 30 minutes at a 1mL/min flow

retention time: 18.847 min



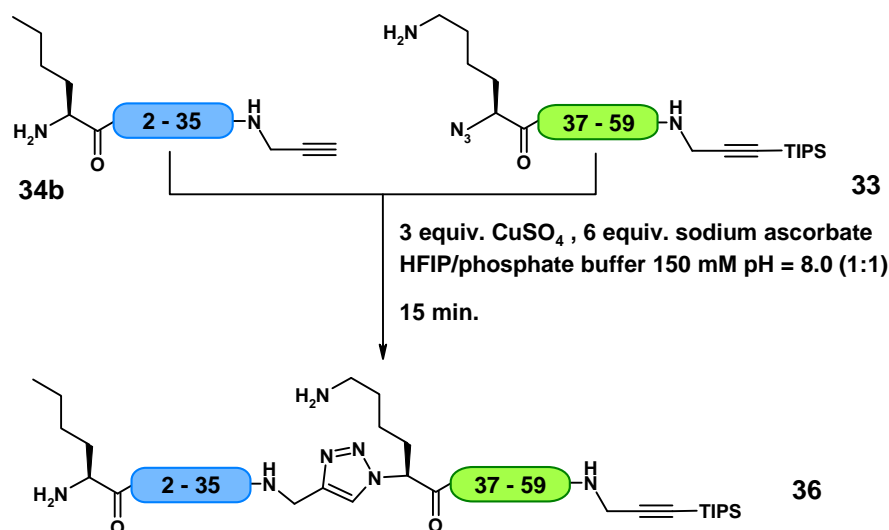
M	Structure
4355.6	35 – 71 Da
4400.7	35 – 26 Da (azide fragmentation)
4426.8	35



HPLC traces and MS spectra of compound of **35**; gradient D

CuAAC ligations

Pseudo-peptide 36



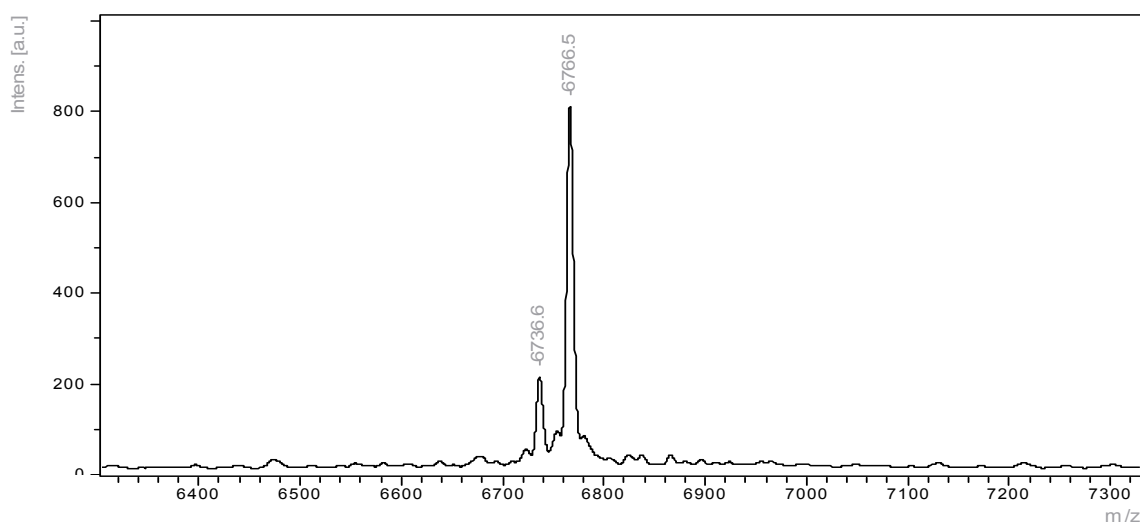
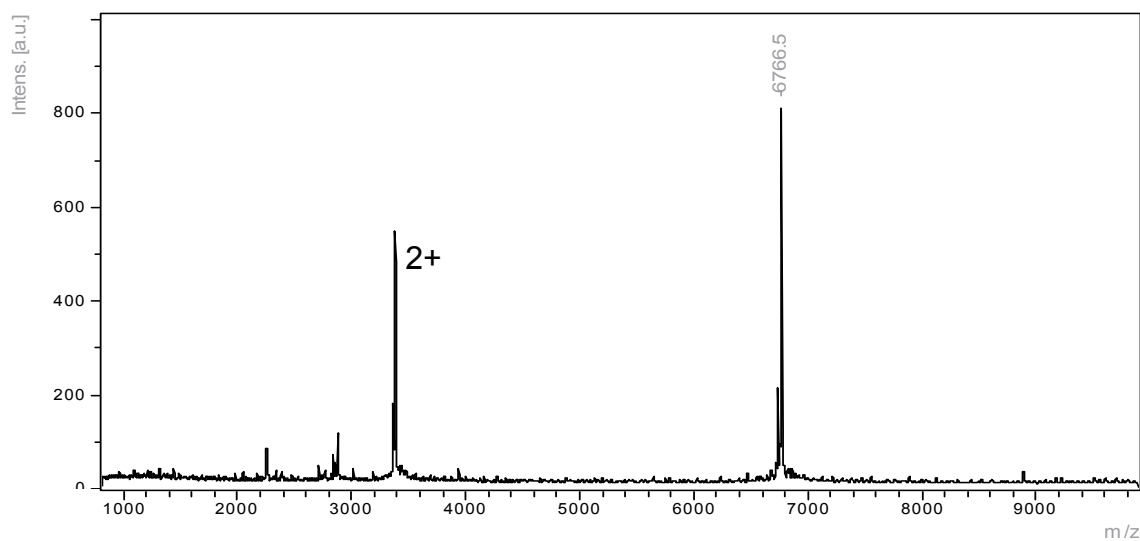
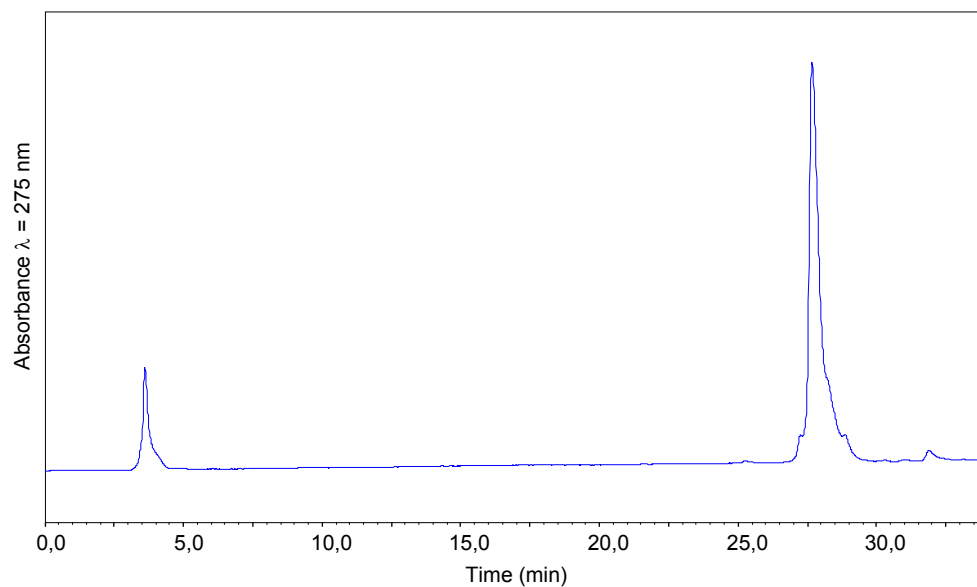
To a solution of **34b** (8.0 mg, 1.84 μmol) and **33** (7.3 mg, 2.2 μmol , 1.2 equiv) in 500 μL of degassed HFIP under argon was added 500 μL of 150 mM phosphate buffer pH = 8.0. In case of precipitation at this step, the mixture was added a small amount of degassed HFIP until the precipitate disappears. A fresh Cu(I) solution was prepared by adding 100 μL of a 0.5 M CuSO₄ pentahydrate solution to 100 μL of an ice-cold 1M solution of sodium ascorbate followed by vigorous stirring. 22 μL (5.5 μmol , 3 equiv) of the preformed solution of Cu (I) were added to the ligation mixture and the reaction was allowed to stir for 15 min at RT. The resulting mixture was diluted with demineralised water (2 mL) to allow quantitative precipitation of **36**. After centrifugation, the precipitate was recovered by centrifugation then successively washed with a 100 mM EDTA solution pH = 4.5 (3 x 500 μL) and demineralized water (3 x 500 μL). The precipitate was finally suspended in demineralised water, lyophilised and used in the next step without further purification.

MALDI-TOF calcd for **35a** C₃₀₈H₅₀₂N₇₈O₉₀Si [M+H]⁺ *m/z*: 6766.0, found: 6765.5.

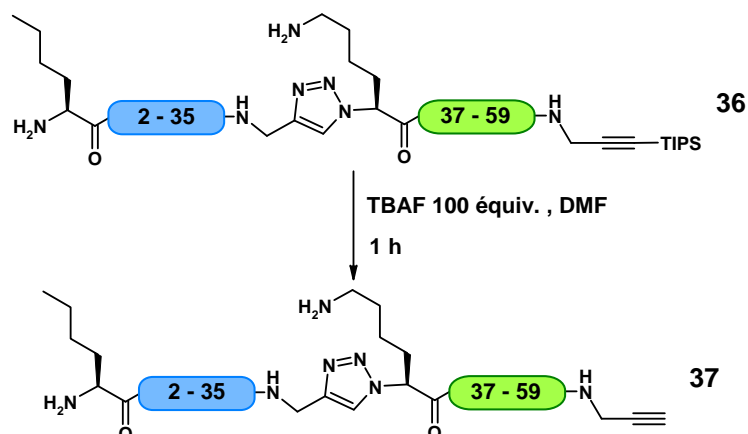
HPLC analytical gradient : 20-50% B/A over 30 minutes at a 1 mL/min flow

retention time: 27.67 min

MALDI-TOF calcd for **35b** C₃₀₈H₅₀₂N₇₈O₉₀Si [M+H]⁺ *m/z*: 6766.0, found: 6765.5.



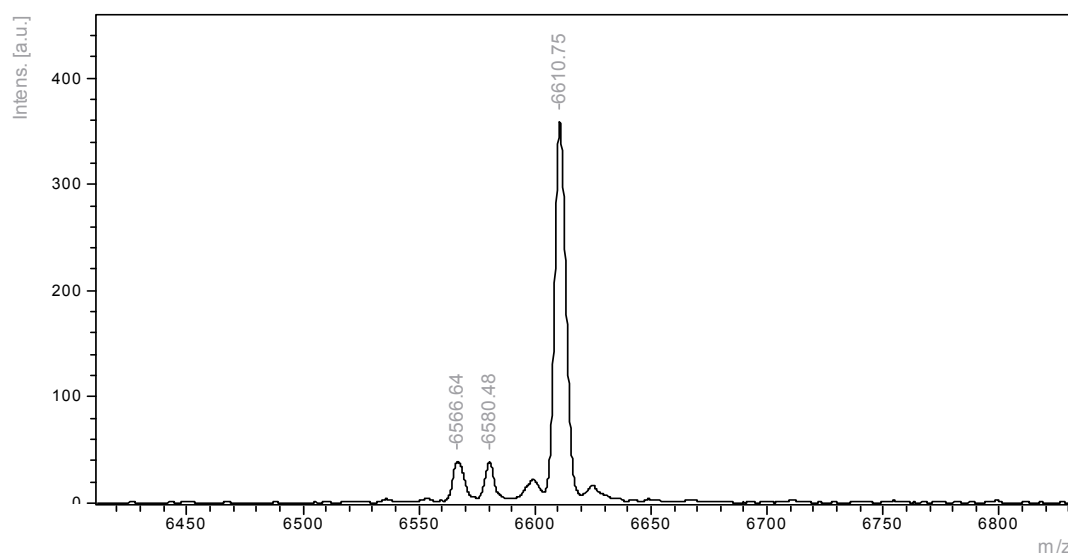
HPLC traces and MS spectra of compound of **36**; gradient G

Pseudo-peptide **37**

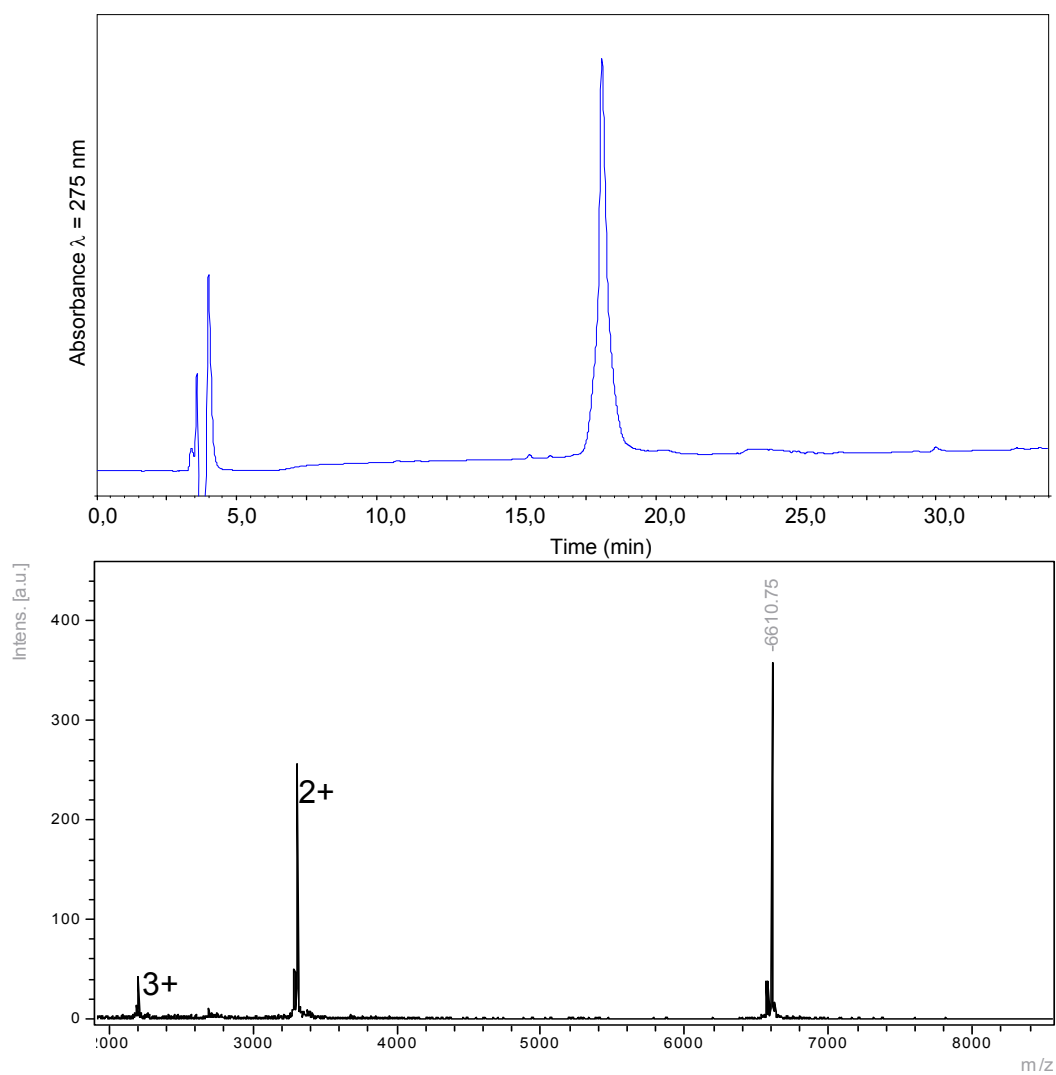
To a suspension of crude **36** (assumed 1.84 μmol) in DMF (20mL) was added 29 mg (0.09 mmol, 50 equiv.) of TBAF. The reaction was then allowed to stir for 1h at RT. The clear DMF solution was concentrated under reduced pressure up to a volume of 2 mL, diluted with demineralized water and purified by semi-preparatory HPLC with a 25-33% B/A gradient over 16 min at 5 mL/min flow to afford **37** in 47% yield starting from .

MALDI-TOF calcd for $\text{C}_{299}\text{H}_{482}\text{N}_{78}\text{O}_{90}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z : 6609.6, found: 6609.6.

HPLC analytical gradient : 20-50% B/A over 30 minutes at a 1mL/min flow
retention time: 18.05 min

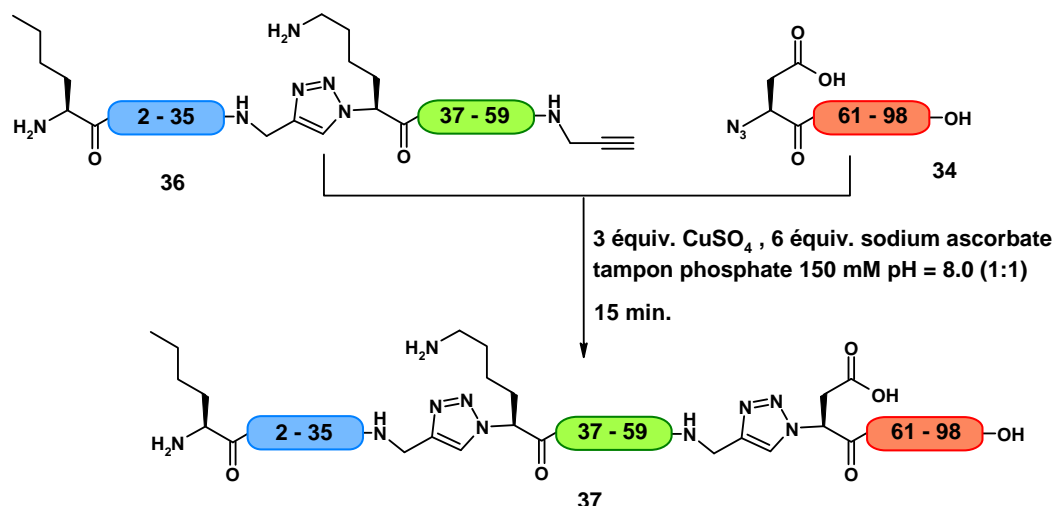


M	Structure
6566.6	37 – 44 Da
6580.5	37 – 30 Da
6610.7	37



HPLC traces and MS spectra of compound of **37**; gradient G at 55°C

Pseudo-peptide 38

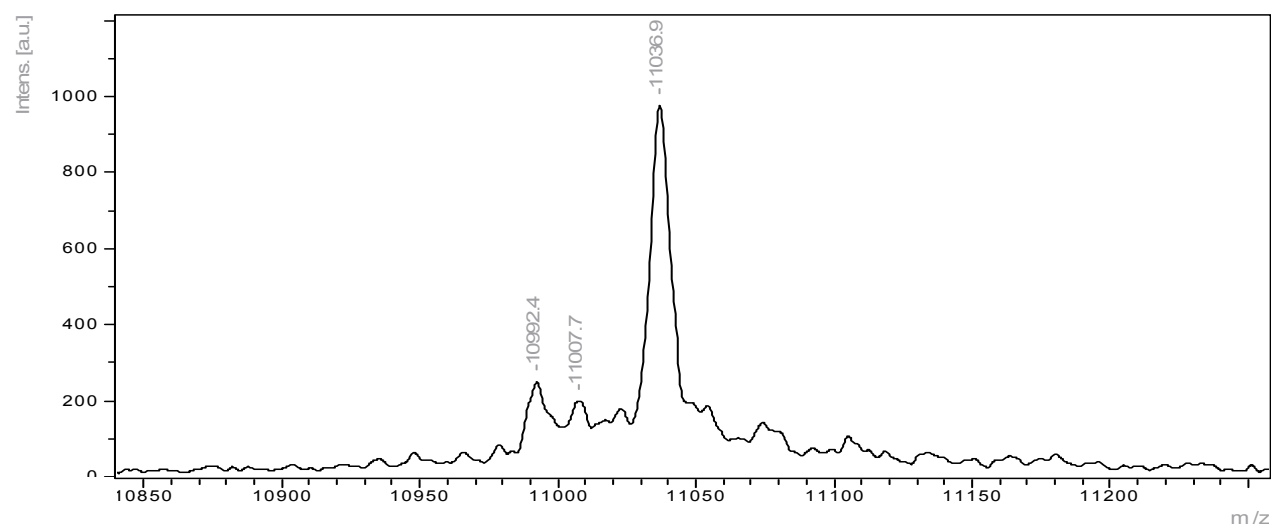


To a solution of **37** (6.5 mg, 0.98 μmol) and **35** (5.4 mg, 1.04 μmol , 1.2 equiv.) in 1 mL of degassed 150 mM phosphate buffer pH 8.0 under Ar atmosphere was added 16 μL of a fresh 0.25M Cu(I) solution prepared as described for the preparation of **36**. The reaction was allowed to stir for 30 min at RT. The reaction completion was checked by HPLC. The mixture was purified by HPLC with a 20-50% B/A gradient over 30 min at 55 $^{\circ}\text{C}$ at a 1 mL/min flow to afford the desired *bis*-triazolo peptide in 57% yield (6.2 mg).

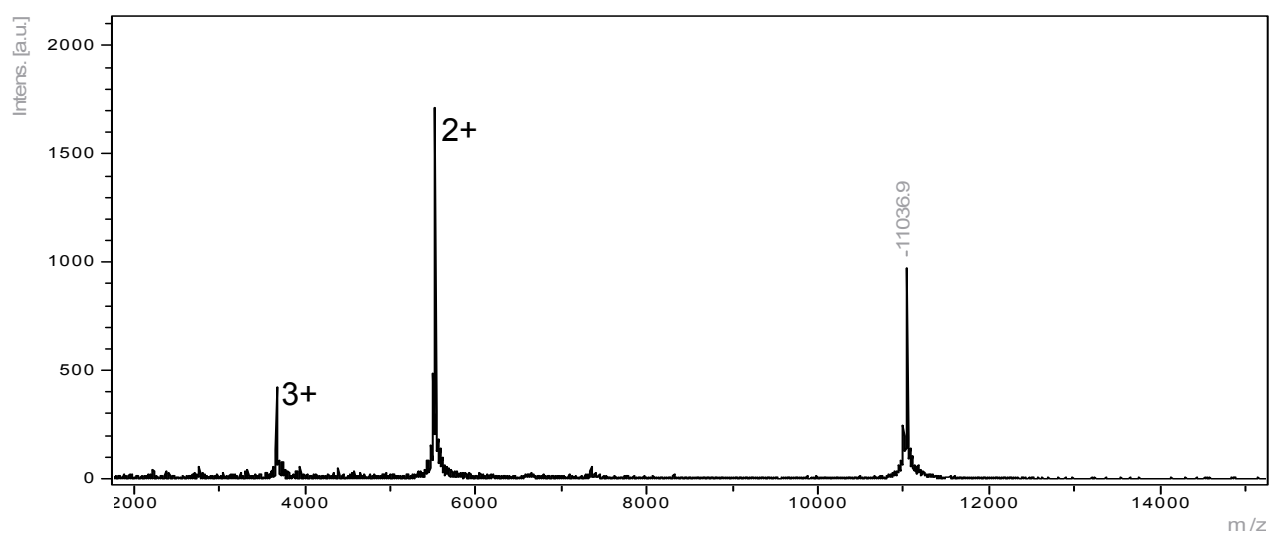
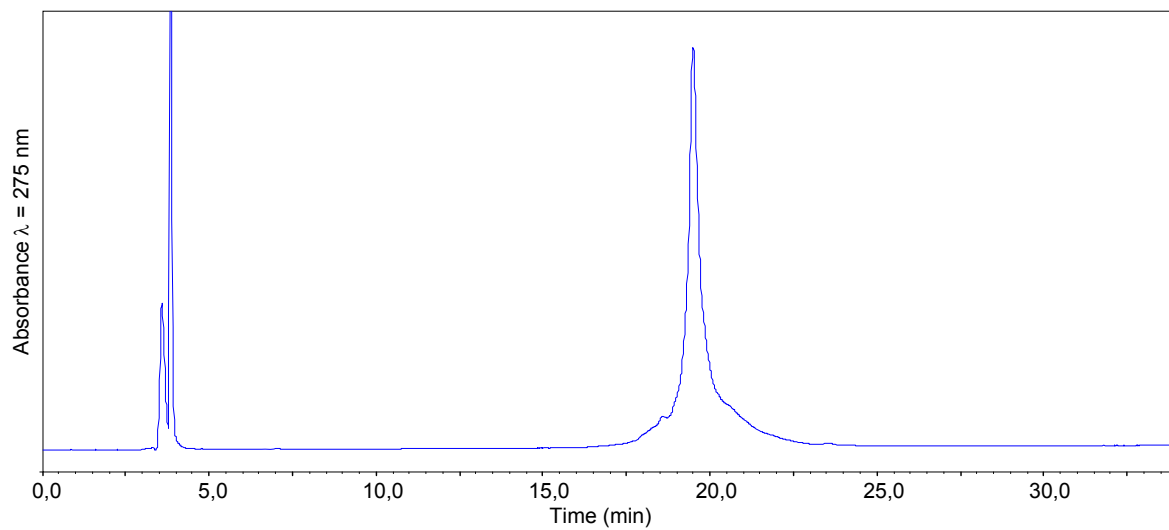
MALDI-TOF calcd for $\text{C}_{495}\text{H}_{784}\text{N}_{130}\text{O}_{153}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z : 11036.6, found: 11035.8.

HPLC analytical gradient : 20-50% B/A over 30 minutes at 55 $^{\circ}\text{C}$ at a 1 mL/min flow

retention time: 19.60 min



M	Structure
10992.4	38 – 44 Da
11007.7	38 – 29 Da
11036.9	38



HPLC traces and MS spectra of compound of **38** ; gradient G at 55°C

Procedure for the evaluation of biological activity

Z-FR-AMC was purchased from Bachem (Weil am Rhein, France), papain was purchased from Roche Diagnostics (Meylan, France).

The activation buffer was a 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.0 containing 1mM disodium EDTA and 2 mM DTT. A stock solution of papain was prepared according to specifications furnished by G. Lalmanach. 10 μ L of the commercial suspension of papain were added to 70 μ L of demineralized water and allowed to dissolve for approximately 10 minutes. The resulting solution was then added 80 μ L of 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.0 to afford a \sim 45 μ M solution of papain. This papain solution was then diluted to 1 μ M with a 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.0.

Papain (1 nM) was incubated in the activation buffer for 15 min at 37°C. After addition of Z-FR-AMC (5 μ M) the residual enzymatic activity was followed by monitoring the fluorescence release (FluoroMax2, Jobin-Yvon) with λ_{ex} : 350 nm and λ_{em} : 460 nm. For the evaluation of biological activity, papain (1 nM) was incubated with **38** (1 nM or 10 nM) in the activation buffer for 15 min at 37°C. After addition of Z-FR-AMC (5 μ M) the residual enzymatic activity was followed by monitoring the fluorescence release with λ_{ex} : 350 nm and λ_{em} : 460 nm.

Procedure for circular dichroism measurements

Recombinant Stefin A was purchased from R&D Systems Europe (Lille, France)

Circular dichroism measurements were performed on a Jasco J810 spectropolarimeter. Data acquisition and analysis were performed on a computer interfaced to the spectrometer. The temperature was adjusted to 37 \pm 0.2°C with a Jasco Peltier-type temperature controller system (PTC-423S). The experiments were run under nitrogen. Samples were scanned 3 to 4 times at 100 nm/min with a time constant of 2 s, usually over a wavelength range of 200 \pm 260 nm in a 0,1 cm path length cuvette. The data were averaged, and the spectrum of a sodium phosphate buffer solution 0.1M was subtracted. The resulting spectra were then smoothed. Optical activities were reported as ellipticity per peptidic bond ($[\theta] \cdot 10^{-3}$ degrees \cdot cm²/decimole).

Procedures for pH and thermal stability measurements

A) pH resistance: Each stefin A (100 nM) was preincubated during one hour at different pH. Assays were performed in 0.1 M citrate buffer, pH 3.0; 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5; 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 and 0.1 M sodium carbonate-bicarbonate buffer, pH 10.5. Papain (1.7 nM) was incubated in the activation buffer (0.1 M sodium acetate buffer pH 5.5, containing 2 mM DTT, 2 mM EDTA, 0.01% Brij35), with a aliquot (3.5 μ l) of each buffer (control) or either with rec. stefin A or *bis*-triazolo stefin A (final concentration: 1 nM). Residual activity was triggered by adding the fluorogenic substrate Z-FR-AMC (7 μ M) and recorded continuously with a microtiterplate reader at 30°C with λ_{ex} : 350 nm and λ_{em} : 460 nm (Gemini spectrofluorimeter, Molecular Devices, France).

B) Thermal resistance: Each stefin A (100 nM) was preincubated during one hour at different temperatures. Samples were cooled at room temperature for several minutes before kinetics measurement with papain.

Experiments were repeated in triplicate and values expressed as median (+/- quartiles).

Procedures for K_i measurements

Cathepsins B, H and L purified from human liver were supplied by Calbiochem (VWR International, Libourne, France). Cathepsins were activated in assay buffer, *i.e.* 0.1 M acetate buffer pH 5.5, containing 2 mM DTT and 2 mM EDTA, Brij35 0.01% for 5 min at 37°C prior to kinetic assays (Kontron SFM25 spectrofluorimeter; excitation wavelength: 350 nm; emission wavelength: 460 nm). Cathepsins were titrated using E-64 as active site reagent⁶ and Z-Phe-Arg-AMC as substrate.

Inhibition constant $K_{i(app)}$ were determined under experimental conditions that gave non-linear dose-response curves as described elsewhere.⁷ Data were plotted using the Easson and Stedman procedure and fitted with Enzfitter software (Biosoft, Cambridge). Enzyme concentration $[E_0]$ were at least 1-10 higher than K_i value and less than 5% of substrate (using Z-Phe-Arg-AMC as substrate for cathepsins B and L and H-Arg-AMC for cathepsin H) was hydrolyzed during these experiments. K_i values were calculated from $K_{i(app)}$ values according to equation (1):

$$K_i = K_{i(app)} / (1 + S_0/K_m) \quad (1)$$

Michaelis constant (K_m) for wild type cathepsins B, L and H were determined as previously reported.⁸

Rate constant for association (k_{ass}) between cathepsins B and L *bis*-triazolo steffin A was determined by monitoring the time dependence of association of equimolar amounts of enzyme and inhibitor active site.⁹ Aliquots were incubated at 37°C and the residual activity was measured as a function of time after addition of Z-Phe-Arg-AMC (3,3 μ M). Fractional activity was plotted against time according to equation (2):

$$1/[E] = k_{ass}t + 1/[E_0] \quad (2)$$

with $[E_0]$ the initial enzyme concentration and $[E]$ the enzyme concentration at time t . The rate constant for dissociation (k_{diss}) was calculated from the experimental values of K_i and k_{ass} which are related to k_{diss} as follows:

$$k_{diss} = K_i \times k_{ass} \quad (3)$$

Procedures for *in vivo* gelatinolytic activity abrogation of MDA-MB-231 cells

Living MDA-231 cells (30×10^5 cells /ml) were grown on reconstituted membrane (50 μ l of Matrigel: 10 mg/ml) containing dye-quenched (DQ)-gelatin (25 μ g/ml) with and without inhibitors and imaged with a fluorescence microscope (REF). Green fluorescence depicts cleavage products of (DQ)-gelatin and blue fluorescence corresponds to DAPI-labeled nuclei.

⁶ Barrett, A. J.; Kembhavi, A. A.; Brown, M. A.; Kirschke, H.; Knight, C. G.; Tamai, M.; Hanada, K. *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189-198

⁷ Moreau, T.; Gutman, N.; el Moujahed, A.; Esnard, F.; Gauthier, F. *Eur. J. Biochem.* **1986**, *159*, 341-346

⁸ Lecaille, F.; Weidauer, E.; Juliano, M. A.; Brömme, D.; Lalmanach, G. *Biochem. J.* **2003**, *375*, 307-312

⁹ Bieth, J. G. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **1980**, *16 Suppl*, 183-197

Part VI

Peptide 39



A commercial Rink linker (4-[4-(2,4-dimethoxybenzoyl)phenoxy]butyric acid) (2.5 equiv., 0.25 mmol) was loaded on the aminomethyl PEGA[®] 800 resin (0.1 mmol, 0.4 mmol/g) by manual coupling using HATU (95 mg, 2.5 equiv., 0.25 mmol) and DIEA (86 μ l, 5 equiv., 0.5 mmol) in DMF for 2 h. The completion of the reaction was checked by the Kaiser test.

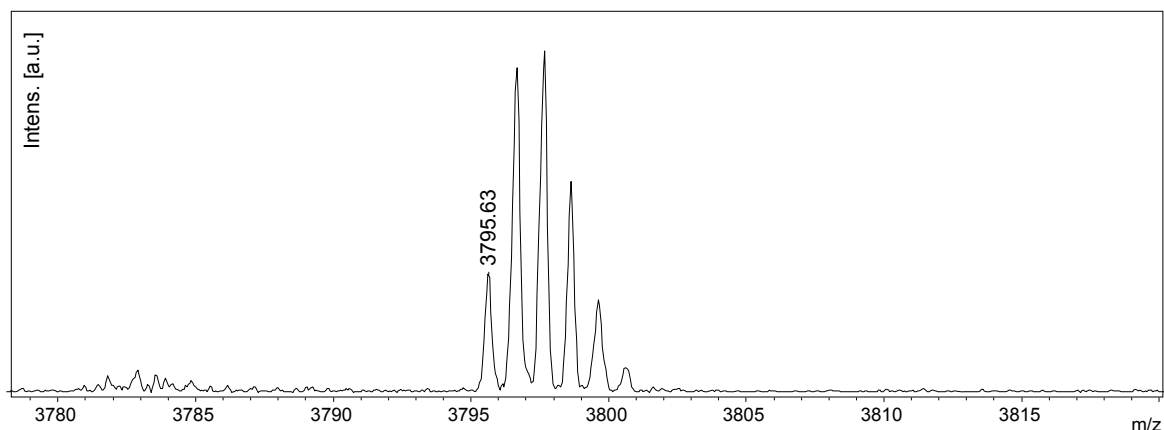
All amino acids were coupled by automated solid phase (procedure A p.167). During the automated synthesis, amino acids 4, 5, 24 and 25 were coupled twice following the automated program for double couplings. Final acetylation was performed with the capping program purchased from the manufacturer.

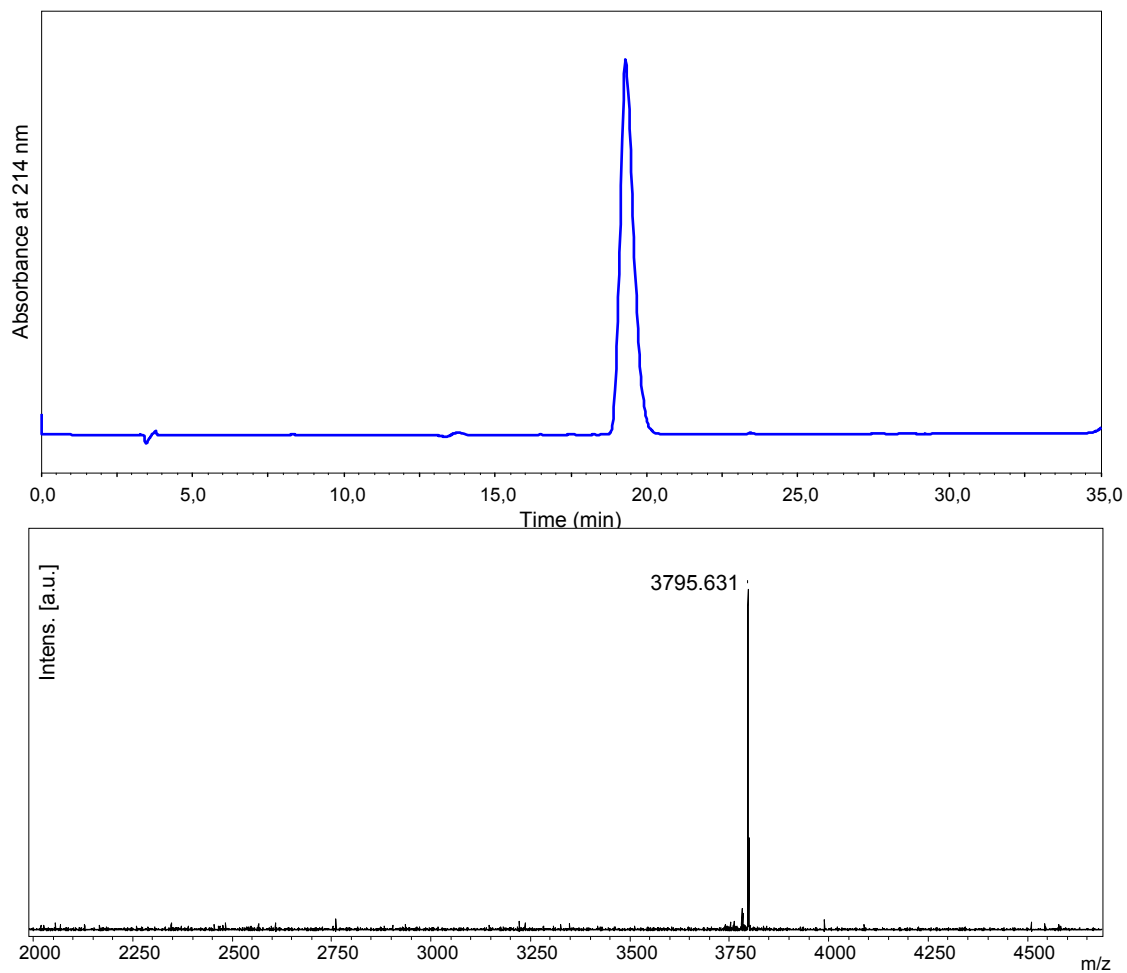
The peptide resin was then cleaved and deprotected by a standard 2h treatment with a mixture of TFA/H₂O/TIS/PhOH (87.5:5:2.5:5), and the peptide was precipitated with ice-cold diethyl ether, recovered by centrifugation and washed twice with cold diethyl ether. The precipitate was lyophilised to obtain peptide **39** as a white powder in 45% yield.

MALDI-TOF calcd. for [M+H]⁺ m/z : 3795.87, found: 3795,63.

HPLC analytical gradient : 05-35% B/A over 30 minutes at a 1mL/min flow

retention time:19.31 min





HPLC traces and MS spectra of compound of **39** ; gradient E

Peptide 40



32 (2.5 equiv., 0.25 mmol) was loaded on the aminomethyl PEGA[®] 800 resin (0.1 mmol, 0.4 mmol/g) by manual coupling using HATU (95 mg, 2.5 equiv., 0.25 mmol) and DIEA (86 μ l, 5 equiv., 0.5 mmol) in DMF for 2 h. The completion of the reaction was checked by the Kaiser test.

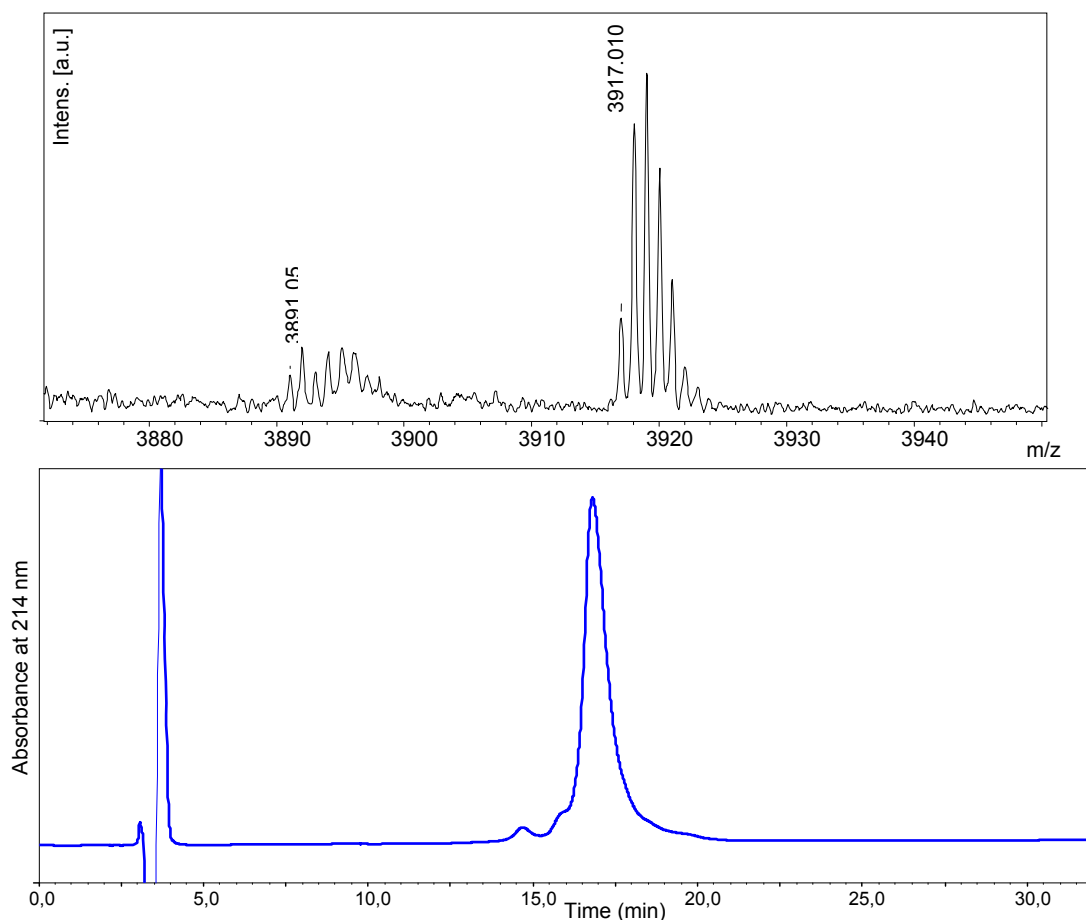
Amino acid 1 was coupled by manual coupling with **30** (Procedure B p.167). Amino acids from 2 to 38 were coupled by automated solid phase (procedure A p.167). During the automated synthesis, amino acids 4, 5, 24 and 25 were coupled twice following the automated program for double couplings. Proline 39 was coupled manually (procedure B p.167).

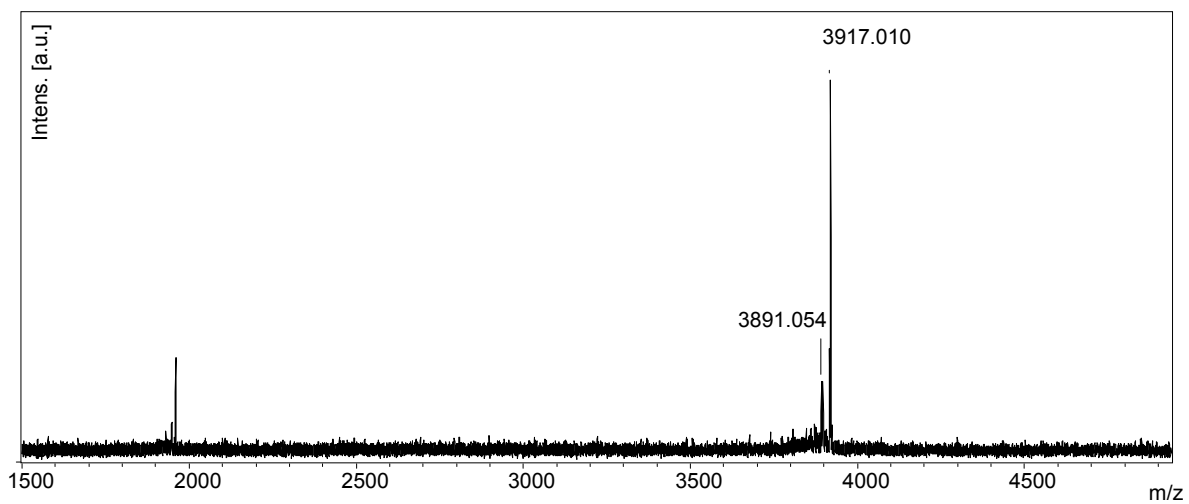
The peptide resin was then cleaved and deprotected by a standard 2h30 minutes treatment with a mixture of TFA/H₂O/TIS/PhOH (87.5:5:2.5:5), and the peptide was precipitated with ice-cold diethyl ether, recovered by centrifugation and washed twice with cold diethyl ether. The precipitate was lyophilised to obtain azido alkyne peptide **40** as a white powder in an estimated 50% yield.

MALDI-TOF calcd for [M+H]⁺ *m/z*: 3916.98, found: 3917,00.

HPLC analytical gradient : 35-40 % B/A over 30 minutes at a 1mL/min flow

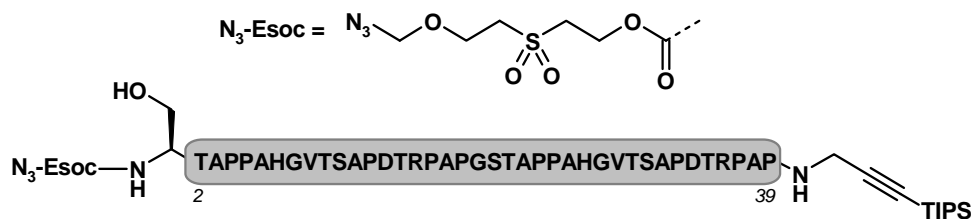
retention time: 16.82 min





HPLC traces and MS spectra of compound of **40** ; gradient K

Peptide 41



32 (2.5 equiv., 0.25 mmol) was loaded on the aminomethyl PEGA[®] 800 resin (0.1 mmol, 0.4 mmol/g) by manual coupling using HATU (95 mg, 2.5 equiv., 0.25 mmol) and DIEA (86 μl , 5 equiv., 0.5 mmol) in DMF for 2 h. The completion of the reaction was checked by the Kaiser test.

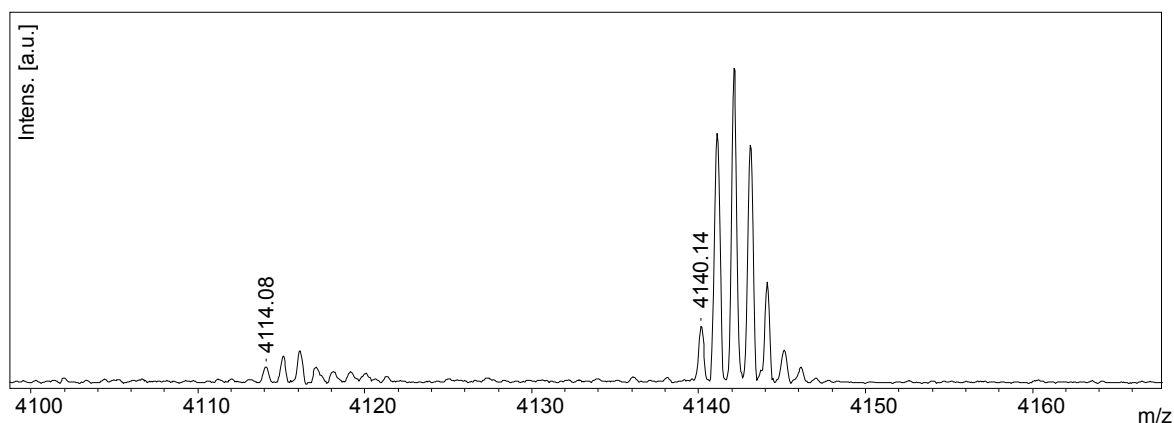
N-terminal Azeoc linker was loaded on the peptide chain using 4-nitrophenyl-Azeoc carbonate and DIEA (86 μl , 5 equiv., 0.5 mmol). Amino acids from 1 to 38 were coupled by automated solid phase. During the automated synthesis (procedure A p.167), amino acids 4, 5, 24 and 25 were coupled twice following the automated program for double couplings. Proline 39 was coupled manually (procedure B p.167).

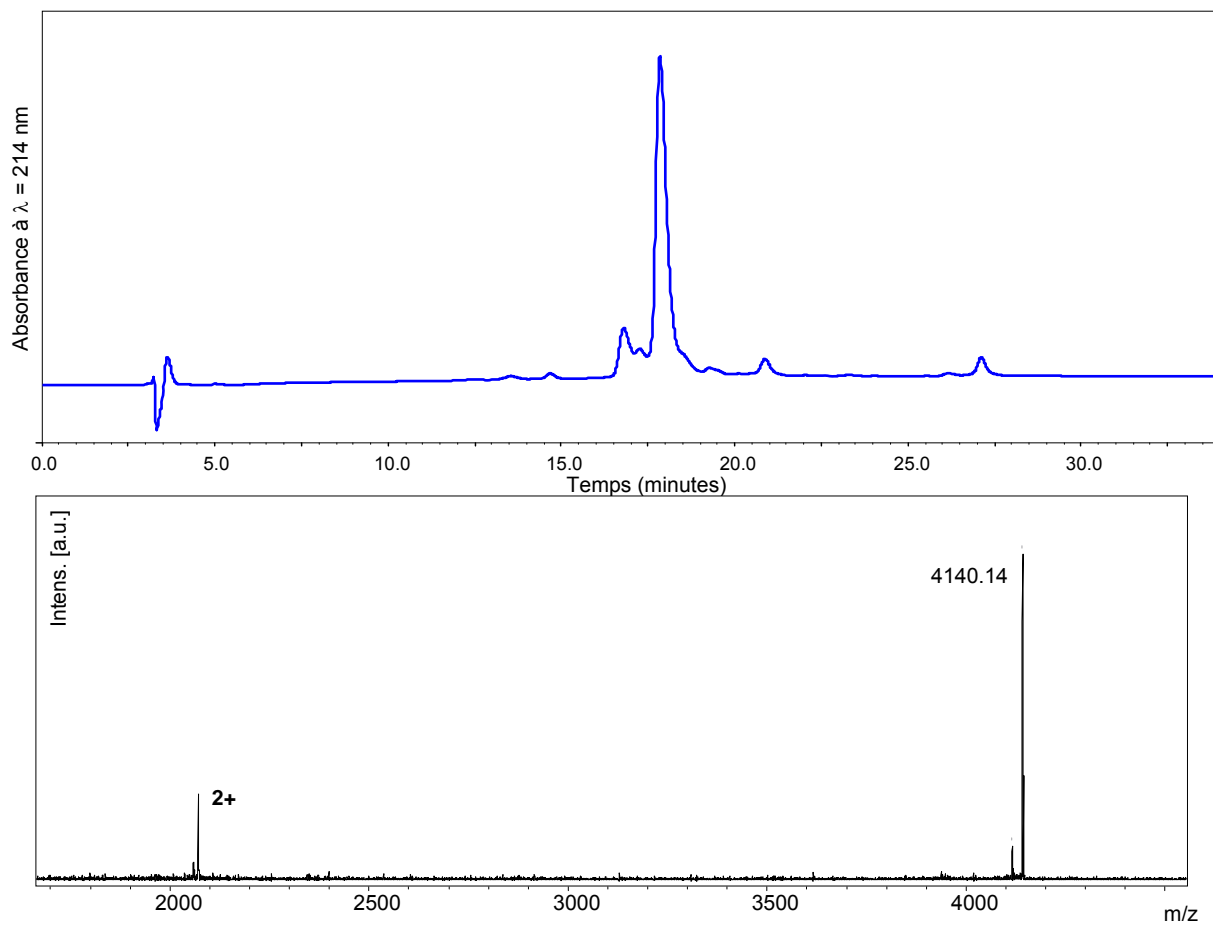
The peptide resin was then cleaved and deprotected by a standard 2h30 treatment with a mixture of TFA/ H_2O /TIS/PhOH (87.5:5:2.5:5), and the peptide was precipitated with ice-cold diethyl ether, recovered by centrifugation and washed twice with cold diethyl ether. The precipitate was lyophilised to obtain azido alkyne peptide **41** as a white powder in an estimated 90% yield.

MALDI-TOF calcd. for $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z : 4140.03 , found: 4140,14.

HPLC analytical gradient :30-60 % B/A over minutes at a 1mL/min flow

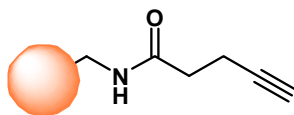
retention time: 18.06 min





HPLC traces and MS spectra of compound of **41** ; gradient G

Alkyne substituted resin 45



Commercial pentynoic acid (19.6 mg, 2 equiv., 0.2 mmol) was loaded on the aminomethyl PEGA[®] 1900 resin (0.1 mmol, 0.2 mmol/g) by manual coupling using HATU (76 mg, 2 equiv., 0.2 mmol) and DIEA (70 μ l, 4 equiv., 0.5 mmol) in DMF for 2 h. The completion of the reaction was checked by the Kaiser test.

General procedure H for peptide release from the resin:

The peptide-substituted resin was introduced in a syringe fitted with a polypropylene frit and a teflon tap and was subsequently added CAPS buffer 50mM pH = 11.6 and allowed to stir by rotation for 30 min. The peptide was recovered by filtration and the resin was washed twice with demineralised water to afford the desired peptide.

General procedure I for on-resin CuAAC:

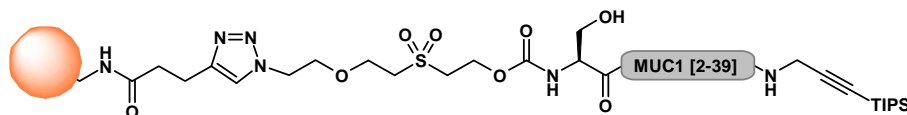
Preparation of copper (I) solution : A fresh Cu(I)·THPTA solution was prepared by adding 50 μ L of a 0.5 M CuSO₄ pentahydrate solution to 50 μ L of an ice-cold 1M solution of sodium ascorbate and 50 μ L of a THPTA 1M aqueous solution followed by vigorous stirring.

In a syringe fitted with a frit and a tap, the alkyne resin was swollen with degassed demineralized water. The solvent was drained off thoroughly and the resin was added a solution of the organic azide (1.5 equiv.) in a mixture of MeOH and HEPES buffer 100mM pH = 7.0 (2:3). To the suspension were subsequently added a 1M aqueous solution of aminoguanidine (30 equiv.), a 1M aqueous solution of *tert*-butanol (30 equiv.) and the resulting mixture was bubble-degassed. The preformed Cu (I)-solution was introduced (6 equiv.), the suspension was bubble-degassed twice and was allowed to stir by rotation for 1h. The resin was then extensively washed with demineralized water, repeatedly swollen with a guanidinium chloride 6M + EDTA 100mM aqueous solution adjusted at pH = 7.0 and drained (3x) and extensively washed with demineralized water.

General procedure J for on-resin desilylation :

The peptide-substituted resin was introduced in a syringe fitted with a polypropylene frit and a teflon tap and was subsequently added an aqueous solution of AgNO₃ (500 equiv.) and allowed to stir by rotation for 1h30 at RT. The resin was then extensively washed with demineralised water.

Note : In case of inefficient washing of the resin, some insolubilities or white-coloured resin beads can appear, those silver precipitates are efficiently removed by treatment of the resin with an aqueous solution of sodium thiosulfate 100mM pH = 5.0.

Peptide-resin **46**

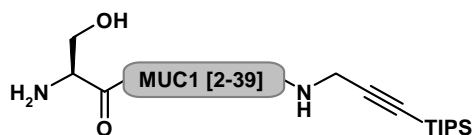
Preparation of copper (I) solution : A fresh Cu(I)·THPTA solution was prepared by adding 50 μL of a 0.5 M CuSO_4 pentahydrate solution to 50 μL of an ice-cold 1M solution of sodium ascorbate and 50 μL of a THPTA 1M aqueous solution followed by vigorous stirring.

Loading of the resin with the peptide : In a syringe fitted with a frit and a tap, the alkyne resin **45** (2 equiv.) was swollen with degassed demineralised water. The solvent was drained off thoroughly and the resin was added a solution of the organic azide (0.5 μmol , 2 mg) in a mixture of MeOH and HEPES buffer 100mM pH = 7.0 (3:5). To the suspension were subsequently added a 1M aqueous solution of aminoguanidine (5 μL , 10 equiv.), a 1M aqueous solution of *tert*-butanol (5 μL , 10 equiv.) and the resulting mixture was bubble-degassed. The preformed copper (I) solution was introduced (3 μL , 1 equiv.), the suspension was bubble-degassed twice and was allowed to stir by rotation for 1h. The resin was then extensively washed with demineralised water, repeatedly swollen with a guanidinium chloride 6M + EDTA 100mM aqueous solution adjusted at pH = 7.0 and drained (3x) and extensively washed with demineralised water.

Capping of the resin : In a syringe fitted with a frit and a tap, the alkyne resin (2 equiv.) was swollen with degassed demineralised water. The solvent was drained off thoroughly and the resin was added a solution of 2-(2-azido-ethoxy)-ethanol (10 equiv.) in a mixture of MeOH and HEPES buffer 100mM pH = 7.0 (1:1). To the suspension were subsequently added a 1M aqueous solution of aminoguanidine (5 μL , 10 equiv.), a 1M aqueous solution of *tert*-butanol (5 μL , 10 equiv.) and the resulting mixture was bubble-degassed. The preformed copper (I) solution was introduced (3 μL , 1 equiv.), the suspension was bubble-degassed twice and was allowed to stir by rotation for 1h. The resin was then extensively washed with demineralised water, repeatedly swollen with a guanidinium chloride 6M + EDTA 100mM aqueous solution adjusted at pH = 7.0 and drained (3x) and extensively washed with demineralised water.

The synthesis of **46** was confirmed by cleavage of an aliquot of the resin following general procedure H.

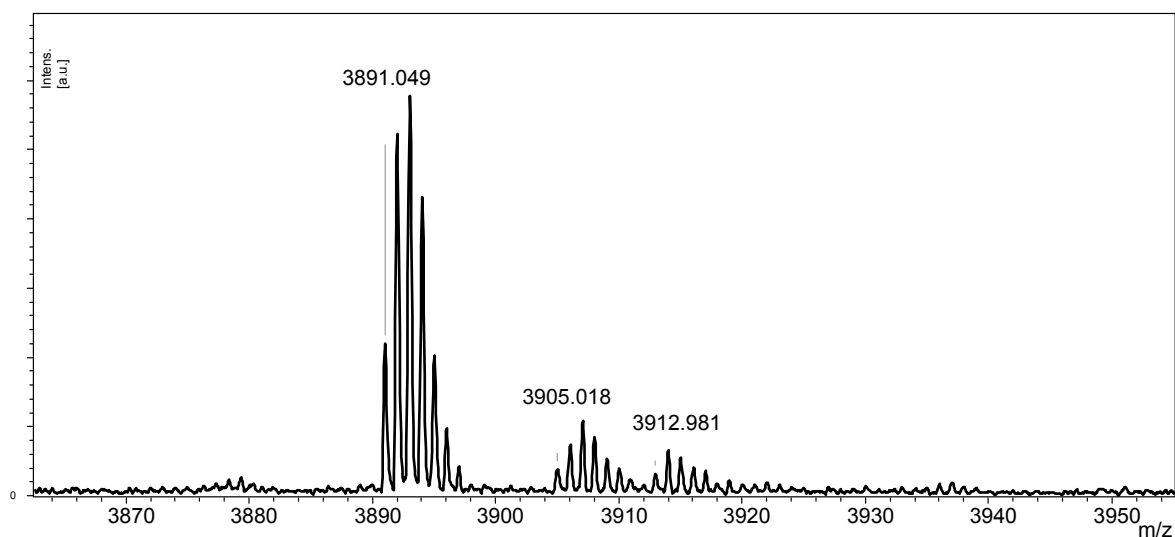
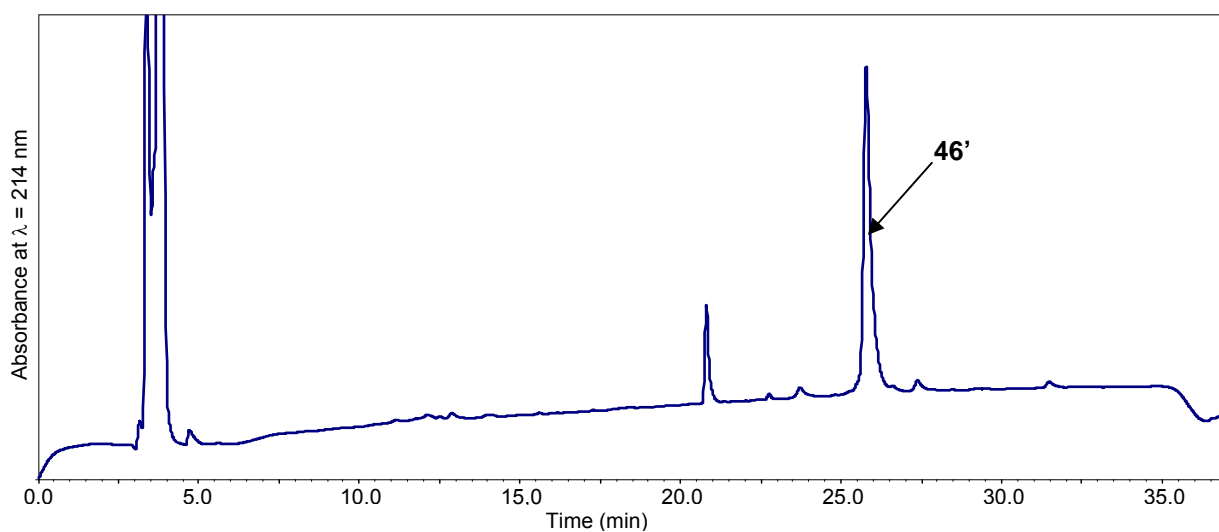
Peptide 46'



46' was obtained by cleavage of an aliquot of the resin **46** following general procedure H (p.213).

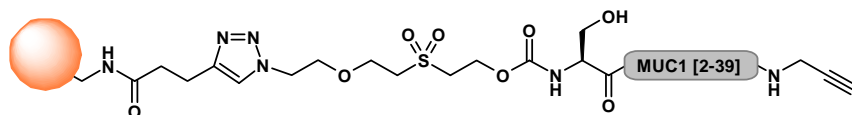
MALDI-TOF calcd for C₁₇₀H₂₇₂N₅₀O₅₃Si [M+H]⁺ *m/z*: 3891.99 , found: 3891.05.

HPLC analytical gradient : 10-60% B/A over minutes at a 1mL/min flow
retention time: 25.83 min



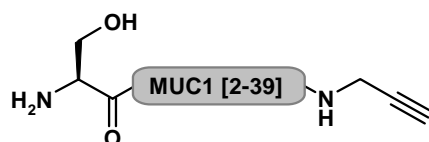
HPLC traces and MS spectra of compound of **46'** ; gradient I

Peptide 47



Resin **46** was treated following procedure J (p.213) to quantitatively afford **47**. The synthesis of **47** was confirmed by cleavage of an aliquot of the resin following general procedure H.

Peptide 47'

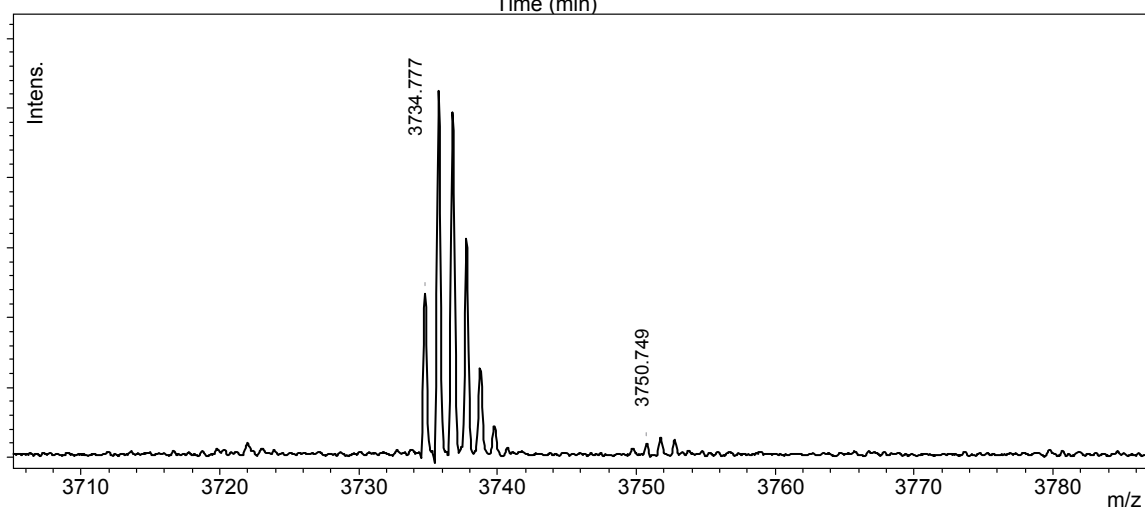
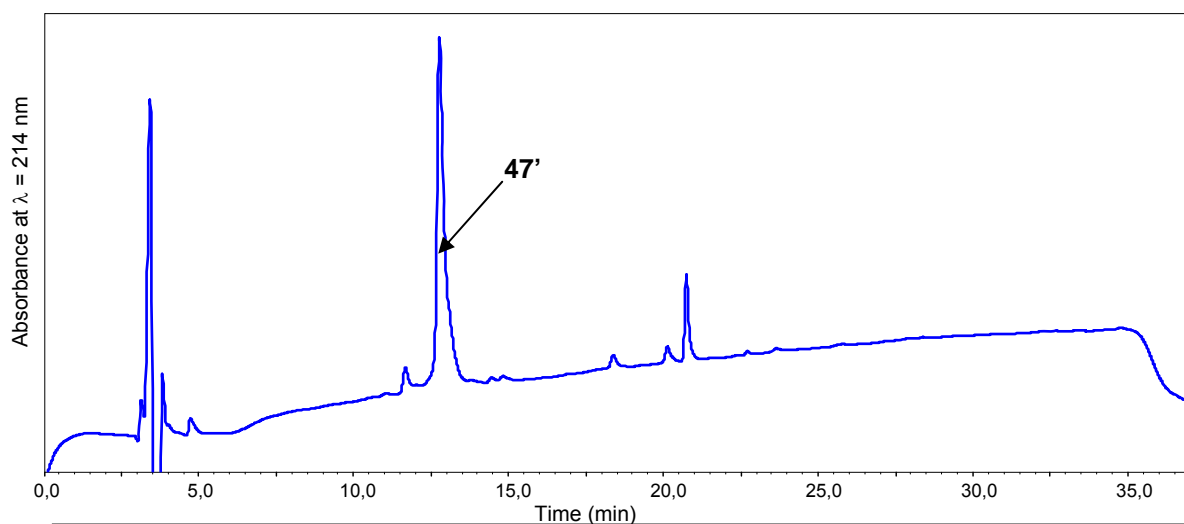


47' was obtained by cleavage of an aliquot of the resin **47** following general procedure H (p.213).

MALDI-TOF calcd for $C_{161}H_{252}N_{50}O_{53}$ $[M+H]^+$ m/z : 3734.86 , found: 3734.78.

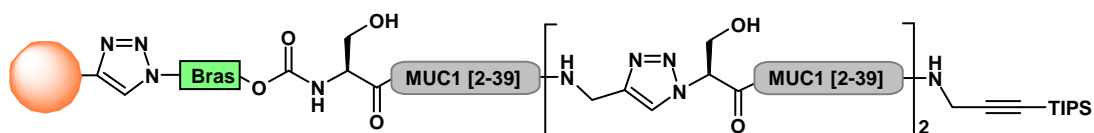
HPLC analytical gradient : 10-60% B/A over minutes at a 1mL/min flow

retention time: 12.80 min



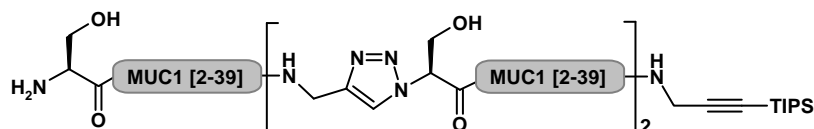
HPLC traces and MS spectra of compound of **47'** ; gradient I

Peptide 48



Peptide-resin **47** was successively submitted to procedure I , J and I (p.213)to afford peptide **48**.

Peptide 48'

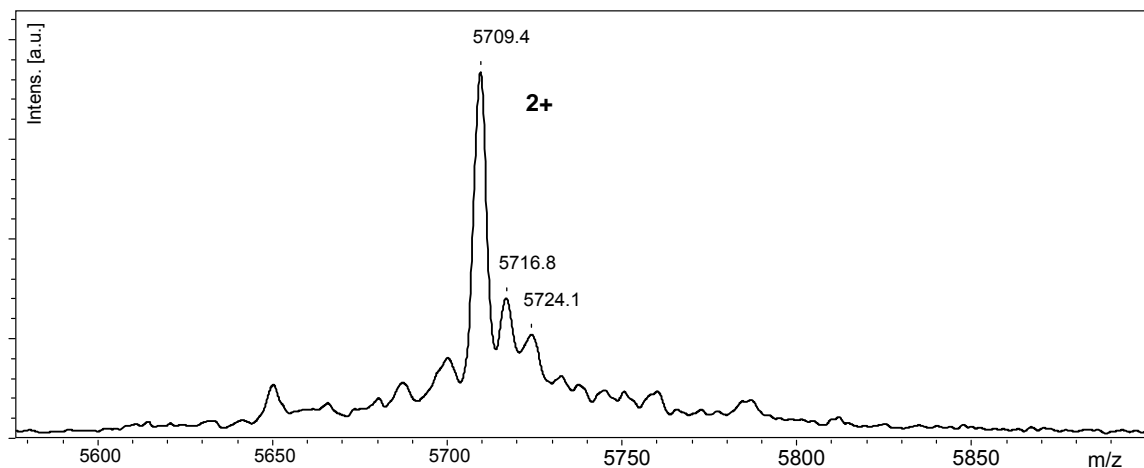
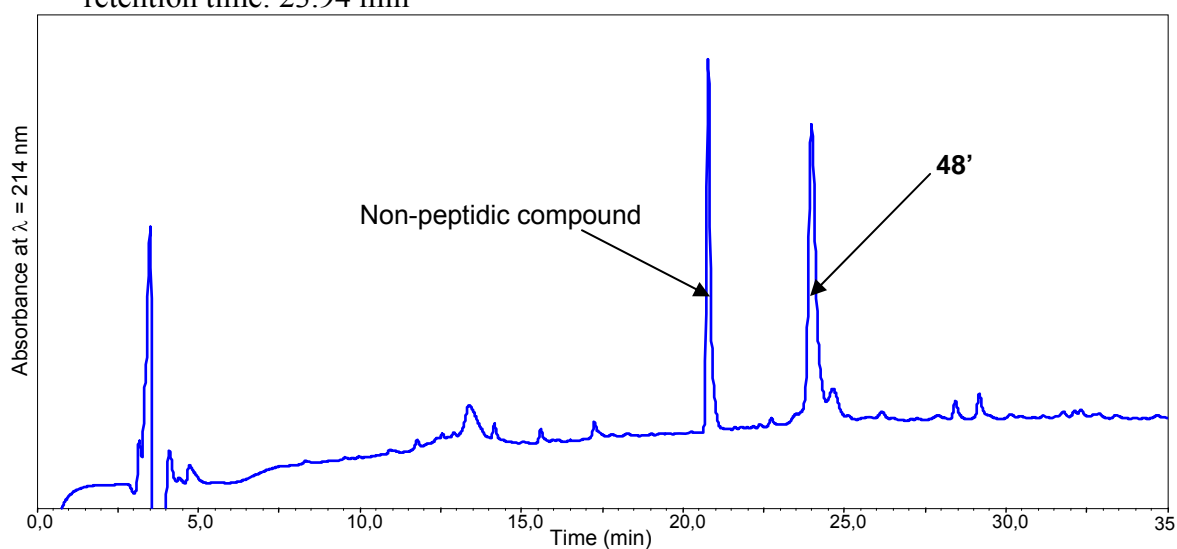


48' was obtained by cleavage of an aliquot of the resin **48** following general procedure H (p.213).

MALDI-TOF calcd. for $C_{492}H_{772}N_{154}O_{159}Si$ $[M+H]^+$ m/z : 11417.7 , found: 11417.8.

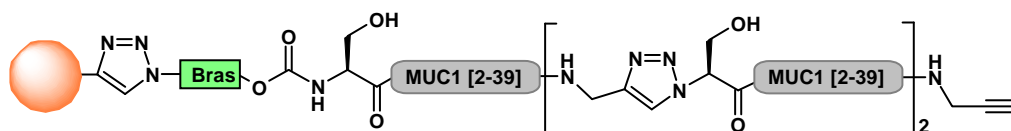
HPLC analytical gradient : 10-60% B/A over minutes at a 1mL/min flow

retention time: 23.94 min



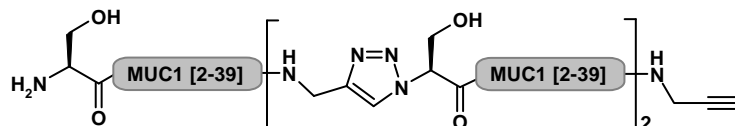
HPLC traces and MS spectra of compound of **48'** ; gradient I

Peptide 49



Peptide-resin **48** was submitted to procedure J (p.213) to afford peptide **49**.

Peptide 49'

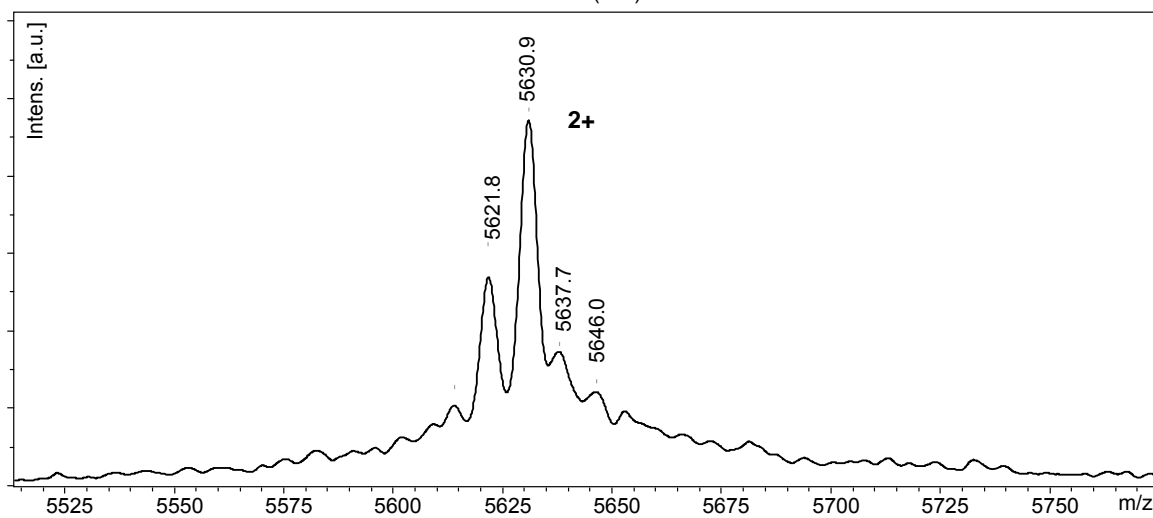
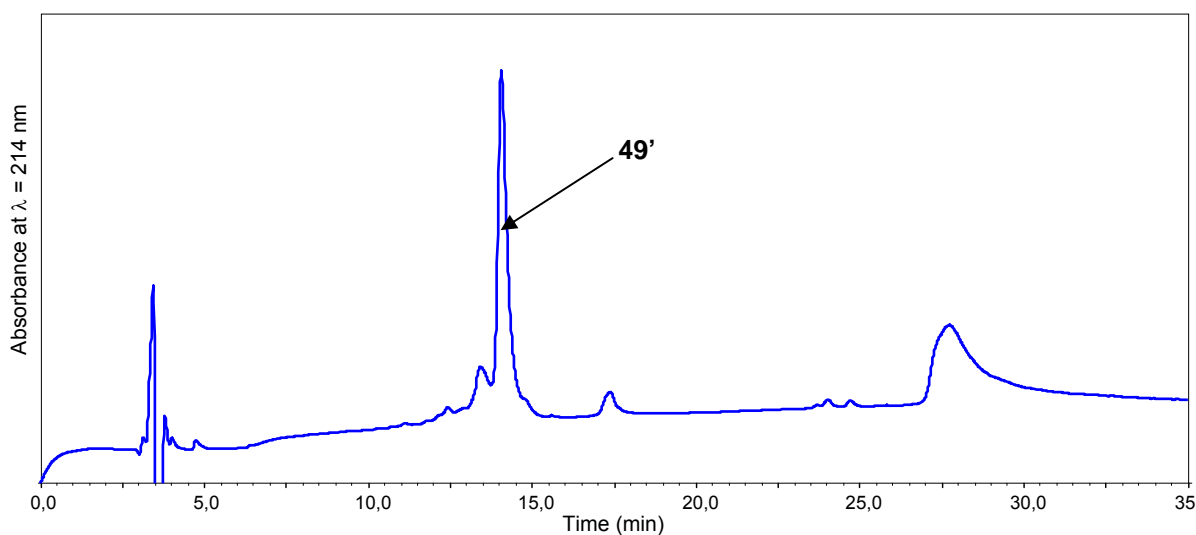


50' was obtained by cleavage of an aliquot of the resin **50** following general procedure H (p.213).

MALDI-TOF calcd. for $C_{483}H_{752}N_{154}O_{159}$ $[M+H]^+$ m/z : 11261.3 , found: 11260.8.

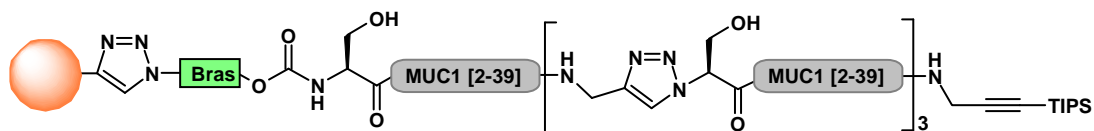
HPLC analytical gradient : 10-60% B/A over minutes at a 1mL/min flow

retention time: 14.08 min



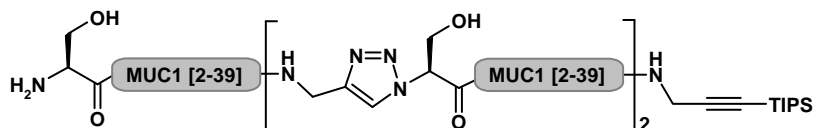
HPLC traces and MS spectra of compound of **49'** ; gradient I

Peptide 50



Peptide-resin **49** was submitted to procedure I (p.213) to afford peptide **50**.

Peptide 50'

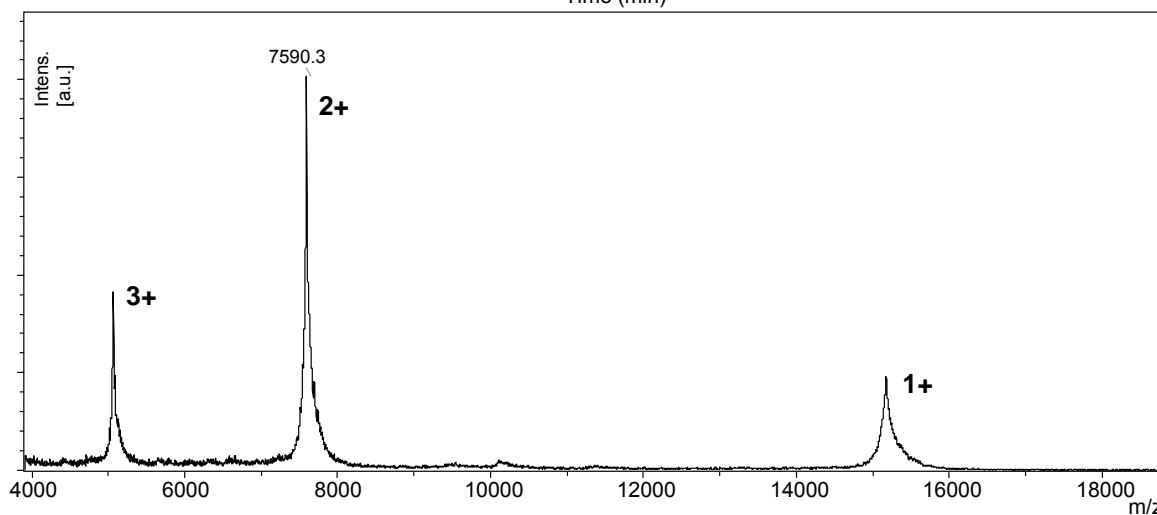
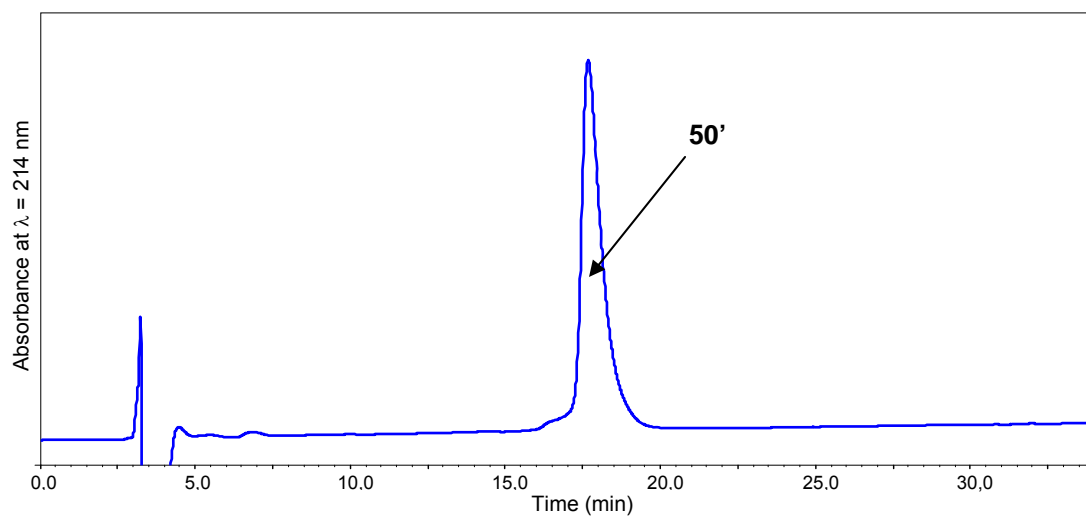


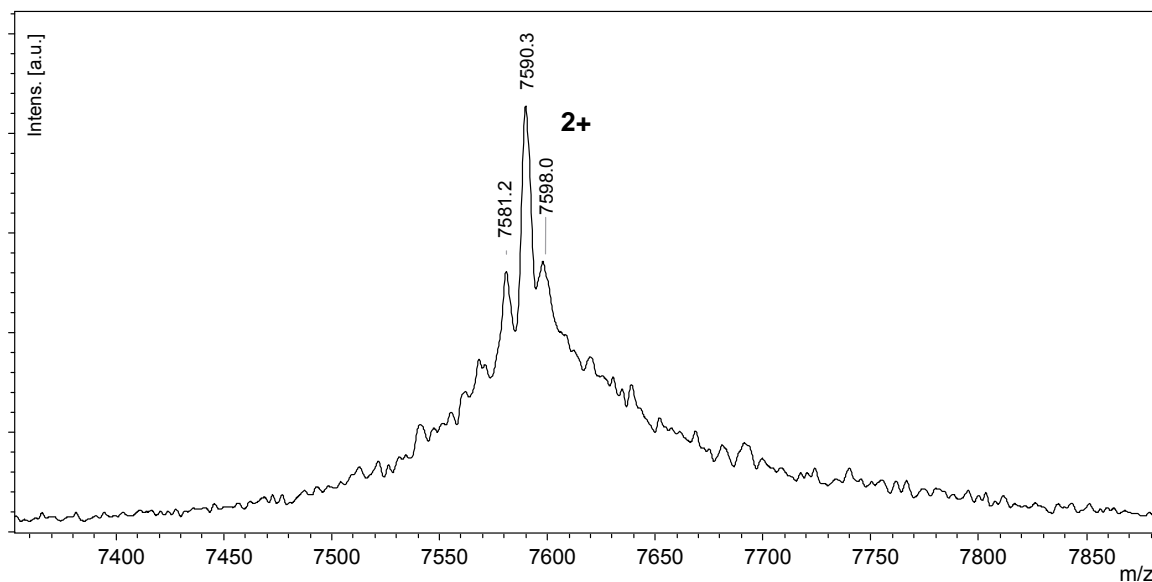
50' was obtained by cleavage of an aliquot of the resin **50** following general procedure H (p.213).

MALDI-TOF calcd. for $C_{653}H_{1022}N_{206}O_{212}Si$ $[M+H]^+$ m/z : 15179.7, found: 15179.6.

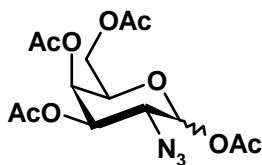
HPLC analytical gradient : 30-40% B/A over minutes at a 1mL/min flow

retention time: 17.67 min





HPLC traces and MS spectra of compound of **50'** ; gradient I

1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-azido-2-deoxy-D-galactose (51) (CAS n° 84278-00-2)

Imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride¹⁰ (2.85 g, 1.2 equiv, 13 mmol) was added to D-galactosamine hydrochloride (2.45 g, 1.0 mmol, 11.3 mmol), powdered K₂CO₃ (4.3 g, 2.7 equiv., 30 mmol) and CuSO₄ · 5 H₂O (28.3 mg, 0.11 mmol) in MeOH (50 mL) and the mixture stirred at room temperature for 2h. The mixture was then filtered, concentrated and co-evaporated with PhMe (2 x 50 mL). The residue was then added pyridine (20 mL) and crushed until obtention of a fine suspension. The suspension was added pyridine (30 mL) and acetic anhydride (8.5 mL, 8.0 equiv., 90 mmol) and the mixture stirred for 3h. The mixture was concentrated, diluted with an HCl 1M aqueous solution (30 mL) and EtOAc (100 mL). The organic phase was consecutively washed with an HCl 1M aqueous solution (3 x 30 mL) and with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (3 x 30mL). The organic phase were dried (MgSO₄), filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (petroleum ether/EtOAc, 8:2 to 7:3) to give the azide **51** in 71% yield.

Spectrometric data were found to be identical to literature data¹¹

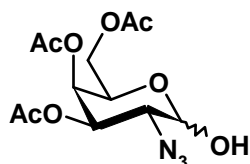
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) :

α anomer δ 6.32 (d, $J_{\text{CH1-CH2}} = 3.5$ Hz, 1H, H1), 5.47 (br d, $J_{\text{CH4-CH3}} = 3.0$ Hz, 1H, H4), 5.31 (dd, $J_{\text{CH3-CH4}} = 3.0$ Hz, $J_{\text{CH3-CH2}} = 11.0$ Hz, 1H, H3), 4.28 (br t, $J_{\text{CH5-CH6}} = 7.0$ Hz, 1H, H5), 4.21-4.09 (m, H6ab), 3.94 (dd, 1H, H2), 2.17 (s, 3H, Ac), 2.16 (s, 3H, Ac), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac).

β anomer δ 5.54 (d, $J_{\text{CH1-CH2}} = 8.5$ Hz, 1H, H1), 5.38 (br d, $J_{\text{CH4-CH3}} = 3.0$ Hz, 1H, H4), 4.89 (dd, $J_{\text{CH3-CH4}} = 3.0$ Hz, $J_{\text{CH3-CH2}} = 11.0$ Hz, 1H, H3), 4.21-4.09 (m, 2H, H6ab), 4.04 (br t, $J_{\text{CH5-CH6}} = 7.0$ Hz, 1H, H5), 3.84 (dd, 1H, H2), 2.20 (s, 3H, Ac), 2.16 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac).

¹⁰ Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3797-3800

¹¹ Vasella, A.; Witzig, C.; Chiara, J.; Martin-Lomas, M. *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 2073-2077

3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-deoxy-D-galactose (52) (CAS n° 132183-13-2/71906-78-0)

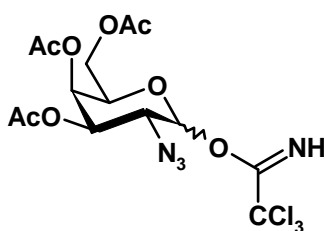
Azide **51** (3.1g, 8.25 mmol) was dissolved in DMF (16 mL) and hydrazine acetate (892 mg, 1.2 equiv., 9.9 mmol) was added. After 30 min, the reaction was diluted with ice-cooled H₂O (300 mL) and EtOAc (300mL) and the organic phase was washed once with brine. The organic phase was then dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (petroleum ether/EtOAc, 7:3) to yield the hemiacetal **52** product as a white foam (2.64 g, 99%)

Spectrometric data were found to be identical to literature data¹²

α anomer δ 5.47-5.39 (m, 3H, H1, H3, H4), 4.50 (ddd, $J_{\text{CH5-CH6}} = 6.5$ Hz, 1H, H5), 4.18-4.10 (m, 2H, H6ab), 3.80 (dd, $J_{\text{CH2-CH1}} = 3.5$ Hz, $J_{\text{CH2-CH3}} = 11.0$ Hz, 1H, H2), 3.07 (OH), 2.20-2.08 (Ac, 9H).

β anomer δ 5.47-5.39 (m, 2H, H3, H4), 4.86 (dd, $J_{\text{CH3-CH2}} = 11.0$ Hz, $J_{\text{CH3-CH4}} = 3.5$ Hz, 1H, H3), 4.75 (dd, $J_{\text{CH1-OH}} = 5.0$ Hz, $J_{\text{CH1-CH2}} = 8.0$ Hz, 1H, H1), 4.18-4.10 (m, 2H, H6ab), 3.95 (ddd, $J_{\text{CH5-CH4}} = 0.5$ Hz, $J_{\text{CH5-CH6}} = 6.5$ Hz, 1H, H5), 3.70 (dd, 1H, H2), 2.20-2.08 (Ac, 9H).

¹² Grundler, G.; Schmidt, R. R. *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1984, 1826-1847

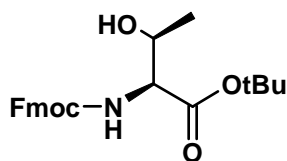
***O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-deoxy-*D*-galactopyranoside) trichloroacetimidate (**53**)
(CAS n° 167939-15-3)**

To a solution of **52** (3.46g, 11 mmol) and trichloroacetonitrile (10.8 mL, 10 equiv., 110 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) was added dry powdered K₂CO₃ (1.5 g, 1 equiv., 11 mmol) and the mixture was allowed to stir for 6h. The mixture was then filtered through celite, concentrated under vacuum and the residue purified by flash chromatography on silica gel (petroleum ether/EtOAc, 75:25) to give the title compound **53** as a white foam in 94% yield.

Spectrometric data were found to be identical to literature data¹²

α anomer δ 8.80 (s, 1H, NH), 6.51 (d, $J_{\text{CH1-CH2}} = 3.0$ Hz, 1H, H1), 5.55 (d, $J_{\text{CH4-CH5}} = 2.5$ Hz, 1H, H4), 5.39 (dd, $J_{\text{CH3-CH4}} = 2.5$ Hz, $J_{\text{CH3-CH2}} = 9.5$ Hz, 1H, H3), 4.42 (br t, $J_{\text{CH5-CH6}} = 5.5$ Hz, 1H, H5), 4.15 (dd, $J_{\text{CH6a-CH6b}} = 9.5$ Hz, 1H, H6a), 4.07 (dd, 1H, H6a), 4.04 (dd, 1H, H2), 2.18 (s, 3H, Ac), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.02 (s, 3H, Ac).

β anomer δ 8.80 (s, 1H, NH), 5.70 (d, $J_{\text{CH1-CH2}} = 7.0$ Hz, 1H, H1), 5.41 (d, $J_{\text{CH4-CH5}} = 3.0$ Hz, 1H, H4), 4.92 (dd, $J_{\text{CH3-CH4}} = 2.5$ Hz, $J_{\text{CH3-CH2}} = 9.0$ Hz, 1H, H3), 4.17 (br t, 2H, H6a, H6b), 4.04 (dd, $J_{\text{CH5-CH6}} = 5.5$ Hz, 1H, H5), 3.96 (dd, 1H, H2), 2.19 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 3H, Ac).

N-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- L-threonine *tert*-butyl ester (54)¹³ (CAS n° 120791-76-6)

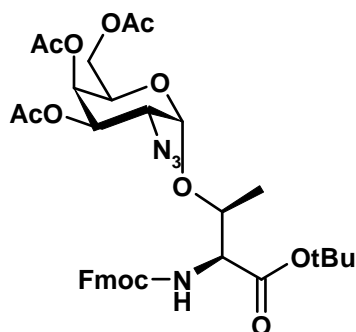
A mixture of DCC (50 g, 3.3 equiv., 0.24 mol), *tert*-butanol (28.2 mL, 6.7 equiv., 0.49 mol) and copper (I) chloride (0.61 g, 0.08 equiv., 6.02 mmol) was stirred in a tightly sealed flask at RT for 5 days. The mixture was then added dry CH₂Cl₂ (100 mL) and a solution of commercial Fmoc-Thr-OH (25 g, 73 mmol) in dry CH₂Cl₂ (100 mL) was added dropwise over 40 min. After stirring 4h, the mixture was filtered and concentrated. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (approx. 70 mL) and the precipitate is removed by filtration over a frit. The filtrate was repeatedly washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ + EDTA (100 mM) (3 x 100 mL) and the organic phase was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was then purified by flash chromatography on silica gel (petroleum ether/EtOAc, 95:15). The resulting solid was recrystallised in toluene/petroleum ether to afford **54** in 52% yield.

Spectrometric data were found to be identical to literature data.¹⁴

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.78-7.30 (m, 8H, H_{arom}), 5.51 (d, *J*_{NH-CH₂} = 8.5 Hz, 1H, NH), 4.42-4.22 (m, 5H, H_{Thrα}, H_{Thrβ}, CH_{Fmoc}), 1.49 (s, 9H, *t*Bu), 1.24 (d, *J*_{CH₃-CH} = 6.0 Hz, 3H, CH₃-Thr).

¹³ Kunz, H. Dans *Preparative Carbohydrate Chemistry*; Hanessian, S., 1997; p. 265-281

¹⁴ Paulsen, H.; Adermann, K. *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 1989, 751-769

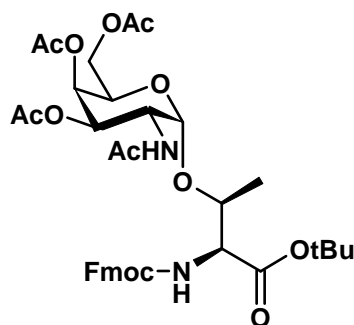
***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonine *tert*-butyl ester (**55**) (CAS n° 120791-77-7)**

Trichloroacetimidate **53** (1.43 g, 1.5 equiv., 3.0 mmol) and threonine derivative **54** (719 mg, 2.0 mmol) were combined and dried overnight under vacuum, then added 4 Å MS and dissolved with freshly distilled dichloromethane (20 mL) and stirred for 10 minutes. The solution was cooled to -78°C and TMSOTf (54 μL , 0.15 equiv., 0.3 mmol) was added dropwise. The mixture was allowed to stir overnight at RT then diluted with CH_2Cl_2 (80 mL) and washed once with 0.1M HCl (100 mL). The aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 100 mL) and EtOAc (1 x 50 mL). The organic layers were pooled, dried over MgSO_4 , filtered, concentrated *in vacuo* and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (petroleum ether/EtOAc, 9:1 to 8:2) to afford the desired product **55** (598 mg) in 42% yield.

Spectrometric data were found to be identical to literature data.¹⁵

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.77-7.30 (m, 8H, H_{arom}), 5.66 (d, $J_{\text{NH-CH}_2} = 9.5$ Hz, 1H, NH), 5.47 (br s, 1H, H4), 5.34 (dd, $J_{\text{CH}_3\text{-CH}_4} = 3.5$ Hz, $J_{\text{CH}_3\text{-CH}_2} = 11.0$ Hz, 1H, H3), 5.11 (d, $J_{\text{CH}_1\text{-CH}_2} = 3.5$ Hz, 1H, H1), 4.47-4.26 (m, 6H, $\text{H}_{\text{Thr}\alpha}$, $\text{H}_{\text{Thr}\beta}$, CH_{Fmoc} , H5, H6), 4.10 (d, $J_{\text{CH-CH}_2} = 6.5$ Hz, $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$), 3.64 (dd, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}_1} = 3.5$ Hz, $J_{\text{CH}_2\text{-CH}_3} = 11.0$ Hz, 1H, H2), 2.15 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 3H, Ac), 2.19 (s, 3H, Ac), 1.51 (s, 9H, *t*Bu), 1.19 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-Thr}$).

¹⁵ Liebe, B.; Kunz, H. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473-1482

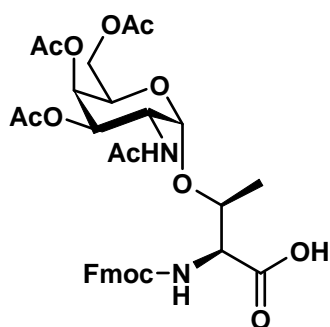
***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonine *tert*-butyl ester (**56**) (CAS n° 120173-56-0)**

Zinc (3 g) was activated by stirring in a bubble-degassed aqueous solution of CuSO_4 pentahydrate 2% (200 mL) then filtered over a frit, washed once with degassed water and washed twice with THF. Activated zinc (2.74 g, 50 equiv., 42 mmol) was then added to a solution of **55** (600 mg) in glacial acetic acid (15 mL) and vigorously stirred overnight. The suspension was then filtered over a frit, washed with CH_2Cl_2 and toluene and the filtrate concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in a mixture of CH_2Cl_2 /pyridine (2:1) (30 mL) and acetic anhydride (15 mL) was added dropwise and the solution was allowed to stir 1h. The solvent was then evaporated to dryness and the residue was diluted in EtOAc (50 mL) and washed once with an aqueous 0.1M HCl solution (20 mL). The organic phase was dried over MgSO_4 , filtered, concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography over silica gel (petroleum ether/EtOAc, 5:5 to 4:6) to afford **56** in 88% yield

Spectrometric data were found to be identical to literature data.¹⁵

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.79-7.30 (m, 8H, H_{arom}), 6.01 (d, $J_{\text{NH-CH}_2} = 9.0$ Hz, 1H, NHAc), 5.58 (d, $J_{\text{NH-CH}_2} = 9.5$ Hz, 1H, NH-Fmoc), 5.39 (br s, 1H, H4), 5.09 (dd, $J_{\text{CH}_3\text{-CH}_4} = 2.0$ Hz, $J_{\text{CH}_3\text{-CH}_2} = 11.0$ Hz, 1H, H3), 4.89 (dd, $J_{\text{CH}_1\text{-CH}_2} = 2.5$ Hz, 1H, H1), 4.62 (ddd, $J_{\text{H}_2\text{-H}_1} = 2.5$ Hz, $J_{\text{H}_2\text{-NH}} = 9.5$ Hz = $J_{\text{H}_2\text{-H}_3} = 9.5$ Hz, 1H, H2), 4.47 (dd, 2H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.29 - 4.19 (m, 4H, H5, $\text{H}_{\text{Thr}\alpha}$, $\text{H}_{\text{Thr}\beta}$, CH_{Fmoc}), 4.12 (dd, $J_{\text{H}_5\text{-H}_6} = 5.0$ Hz, $J_{\text{H}_{6a}\text{-H}_{6b}} = 12.0$ Hz, 1H, H6a), 4.08 (dd, $J_{\text{H}_5\text{-H}_6} = 7.5$ Hz, $J_{\text{H}_{6a}\text{-H}_{6b}} = 12.0$ Hz, 1H, H6b), 2.17 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 6H, OAc, NHAc), 1.47 (s, 9H, *t*Bu), 1.33 (d, 3H, $J_{\text{Thr}\gamma\text{-Thr}\beta} = 6.0$ Hz, $\text{CH}_3\text{-Thr}$)

***N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonine (**57**) (CAS n° 116783-35-8)**



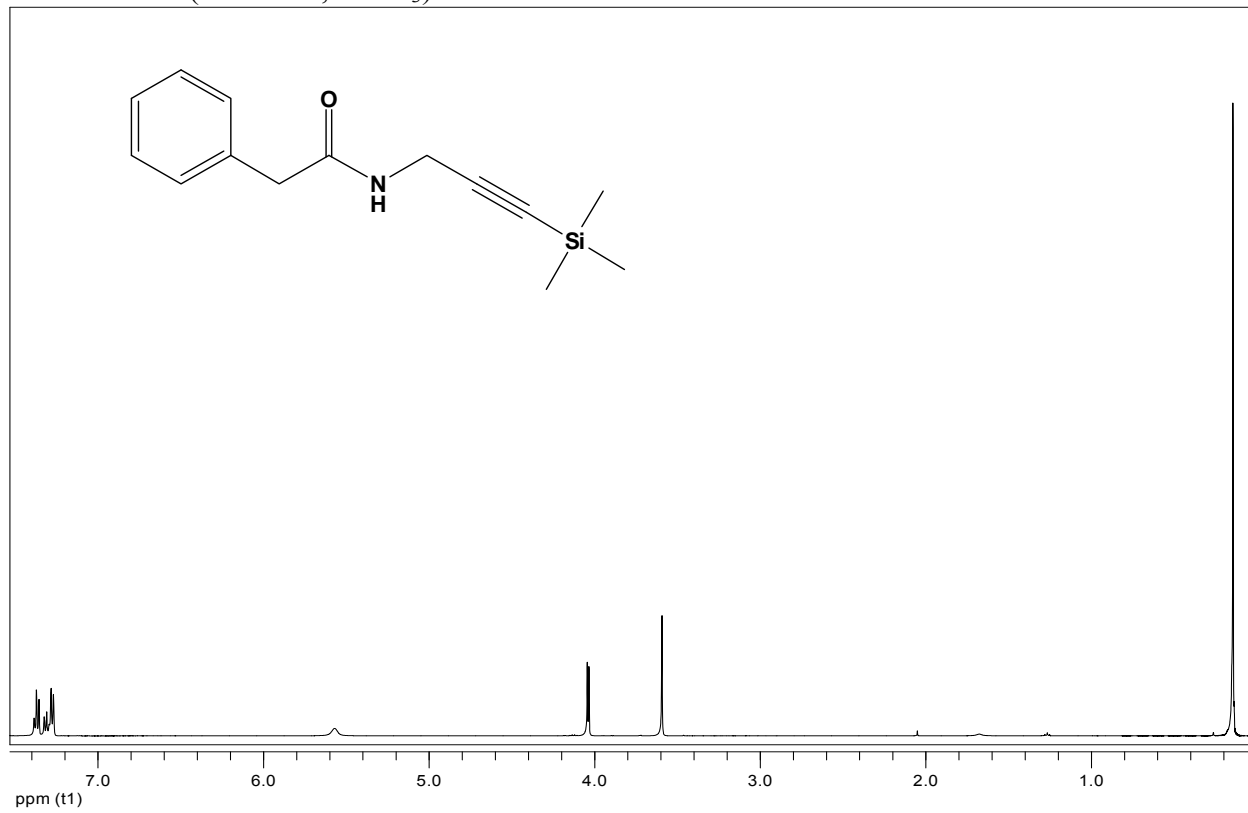
Ester **56** (540 mg, 0.74 mmol) was dissolved in TFA/H₂O (95:5) (7.4 mL) and stirred at room temperature for 2 h. The mixture was then added of toluene and was concentrated under vacuum (2x). The residue was purified by flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 1% to 10%) to afford **57** as a white solid in 94% yield.

Spectrometric data were found to be identical to literature data.¹⁴

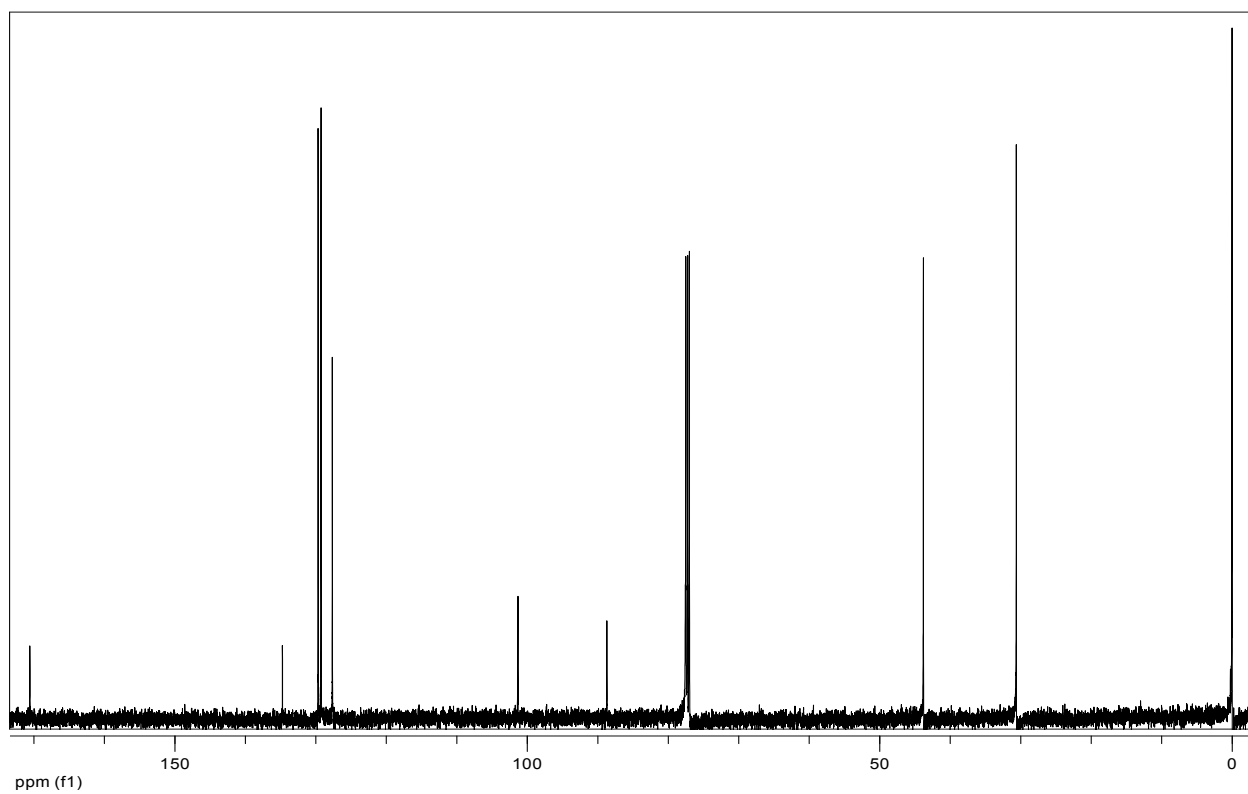
¹H NMR (500 MHz, DMSO) : δ 7.90-7.30 (m, 8H, H_{arom}), 5.29 (br d, $J_{\text{CH4-CH3}} = 1.5$ Hz, 1H, H4), 5.00 (br dd, $J_{\text{CH3-CH4}} = 1.0$ Hz, $J_{\text{CH3-CH2}} = 11.5$ Hz, 1H, H3), 4.87 (br s, 1H), 4.40-4.20 (m, 9H, H_{Thr α} , H_{Thr β} , CH_{Fmoc}, CH_{2Fmoc}, H5, H6, H2), 2.11 (s, 3H, Ac), 1.99 (s, 3H, Ac), 1.89 (s, 3H, Ac), 1.87 (s, 3H, Ac), 1.13 (d, $J_{\text{Thr γ -Thr $\beta Hz, 3H, CH₃-Thr).$$

ANNEXE

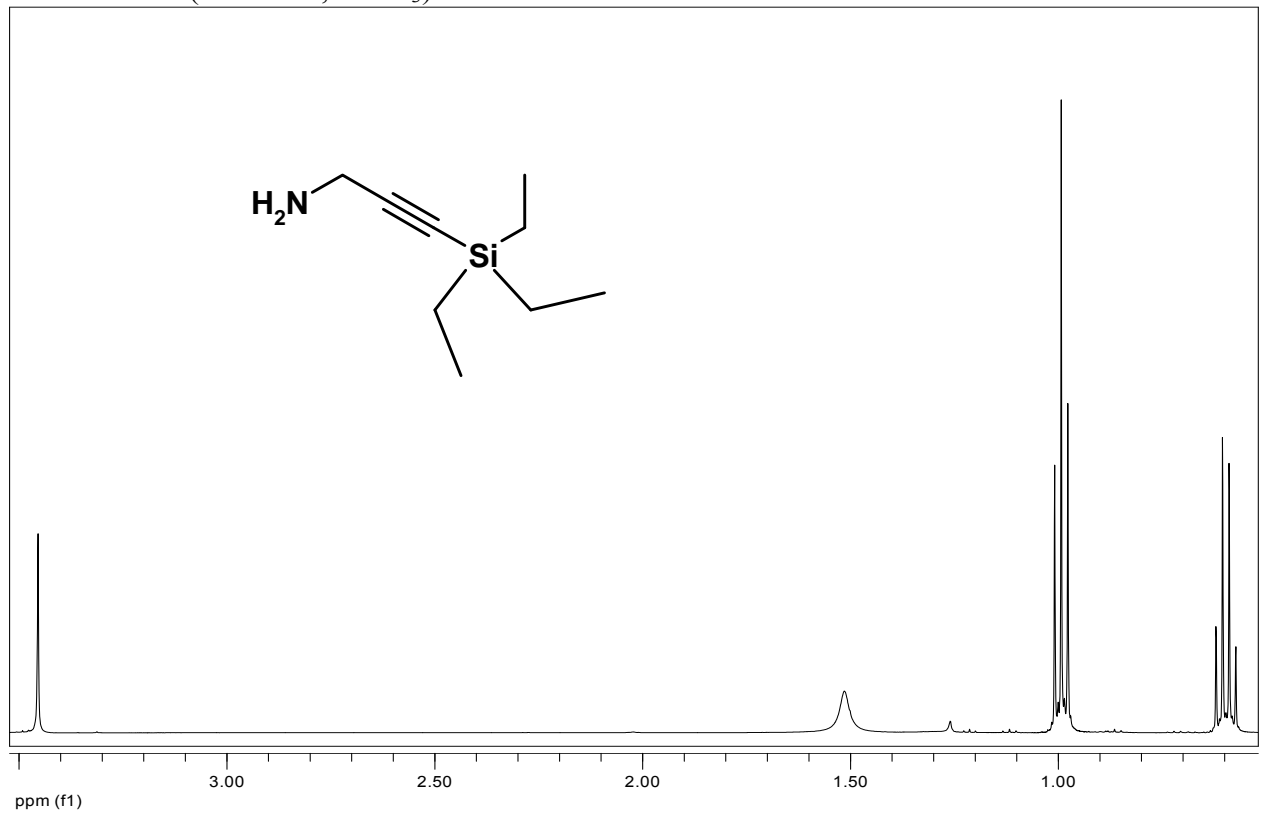
^1H NMR of **3** (500 MHz, CDCl_3)



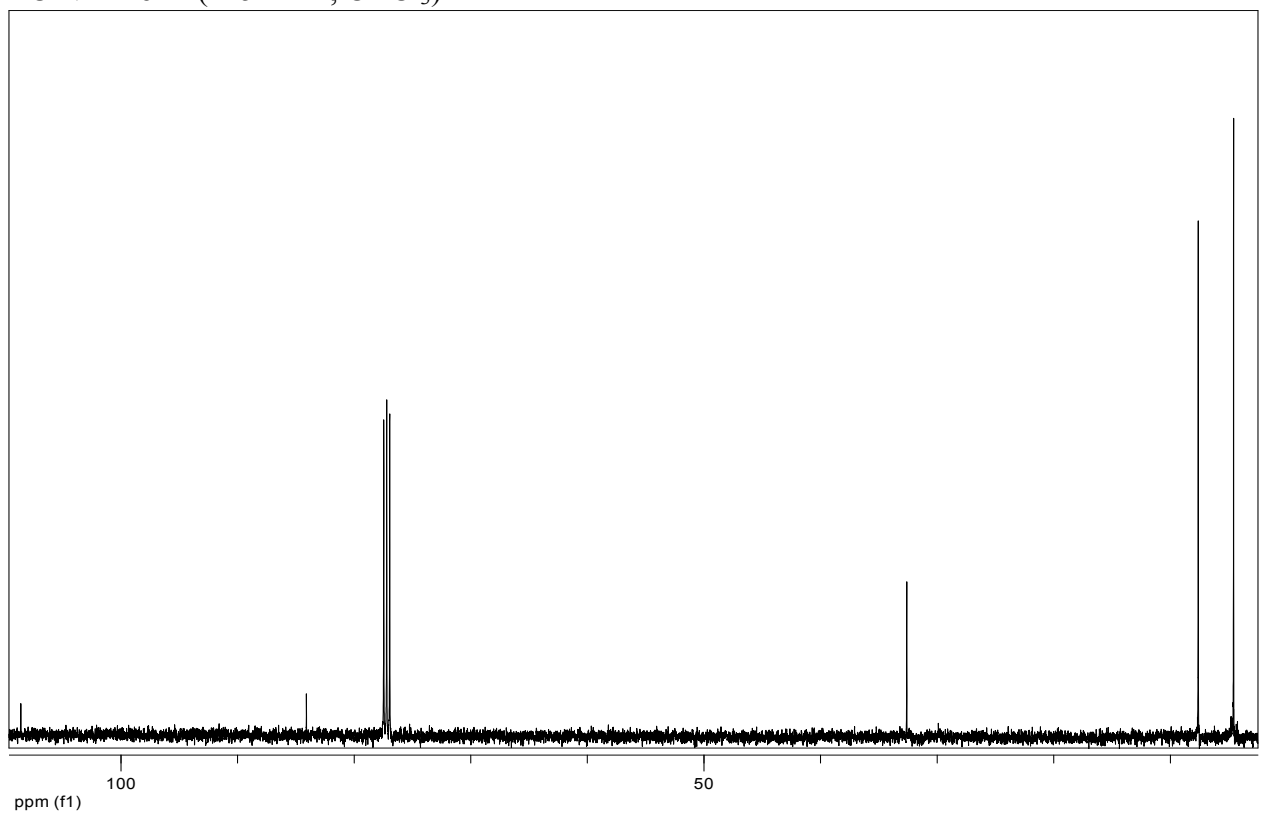
^{13}C NMR of **3** (125 MHz, CDCl_3)



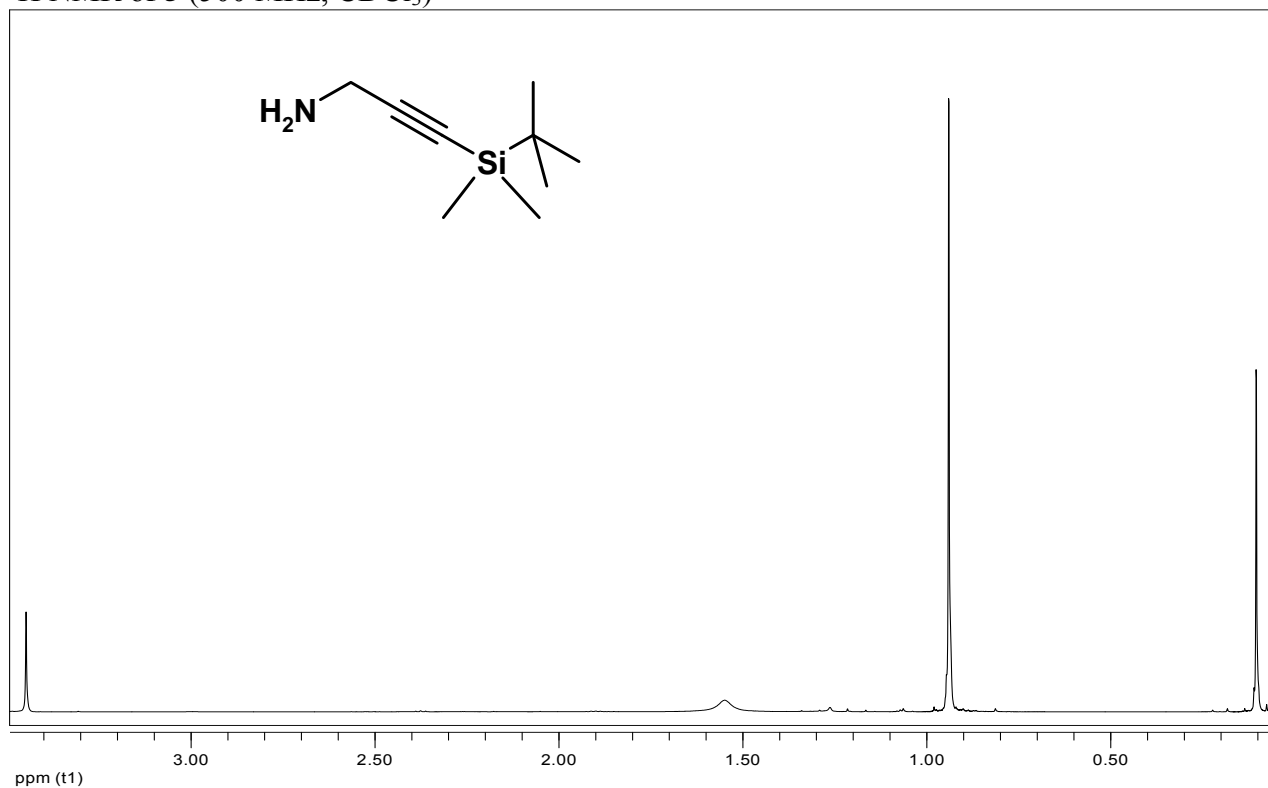
^1H NMR of **4** (500 MHz, CDCl_3)



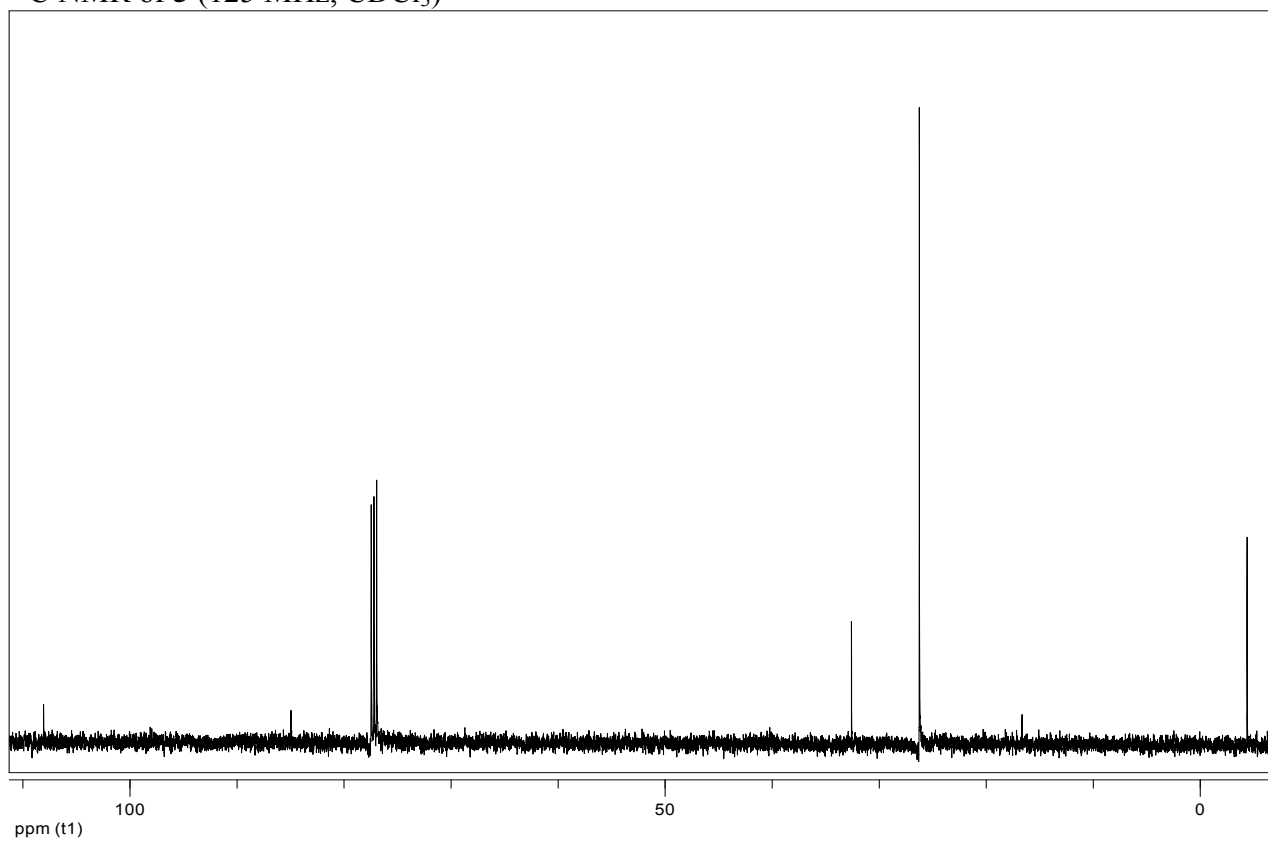
^{13}C NMR of **4** (125 MHz, CDCl_3)

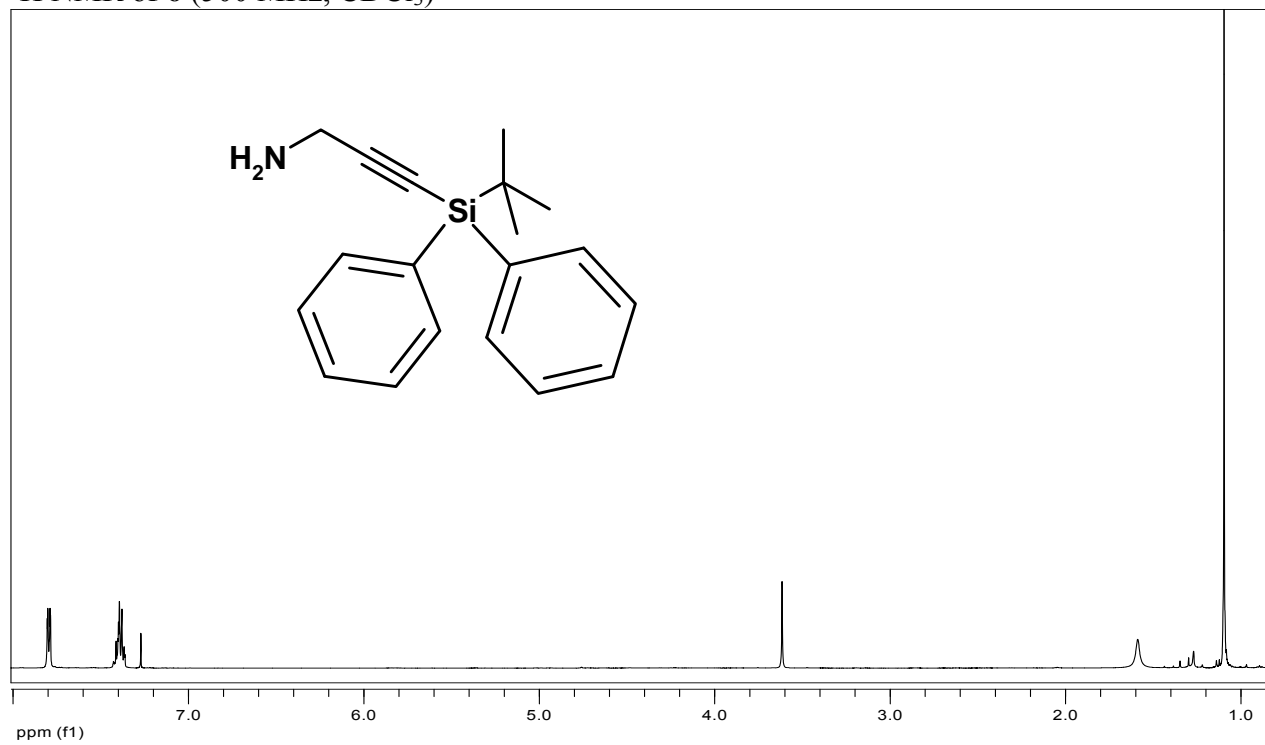
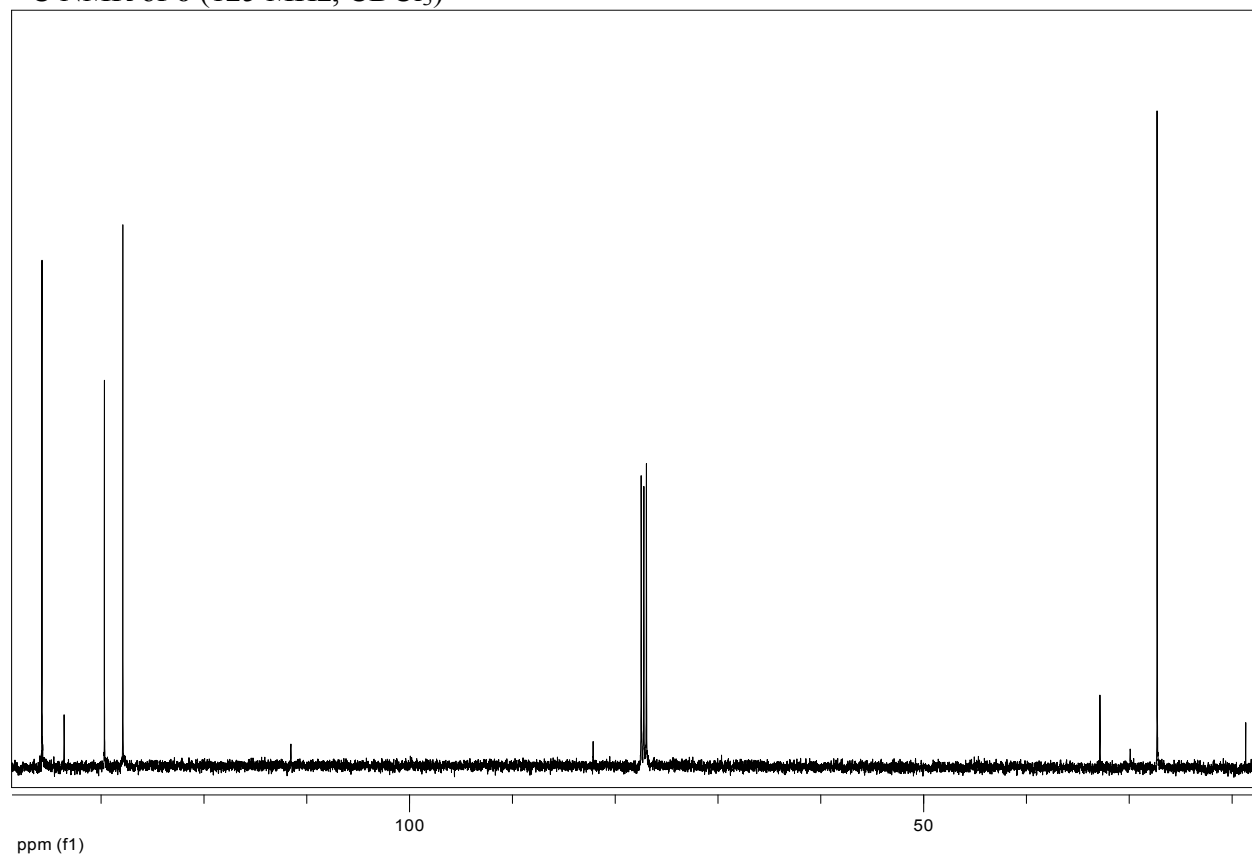


^1H NMR of **5** (500 MHz, CDCl_3)

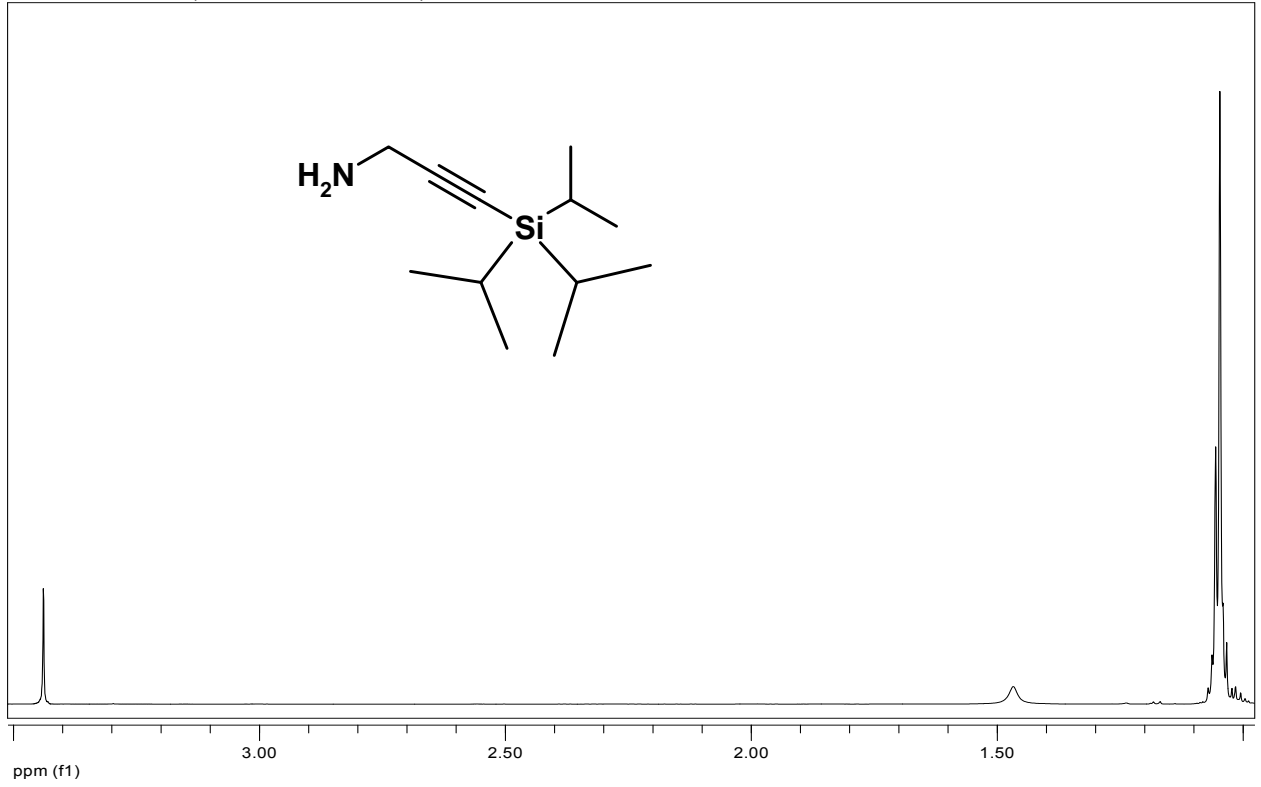


^{13}C NMR of **5** (125 MHz, CDCl_3)

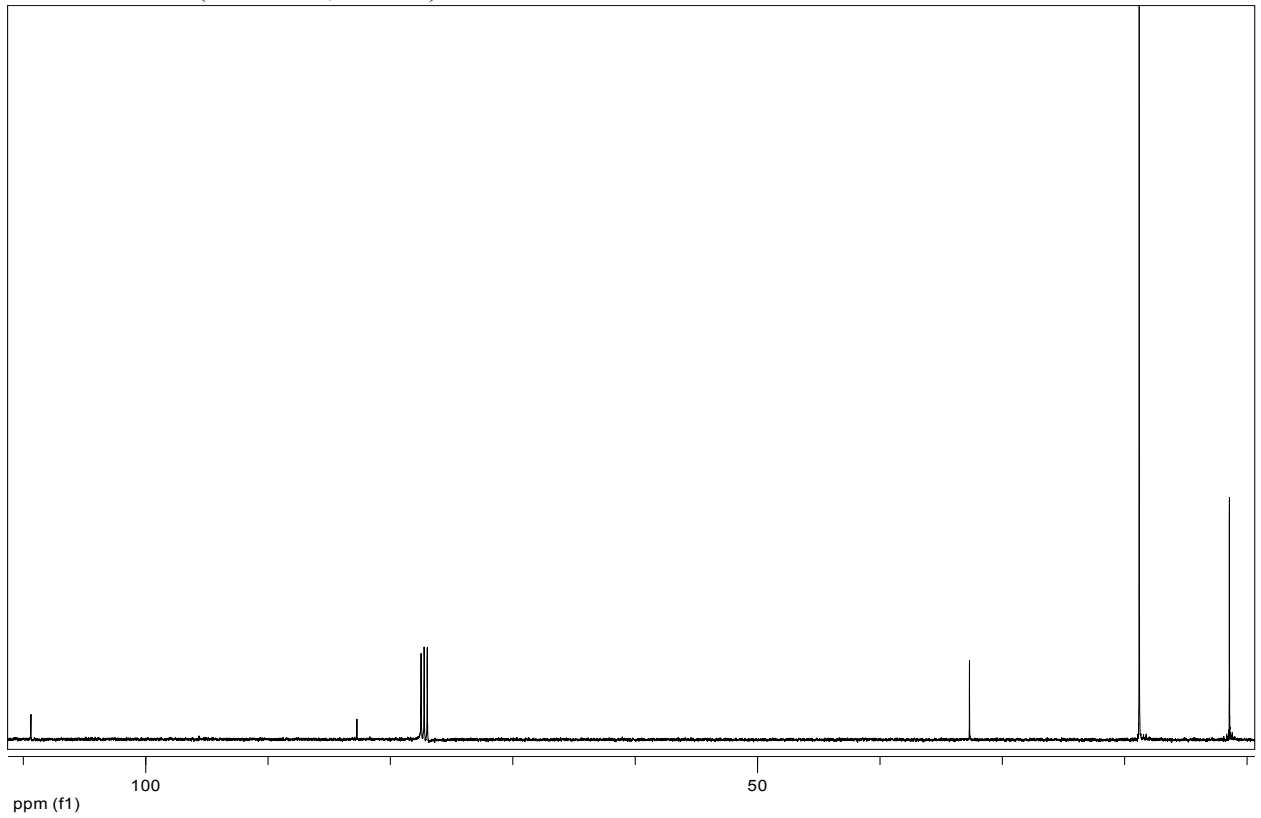


^1H NMR of **6** (500 MHz, CDCl_3) ^{13}C NMR of **6** (125 MHz, CDCl_3)

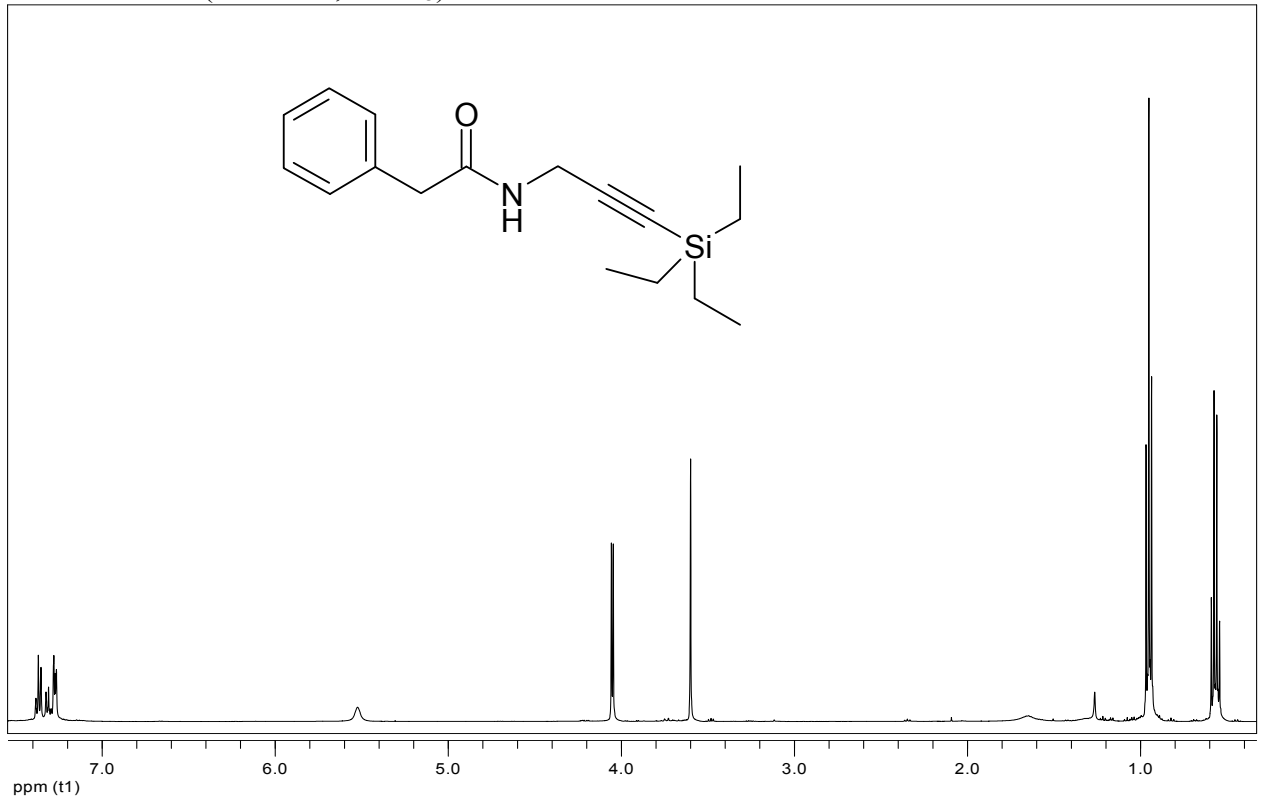
^1H NMR of **7** (500 MHz, CDCl_3)



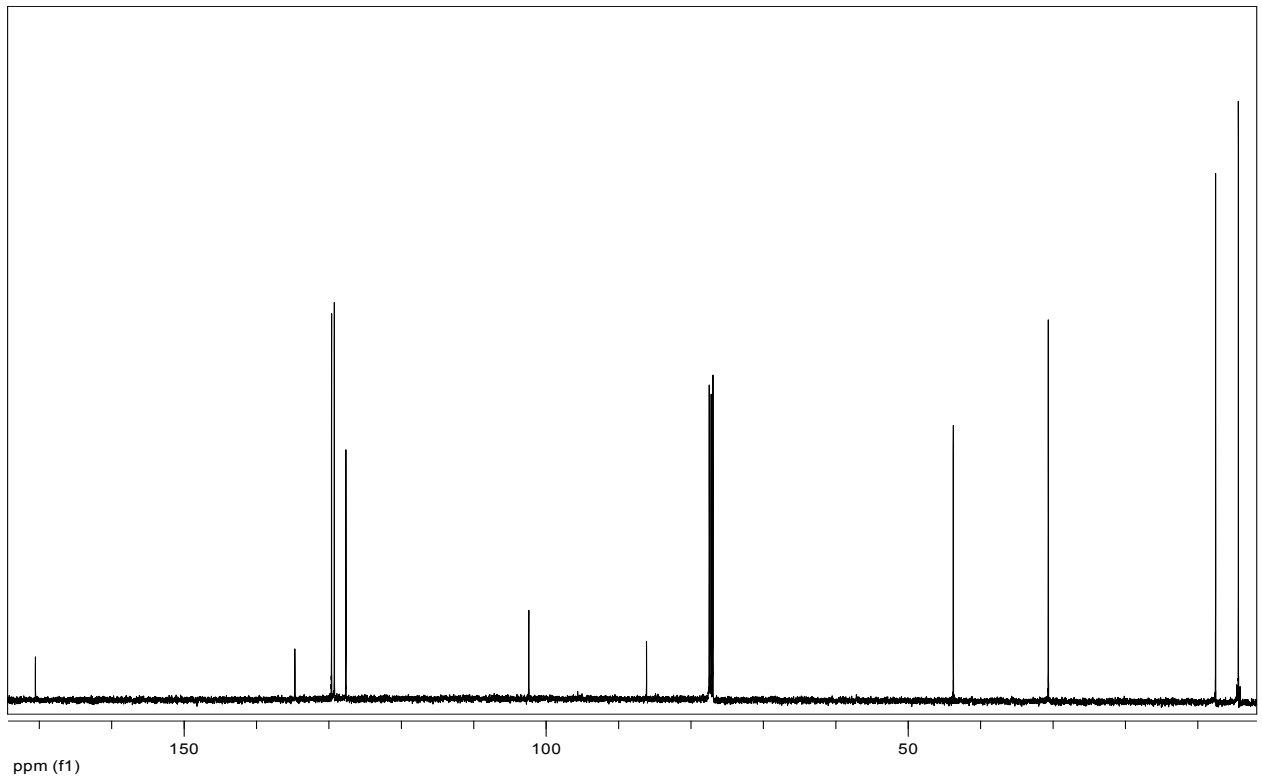
^{13}C NMR of **7** (125 MHz, CDCl_3)



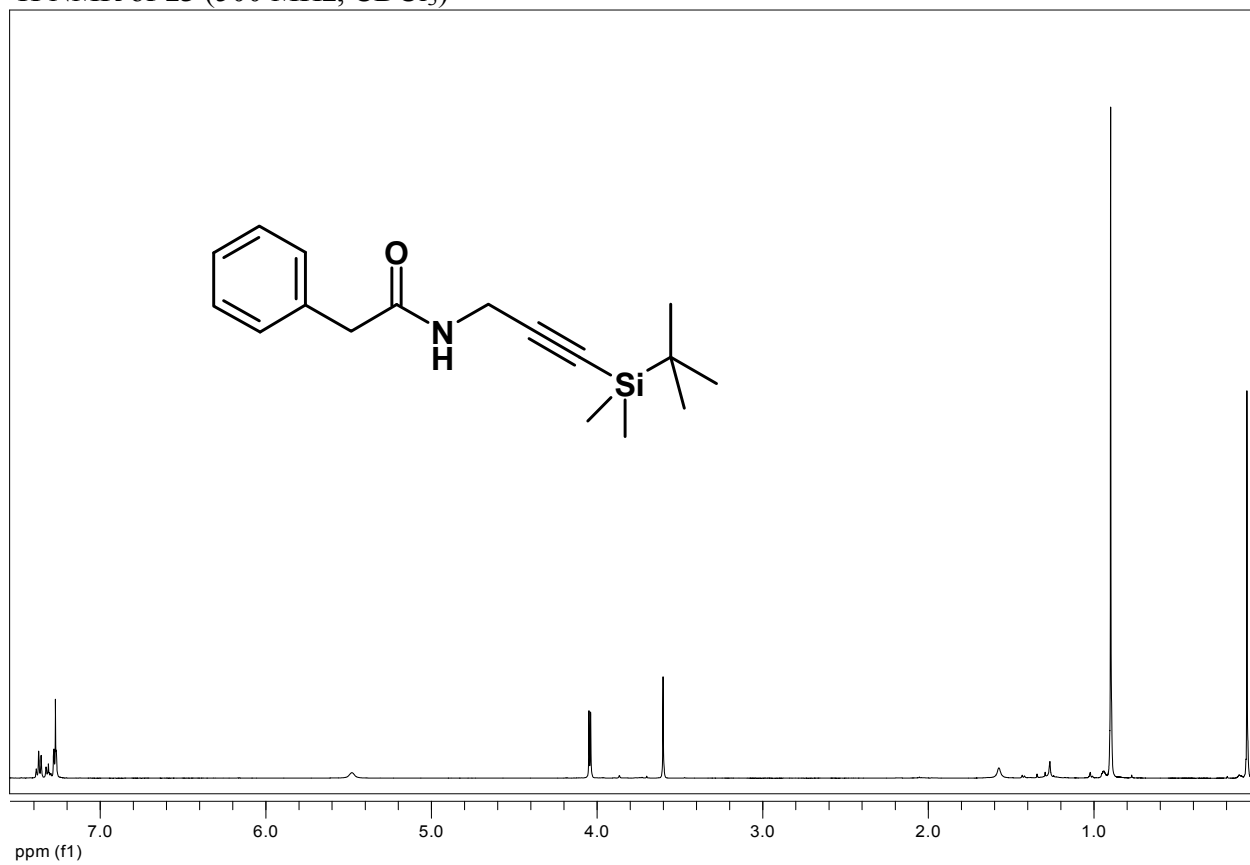
^1H NMR of **12** (500 MHz, CDCl_3)



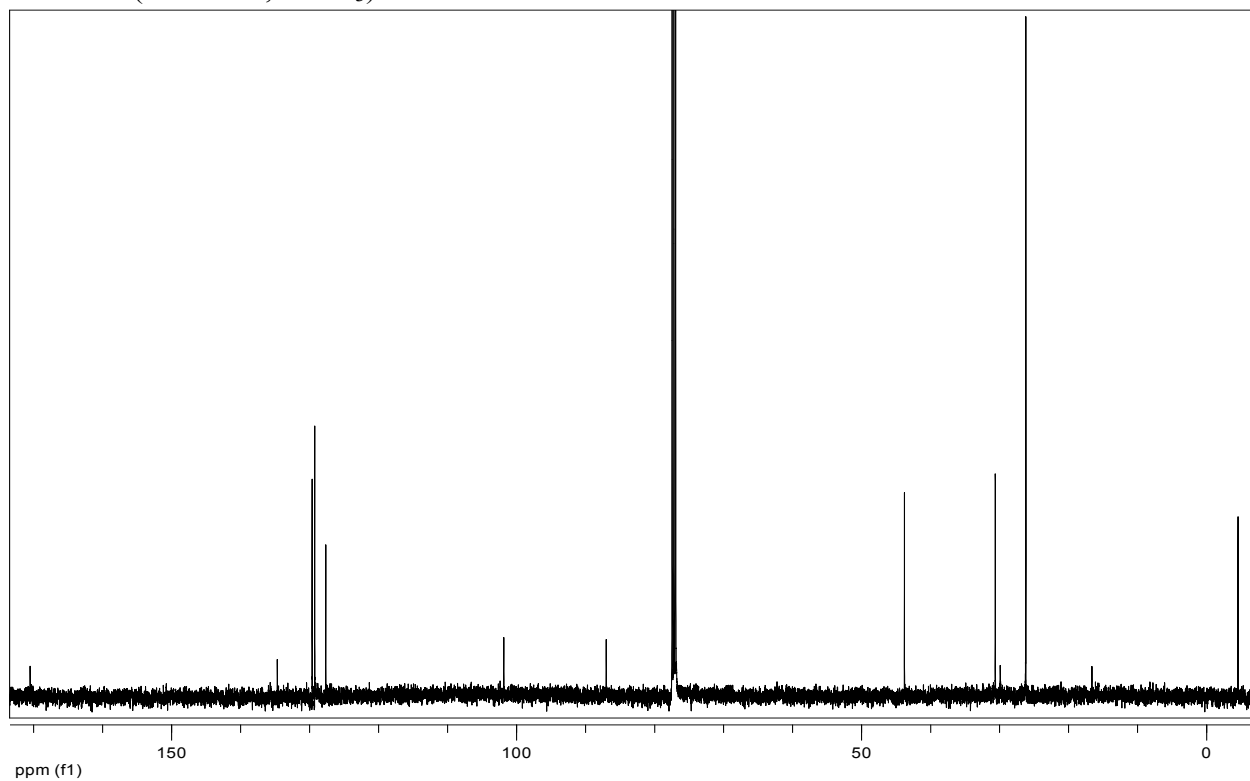
^{13}C NMR of **12** (125 MHz, CDCl_3)



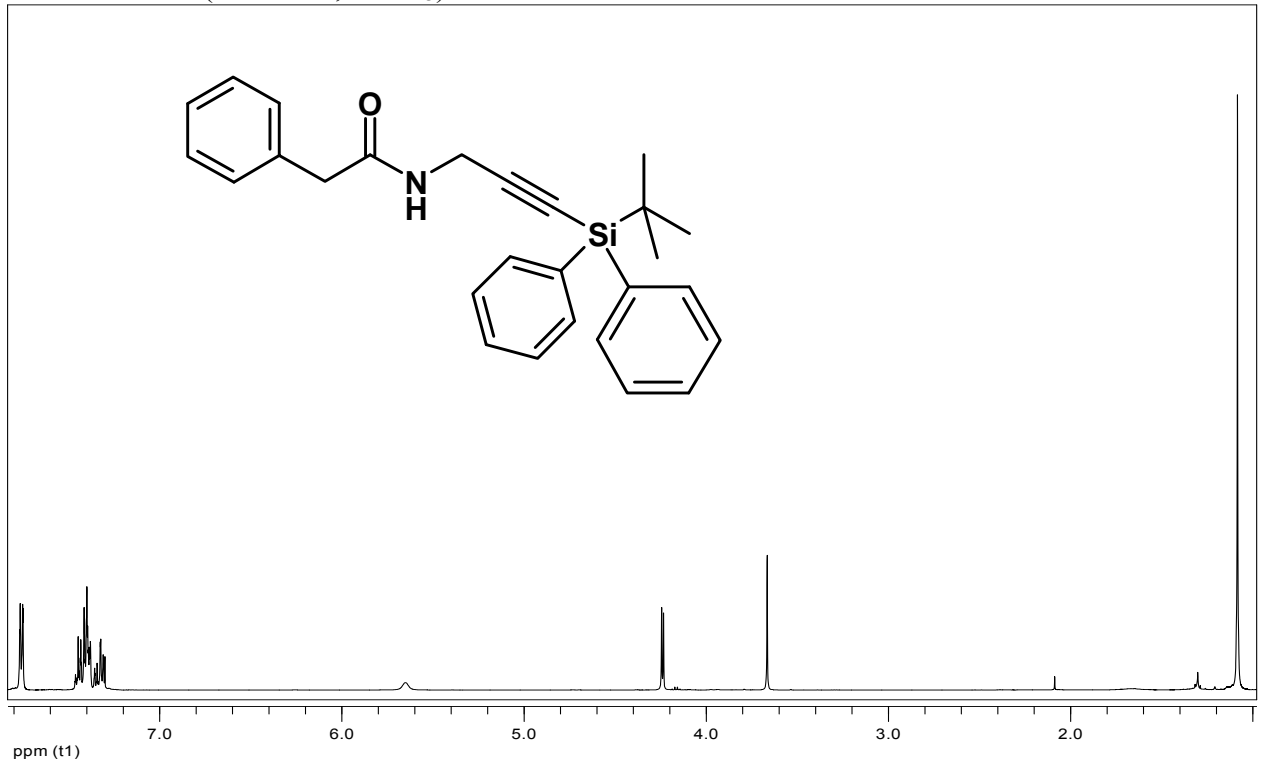
^1H NMR of **13** (500 MHz, CDCl_3)



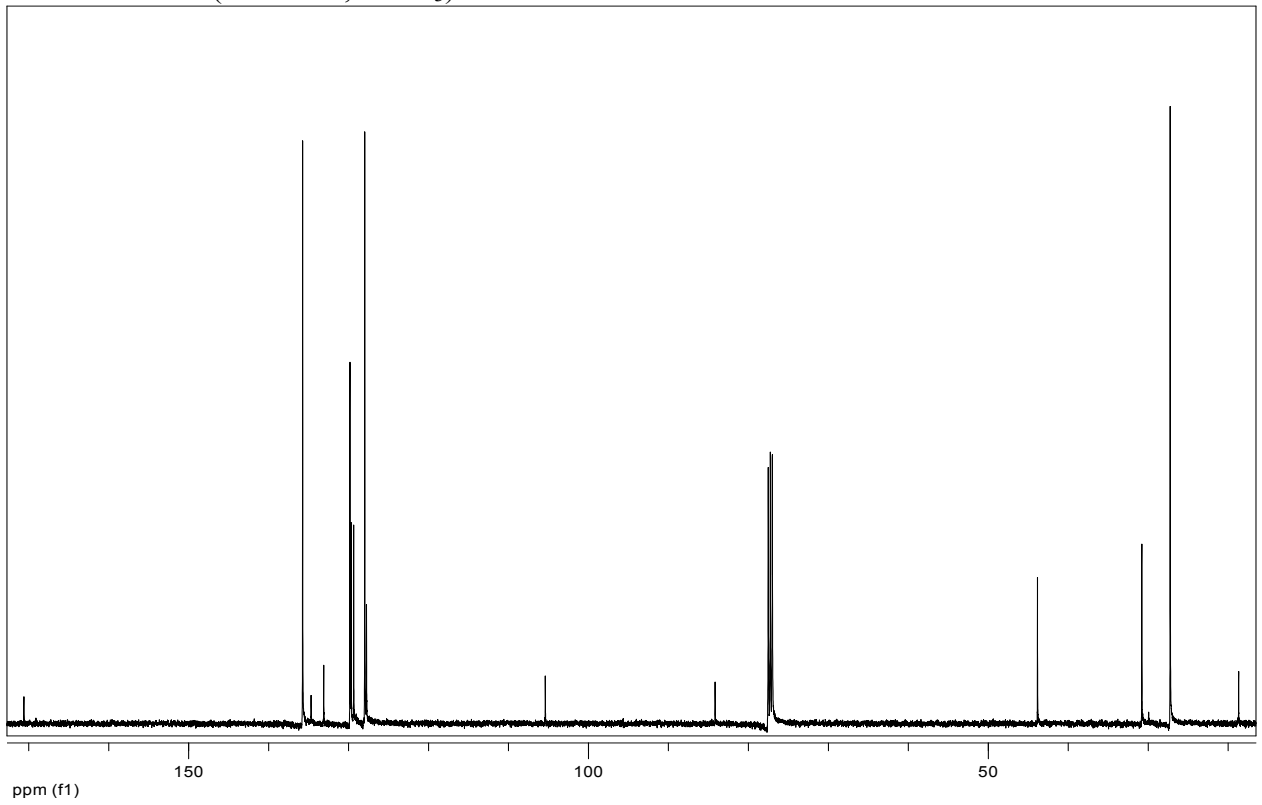
^{13}C of **13** (125 MHz, CDCl_3)



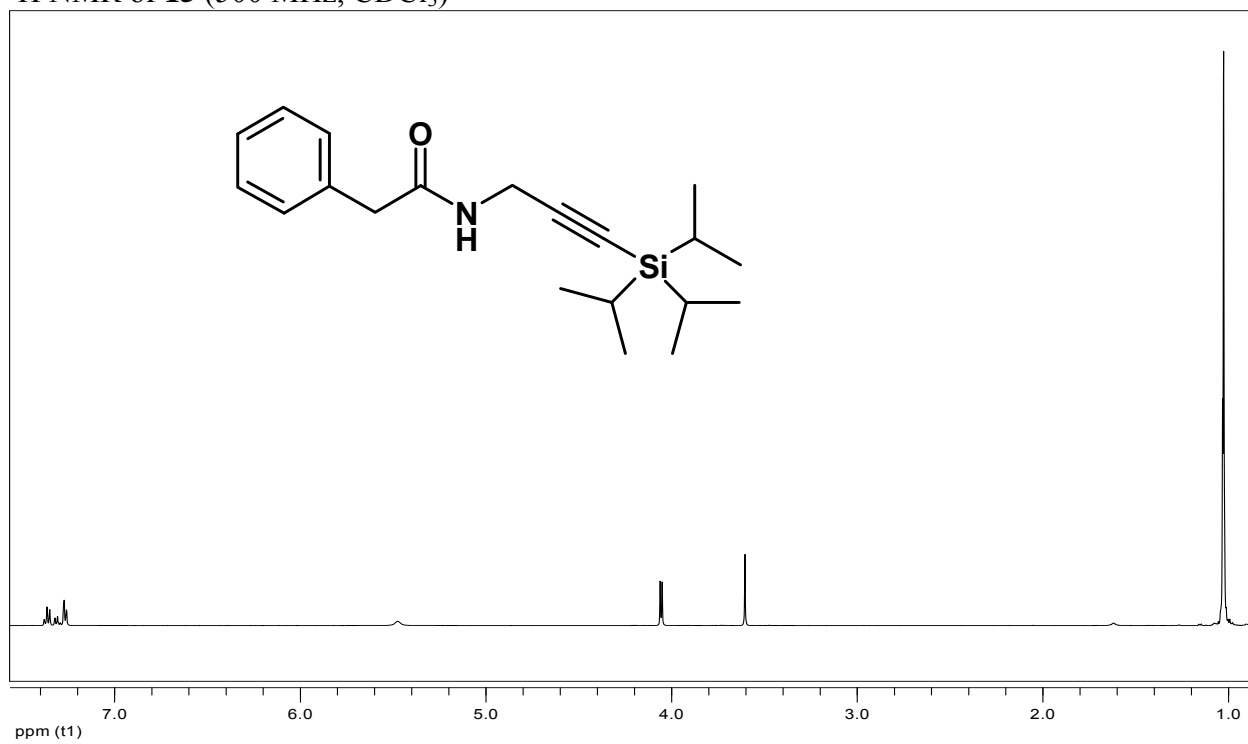
^1H NMR of **14** (500 MHz, CDCl_3)



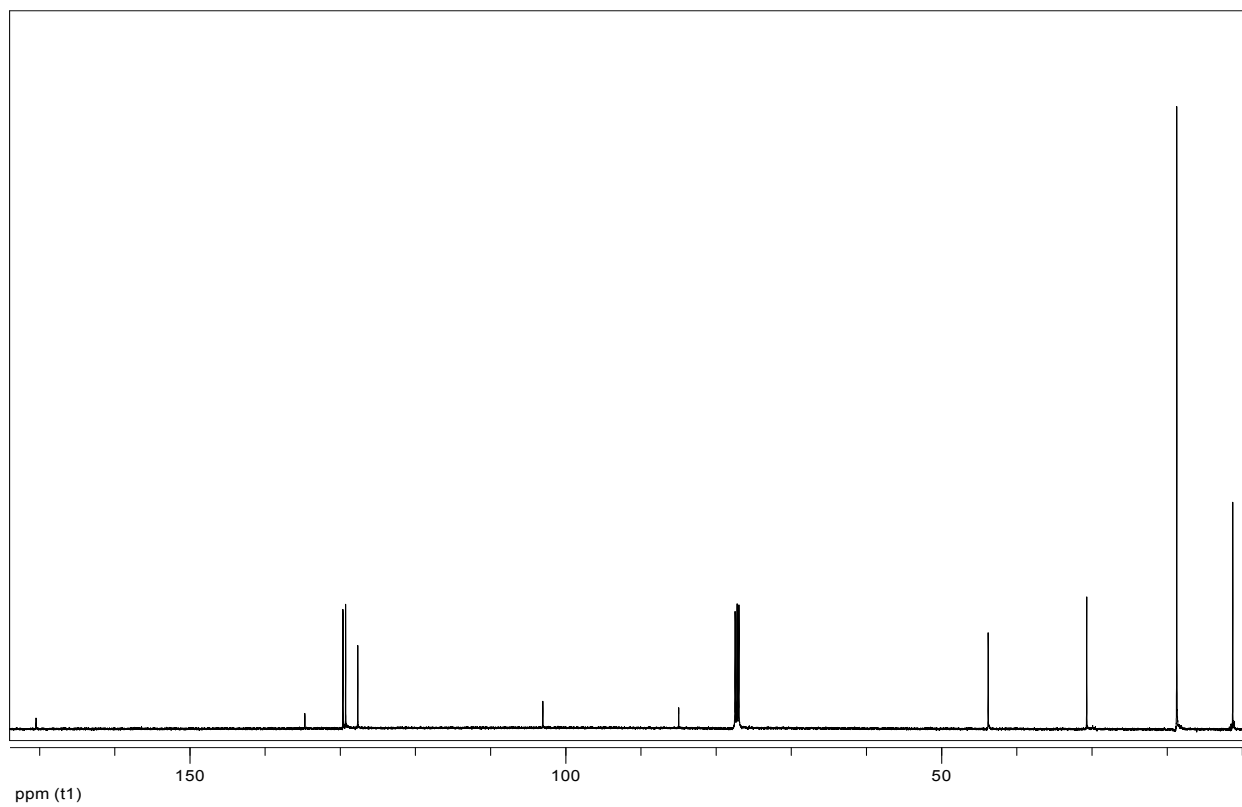
^{13}C NMR of **14** (125 MHz, CDCl_3)

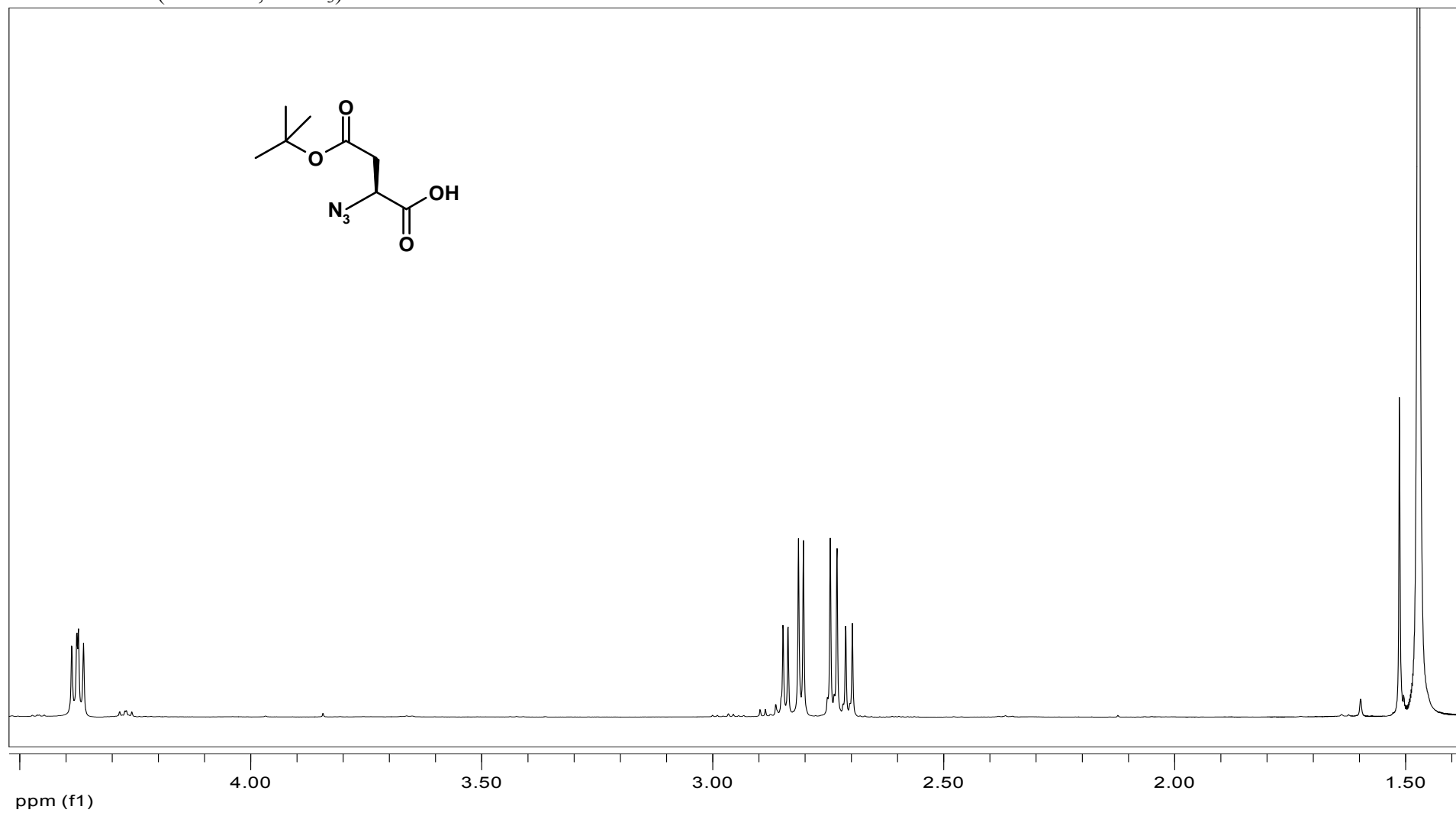


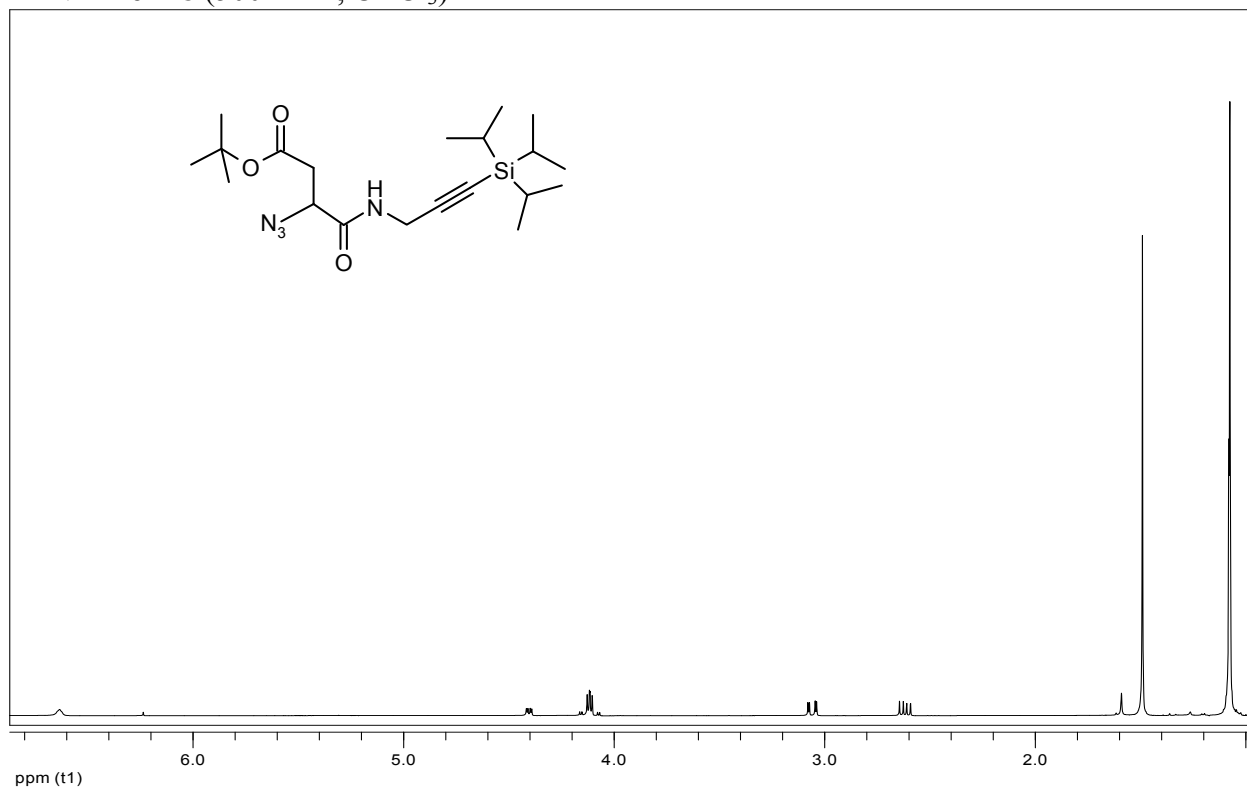
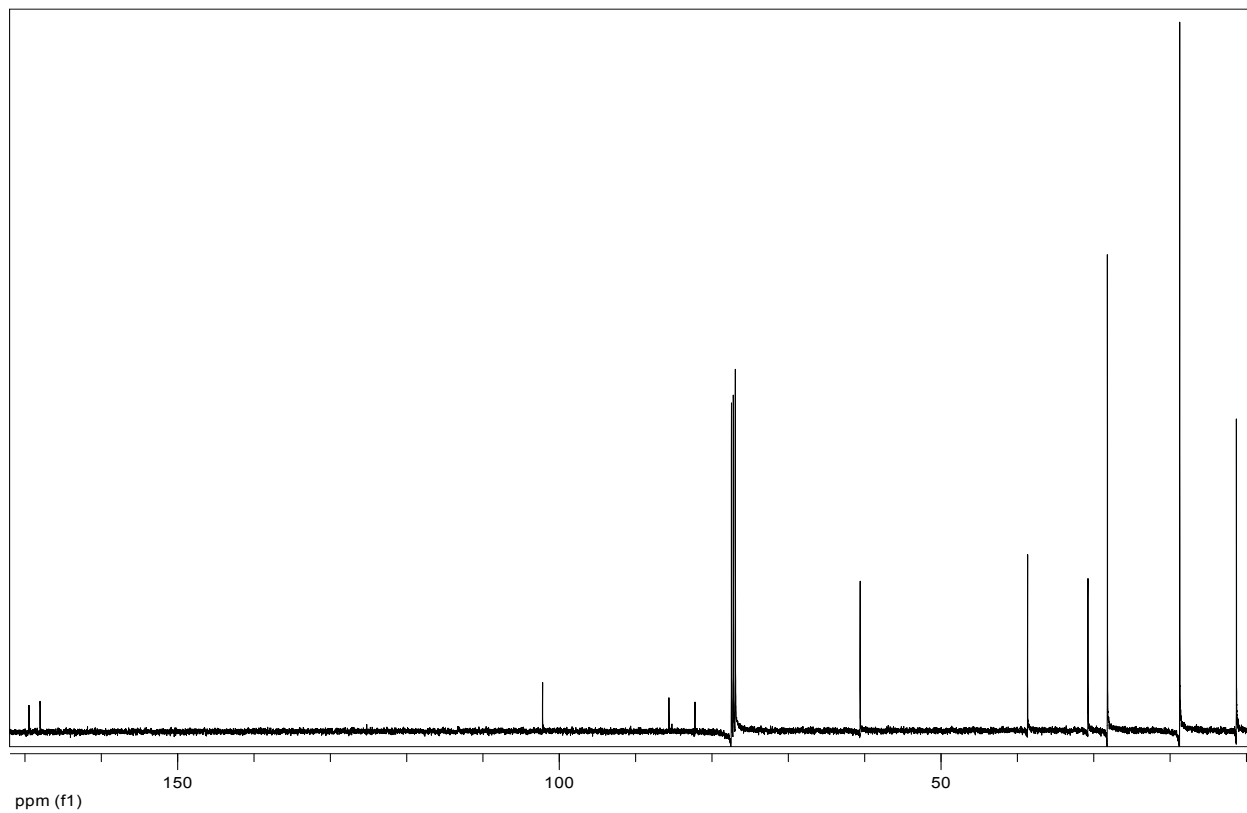
^1H NMR of **15** (500 MHz, CDCl_3)

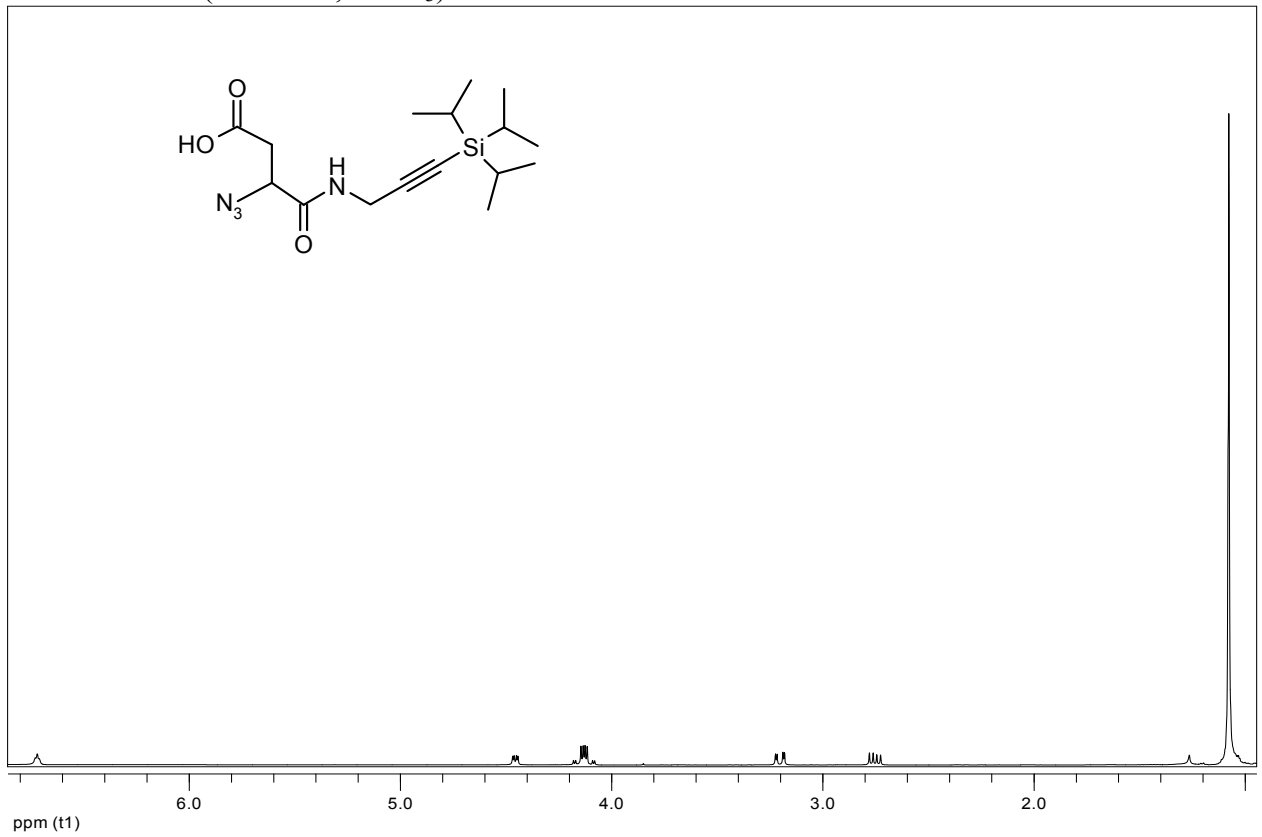
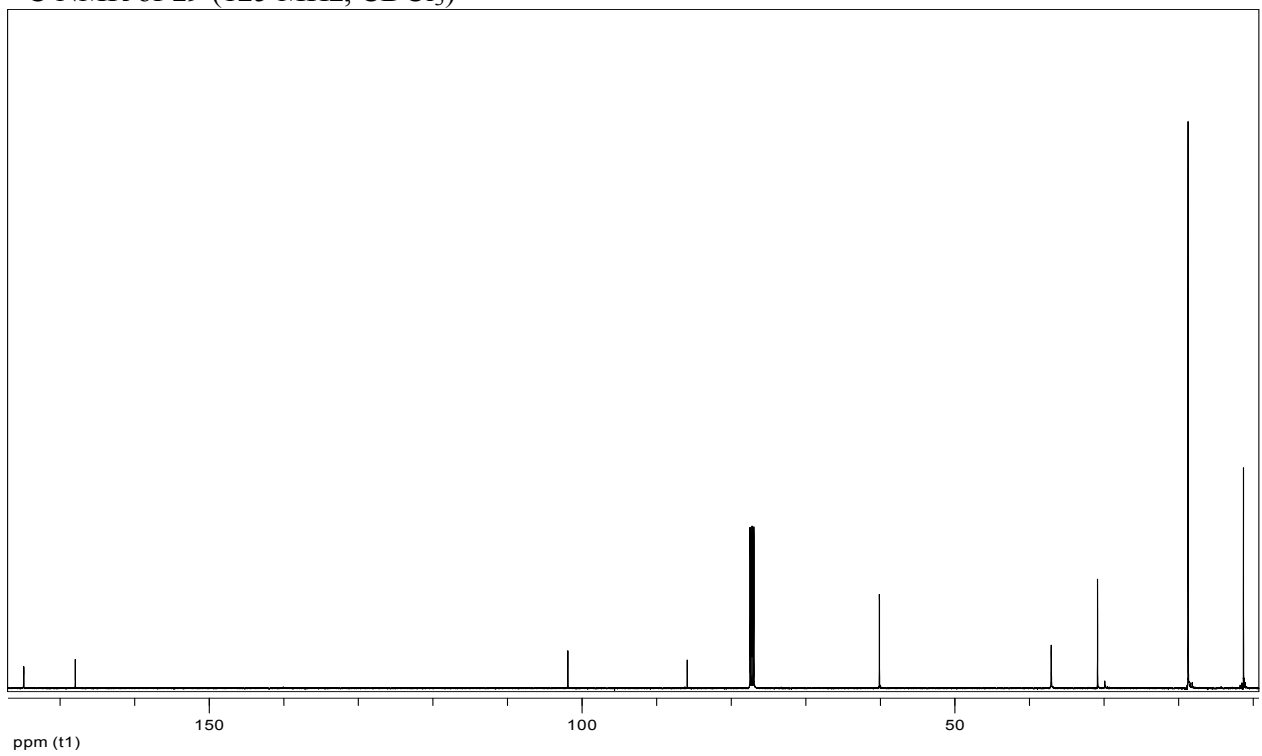


^{13}C NMR of **15** (125 MHz, CDCl_3)

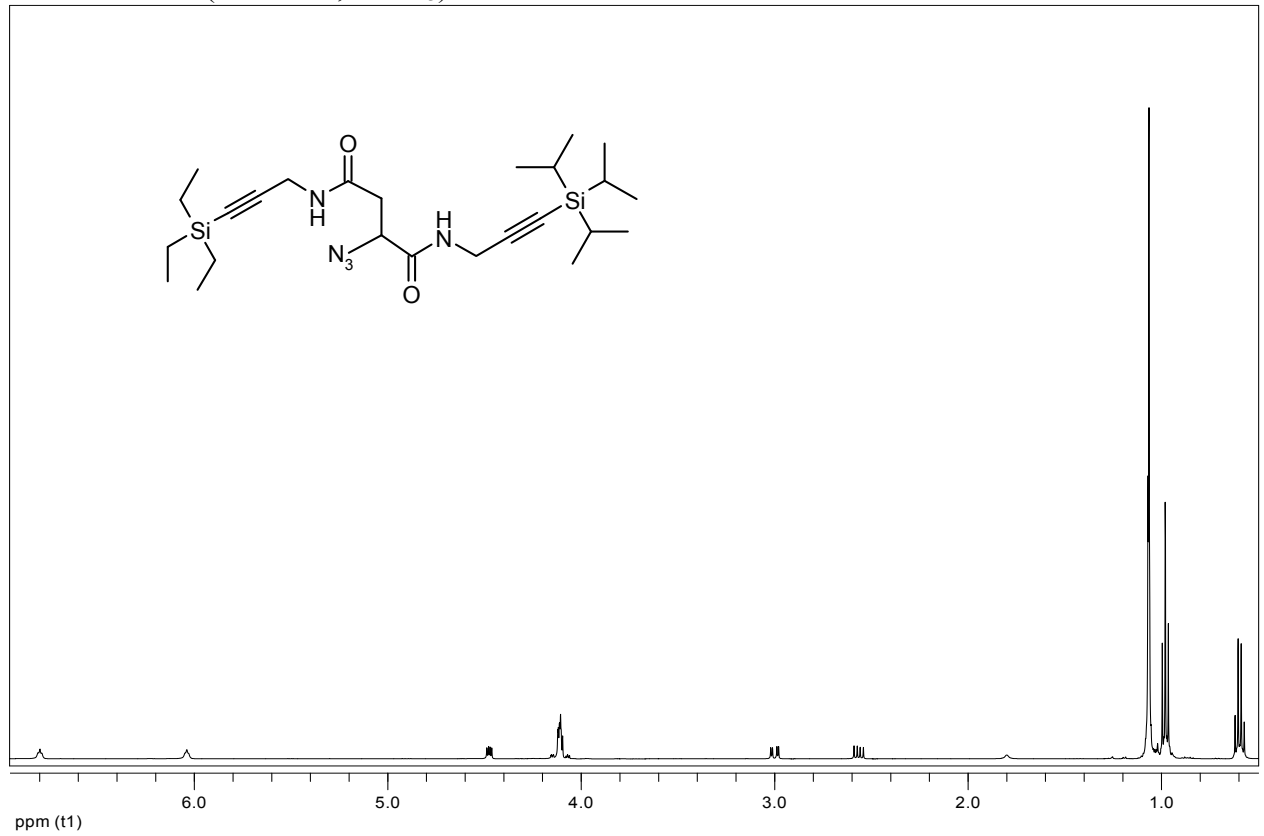


^1H NMR of **17** (500 MHz, CDCl_3)

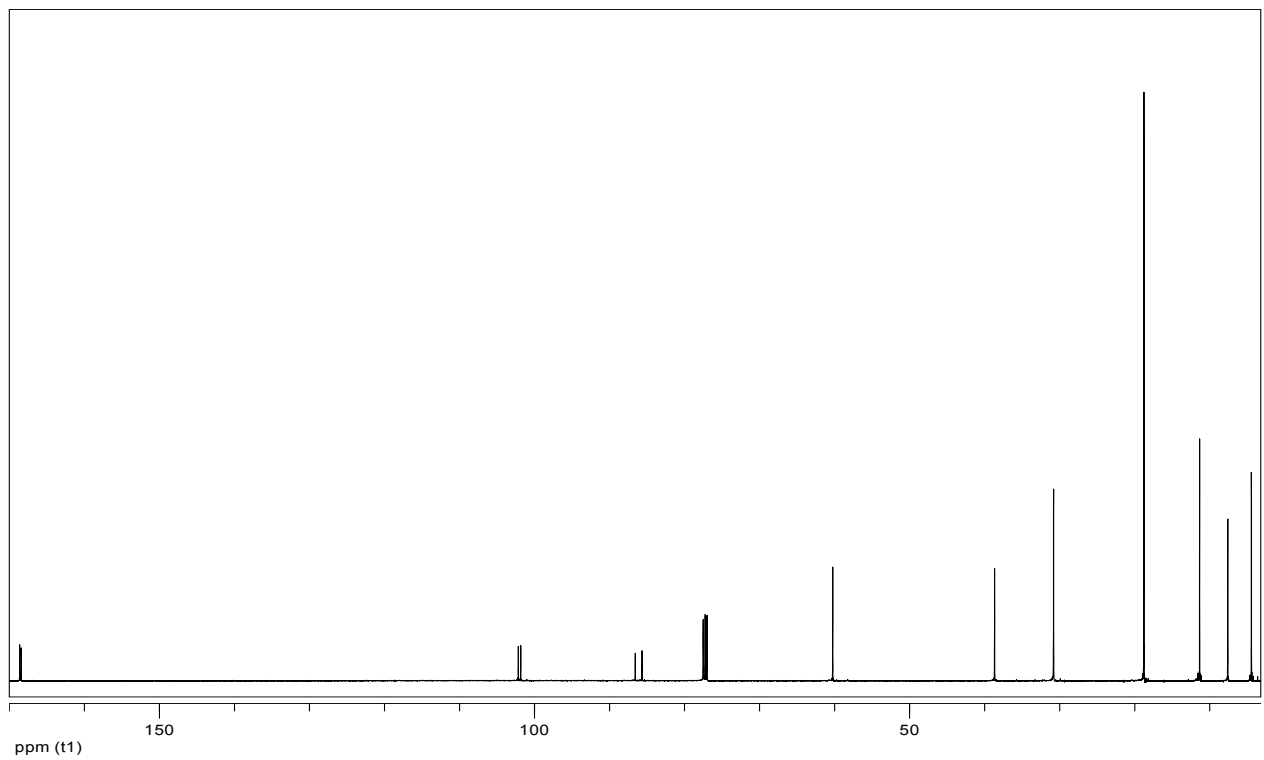
^1H NMR of **18** (500 MHz, CDCl_3) ^{13}C NMR of **17** (125 MHz, CDCl_3)

^1H NMR of **19** (500 MHz, CDCl_3) ^{13}C NMR of **19** (125 MHz, CDCl_3)

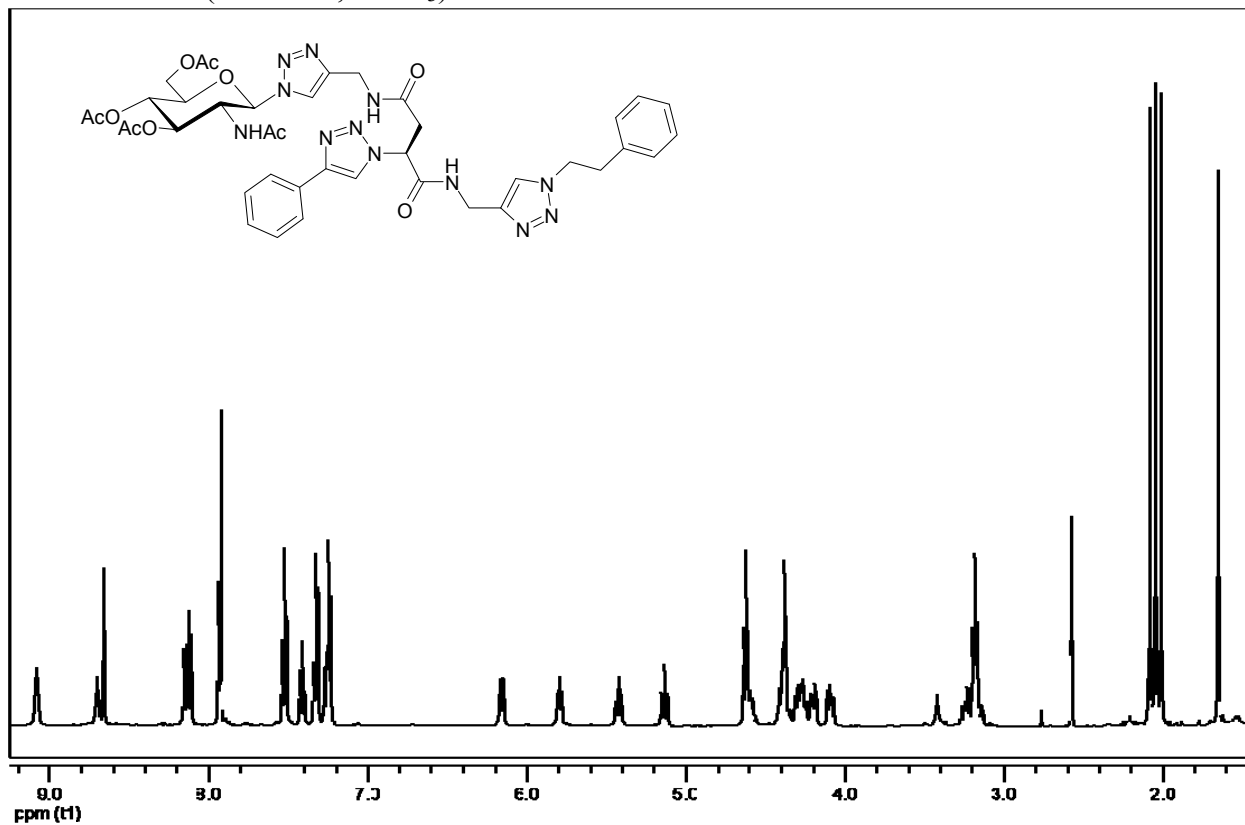
^1H NMR of **20** (500 MHz, CDCl_3)



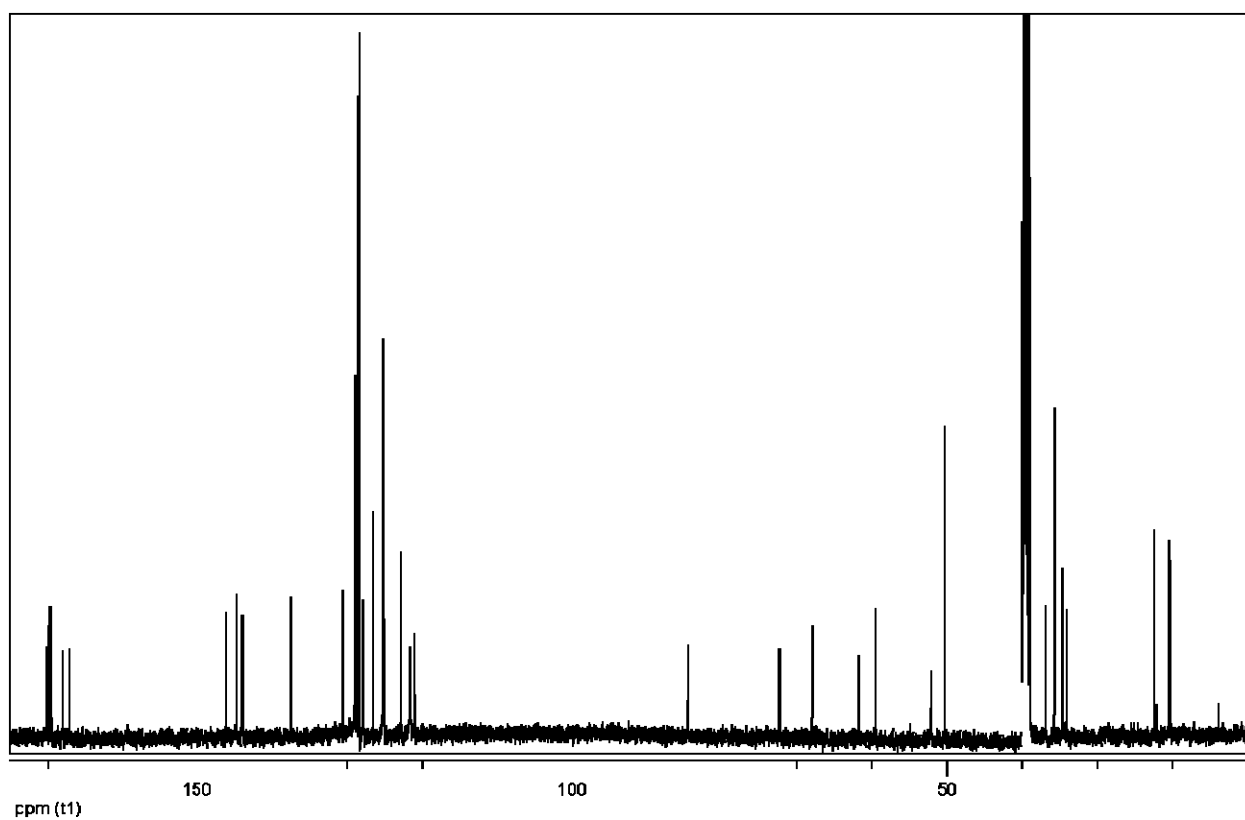
^{13}C NMR of **20** (125 MHz, CDCl_3)



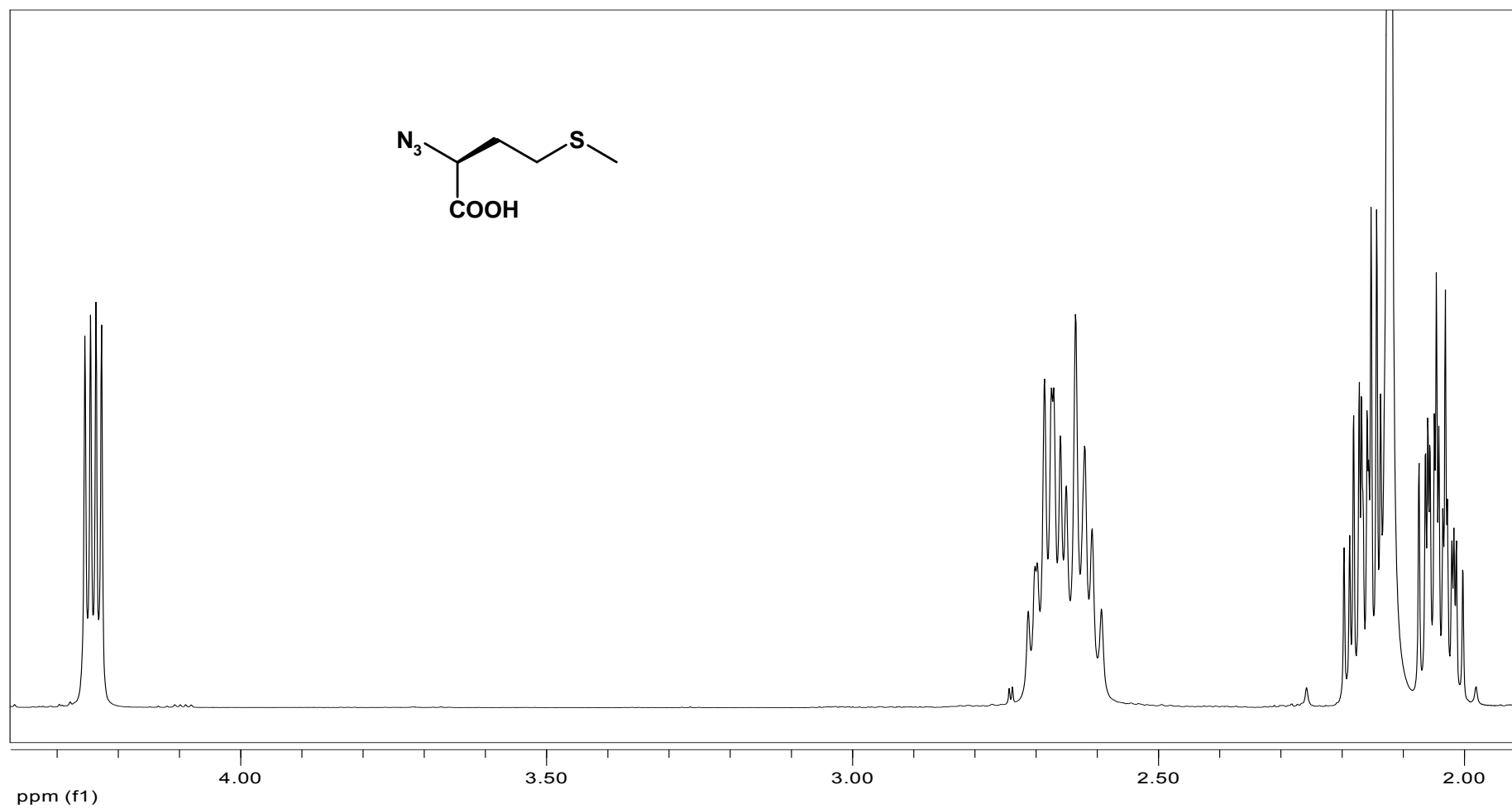
¹H NMR of **25** (500 MHz, CDCl₃)



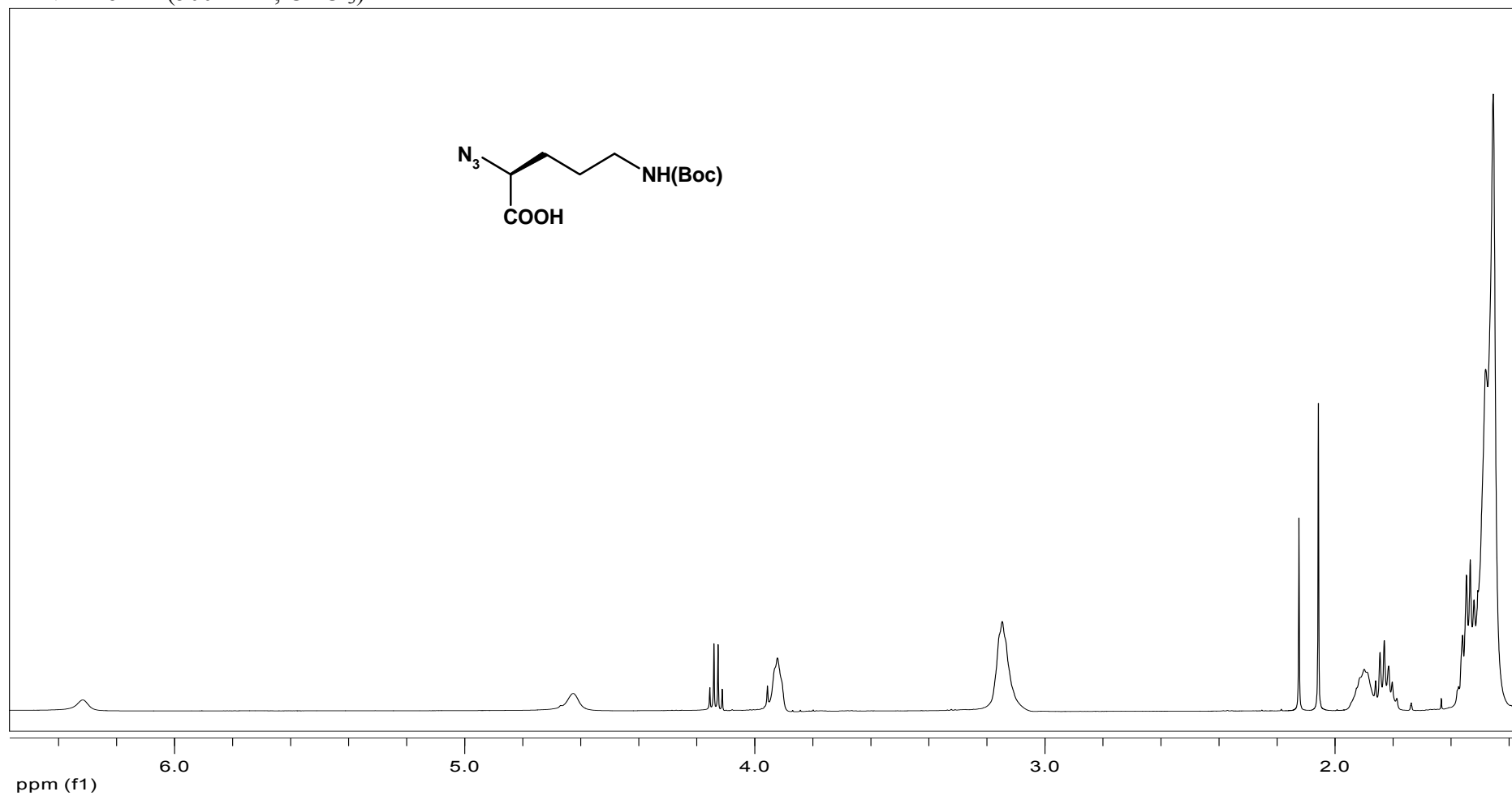
¹³C NMR of **25** (125 MHz, CDCl₃)



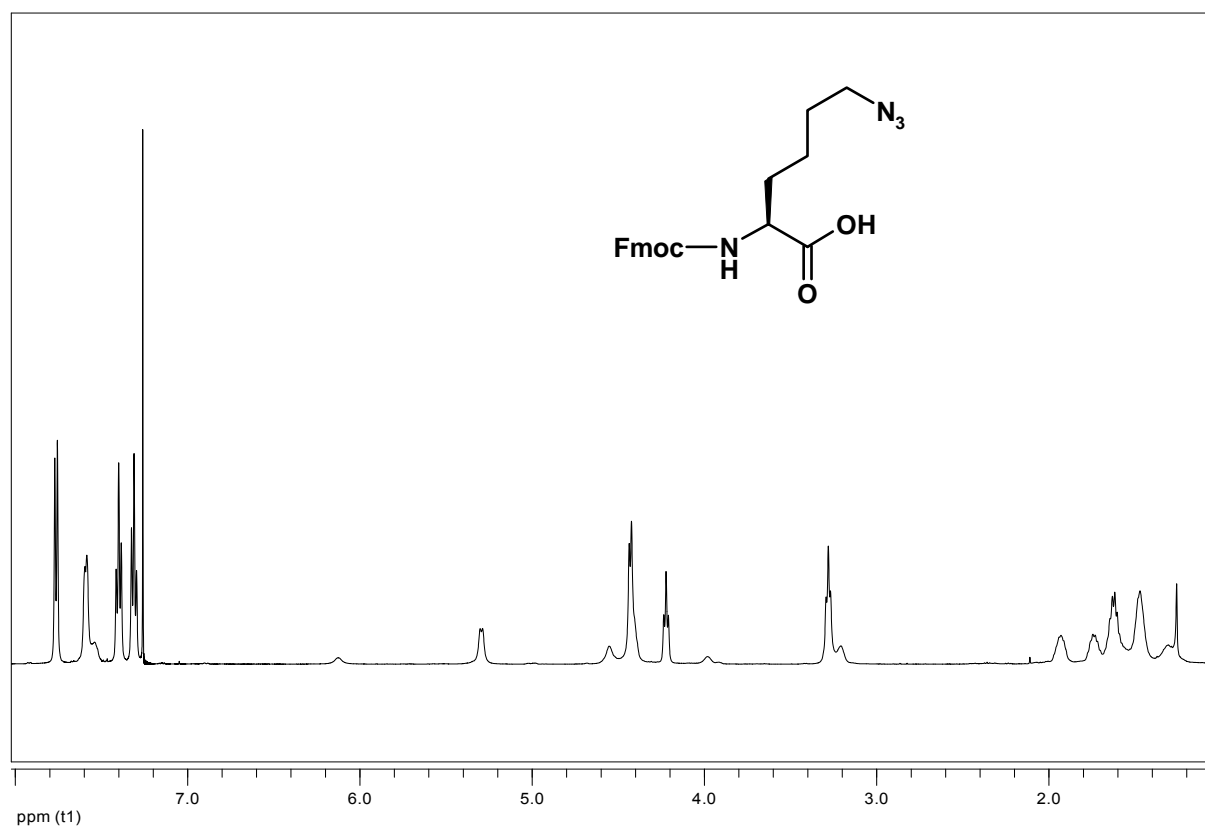
^1H NMR of **26** (500 MHz, CDCl_3)



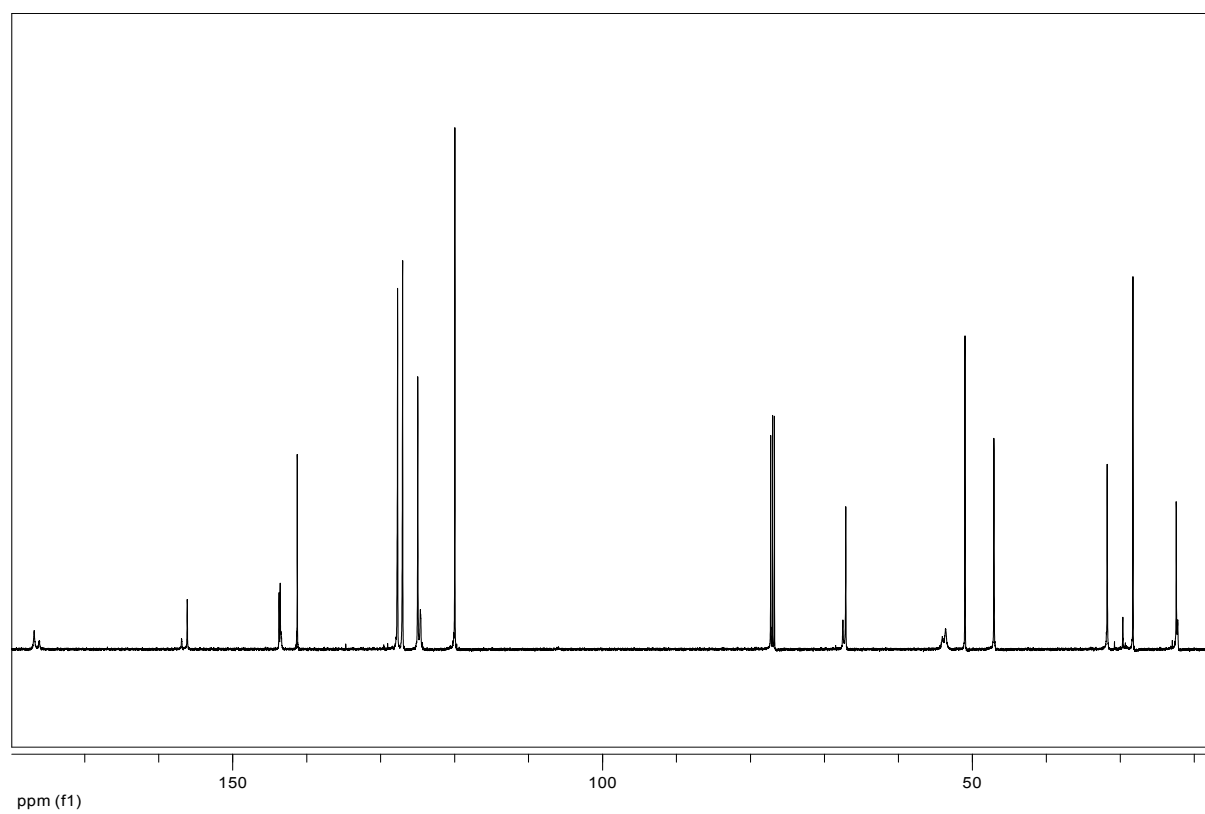
^1H NMR of **27** (500 MHz, CDCl_3)



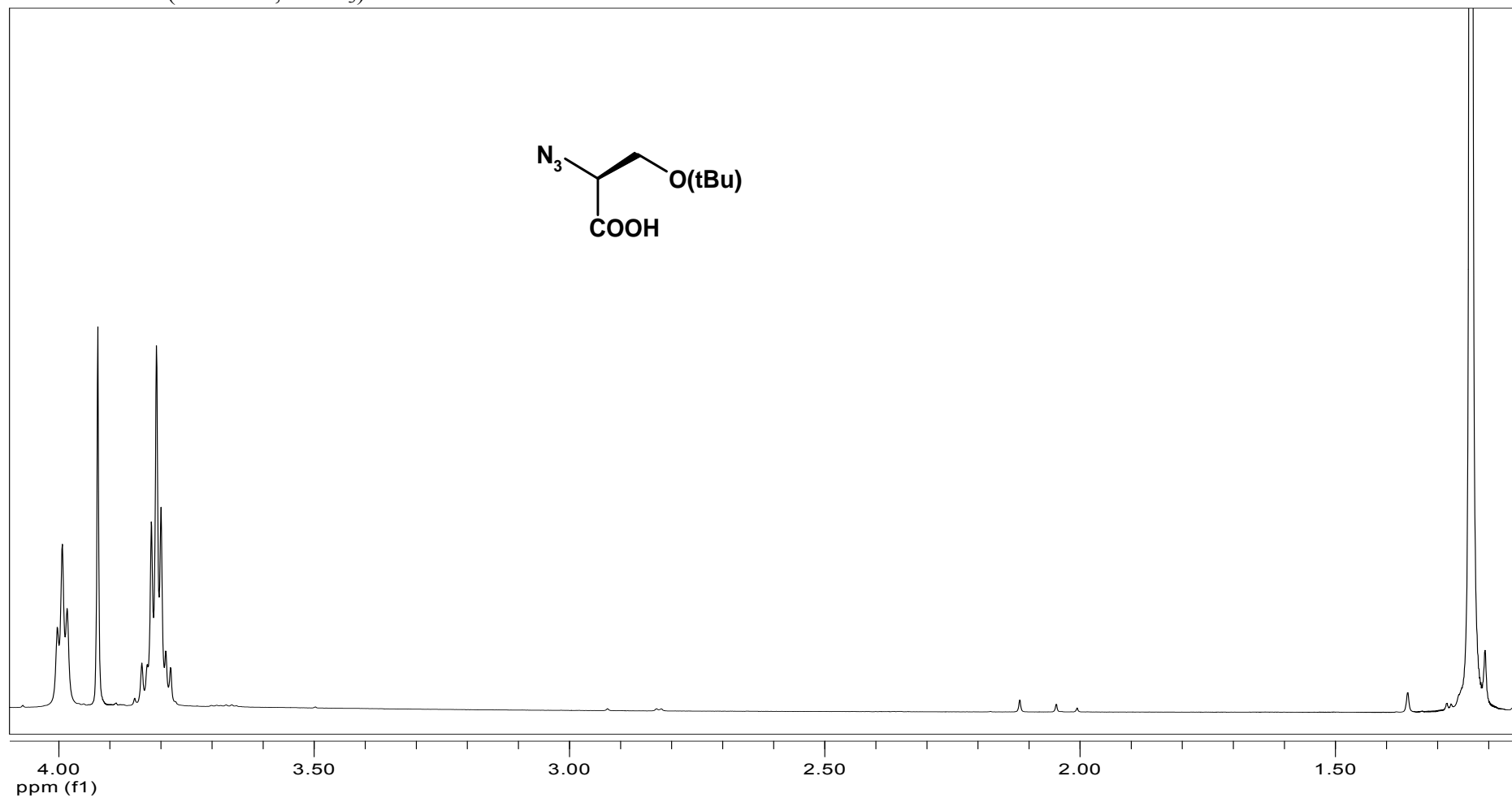
^1H NMR of **29** (500 MHz, CDCl_3)



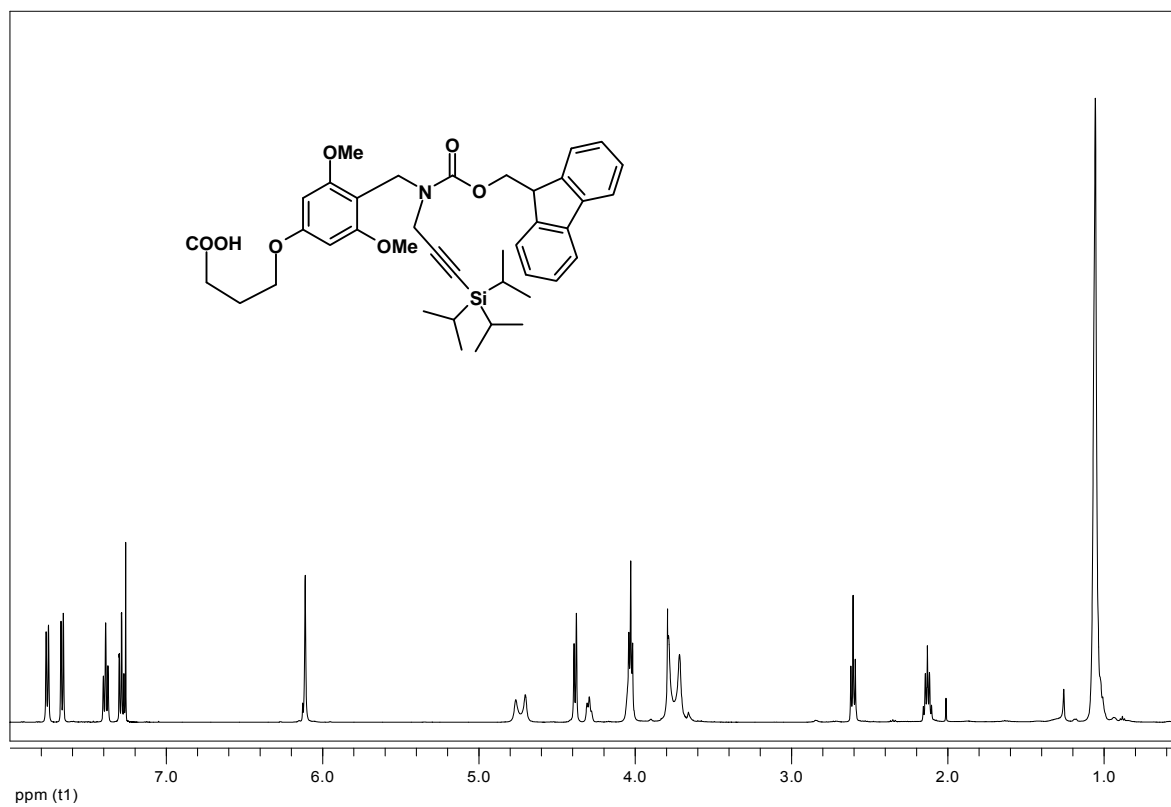
^{13}C NMR of **29** (125 MHz, CDCl_3)



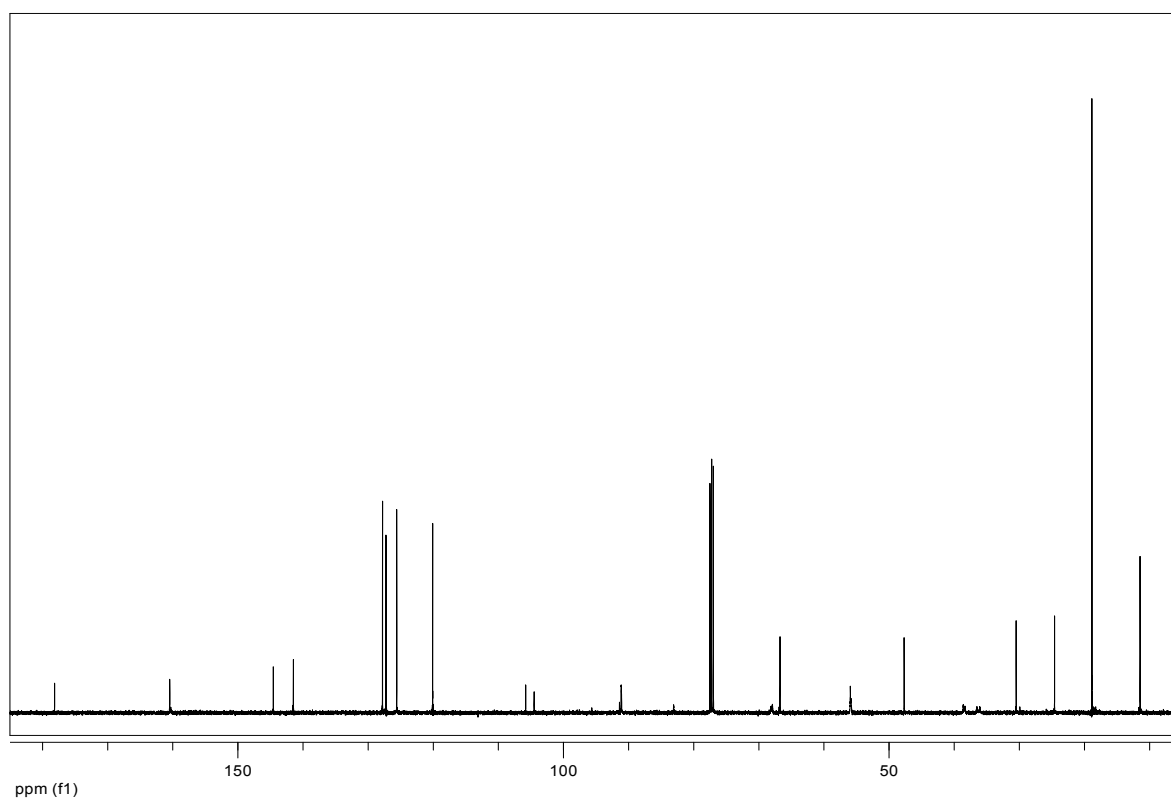
^1H NMR of **30** (500 MHz, CDCl_3)



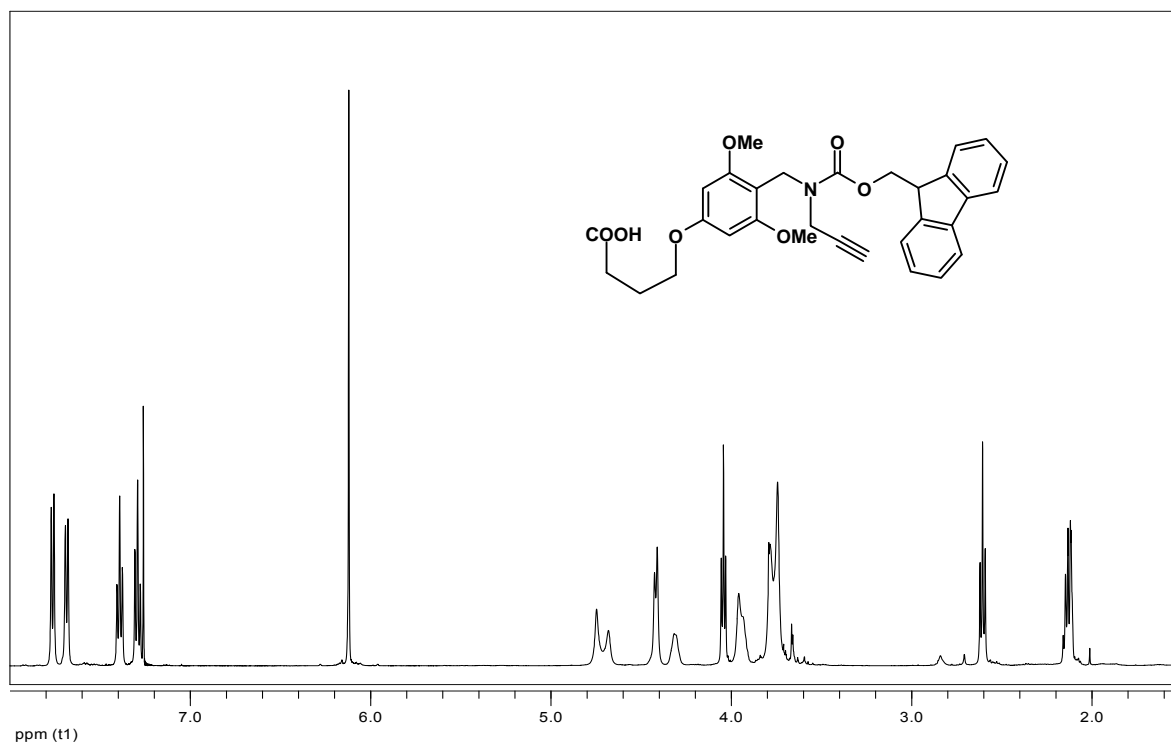
^1H NMR of compound **31** (500 MHz, CDCl_3)



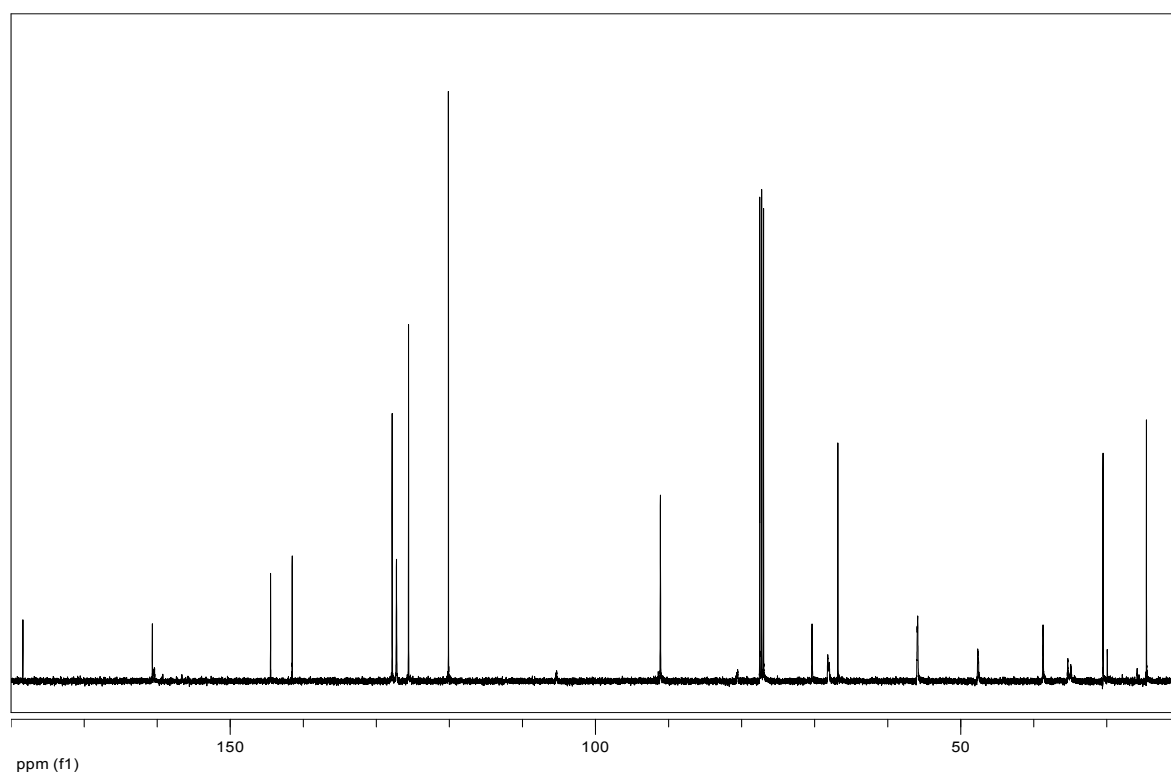
^{13}C NMR of compound **31** (125 MHz, CDCl_3)



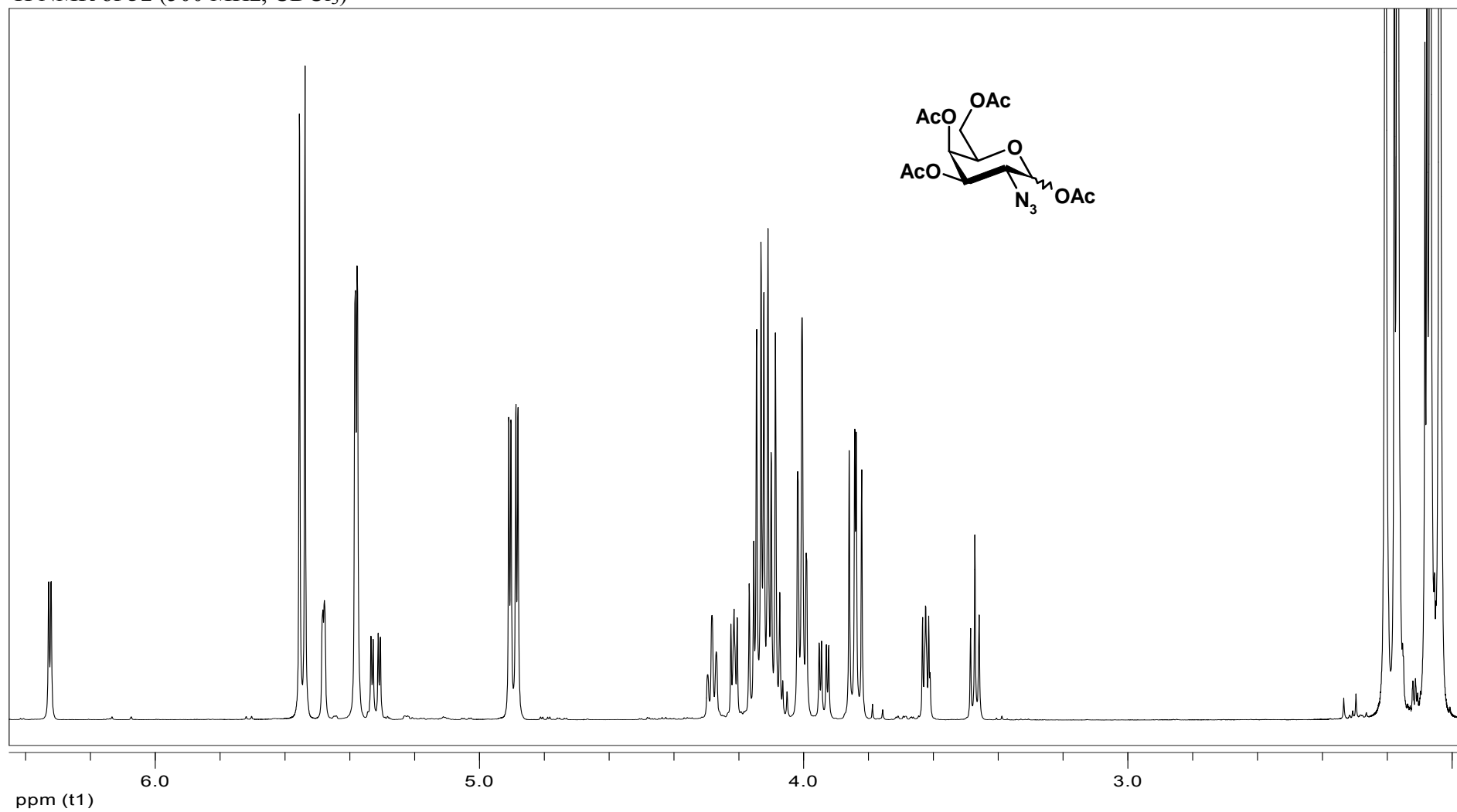
^1H NMR of **32**



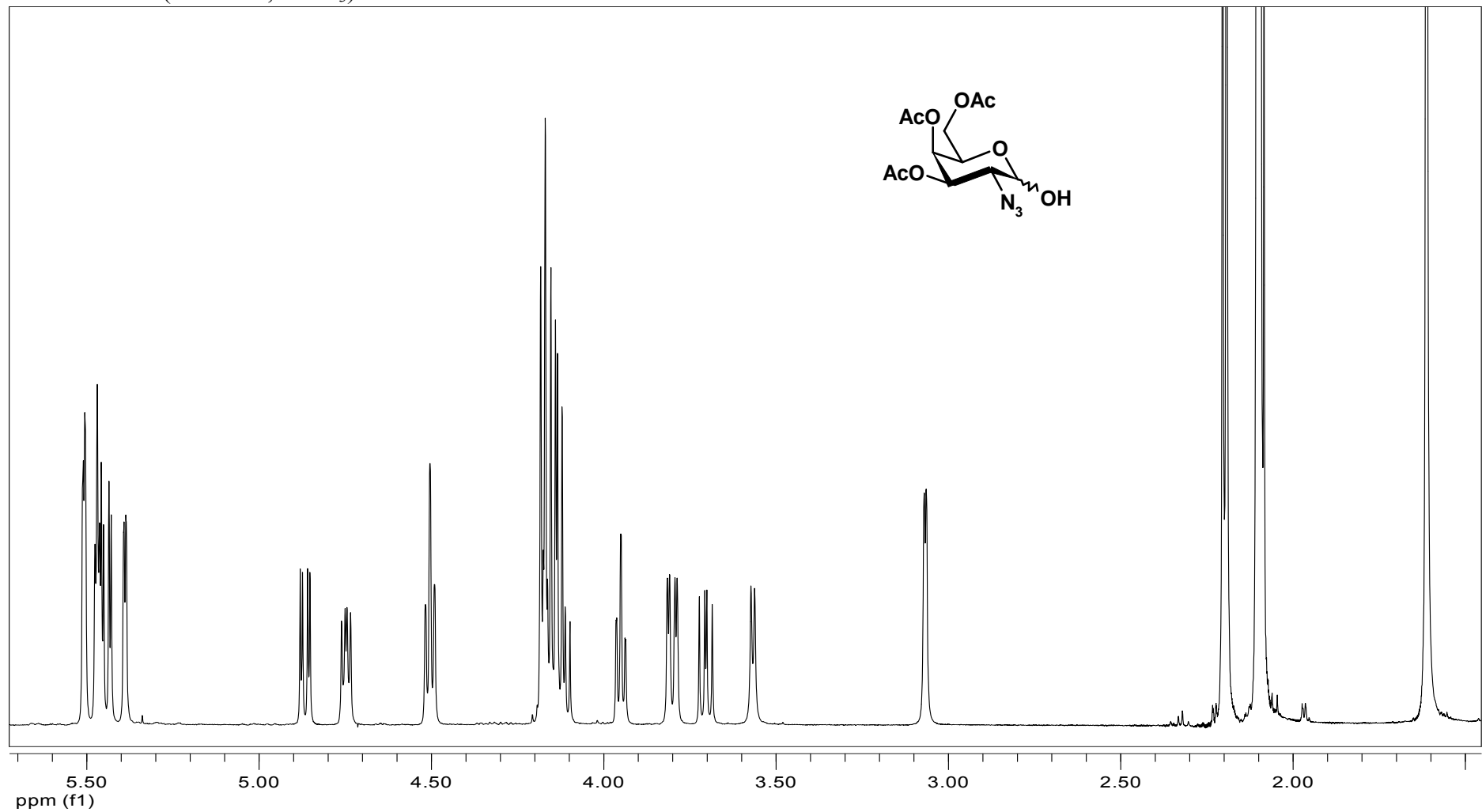
^{13}C NMR of compound 32



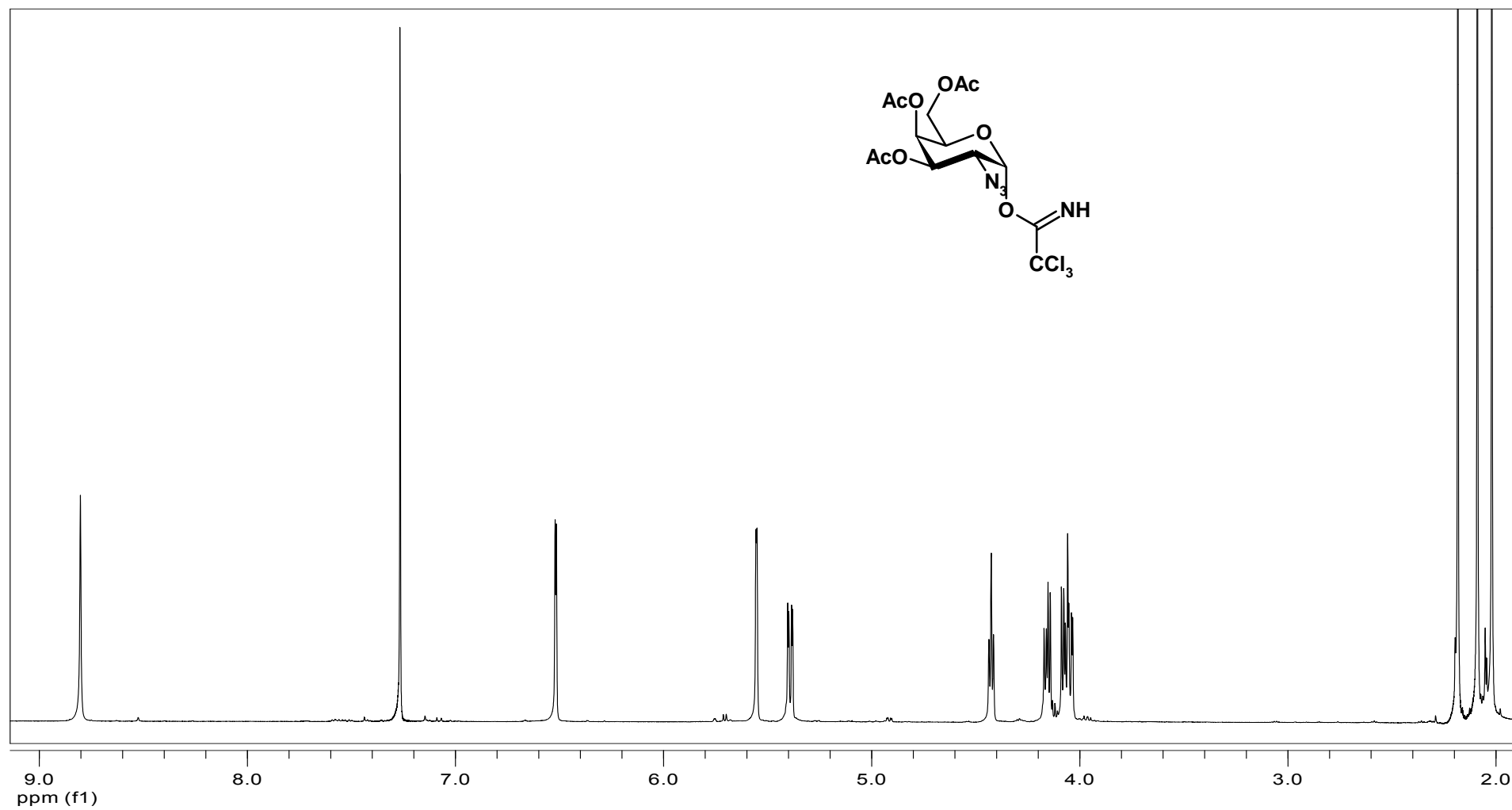
^1H NMR of **51** (500 MHz, CDCl_3)



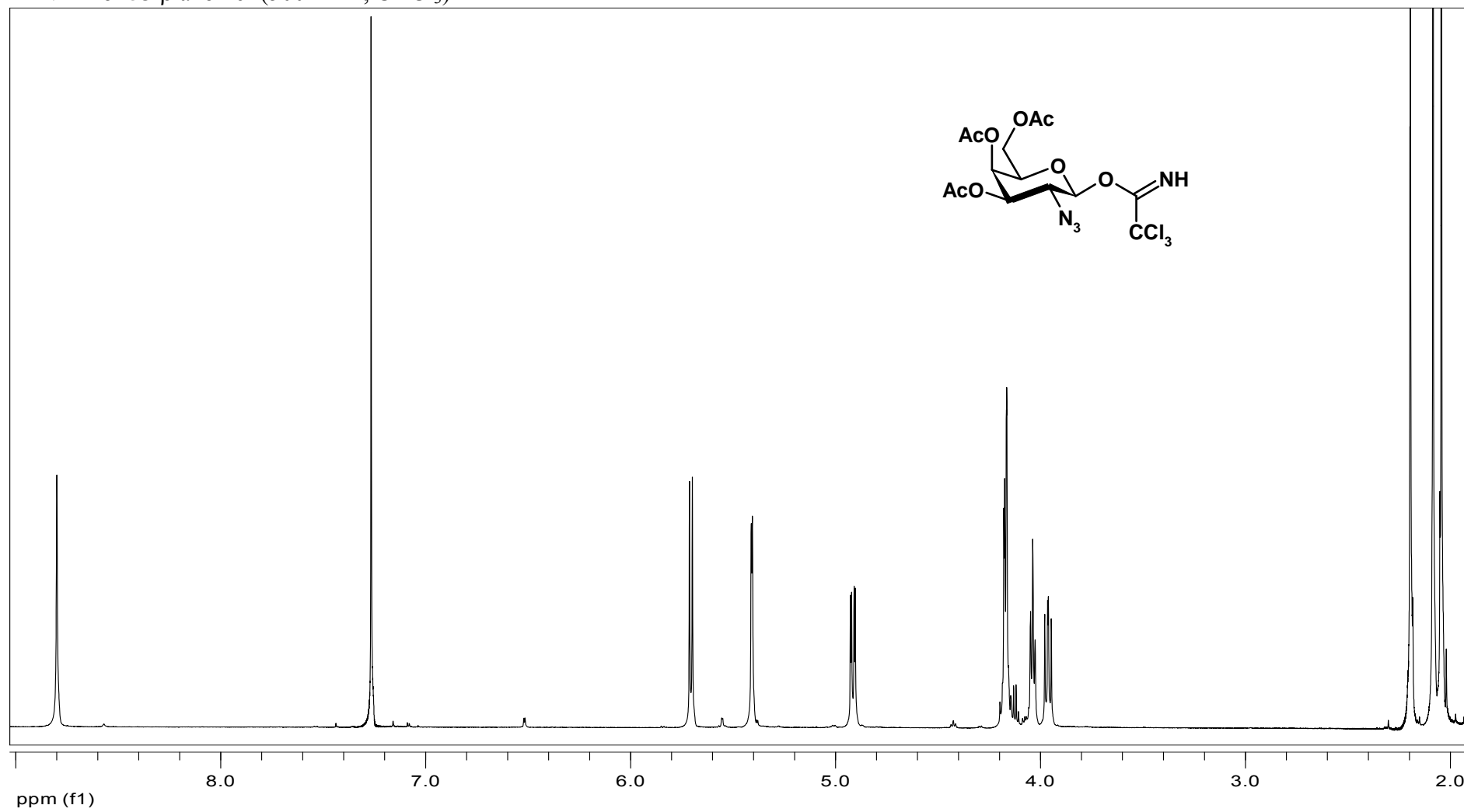
^1H NMR of **52** (500 MHz, CDCl_3)

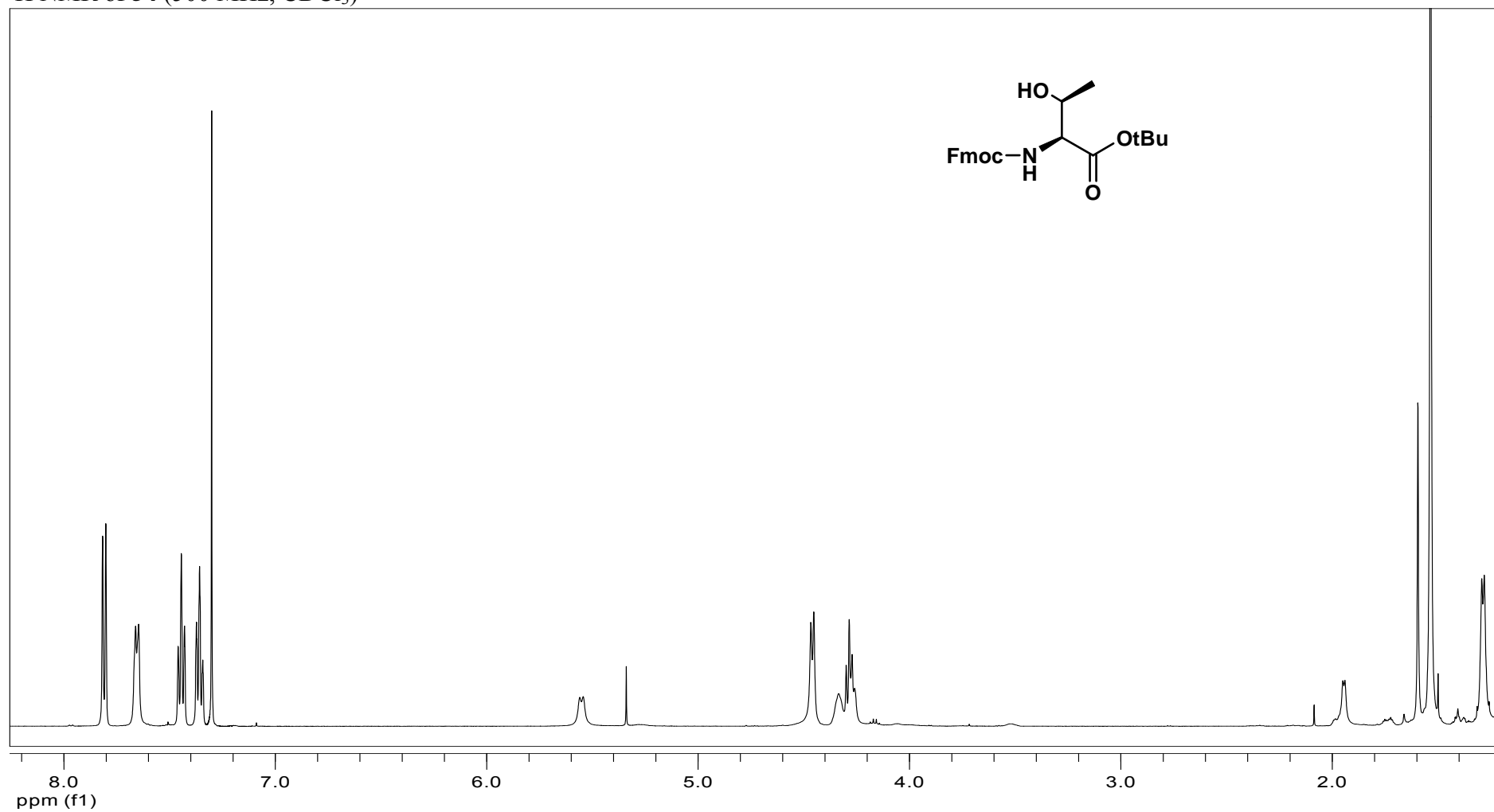


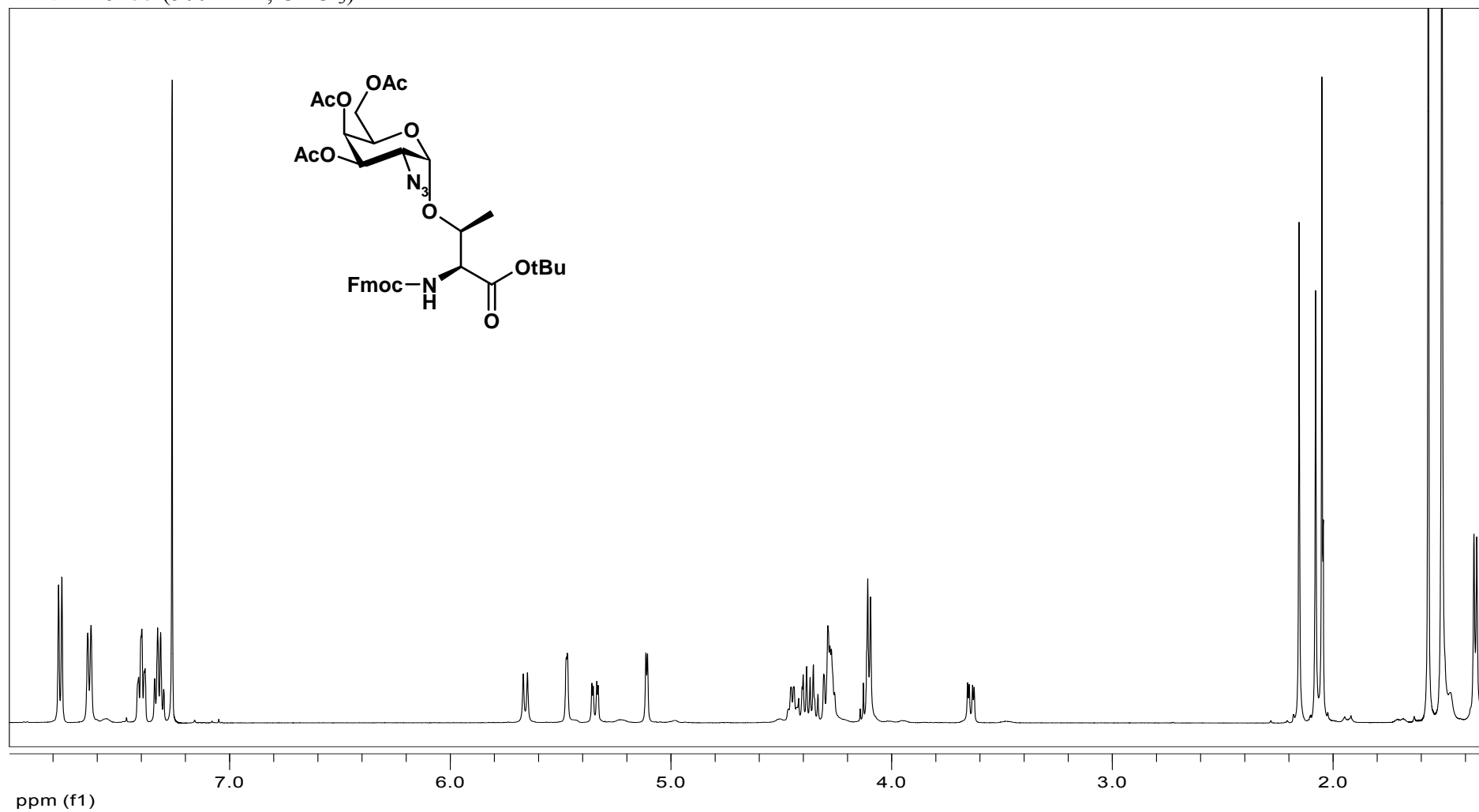
^1H NMR of **53** α anomer (500 MHz, CDCl_3)



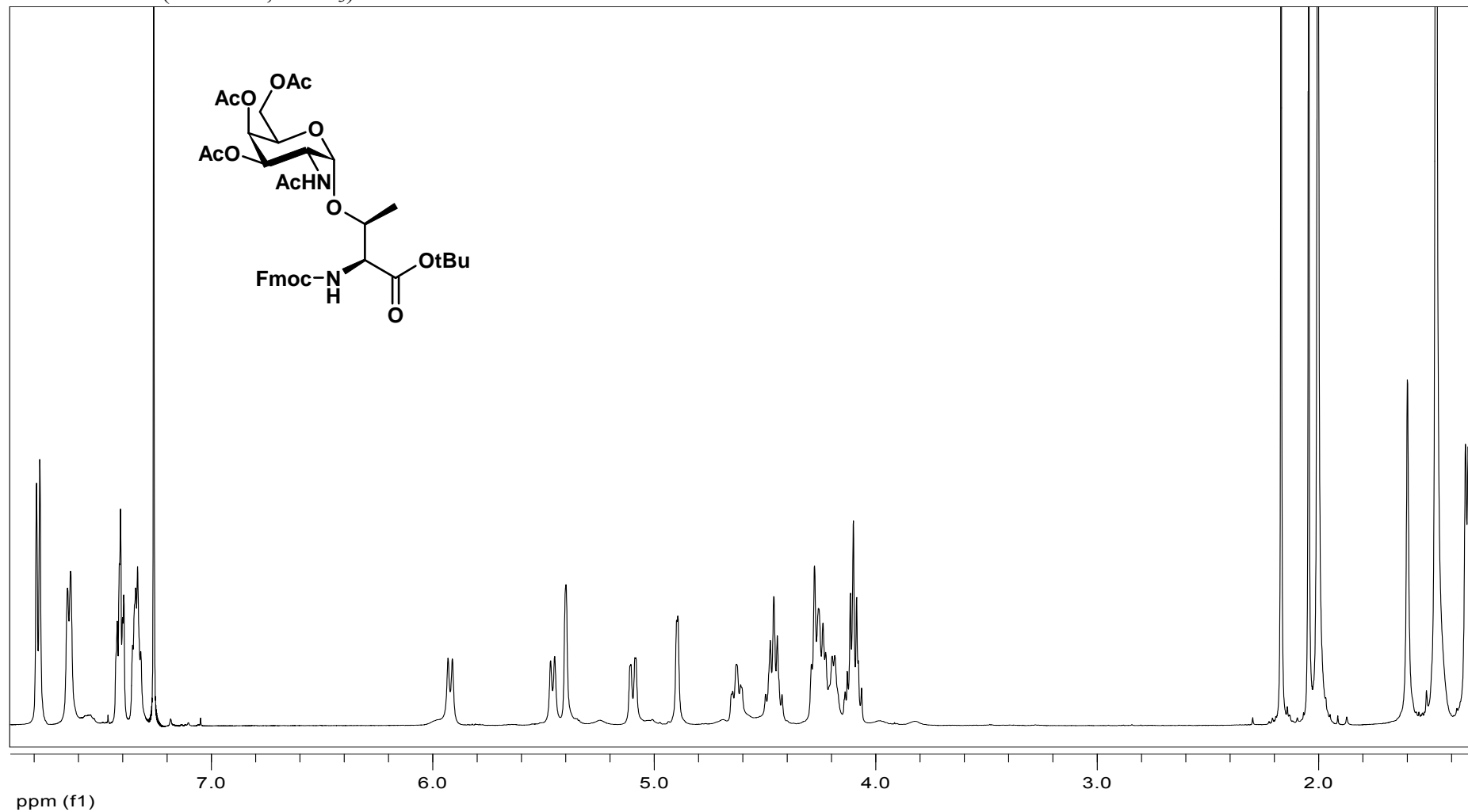
^1H NMR of **53** β anomer (500 MHz, CDCl_3)



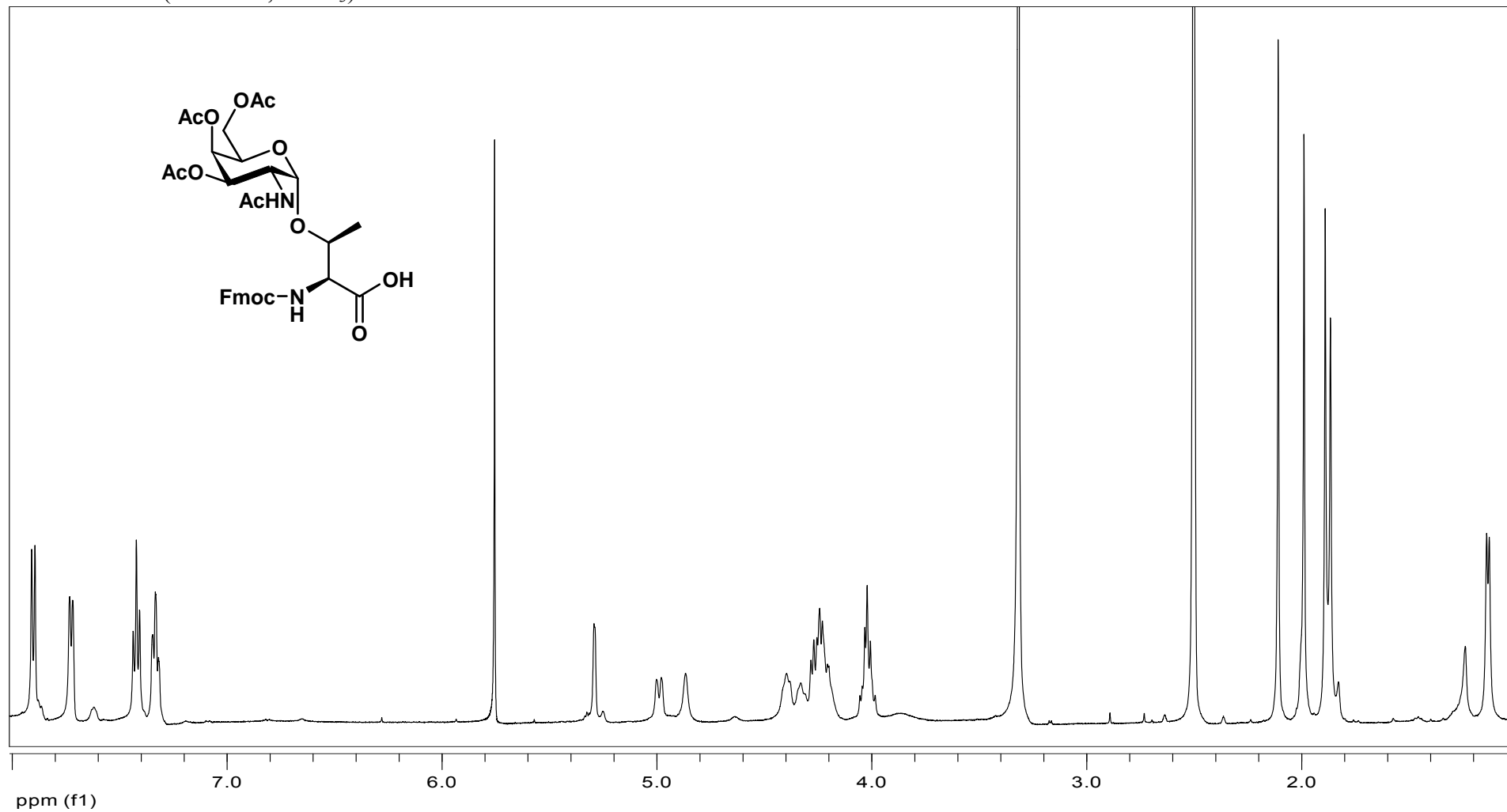
^1H NMR of **54** (500 MHz, CDCl_3)

^1H NMR of **55** (500 MHz, CDCl_3)

^1H NMR of **56** (500 MHz, CDCl_3)

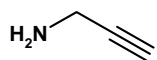


^1H NMR of **57** (500 MHz, CDCl_3)

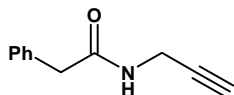


INDEX DES PRODUITS

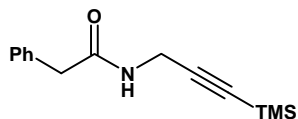
1



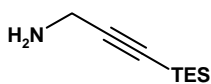
2



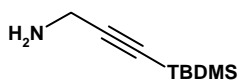
3



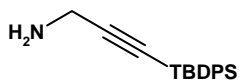
4



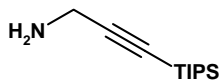
5



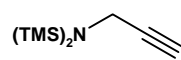
6



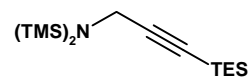
7



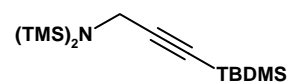
8



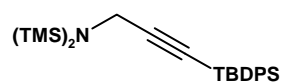
9



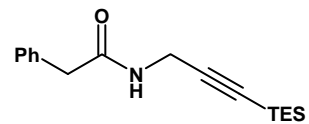
10



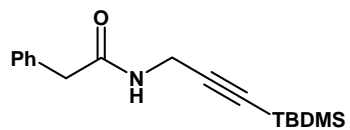
11



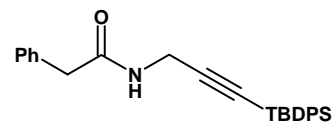
12



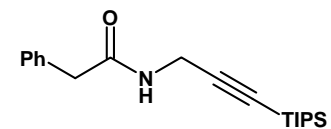
13



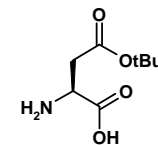
14



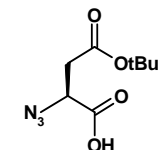
15



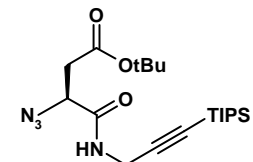
16



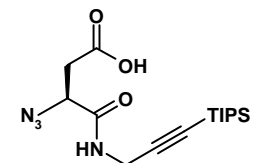
17



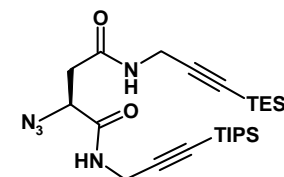
18



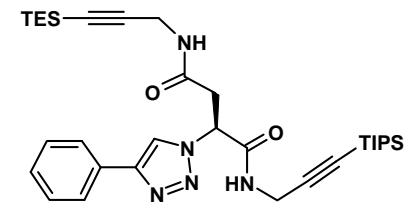
19



20

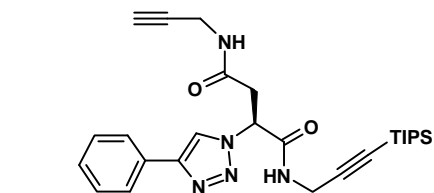


21

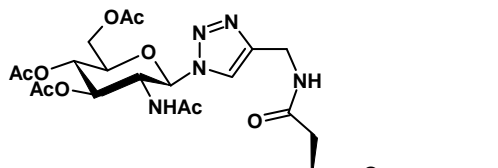


INDEX DES PRODUITS

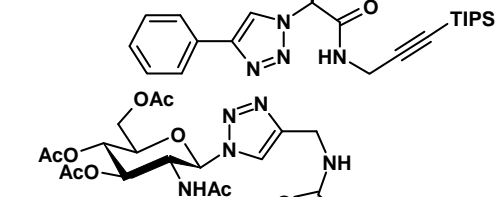
22



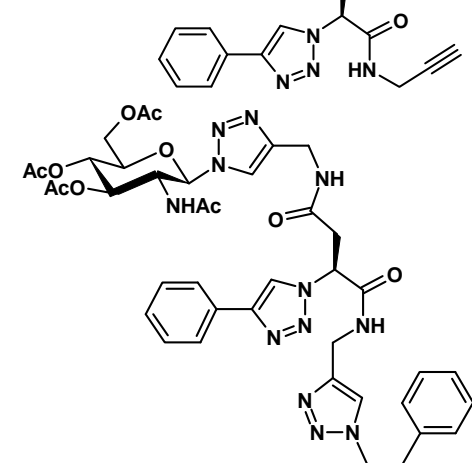
23



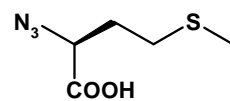
24



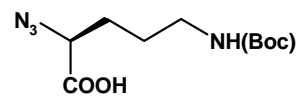
25



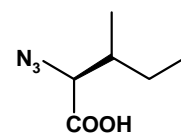
26



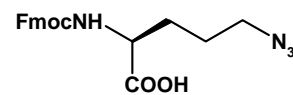
27



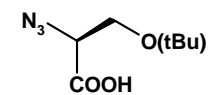
28



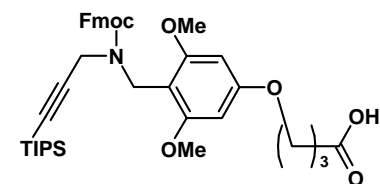
29



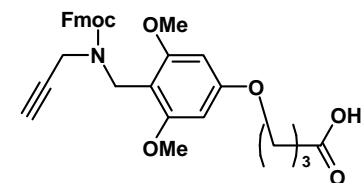
30



31



32



*Tournez la page,
S'il vous plait*

INDEX DES PRODUITS

33



34a



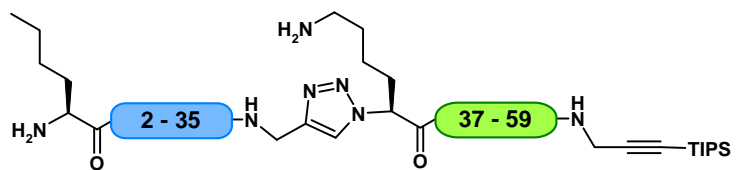
34b



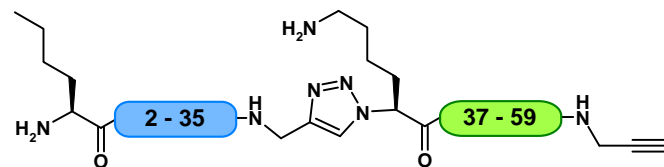
35



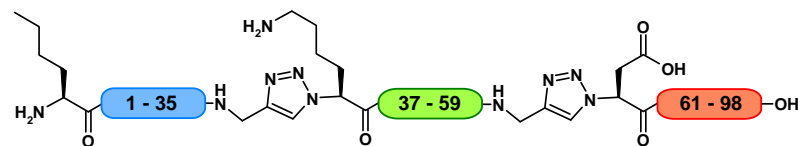
36



37



38



39



40

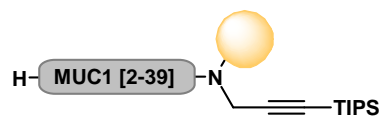


41

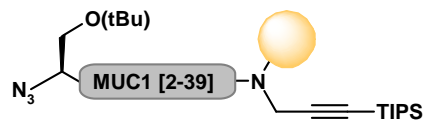


INDEX DES PRODUITS

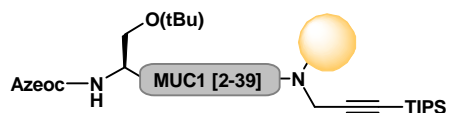
42



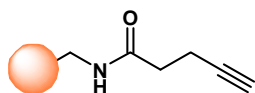
43



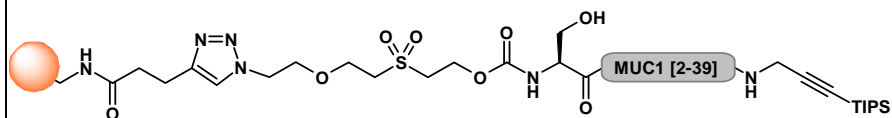
44



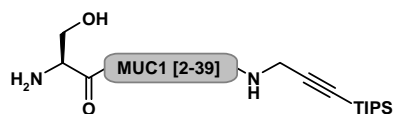
45



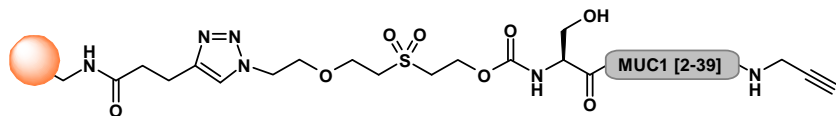
46



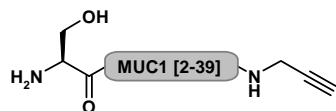
46'



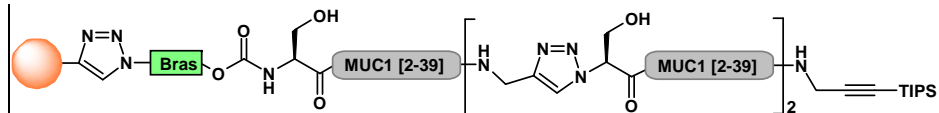
47



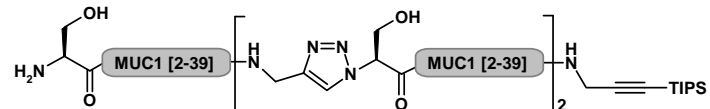
47'



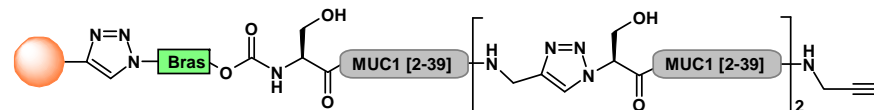
48



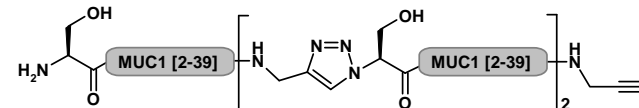
48'



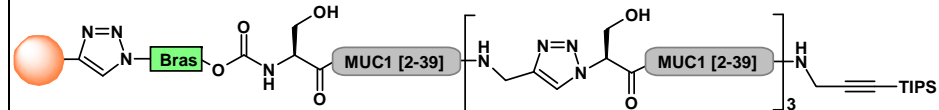
49



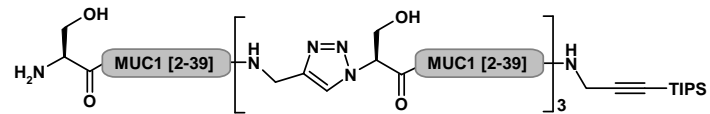
49'



50



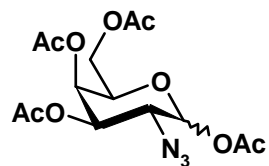
50'



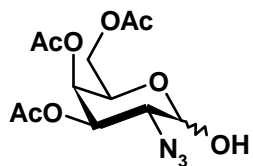
*Tournez la page
S'il vous plait*

INDEX DES PRODUITS

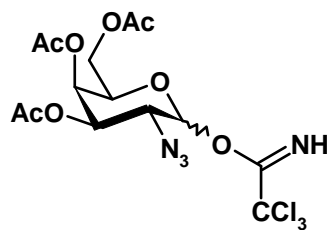
51



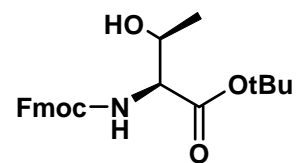
52



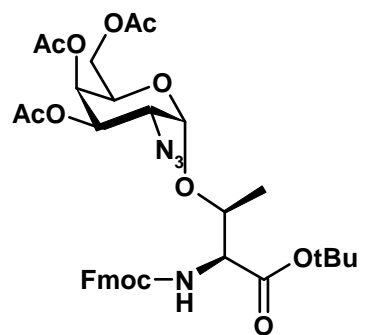
53



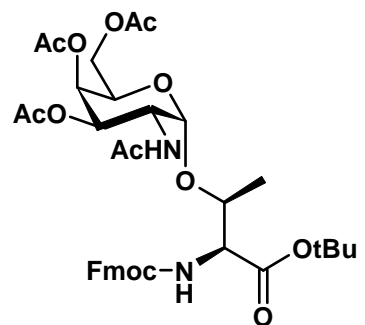
54



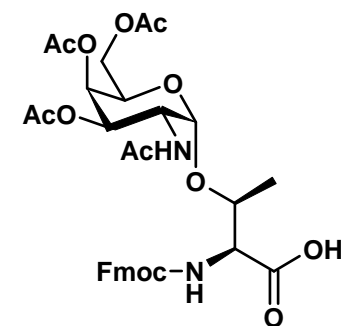
55



56



57



INDEX DES GRADIENTS

<i>Gradient</i>	<i>Pente</i>	<i>Composition</i>	<i>Durée (min)</i>	<i>Débit (mL/min)</i>
<i>A</i>	2,5 %	20-95% MeCN/H ₂ O + 0,1% TFA	30	1
<i>B</i>	1 %	30-60% MeCN/H ₂ O + 0,1% TFA	30	1
<i>C</i>	0,33 %	27-37% MeCN/H ₂ O + 0,1% TFA	30	1
<i>D</i>	0,33 %	26-36% MeCN/H ₂ O + 0,1% TFA	30	1
<i>E</i>	1 %	05-35% MeCN/H ₂ O + 0,1% TFA	30	1
<i>F</i>	1,4 %	15-70% MeCN/H ₂ O + 0,1% TFA	40	1
<i>G</i>	1 %	20-50% MeCN/H ₂ O + 0,1% TFA	30	1
<i>H</i>	2 %	00-60% MeCN/H ₂ O + 0,1% TFA	30	1
<i>I</i>	1,66 %	10-60% MeCN/H ₂ O + 0,1% TFA	30	1
<i>J</i>	0,33%	30-40% MeCN/H ₂ O + 0,1% TFA	30	1
<i>K</i>	0,17%	35-40% MeCN/H ₂ O + 0,1 TFA	30	1

Ibai VALVERDE

La multi-ligation triazole : Développement de nouveaux outils pour la synthèse de mimes de protéines par cycloadditions successives

Ce travail est consacré au développement d'une nouvelle méthode de synthèse d'analogues bioactifs de protéines en utilisant des réactions successives de cycloaddition entre les alcynes terminaux et les azotures (CuAAC).

Pour pouvoir effectuer des cycloadditions itératives, nous avons étudié la stabilité et les conditions de coupure de différents groupements masquants des alcynes terminaux. Cette étude a été valorisée par le développement d'une stratégie originale pour réaliser un triple cycloaddition successive une même molécule basée sur la protection temporaire de la fonction alcyne.

La méthode a été appliquée à la synthèse d'un analogue de la stéfine A humaine, un inhibiteur naturel de protéases à cystéine d'intérêt thérapeutique. Pour cela, nous avons mis au point des conditions de CuAAC successive compatibles avec des peptides déprotégés de façon beaucoup à obtenir *in fine* un analogue *bis*-triazole de la stéfine A. Les études par dichroïsme circulaire et d'inhibition de diverses protéases à cystéines confirment que notre analogue synthétique conserve la structure et l'activité biologique de la protéine native.

La stratégie de ligation triazole successive a été étendue par la mise au point de conditions pour réaliser des ligations sur phase solide. La méthodologie développée permet la synthèse de protéines de façon plus rapide et plus simple que par des procédés classiques de ligation successive en solution. Dans l'optique de la synthèse de structures glycopeptidiques capables d'induire une réponse immunitaire contre MUC1 tumorale, nous avons réalisé la synthèse d'analogues peptidiques de MUC1 par ligation successive sur phase solide de 160 acides aminés.

Mots clés: groupes protecteurs des alcynes, azotures, 1,2,3 triazoles, CuAAC, ligation chimique, peptides, analogues de protéines, acides aminés glycosylés, chimie click.

Triazole multi-ligation : Development of new tools for the synthesis of protein analogues through successive cycloadditions

The aim of this work was the development of a novel method for the synthesis of triazolo-proteins by multiple successive copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions (CuAAC).

In order to achieve several successive cycloadditions, we have studied the stability and cleavage conditions of several alkyne protective groups. This study led us to the development of an original strategy in order to achieve three successive cycloadditions on a same scaffold by temporal protection of alkyne functionalities.

The method has been applied to the synthesis of an analogue of human stefin A, a natural inhibitor of several therapeutically relevant cysteine proteases. Therefore, we have developed CuAAC conditions compatible with unprotected peptide ligation. The strategy allowed us to obtain a *bis*-triazolo analogue of human stefin A. Circular dichroism and enzymology assays on several cysteine cathepsins revealed that the synthetic analogue has retained the folding and full biological activity of the native protein.

In order to expand the possibilities of this strategy, we have developed reaction conditions allowing us to perform successive triazole ligation on solid phase. This methodology avoids the need for a time-consuming and labor-intensive purification step before and after each ligation. With the aim of exploring the use of analogues of the tumor-associated form of the glycoprotein MUC1 to induce a specific immune response, we have synthesized a triazolo-analogue of MUC1 of 160 aminoacids using solid phase peptide ligation

Keywords: alkyne protecting groups, azides, CuAAC, chemical ligation, peptides, protein analogues, glycosyl-aminoacids, click chemistry.



Centre de Biophysique Moléculaire
Rue Charles Sadron 45071

