



HAL
open science

**Substitution de la liaison amide par un triazole 1,4-
disubstitué dans le but d'étudier l'impact de ce
remplacement sur la structure secondaire et l'activité
biologique de peptides**

Khoubuib Ben Haj Salah

► **To cite this version:**

Khoubuib Ben Haj Salah. Substitution de la liaison amide par un triazole 1,4- disubstitué dans le but d'étudier l'impact de ce remplacement sur la structure secondaire et l'activité biologique de peptides. Chimie organique. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT03 . tel-01314127

HAL Id: tel-01314127

<https://theses.hal.science/tel-01314127>

Submitted on 10 May 2016

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences
Chimiques Balard ED 459
Et de l'unité de recherche
Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de
l'Environnement USR 3278

Spécialité: **Ingénierie Moléculaire**

Présentée par **Khoubaib BEN HAJ SALAH**

**Substitution de la liaison amide par un
triazole 1,4- disubstitué dans le but
d'étudier l'impact de ce remplacement sur
la structure secondaire et l'activité
biologique de peptides.**

Soutenue le 29 septembre 2015 devant le jury composé de

Mme Florine CAVELIER Directeur de recherche, CNRS-IBMM Montpellier	Président du Jury
Mr Vincent AUCAGNE Chargé de recherche (HDR), CNRS-CBM Orléans	Rapporteur
Mr Thierry BRIGAUD Professeur, université de Cergy-Pontoise	Rapporteur
Mr Eduard BARDAJI RODRIGUEZ Professeur, université de Girone (Espagne)	Examineur
Mr Nicolas RUIZ Maître de conférences, université de Nantes	Examineur
Mr Nicolas INGUIMBERT Professeur, université de Perpignan	Directeur de thèse



A Mouna,

A ma famille et mes amis,

A tous ceux qui ont partagés ces moments magiques.

Remerciements

Cette thèse a été débutée au sein du Laboratoire de Chimie des Biomolécules et de l'Environnement (LCBE EA4215) avant que celui-ci n'intègre le Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE USR 3278).

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens à exprimer ma plus sincère gratitude aux deux rapporteurs de cette thèse, monsieur le professeur Thierry Brigaud et monsieur le docteur Vincent Aucagne.

Mes plus vifs remerciements à madame le docteur Florine Cavelier qui a accepté d'être président du jury, et pour sa proposition de collaboration qui s'est avérée fructueuse.

Je tiens également à remercier les personnes ayant accepté d'examiner mon travail, le professeur Eduard Badaji de l'université de Girone, le docteur Nicolas Ruiz de l'université de Nantes.

Je remercie ensuite tout particulièrement le Professeur Nicolas Inguibert pour avoir encadré cette thèse et pour la liberté dont j'ai bénéficié durant ces trois années de travail. J'ai ainsi pu jongler entre divers sujets, étendre ma culture scientifique tout en utilisant diverses techniques. Je le remercie pour toutes les idées qu'il a su apporter à ce sujet, les nombreuses expériences qu'il a réalisées lui-même qui ont permis à cette thèse d'avancer rapidement. J'ai beaucoup appris à son contact tant au niveau professionnel qu'au niveau humain.

Cette thèse ne serait pas ce qu'elle est sans l'aide et le dynamisme du Dr Baptiste Legrand qui dès notre premier contact s'est impliqué totalement dans la réalisation de l'ensemble des études structurales qui ont enrichies cette thèse. Un grand merci pour cette collaboration enthousiasmante.

Merci à Robertao Fanelli, pour sa confiance dans les essais que nous avons menés en utilisant ses « rares et donc chers » aminoacides silylés.

Je remercie vivement le Docteur Bernard Banaigs pour sa motivation et sa joie de vivre. Ses conseils judicieux au quotidien ainsi que son incroyable « Zen attitude » qui ont fait de cette thèse un réel plaisir.

Mes remerciements vont également à Louis Bornancin qui anime le laboratoire de son humour sans borne et de sa bonne humeur.

J'adresse mes remerciements à Bruno Viguié qui s'occupe avec amour de tous nos appareils, en particulier de la LC-MS qui a une vie mouvementée. Je le remercie également pour sa gentillesse et son écoute.

Mes remerciements à l'équipe féminine d'AkiNaO, Vanessa Andreu, Anais Amiot et Annabel Levert avec qui j'ai vécu ma première course en caisses à savon, expérience inédite !!!

Je remercie également tous les membres du laboratoire, les docteurs Nataly Bontemps, Anne Witzak, Isabelle Bonnard, Cedric Bertrand, Christophe Calvayrac, Emmanuelle Gros et le professeur Jean-François Cooper, ainsi que notre secrétaire Mme Marie-Louise Mascunano.

Une dédicace spéciale aux personnes qui m'ont donné l'envie de faire de la synthèse peptidique et de la recherche pendant mes années d'études à l'Université de Cergy pontoise. En commençant par Evelyne Chelain, mais aussi Nathalie Lensen et Thierry Brigaud qui m'ont donné envie de toujours comprendre la chimie organique et d'approfondir mes connaissances, ce qui m'a permis d'avancer jusqu'à la thèse. Mais aussi à mes encadrants de stage au laboratoire LCB (ex SOSCO) Grégory Chaume et Julien Pytkowicz pour m'avoir aidé dans mon apprentissage, pour leur gentillesse et pour m'avoir incité à faire de la recherche.

Un grand merci à ma femme Mouna pour ses encouragements journalier, sa confiance et pour avoir supporté ma mauvaise humeur pendant la rédaction.

Mes plus grands remerciements vont à ma famille et mes amis, qui m'ont soutenu durant toute la durée de ma thèse et à qui j'ai expliqué avec plus ou moins de succès mes péripéties chimiques.

Enfin, je termine ces remerciements en m'adressant à vous, lecteur, qui aborder ici trois ans de ma vie.

Merci et bonne lecture.

Liste des abréviations

All:	Allyle
AMM:	Autorisation de Mise sur le Marché
aq:	Aqueux
ARN:	Acide RiboNucléique
atm:	Atmosphérique
BOC:	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
Bzl:	Benzyle
CI₅₀:	La concentration inhibitrice médiane
Chex:	Cyclohexane
COSY:	Correlation Spectroscopy
COMU:	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate
DEDL:	Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière
DIC:	1,3-diisopropyl-carbodiimide
DCM:	Dichlorométhane
DIEA:	Diisopropyl-éthylamine
Dmab:	4-{N-[1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidene)-3-méthyl-butyl]-amino}benzyl
DMAP:	4-diméthyl-amino pyridine
DMF:	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO:	Diméthylsulfoxyde
EDC.HCl:	1-(3-diméthylaminopropyle)-3-éthyl-carbodiimide hydrochloride
ELSD:	Evaporative Light Scattering Detector
éq:	Equivalent
ESI-MS:	Electrospray ionisation - mass spectrometry
Et:	Ethyle
EtOH:	Ethanol
FDA:	Food and Drug Administration
Fmoc:	Fluorènylméthoxycarbonyle
h:	Heure
HATU:	2-(7-aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyl-uroniumhexafluorophosphate

HBTU:	2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyl-uroniumhexafluorophosphate
HOAt:	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt:	1-hydroxybenzotriazole
HPLC:	Chromatographie en Phase liquide à Haute Performance
ivDde:	(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidène)-3-méthylbutyl
Hz:	Hertz
ⁱPr:	Isopropyle
LC/MS:	Chromatographie liquide/ spectrométrie de masse
Me:	Méthyle
MeOH:	Méthanol
min:	Minute
NMP :	<i>N</i> -méthyle-2-pyrrolidinone
Oxyma Pure[®]:	Ethyl (hydroxyimino)cianoacetate
PIP:	Pipéridine
ppm:	Partie par million
Rdt:	Rendement
RMN:	Résonance magnétique nucléaire
SPPS:	Synthèse Peptidique sur Phase Solide
TA:	Température ambiante
TBDMS:	<i>tert</i> -butyldiméthylsiloxyle
^tBu:	<i>tert</i> -butyle
TEA:	Triéthylamine
TFA:	Acide trifluoroacétique
THF:	Tétrahydrofurane
TIS:	Triisopropylsilane
Trt:	Trityle
Z:	<i>N</i> -benzyloxycarbonyl

Introduction	11
Chapitre 1: Introduction et problématique de la thèse.	14
Partie 1 : Peptides d'origine naturelle.	15
A. Les peptides.	15
1. Peptides et protéines ribosomiques.....	17
2. Les peptides non ribosomiques.....	19
a. Biosynthèse par voie NRPS.....	19
b. Biosynthèse par voie NRPS/PKS (non ribosomal peptide synthase/polyketide synthase).....	21
c. Les peptides issus des voies de synthèses NRPS/PKS, un de nos thèmes de recherches.....	22
B. Structure secondaire des peptides.....	23
1. La liaison amide.....	23
2. Structure des peptides.....	25
a. Les hélices.....	28
b. Le feuillet β	29
c. Les coudes.....	30
d. Mimer ces structures secondaires.....	31
C. Rôles des peptides et utilisations comme médicaments.....	31
1. Avantages.....	31
2. Limitations.....	31
3. Stratégies mis en place pour abolir ces limitations.....	32
Partie 2 : Cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre CuAAC.....	35
A. Chimie Click, généralités, mécanisme réactionnel et applications en synthèse peptidiques.....	35
1. Généralités sur la chimie Click.....	35
2. Synthèse des précurseurs alcynes, azotures.....	36

a.	Obtention des alcynes.....	37
b.	Sources d'azoture.....	38
B.	Application de la chimie click en synthèse peptidique.....	39
1.	Introduction.....	39
2.	Synthèse des protéines par ligations successive avec CuAAC.....	40
Partie 3 : Introduction à la problématique : Le triazole comme isostère de la liaison amide. .		43
A.	Définition d'un isostère.....	43
B.	Comparaison topologiques et électroniques entre les unités amide et 1,2,3-triazole.....	44
C.	Effet du remplacement de la liaison amide par 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué sur des peptides à activité biologique.....	45
D.	Effet du remplacement de la liaison amide par 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué sur des peptides linéaires structurés en hélice.....	48
E.	Conclusion et objectifs.....	49
Chapitre 2: les Peptaibols des peptides linéaires constituant un modèle idéal pour l'étude du remplacement de la liaison amide par des triazoles.....		50
Partie 1: Les peptaibols, présentation générale.....		51
A.	Structure des peptaibols.....	51
1.	Structure primaire.....	51
2.	Structure secondaire.....	52
B.	Origine biologique et rôle écologique.....	54
1.	Voie de Bio-synthèse.....	55
2.	Propriétés membranaires et biologiques des peptaibols.....	56
a.	Interactions des peptaibols avec les membranes cellulaires.....	56
b.	Activité biologiques des peptaibols.....	60
C.	Synthèse des peptaibols.....	61
1.	Synthèse de l'alamethicin F50/5 en solution.....	61

2.	Synthèse des peptaibols en SPPS	62
3.	Bilan des différentes synthèses de l'alaméthicine	64
Partie 2 : Développement d'une stratégie simplifiée d'obtention des peptaibols par SPPS.....		65
A.	Présentation de la synthèse.	65
B.	Article 1: Efficient Microwave-Assisted One Shot Synthesis of Peptaibols Using Inexpensive Coupling Reagents	68
C.	Résultats complémentaires	72
1.	Etude structurale de la bergofungine D et de son analogue.	72
2.	Extension à l'obtention d'alaméthicine porteuse d' α,α -dialkyl-aminoacide présentant une chaîne latérale silylée.....	77
a.	Introduction	77
b.	Choix de la position de substitution.	77
c.	Optimisation de la synthèse de l'alaméthicine et application à l'insertion de TESDpg.....	78
d.	Etudes structurales des analogues d'alaméthicine.....	79
e.	Effet de la substitution des Aib par le TESDpg sur l'activité biologique. ...	80
f.	Hypothèse quant à la perte d'activité biologique.	82
D.	Article 2: Access to α,α -Disubstituted Disilylated Amino Acids and Their Use in Solid-Phase Peptide Synthesis.....	84
E.	Conclusion	89
Partie 3 : Précurseurs dipeptidiques Aib Ψ [Tz]-Xaa, synthèse et application.		90
A.	Introduction de la stratégie adoptée pour un scan triazole sur les peptaibols.....	90
B.	Article 3: Straightfoward strategy to substitute amide bond by 1,2,3-triazoles in peptaibols analogs using Aib Ψ [Tz]-Xaa dipeptides.....	93
Partie 4 : Triazole scan sur les peptaibols.		105
A.	Introduction	105
B.	Résumé de la synthèse des peptaibols à motifs triazoles.....	106

C.	Article 4: 1,2,3-triazole are not so well-disposed as amide bond mimetic. A case study on peptaibols.	108
D.	Résultats complémentaires. Amélioration de l'activité biologique de l'alaméthicine.	113
1.	Introduction.	113
2.	Insertion d'un tag hydrophobe en partie N-terminale de l'alaméthicine et essais biologiques.	115
E.	Conclusion.	117
Chapitre 3: Synthèse d'analogues simplifiés à motif triazole de la tamandarine.		118
Partie 1 : Présentation des composés dérivés de didemnine et tamandarine.		119
A.	Isolation et structure des didemnines et des tamandarines.	119
B.	Biosynthèse.	120
C.	Activités biologiques des didemnines et tamandarines.	121
D.	Etudes structurales.	122
E.	Synthèse des didemnines et les tamandarines.	124
F.	Résumé des relations structure/activité établies pour les didemnines et les tamandarines.	125
G.	Proposition d'une simplification de structure de la tamandarine B.	126
.Partie 2 : Synthèse d'analogues simplifiés de la tamandarine B.		128
Conclusion et perspectives.		130
Partie expérimentale.		133
A.	Partie expérimentale de l'article 1: Efficient Microwave-Assisted One Shot Synthesis of Peptaibols Using Inexpensive Coupling Reagents.	134
B.	Partie expérimentale de l'article 2: Efficient access to the first example of α,α -disubstituted di-silylated amino acids and their uses in solid phase peptide synthesis.	144
C.	Annexe de l'article 3 : Straightforward strategy to substitute amide bond by 1,2,3-triazoles in peptaibols analogs using Aib Ψ [Tz]-Xaa dipeptides Spectres LC/MS et RMN.	176

D.	Partie expérimentale de l'article 4. 1,2,3-triazole are not so well-disposed as amide bond mimetic. A case study on peptaibols.	213
E.	Partie expérimentale de la partie: Amélioration de l'activité biologique de l'alamethicine.	233
F.	Partie expérimentale de la partie : Synthèse d'analogues simplifiés de la tamandarine B.....	249
	Références bibliographiques.	262

Introduction

Les peptides et les protéines sont des acteurs clés de l'ensemble des processus biologiques. Dès leur découverte ils ont attiré l'attention du chimiste organicien, pour en réaliser la synthèse. C'est certainement l'avènement de la synthèse peptidique sur phase solide qui est en parti responsable de l'essor considérable que connaissent les peptides en tant que médicaments ou comme outils pour l'étude des mécanismes biologiques.¹ Leur développement s'est accompagné de nombreuses avancées techniques, synthétiseurs, nouveaux agents de couplages et nouvelles résines mais également de différentes améliorations pour tenter d'augmenter leur stabilité métabolique ou faciliter la synthèse de protéines. La réaction de cycloaddition entre un azoture et un alcyne catalysée par le cuivre (I) (CuAAC) pour former un 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué en est un exemple. En effet, le caractère isostère du noyau triazole et de la liaison amide ont très rapidement été mis en avant sans que pour autant l'impact de l'insertion d'un triazole sur la structure secondaire de peptides n'ait été exploré en détail. Ainsi, pour étudier l'effet d'un tel remplacement nous avons choisi deux types de peptides modèles structurés. Le premier modèle est constitué par des peptaibols structurés en hélice. Le second modèle repose sur un peptide cyclique d'origine marine, la tamandarine B.

Mon travail a donc consisté en la modification de ces peptides par insertion de noyau triazole en remplacement de certaines liaisons amides afin de juger des modifications de structures que cela induisait en corrélant ces résultats à la mesure de leur activité biologique.

Dans un premier temps, nous avons optimisé une voie de synthèse de peptaibols que nous avons appliqué à l'alaméthicine F50/5 et à un analogue de la bergofungine D. Pour cela, nous avons utilisé une synthèse peptidique en phase solide sous irradiation micro-ondes en profitant d'un cocktail de réactifs efficaces contenant du diisopropylcarbodiimide comme agent de couplage et de l'oxyma. Cette méthode de synthèse a été étendue à l'obtention d'analogues silylés de l'alaméthicine en substituant dans différentes positions l'acide

aminobutyrique par un résidu hydrophobe et encombré : la bis-triethylsilyl-dipropylglycine (TES-Dpg).

Dans la deuxième partie nous avons développé la synthèse de dipeptides à motif triazole. Puis nous avons défini les conditions réactionnelles nécessaires pour leur utilisation en SPPS et synthétisé des peptides contenant plusieurs motifs triazoles. Ces dipeptides ont ensuite été utilisés pour réaliser un scan triazole sur les deux peptaibols modèles. Les études structurales par dichroïsme circulaire, RMN et les tests biologiques de différents analogues nous permettent de conclure que le triazole affecte la structure secondaire des peptaibols et par conséquent induit une perte d'activité. Ainsi il apparaît que le concept de triazole comme isostère de la liaison peptidique doit être employé avec prudence.

Dans l'optique de comprendre l'impact de triazole sur l'activité et la structure secondaire de peptides cycliques, nous avons généré des analogues simplifiés de la tamandarine B un depsipeptide cyclique d'origine marine. Nous rapportons les résultats préliminaires de cette étude.

Chapitre 1: Introduction et problématique de la thèse.

Partie 1 : Peptides d'origine naturelle.

A. Les peptides.

Les peptides et les protéines sont des macromolécules formées par l'enchaînement d'acides aminés (Figure 1) reliés entre eux par des liaisons amides. Jusqu'à une taille d'une cinquantaine d'acides aminés on parle généralement de peptides et au-delà de protéines.

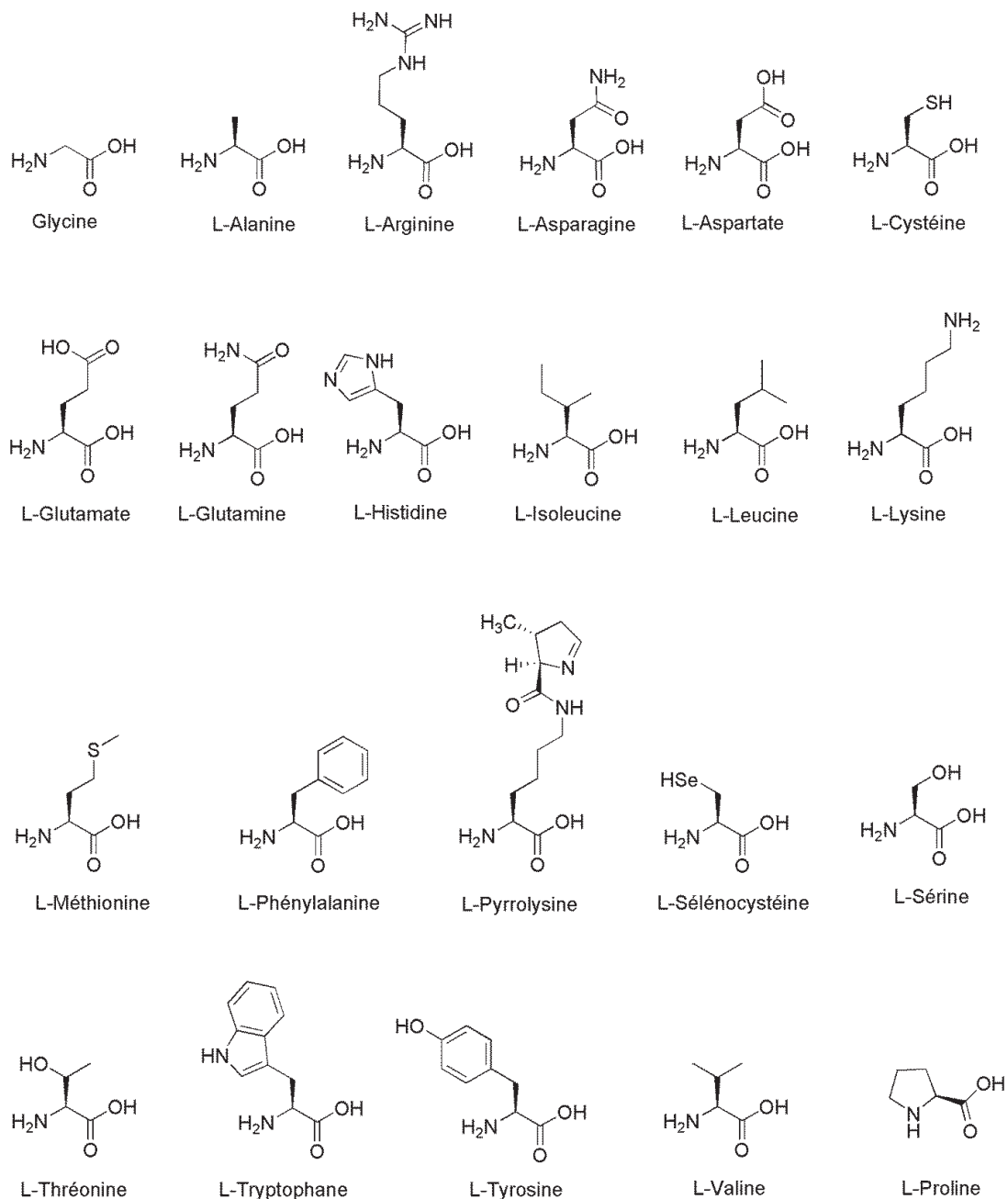


Figure 1: Structure des 22 acides aminés protéinogéniques.

Dans le cadre de nos travaux nous nous sommes principalement intéressés à des peptides. En effet, les peptides sont des biomolécules de première importance:

- par leur présence universelle dans le monde vivant.
- par leur abondance cellulaire: c'est le premier constituant après l'eau (10 fois plus que des glucides)
- par leur extrême diversité. Ils assurent des fonctions vitales et participent à l'homéostasie de la plupart des organismes. Les peptides peuvent être des hormones comme la vasopressine (9AA), des neurotransmetteurs comme les enképhalines (5AA), des édulcorants tel l'aspartame un dipeptide, pour n'en citer que quelques un.

Cette grande diversité d'activité biologique est essentiellement due au nombre de combinaison possible entre les vingt acides aminés protéinogènes auxquels s'ajoutent de nombreux autres aminoacides produits par les bactéries et les champignons. Aujourd'hui, on dénombre plus de 300 acides aminés, certains dérivent des vingt acides aminés « naturels » par modification post-traductionnelle réalisée par des enzymes. Ainsi, la citrulline dérive de l'arginine, et l'acide pyroglutamique est produit par lactamisation de l'acide glutamique (Figure 2).

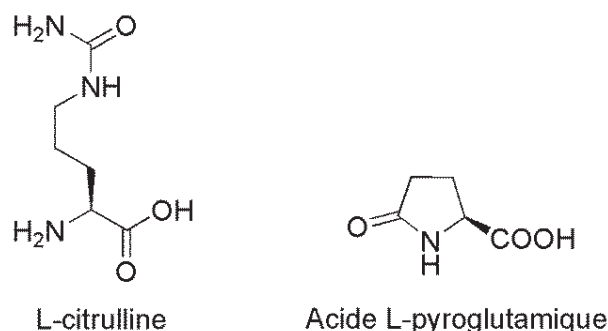


Figure 2 : structure de la citrulline l'acide pyroglutamique

Il existe également des acides aminés qui n'entrent pas dans la constitution des protéines comme la DOPA et l'ornithine et plusieurs autres acides aminés ayant leur groupe fonctionnel

amine sur les carbones plus éloignés du carboxyle (carbones β , γ , δ , etc.) comme l'acide γ -aminobutyrique, un neurotransmetteur du système nerveux central, qui est un acide γ -aminé. Certains acides α -aminés peuvent également être toxiques, comme l'acide domoïque, qui est une phycotoxine(Figure 3).²⁻⁴

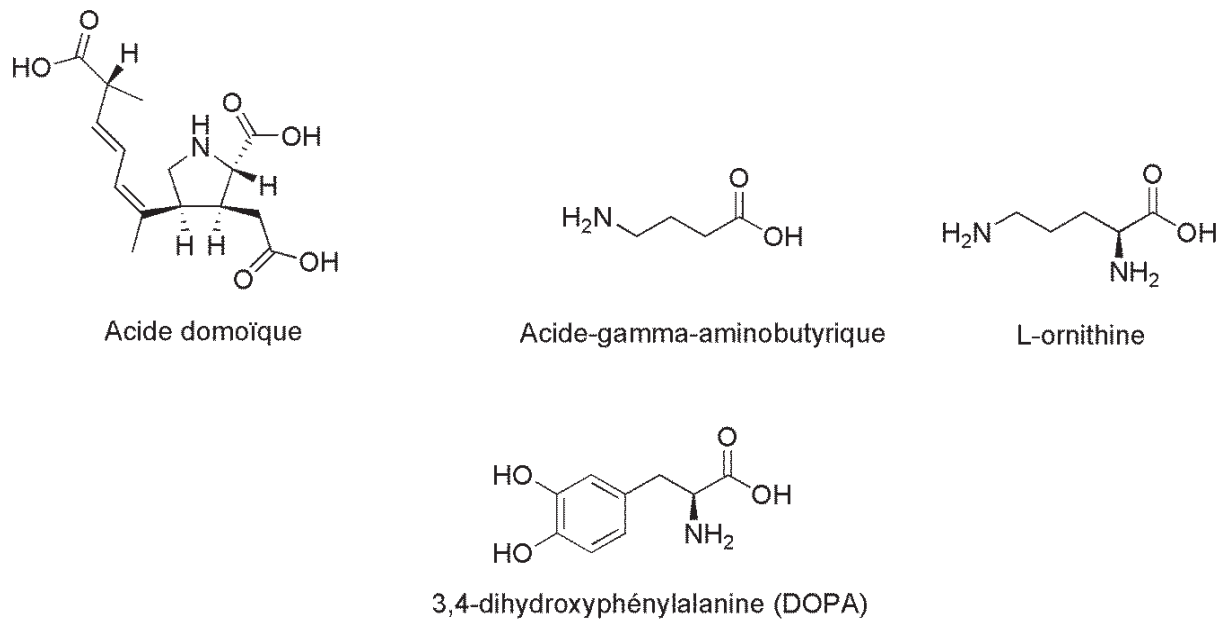


Figure 3 : autres exemples d'acides aminés.

Suivant leur biosynthèse et les acides aminés constituant leurs séquences, on peut distinguer deux grandes familles de peptides, ceux synthétisés par voie ribosomale et ceux obtenus par synthèse non ribosomale.

1. Peptides et protéines ribosomiques.

Les peptides et les protéines sont produits chez les eucaryotes par traduction de l'ARN messenger (ARNm) lui-même issu d'une transcription d'ADN. L'ARN est décodé par un ribosome pour produire une chaîne d'acides aminés spécifiques, ou un polypeptide (figure 4). La taille de peptide et l'ordre dans lequel les acides aminés sont ajoutés est déterminé par le code génétique de l'ARNm. Les séquences des peptides ribosomiaux sont construites à partir des vingt acides aminés naturels. Cet alphabet de vingt lettres permet de multiples combinaisons assurant à chaque peptide une fonction biologique unique.

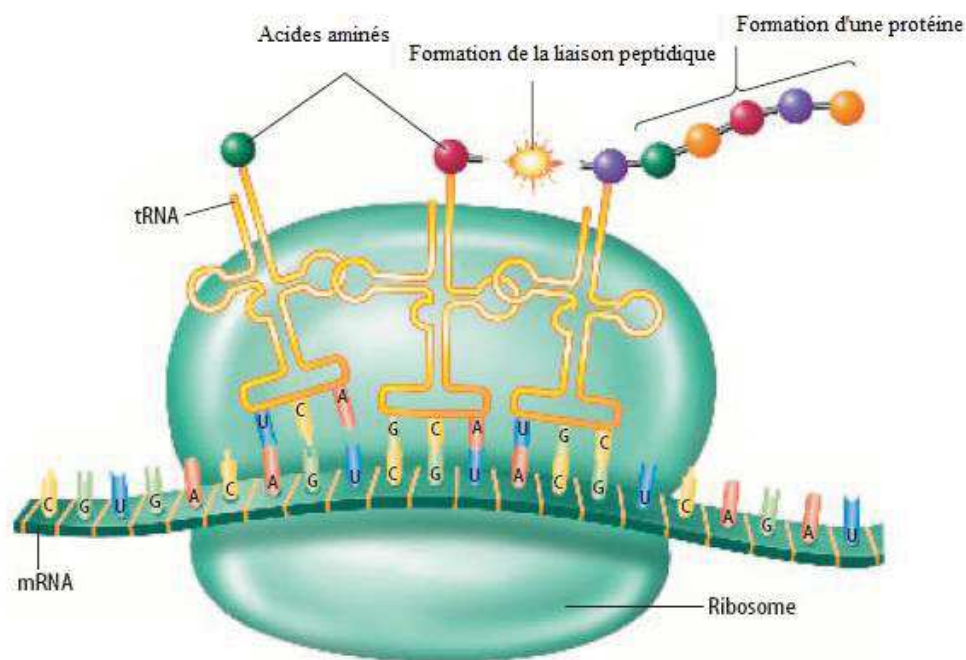


Figure 4 : Procédé général de la biosynthèse des protéines

Par ailleurs, certains peptides subissent ensuite des modifications post-traductionnelles, conduisant par exemple par cyclisation intramoléculaire à des hétérocycles de type thiazole, oxazole qui par une étape supplémentaire d'oxydation conduisent à des thiazolines et oxazolines, comme c'est le cas dans les cyanobactines isolées d'ascidies, tel les dolostatines E et I (Figure 5).⁵⁻⁷

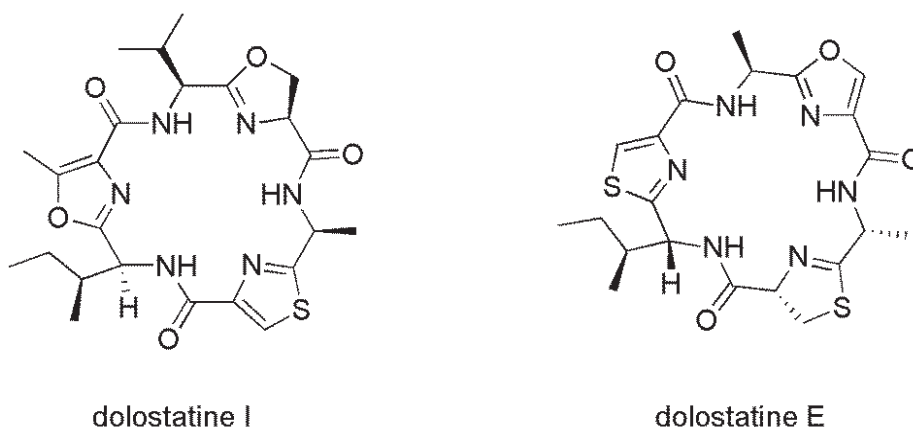


Figure 5 : structure de la dolostatine E et I

Ce type de modifications introduit donc une nouvelle dimension dans la chimiodiversité que l'on peut rencontrer au niveau des peptides.⁸⁻¹⁰

2. Les peptides non ribosomiques.

D'autres peptides présentent des structures très diverses et originales, il s'agit des peptides non ribosomiques (Non-ribosomal peptides (NRP)). Ces peptides sont produits par des systèmes polyenzymatiques, dans lesquels interviennent des synthétases de peptide non ribosomale (NRPS non-ribosomal peptides synthase) ou sont combinées avec des synthèses de polycétides (NRPS/PKS non ribosomal peptide synthase/polyketide synthase). Les biosynthèses par voie NRPS ou NRPS/PKS sont utilisées par les organismes marins, ou terrestres.^{11,12} Ces enzymes permettent des modifications sur les chaînes latérales des acides aminés protéinogènes ou une cyclisation des peptides.

a. Biosynthèse par voie NRPS.

Contrairement à la voie de synthèse protéique par des ribosomes, qui n'utilise que 21 acides aminés différents (les 20 acides aminés classiques et la sélénocystéine) pour produire des peptides, les NRPS produisent plus de 300 acides aminés. Ces acides aminés sont issus de modifications touchant le carbone alpha, les chaînes latérales ou enfin la fonction amine. Les transformations au niveau du carbone alpha se traduisent généralement par une épimérisation conduisant à la stéréochimie(R)¹³ ou à des réactions d'alkylation pour former des C^{α,α}-dialkylglycines.¹⁴ La fonction amine peut être N-méthylée.¹⁵ Des hydroxylations, déshydratations, homologations, et autres transformations fonctionnelles sont observées au niveau des chaînes latérales qui aboutissent aux acides β-aminés¹⁶, β-hydroxylés (Figure 6).^{17,18}

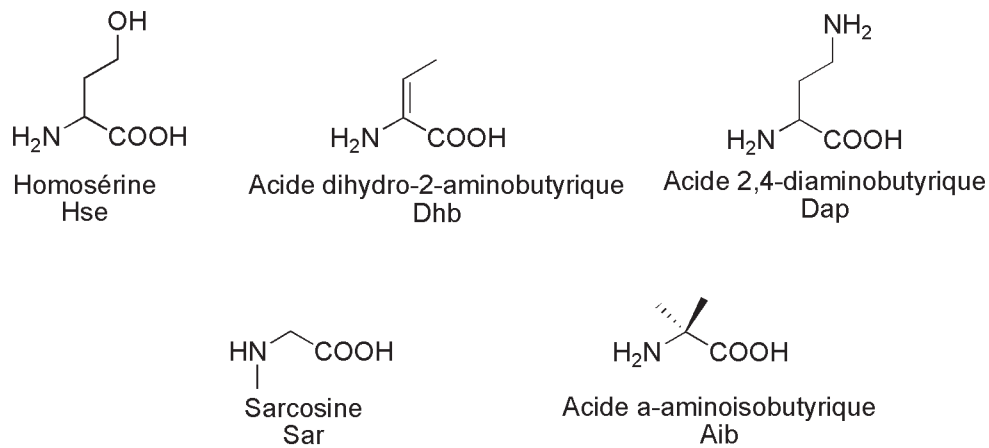


Figure 6 : Exemples d'acides aminés non protéinogènes rencontrés dans les peptides non ribosomiques. Les transformations que nous venons de mentionnerci-dessus se produisent lors de la synthèse du peptide. Les non ribosomal peptide synthases ou NRPS sont des complexes polyenzymatiques formés de plusieurs modules. Chacun d'eux possède plusieurs domaines étant chargé par exemple d'activer un acide aminé, éventuellement de le modifier et de le transférer ensuite sur l'acide aminé activé dans le module adjacent pour constituer un peptide (Figure 7). Les domaines principaux qui composent les modules sont: les domaines d'adénylation (A), de condensation (C), de thiolation (T ou PCP) et thioestérase (TE). Chacun de ces domaines porte une activité enzymatique nécessaire à la biosynthèse des peptides par la voie non ribosomale.

-Le domaine d'adénylation (A) est impliqué dans la sélection et l'activation d'un acide aminé. Ce domaine joue un rôle primordial, il permet la reconnaissance spécifique d'un aminoacide puis son activation grâce à une réaction d'adénylation. L'acide aminé est ainsi transformé en aminoacyl adénylate.

-Le domaine de thiolation (T ou PCP pour Peptidyl Carrier Protein) permet au peptide de rester fixé sur la synthétase tout au long du processus d'élongation de manière covalente par l'intermédiaire d'une liaison thioester. C'est cette liaison thioester qui subit l'attaque de la fonction amine de l'acide aminé suivant pour former la liaison amide.

-Le domaine de condensation (C) permet la formation de la liaison peptidique entre deux monomères.

-Le domaine TE (thioestérase) intervient dans l'ultime étape de la biosynthèse en permettant la libération du peptide néoformé du complexe multi enzymatique par hydrolyse de la liaison thioester qui lie le peptide au domaine T du dernier module de la synthétase.

-Il existe aussi des domaines additionnels permettant les réactions de transformation des acides aminés fixés que nous avons mentionnées au préalable. Par exemple, il est courant d'observer des domaines d'épimérisation (E) qui entraîne une réaction permettant de former un épimère de l'acide aminé concerné (passage d'une configuration (S) vers (R)).^{19,20}

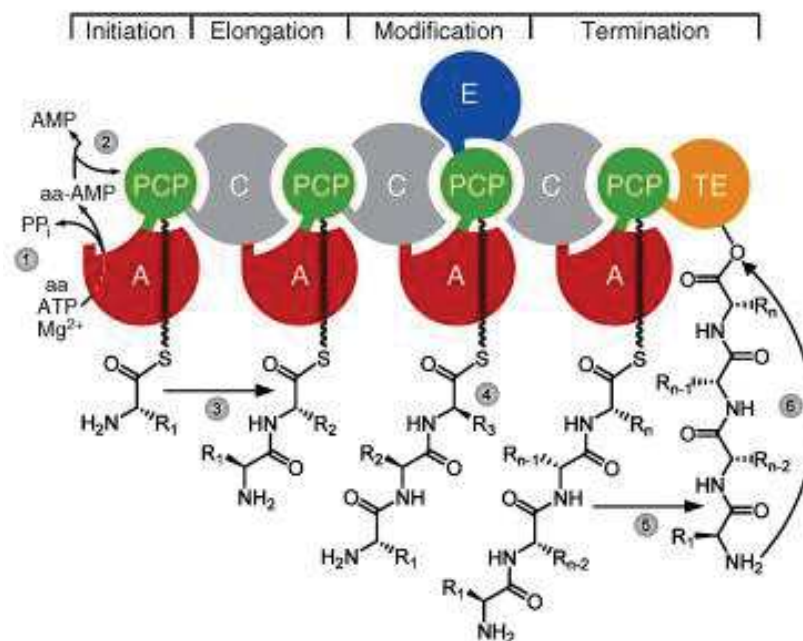


Figure 7 : Exemple schématique d'une biosynthèse par voie NRPS¹⁹

b. Biosynthèse par voie NRPS/PKS (non ribosomal peptide synthase/polyketide synthase).

Outre les synthèses faisant intervenir des NRPS, il existe un autre mécanisme de synthèse modulaire faisant appel à des complexes enzymatiques appelés : polykétides synthases (PKS).

Les polykétides synthases sont, comme les NRPS, des systèmes multienzymatiques organisées en modules et domaines produisant des molécules actives appelées polykétides ou polycétides. Les PKS activent des acides carboxyliques de petite taille, acétate ou malonate pour les assembler en des acides gras diversement substitués.

Les synthétases hybrides NRPS/PKS possèdent les modules catalytiques caractéristiques des NRPS et PKS complétés par un domaine kétoacyl-synthase (KS) qui permet d'accepter des peptides et non des groupements acyles. Les produits de ces synthétases sont donc des composés hybrides comportant à la fois des acides aminés modifiés ou non par les NRPS et des acides aliphatiques issus des PKS (Figure 8).²¹

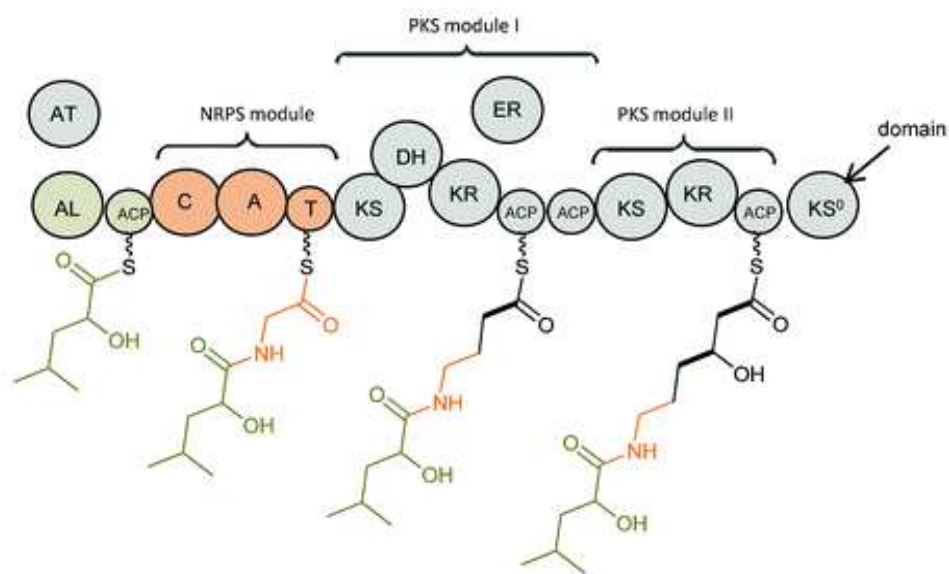


Figure 8: Exemple schématique d'une biosynthèse par voie NRPS/PKS²¹

c. Les peptides issus des voies de synthèses NRPS/PKS, un de nos thèmes de recherches

Notre laboratoire s'intéresse à isoler et caractériser les produits issus de ce type de biosynthèse. Ces composés constituent des moyens de défense, d'attraction ou encore de communication des organismes producteurs. N'étant pas directement impliqués dans la croissance, la reproduction ou le développement de l'organisme producteur ils sont qualifiés

de métabolites secondaires et se caractérisent par des structures moléculaires très complexes. Ces métabolites secondaires du fait de leur activité biologique constituent une des ressources possibles pour le développement de médicaments. Ainsi, la recherche concernant ces produits s'intensifie, non seulement parce que leurs synthèses représentent un défi mais aussi du fait de leurs propriétés biologiques et pharmacologiques variées et enfin parce qu'ils ont un rôle très complexe dans l'écosystème que les chercheurs essaient de décrypter.²²⁻²⁵ Ces différentes propriétés sont souvent intimement liées aux conformations particulières que les peptides adoptent pour interagir avec leurs cibles biologiques.

B. Structure secondaire des peptides.

1. La liaison amide.

La liaison amide qui permet de lier deux acides aminés entre eux correspond à une réaction de déshydratation entre la fonction acide carboxylique d'un acide aminé et la terminaison amine d'un autre acide aminé (Figure 9).

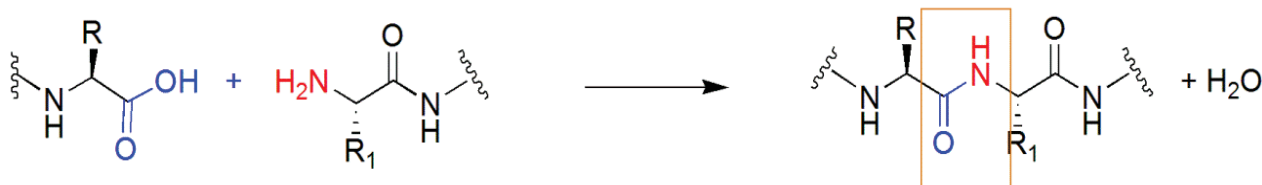


Figure 9 : les acides aminés s'unissent par des liaisons peptidiques

La structure de la liaison peptidique est particulière, en effet les atomes C, O, N, et H qui la constituent, sont coplanaires. Cette liaison simple présente un caractère partiel de double liaison en raison d'un équilibre entre deux formes mésomères du fait de la délocalisation du doublet électronique porté par l'atome d'azote vers le carbonyle (Figure 10). Ainsi l'atome d'azote adopte une hybridation de type sp^2 comparable à celle du carbone et de l'oxygène. Les trois atomes formant la liaison peptidique sont dans un même plan.



Figure 10 : Formes mésomères de la liaison amide.

En conséquence, la longueur d'une liaison peptidique est de 1,33 Å. Elle est donc plus courte qu'une liaison simple (C-N : 1,47 Å) mais plus longue qu'une liaison double (C=N : 1,28 Å). De plus l'absence de libre rotation imposée par cette conjugaison impose deux configurations possibles à la liaison peptidique qui est *cis* ou *trans* (la barrière d'énergie potentielle entre les deux formes étant de l'ordre de 20 kcal.mol⁻¹) (Figure 11). En général, les liaisons peptidiques préfèrent la conformation *trans* et les carbones C_α sont de part et d'autre de la liaison dans le plan peptidique. La conformation *cis* est en effet très défavorisée par l'encombrement stérique des chaînes latérales. Seules les liaisons suivies par un résidu proline présentent ≈10% de conformation *cis*.



Figure 11 : Configuration *cis* et *trans* de la liaison amide

Ces contraintes géométriques combinées à la présence d'atomes accepteurs (N, O) et donneurs de liaisons hydrogènes (NH) permettent aux chaînes peptidiques d'adopter des structures secondaires particulières qui sont influencées par la taille des peptides, la nature des acides aminés qui les composent et par le milieu dans lequel le peptide est plongé (pH, température, autres peptides,...).

2. Structure des peptides.

Les principaux éléments de structure que l'on peut rencontrer dans un peptide sont les coudes, les feuilletts et les hélices. Ces structures nécessitent d'une part des interactions non covalentes qui permettent aux peptides de conserver leur cohésion et d'autre part que les chaînes latérales portées par le carbone α adoptent un nombre limité de positions dans l'espace. Ces différentes positions dépendent essentiellement de la libre rotation des liaisons simples supportées par le carbone α de l'acide aminé. Pour décrire de telles rotations, on utilise des angles dièdres entre deux plans définis par trois atomes successifs du squelette.

L'angle dièdre oméga (ω) entre C-N ne peut prendre que les deux valeurs 0° (configuration *Cis*) et 180° (configuration *Trans*). Les deux angles psi (ψ) et phi (ϕ) correspondent respectivement aux angles de rotation entre C_i -C et entre N- C_i (Figure 12). Les valeurs possibles de (ψ , ϕ) sont contraintes par l'encombrement stérique : certaines configurations sont impossibles car les atomes ne peuvent pas s'interpénétrer.

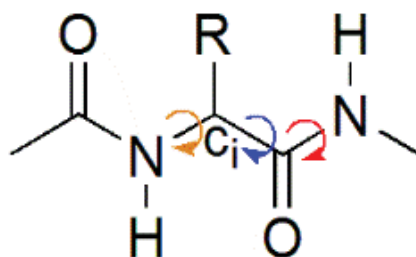


Figure 12 : Les trois angles dièdres (ω , ψ , ϕ) permettant de décrire la structure secondaire d'un peptide
Pour déterminer les angles ψ et ϕ caractéristiques de différents types de structures secondaires, le physicien Ramachandran a étudié la conformation adoptée par les différents acides aminés au sein d'une protéine en fonction de la valeur des angles dièdres (ψ , ϕ), il en a déduit que toutes les valeurs d'angles dièdres n'étaient pas possibles pour les acides aminés car certaines conduisent à des rapprochements trop importants entre atomes et sont donc

énergétiquement défavorables. Il a donc établi un diagramme qui porte son nom et qui impose des valeurs d'angles pour chaque type de structure secondaire (Figure 13).^{26,27}

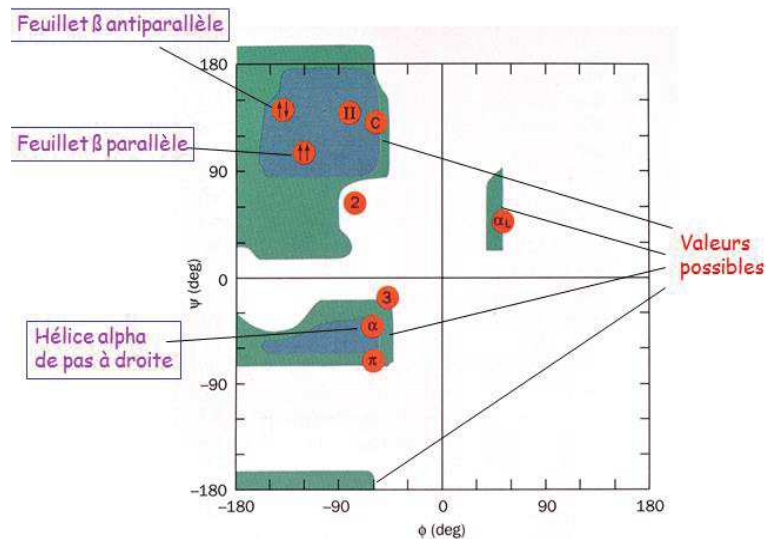


Figure 13: Diagramme simplifié de Ramachandran indiquant les valeurs des angles (ψ , ϕ) permises dans un polypeptide

Le diagramme comporte trois zones favorables, colorées (Figure 13). Lorsqu'on analyse la structure d'un polypeptide, on observe que la plupart des acides aminés ont des combinaisons d'angles (ϕ , ψ) qui s'inscrivent à l'intérieur de ces trois zones. Les deux principales régions correspondent aux structures secondaires régulières qui sont principalement observées dans les polypeptides : la région des hélices et celle des feuillets β .²⁸ La troisième région, plus petite, correspond à une conformation en hélice gauche ($\phi > 0$). La glycine qui ne comporte pas de chaîne latérale présente une plus grande liberté d'un point de vue conformationnel et elle échappe donc à cette règle et peut adopter des conformations se trouvant en dehors des régions favorables du diagramme.

Le repliement d'un peptide est un phénomène multifactoriel qui dépend à la fois d'interactions non covalentes, de la séquence primaire c'est-à-dire de l'ordre dans lequel s'enchaînent les aminoacides qui ensuite vont conditionner le choix des angles phi et psi. C'est ce repliement qui permet à un peptide d'assurer une fonction qui lui est propre. De la séquence primaire au repliement, il existe trois niveaux de structuration de la protéine

-La structure secondaire décrit le repliement local de la chaîne principale d'une protéine. C'est le premier niveau d'agencement dans l'espace tenant compte des liaisons hydrogène. Dans le cas des protéines, elle consiste à définir les repliements réguliers et répétitifs : hélices, feuilletts, coudes. Nous les décrirons plus en détail dans la partie suivante.

-La structure tertiaire d'une protéine correspond au repliement de la chaîne polypeptidique sur elle-même pour former une structure plus compacte qui peut être globulaire. On retrouve donc également des interactions ioniques, des interactions hydrophobes plus fortes au centre de la protéine et des liaisons hydrogènes stabilisant les repliements mais aussi des ponts disulfures. Ces derniers se créent après achèvement du repliement tridimensionnel de la protéine et ont un rôle prépondérant dans le maintien de la structure tertiaire.

-La structure quaternaire est le niveau le plus élevé d'organisation des protéines. Il s'agit de l'association de sous-unités dans une même molécule protéique qui détermine l'arrangement spatial des différentes sous-unités entre elles. Les différents niveaux de description d'une protéine sont résumés dans la Figure 14.

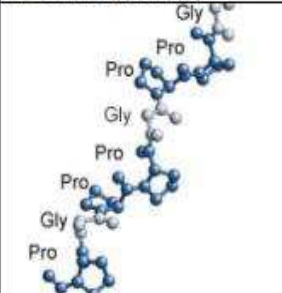
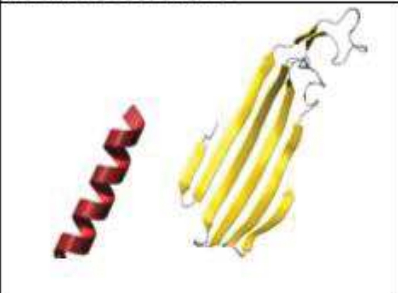

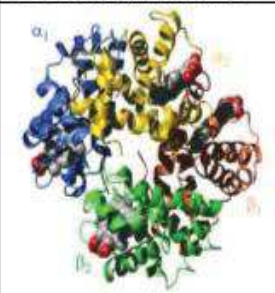
Structure primaire	Structure secondaire	Structure tertiaire	Structure quaternaire
			

Figure 14 : Différents niveaux de description d'une protéine : primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire.

Il faut noter qu'en général, la nature des acides aminés et les repliements obtenus dans la structure secondaire déterminent la structure 3D des protéines.

a. Les hélices.

Les hélices sont les éléments les plus courants de structure secondaire, elles sont créées à la suite de la formation de liaisons hydrogènes entre des groupements C=O et N-H se trouvant à une distance avoisinant les 3Å. Cette proximité spatiale s'observe entre l'hydrogène d'un groupement aminé -NH en position i et l'oxygène d'un groupement carboxylique -C=O situé en position $i+3$ ou $i+4$ selon le type d'hélice. Cela implique donc qu'un tour d'hélice contienne un nombre minimal d'amino acides. En fonction de ce nombre, plusieurs types d'hélices peuvent être définis. L'hélice α qui comprend 3,6 amino acides par tour et permet la formation d'un macrocycle à 13 chaînons incluant la liaison hydrogène est également qualifiée d'hélice 3,6₁₃. Cette notation numérique est un moyen général pour définir une hélice. Le nombre décimal donne le nombre de résidus par tour d'hélice et l'entier en indice le nombre d'atomes dans l'anneau fermé par la liaison hydrogène (Figure 15). L'hélice alpha 3,6₁₃ est la structure secondaire la plus représentée dans les peptides (Figure 16). D'autres structures hélicoïdales existent, le ruban 2,2-7, les hélices 3₁₀ et π (4,4₁₆) en sont des exemples. Ces trois types d'hélices sont permises par le diagramme de Ramachandran.²⁹⁻³²

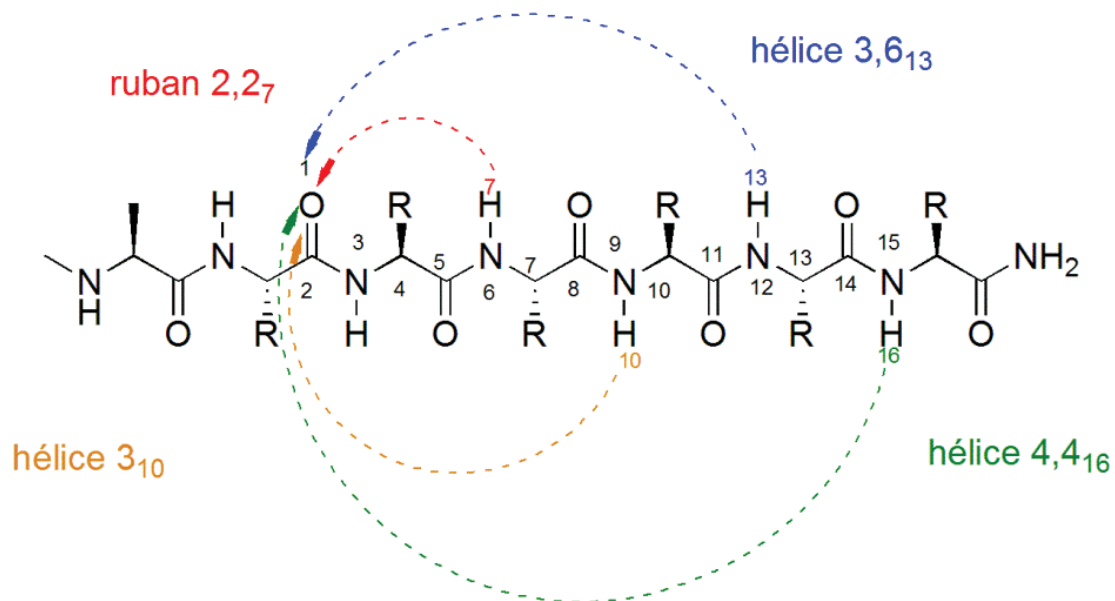


Figure 15 : Principaux types d'hélices

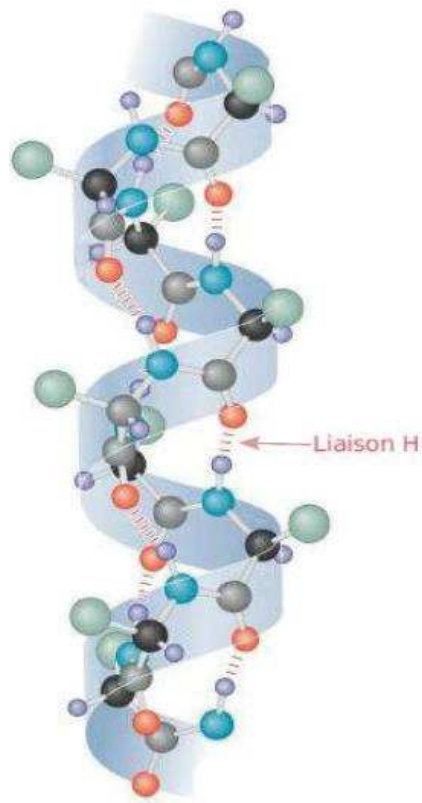


Figure 16 : hélice α

b. Le feuillet β .

Au contraire de l'hélice, le feuillet β , dont le nom provient de l'aspect ondulé de la chaîne polypeptidique étirée comporte des liaisons hydrogènes entre des groupements du squelette provenant de résidus distant les uns des autres dans la séquence linéaire. Dans les feuillets β , deux chaînes sont placées côte à côte et les liaisons hydrogènes se créent entre ces chaînes. Si les deux chaînes peptidiques impliquées dans la formation du feuillet β se déploient dans le même sens du côté N-terminal vers le côté C-terminal le feuillet β est parallèle, a contrario si les deux chaînes peptidiques sont en sens inverse, c'est le feuillet β antiparallèle. Il existe aussi les feuillets β mixtes comportant à la fois des chaînes parallèles et antiparallèles

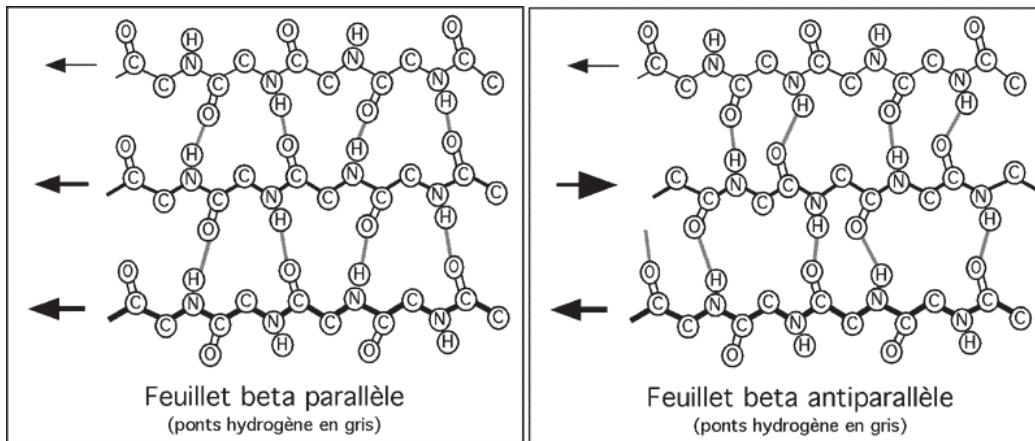


Figure 17 : le feuillet β parallèle et antiparallèle.

Les feuillets β représentent une structure majeure dans les protéines globulaires, ils représentent à peu près un quart des structures régulières rencontrées.³³

c. Les coudes.

Les chaînes polypeptidiques peuvent former des coudes et ainsi changer de direction (Figure 18). Ces coudes ne sont pas des structures périodiques. Il s'agit plutôt d'un repliement particulier du squelette carboné localisé à 3 ou 4 résidus consécutifs. Les coudes ont le rôle de connecteur entre des structures régulières comme les hélices ou les feuillets β . Ils sont souvent présents à la surface des protéines, contiennent des résidus chargés et jouent un rôle important dans les interactions ligand-récepteur.³⁴⁻³⁶

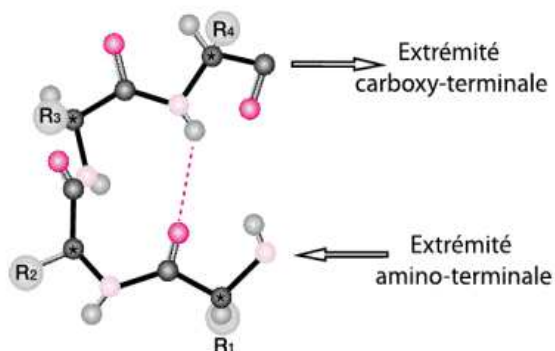


Figure 18 : Coude β

d. Mimer ces structures secondaires.

Les peptides présentant une structure secondaire définie peuvent constituer des candidats médicaments ou des outils pour l'étude de certaines cibles biologiques. En conséquence, une partie du travail des chimistes consiste à mimer ces structures secondaires, pour entre autre développer de nouveaux outils pour l'étude des interactions protéines/protéines. Mais également pour développer des plateformes rigides servant à la présentation d'un ligand dans une conformation définie à sa cible biologique.

C. Rôles des peptides et utilisations comme médicaments.

1. Avantages.

Les peptides offrent plusieurs avantages par rapport aux petites molécules qui constituent les médicaments traditionnels. Le premier est que, représentant souvent la plus petite partie fonctionnelle d'une protéine, ils offrent une efficacité, une sélectivité et une spécificité que les concepteurs de petites molécules ont du mal à atteindre.³⁷ Un deuxième avantage est que, les produits de dégradation des peptides sont des acides aminés, ce qui élimine grandement les risques de toxicité ainsi que les interactions médicamenteuses.³⁸

2. Limitations.

Malgré leurs nombreux avantages l'utilisation thérapeutique des peptides est difficile car ils présentent une faible biodisponibilité par voie orale. Les peptides sont généralement dégradés par l'environnement gastrique très acide et par des protéases. Leur mode d'administration nécessite d'avoir recours à une injection intraveineuse, ce qui constitue une contrainte pour le patient et affecte leur qualité de vie. Ainsi les peptides présentent dans l'organisme un temps de demi-vie trop faible qui ne leur permet pas d'atteindre leur cible biologique.

3. Stratégies mis en place pour abolir ces limitations.

Plusieurs techniques ont été mises en œuvre pour surmonter ces désavantages :

-La première, consiste à trouver des voies d'administration alternatives comme les muqueuses nasales ou pulmonaires.^{39,40}

- La deuxième, s'inspire de la nature et se base sur la substitution dans les séquences peptidiques des acides aminés protéinogènes par des acides aminés non protéinogènes non reconnus par les enzymes.⁴¹ En présence des acides aminés non protéinogènes, des études ont montré une diminution significative de la dégradation enzymatique et par conséquent une augmentation de demi-vie. Les acides aminés utilisés dans cette approche sont des acides β ou γ -aminés,^{16,42-45} de série D,⁴⁶ N-méthylés,⁴⁷ ainsi que les motifs oxazoline et thiazoline⁴⁸ qui sont autant d'éléments structuraux favorisant l'amélioration des propriétés pharmacologiques, en réduisant les risques de métabolisation des peptides. Les acides aminés précédemment cités impactent également favorablement la lipophilie. Par conséquent, ils permettent également de moduler l'activité biologique (Figure 19). L'effet de l'augmentation de la lipophilie a été décrit notamment pour les peptides antimicrobiens dont l'activité biologique est induite par des interactions entre les membranes cellulaires et les parties hydrophobes du peptide.

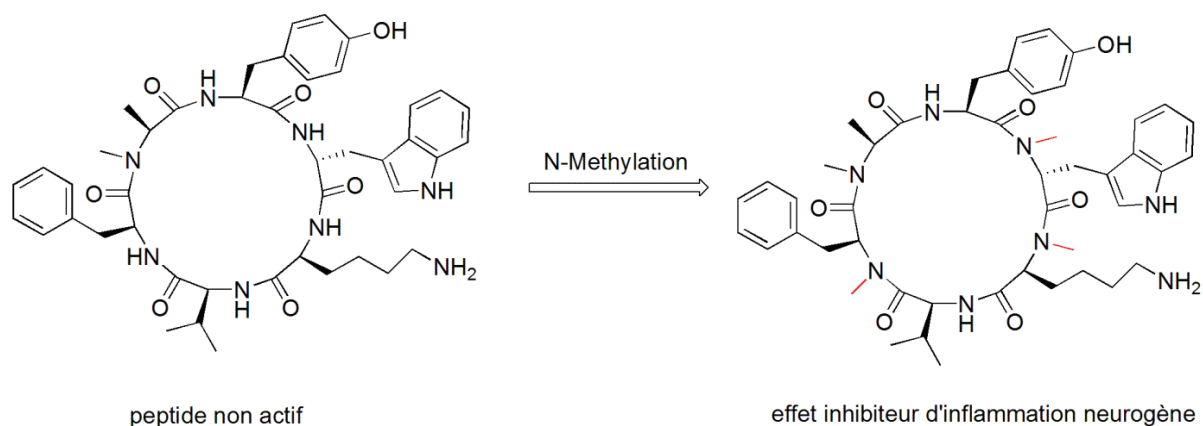


Figure 19 : Exemple de peptide cyclique N-méthylé.

- La troisième s'appuie sur l'incorporation dans les peptides d'acides aminés conçus *de novo*. La présence par exemple d'un acide aminé fluoré dans un peptide influence ses propriétés physico-chimiques comme sa lipophilie et le pKa des fonctions.⁴⁹

- La quatrième propose de remplacer la liaison amide par une fonction isostère, comme le triazole, thioamide. Ces isostères sont supposés avoir des propriétés physicochimiques similaires à la fonction amide. Les atomes de la liaison amide n'intervenant pas nécessairement dans le phénomène de reconnaissance, les peptides modifiés conservent une bonne affinité avec la cible biologique tout en étant plus résistants vis à vis de la dégradation enzymatique et la conformation étendue du peptide est conservée (Figure 20).⁵⁰

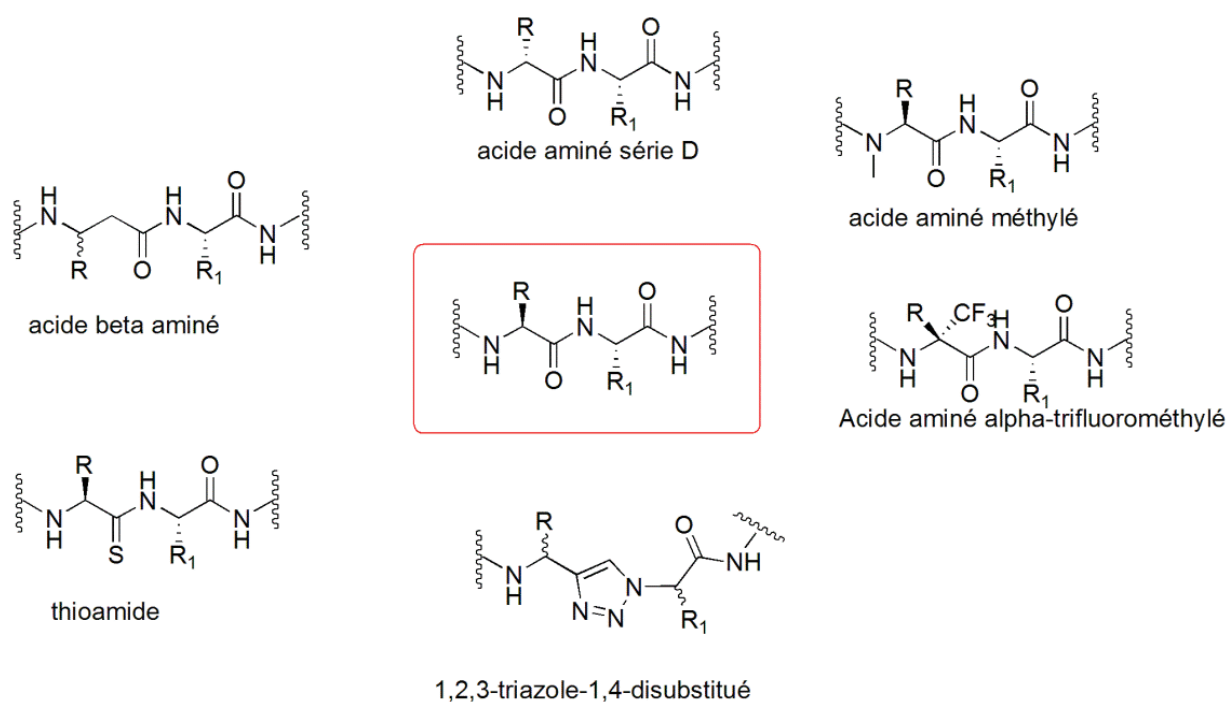


Figure 20 : Exemples de modifications sur des peptides

Parmi les motifs considérés comme isostère de la liaison amide, nous avons choisi de nous intéresser au 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué obtenu par cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne catalysée par le cuivre simultanément découverte en 2002 par les équipes de Meldal et Sharpless. Cette réaction présente de très nombreux avantages. En particulier, elle mène à des produits purs, requiert des conditions de réactions très simples, utilise des

solvants peu dangereux, conduit à des rendements très importants, ne génère pas de produits secondaires et peut être appliquée à de nombreux domaines. Elle est si efficace qu'elle est désormais devenue un outil incontournable pour les chimistes pour augmenter la robustesse des molécules et leur stabilité métabolique.

Si cet hétérocycle a très vite été utilisé dans la synthèse peptidique comme mime de la liaison amide, son impact sur la structure secondaire des peptides et l'activité biologique n'ont été que faiblement explorés. Les travaux présentés dans ce manuscrit, s'inscrivent donc dans le contexte d'une étude de l'impact du remplacement de la liaison amide par un noyau 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué sur des peptides structurés et bioactifs.

Partie 2 : Cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre CuAAC.

A. Chimie Click, généralités, mécanisme réactionnel et applications en synthèse peptidiques.

1. Généralités sur la chimie Click.

La réaction de cyclo addition entre un azoture et un alcyne a été rapportée pour la première fois par Michael à la fin du 19^{ème} siècle et ces travaux ont fait l'objet d'une publication en 1893,⁵¹ puis cette réaction a été développée par Huisgen en 1963.^{52,53} Toutefois, la réaction requiert des températures élevées et n'est généralement pas régiosélective car elle conduit à un mélange de deux isomères qui sont les 1,2,3-triazoles 1,4- et 1,5-disubstitués (Figure 21)

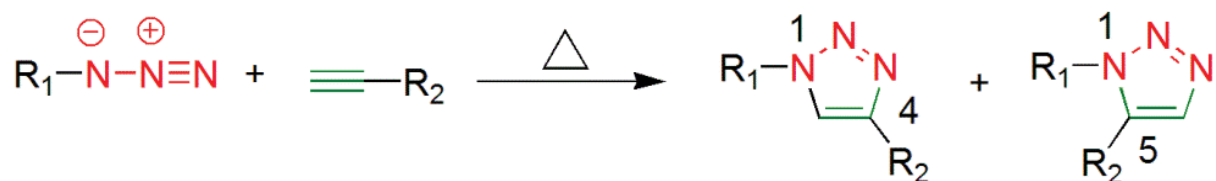


Figure 21: Cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne de Huisgen

Finalement, Meldal et Sharpless ont montré simultanément en 2002 que l'utilisation du cuivre Cu(I) permet de former un seul composé le 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué à température ambiante tout en augmentant la cinétique de réaction.^{54,55} Cette réaction représente à la perfection le concept de « click chemistry » énoncé par Sharpless⁵⁶ pour définir un ensemble de réactions idéales, répondant à plusieurs critères. Ces réactions doivent être reproductibles, quantitatives, chimiosélectives, insensibles aux conditions réactionnelles classiques, et être compatibles avec une très large gamme de fonctions chimiques.

En 2005, c'est à nouveau le groupe de Sharpless⁵⁷ qui est à l'origine de la synthèse régiosélective du 1,2,3-triazole-1,5-disubstitué en utilisant un catalyseur à base du ruthénium. L'accès d'une façon sélective à l'autre régioisomère présente également un grand intérêt pour

la synthèse des molécules bioactives et des foldamères⁵⁸⁻⁶² (Figure 22). Au cours de ma thèse je me suis uniquement intéressé aux 1,2,3-triazoles-1,4-disubstitués en raison de leur analogie avec la liaison amide de configuration *trans*.

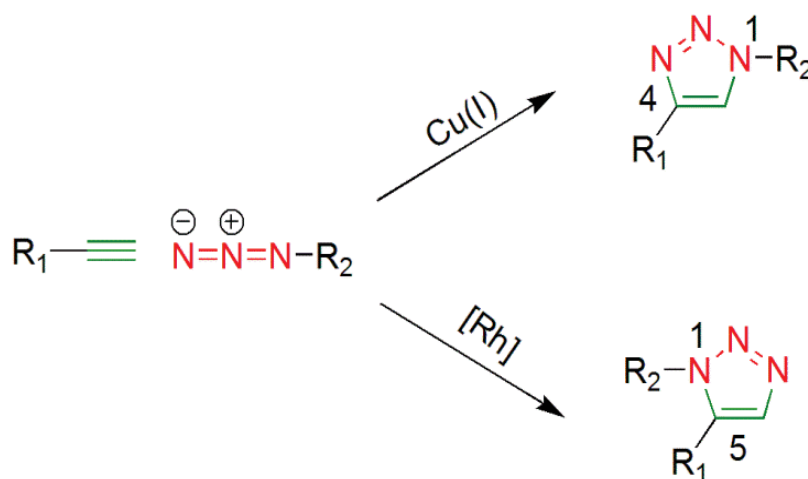


Figure 22 : Effet du catalyseur sur la cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne.

Pour étudier ce mime présumé de la liaison amide et définir ces conditions d'utilisation en synthèse peptidique, il convient d'analyser les différents aspects concernant la mise en œuvre de cette réaction et les voies de synthèse des précurseurs. Mais il est surtout nécessaire de se pencher sur les études décrivant les propriétés structurales des 1,2,3-triazoles-1,4-disubstitués introduits dans des séquences peptidiques.

2 Synthèse des précurseurs alcynes, azotures.

La synthèse des 1,2,3-triazoles-1,4-disubstitués nécessite la préparation des précurseurs portant les fonctions alcyne et azoture. Pour répondre aux critères de la chimie click, il faut que la synthèse de ces briques initiales soit relativement aisée et donne des rendements élevés, mais également que différentes sources de cuivre (I) puissent être utilisées.

a. Obtention des alcynes.

Il existe de nombreux précurseurs commerciaux mono ou multifonctionnels portant un alcyne (Figure 23). Ces précurseurs sont utilisés pour introduire une triple liaison sur un composé par une substitution nucléophile ou par simple couplage avec une autre fonction. L'alcool ou l'amine propargylique sont notamment souvent utilisés pour fonctionnaliser différents types de macro molécules organiques (espaceur, peptides cycliques, polytriazoles, foldamères).⁶³⁻⁶⁸

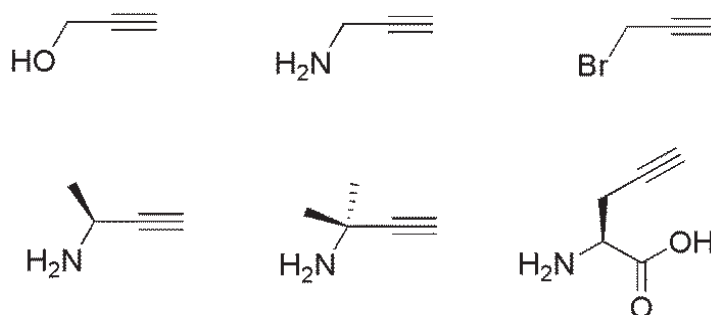


Figure 23 : Exemples de précurseurs alcynes commerciaux

Cependant, si les synthons commerciaux ne sont pas suffisants, il existe d'autres méthodes permettant d'obtenir les alcynes terminaux. Ceux-ci peuvent être obtenus par homologation d'aldéhyde, d'alcool, d'ester ou d'amide de Weinreb.⁶⁹ La méthode de Corey-Fuchs, est la plus traditionnelle, elle permet d'obtenir une large gamme des alcynes terminaux avec des bons rendements (Figure 24).⁷⁰

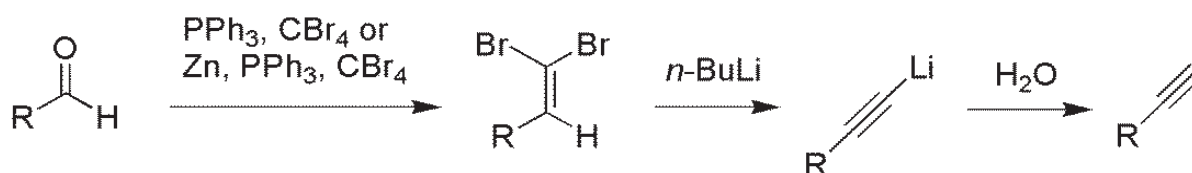


Figure 24: réaction de Corey-Fuchs.⁶⁹

Une autre méthode originale développée par Hinkle en 2004⁷¹ consiste à synthétiser des alcynes à partir des acides aminés protégés sous forme d'un ester méthylique ou d'amides de Weinreb en utilisant le réactif de Bestmann-Ohira (Figure 25).⁷²⁻⁷⁵ Cette méthode représente une avancée pour plusieurs raisons. La première réside dans le fait que c'est une synthèse

monotope dans laquelle l'ester ou l'amide de Weinreb subit plusieurs réactions successives dans un seul réacteur. La deuxième tient au fait que des alcynes dérivés d'acides aminés sont obtenus avec de très bons rendements et peuvent être introduits dans les peptides par chimie click (Figure 25).

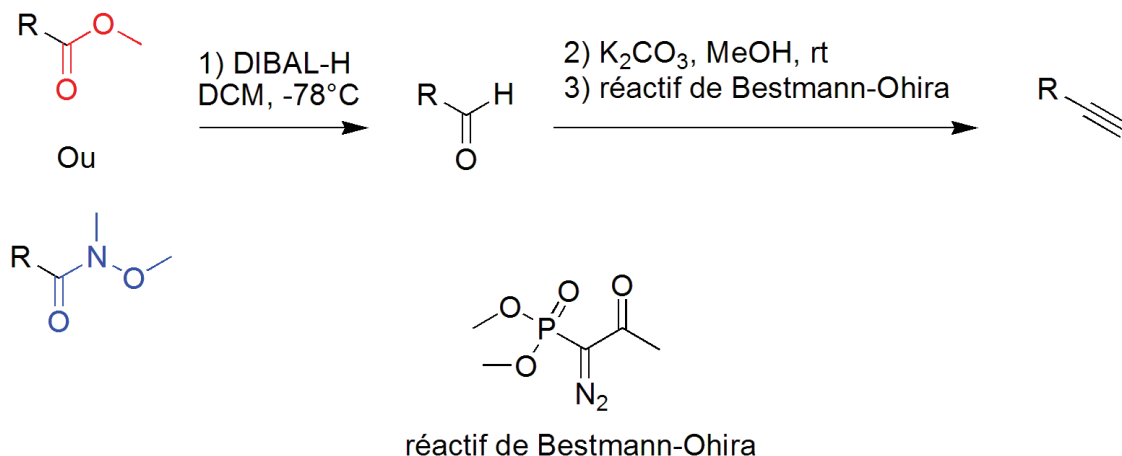


Figure 25 : préparation des alcynes à partir des esters méthyliques ou Les amides de Weinreb

b. Sources d'azoture.

La synthèse du premier azoture organique a été réalisée en 1864 par Peter Griess,⁷⁶ et depuis l'intérêt pour ces intermédiaires n'a cessé de croître après la découverte du réarrangement de Curtius en 1890,^{77,78} de la réaction de Staudinger en 1919,^{79,80} du réarrangement de Schmidt 1924,⁸¹⁻⁸³ et plus récemment de la cycloaddition de Huisgen,^{52,53} pour ne citer que les plus fameuses.⁸⁴

Dans la littérature on trouve différents exemples d'azidation selon la nature des molécules à modifier.

L'azidation par substitution nucléophile par l'azoture de sodium (NaN_3) est la méthode la plus couramment employée, en raison de sa grande efficacité.⁸⁴ Elle consiste en des substitutions nucléophiles (Figure 26):

- via l'intermédiaire de sel diazonium (Réaction de type SN1)

- d'une fonction hydroxyle activée par un mésylate ou un tosylate (Réaction de type SN2, inversion de configuration)
- d'un précurseur halogéné (Réaction de type SN2, inversion de configuration)

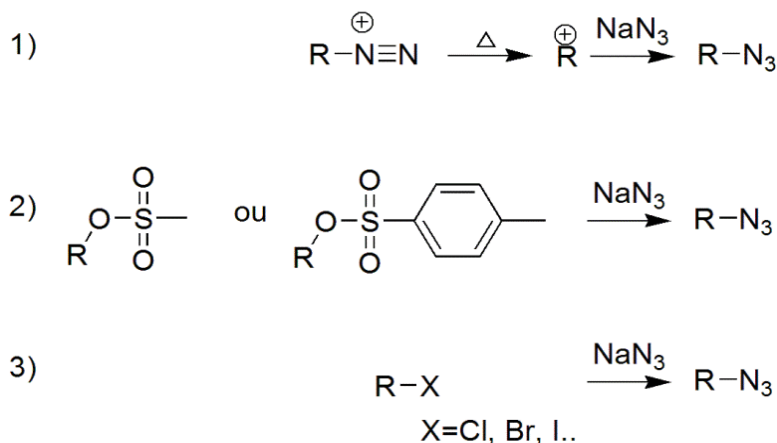


Figure 26: obtention d'un azoture organique par substitution nucléophile.

Toutefois ces méthodes ne sont que rarement applicables aux acide aminés qui eux sont convertis en azoture par réaction de diazo-transfert (Figure 27). Cette méthode présente l'avantage de s'effectuer dans des conditions douces, en une seule étape, avec de bons rendements.^{85,86}

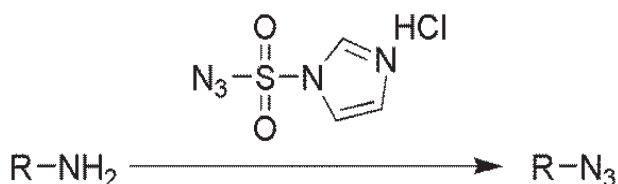


Figure 27 : Préparation des azotures organiques par réaction de diazo-transfert

B. Application de la chimie click en synthèse peptidique.

1. Introduction.

Dès sa découverte en 2002 la CuAAC a trouvé des applications dans la synthèse et l'optimisation de molécules d'intérêt biologique et son utilisation dans le domaine des peptides, a été initiée par Meldal.⁵⁴ Aujourd'hui, elle est considérée comme un outil essentiel en synthèse peptidique et trouve des applications pour le biomimétisme avec les

peptides,^{59,87,88} les cyclisations,^{68,89-93} la ligation chimique,⁹⁴⁻⁹⁶ en chimie combinatoire^{54,97} et d'autres applications comme par exemple dans le domaine des matériaux (Figure 28).⁹⁸⁻¹⁰¹

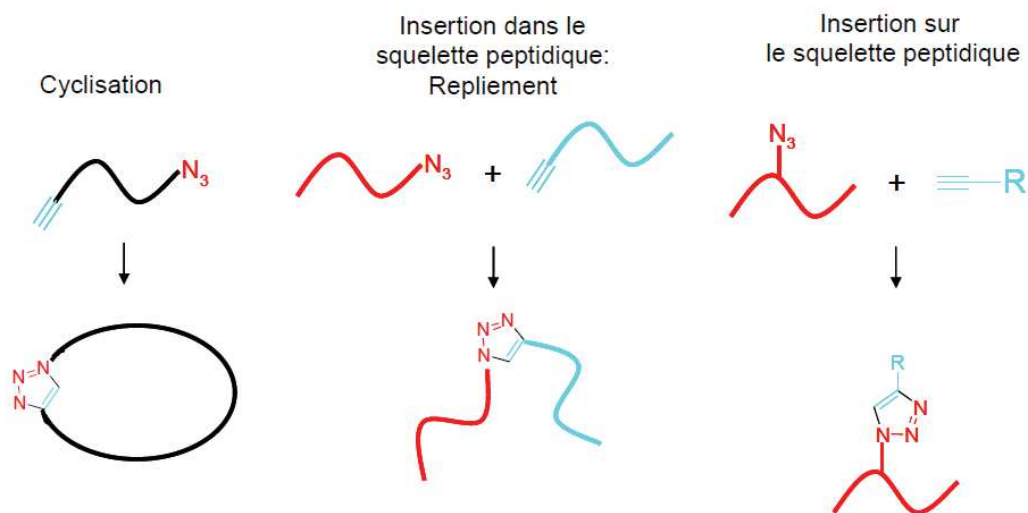


Figure 28 : exemples d'utilisation de la chimie click en synthèse peptidique

2 Synthèse des protéines par ligations successive avec CuAAC

La CuAAC trouve également une application intéressante dans le domaine de la ligation. Cette méthode est particulièrement appréciée pour sa simplicité de mise en œuvre et sa robustesse qui permet de « cliquer », des fragments polyfonctionnalisés complexes. En plus la stéréosélectivité, régiosélectivité font de la chimie click, dans plusieurs cas, un outil plus efficaces que les méthodes classiques de ligation. La synthèse de la cystatine A avec 97 aminoacides par ligation triazole successive est une excellente illustration de cette approche développée dans l'équipe d'Agnès Delmas (Figure 29).⁹⁵

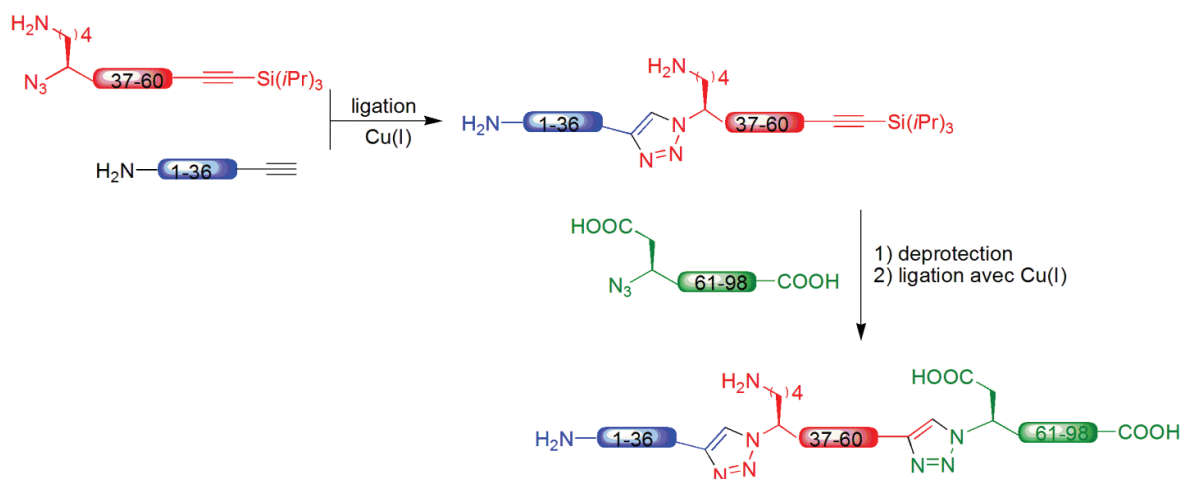


Figure 29 : synthèse d'analogue de la cystatin A par ligation successive⁹⁵

La première ligation est réalisée de façon sélective grâce au masquage de l'alkyne terminal par le groupe triisopropylsilyle. La désilylation a été réalisée avec les fluorures et permet d'obtenir l'alkyne terminal déprotégé qui servira dans une nouvelle ligation pour fournir l'analogue de la cystatin A.

Plus récemment dans la même équipe, une synthèse sur support solide de la protéine MUC non glycosylée a été réalisée. Cette approche a permis de surmonter les limitations d'ordre technique imposées par la ligation en solution et par conséquent le nombre de ligations a été multiplié, donnant accès à l'analogue de la protéine MUC1 de 160 Acides aminés (Figure 30).⁹⁴

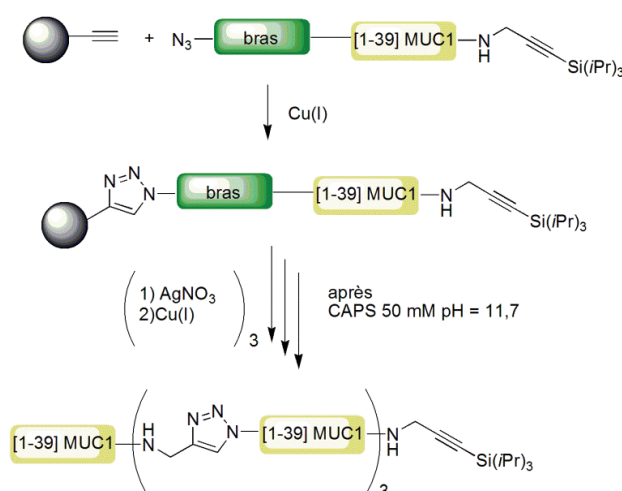


Figure 30 : Synthèse d'analogue non-glycosylé de MUC1 de 160 acides aminés⁹⁴

Les deux exemples précédents mettent en évidence la possibilité de remplacer dans une protéine complexe un certain nombre de liaisons amides par le résidu triazole, ce remplacement dans le premier cas ne conduit pas à une perte de l'activité biologique.

Partie 3 : Introduction à la problématique : Le triazole comme isostère de la liaison amide.

Les cycles 1,2,3-triazole peuvent présenter une activité biologique intéressante. En effet, ils se comportent comme des unités de liaison rigides, sans la même susceptibilité de clivage hydrolytique et tout en ne posant pas de problèmes particuliers de toxicité. Malgré ces avantages, l'effet de l'incorporation d'un tel résidu reste aléatoire^{59,87,88,102} et dans plusieurs exemples il y a diminution de l'activité biologique.^{60,89} Avant d'étudier l'effet de la substitution de la liaison amide 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué sur l'activité biologique et la structure des peptides nous avons choisi de définir le mot isostère. Puis de réaliser une comparaison topologique et électronique entre les unités amide et 1,2,3-triazole et montrer les points de ressemblances et de différences.

A. Définition d'un isostère.

Selon la définition de Gante et Rich,^{103,104} un peptidomimétique est un composé représentant des analogies structurales avec la molécule native suffisantes pour permettre une interaction avec son récepteur. D'après Gante et Rich : on distingue deux types de peptidomimétiques :

- Les molécules isostères de la liaison amide qui présentent une structure secondaire similaire au peptide natif.
- Les molécules non peptidiques possédant les groupements fonctionnels nécessaires pour réaliser les mêmes interactions que le peptide natif avec la protéine.

D'après ces définitions une molécule sera considérée comme peptidomimétique ou isostère si elle est capable de conserver la structure secondaire du peptide natif, d'agir de la même façon que le peptide parent sur son récepteur et de présenter une meilleure stabilité métabolique, une biodisponibilité accrue et une durée d'action plus longue.^{100,105-107} Ainsi, la conception d'un

peptidomimétique ou d'un isostère est basée sur la connaissance de l'activité et la conformation structurale du peptide natif que l'on essaye de mimer.

B. Comparaison topologiques et électroniques entre les unités amide et 1,2,3-triazole.

Comme la liaison amide, le noyau 1,2,3-triazole possède deux accepteurs de liaison hydrogène, deux accepteurs de liaisons hydrogène et une structure plane (Figure 31).

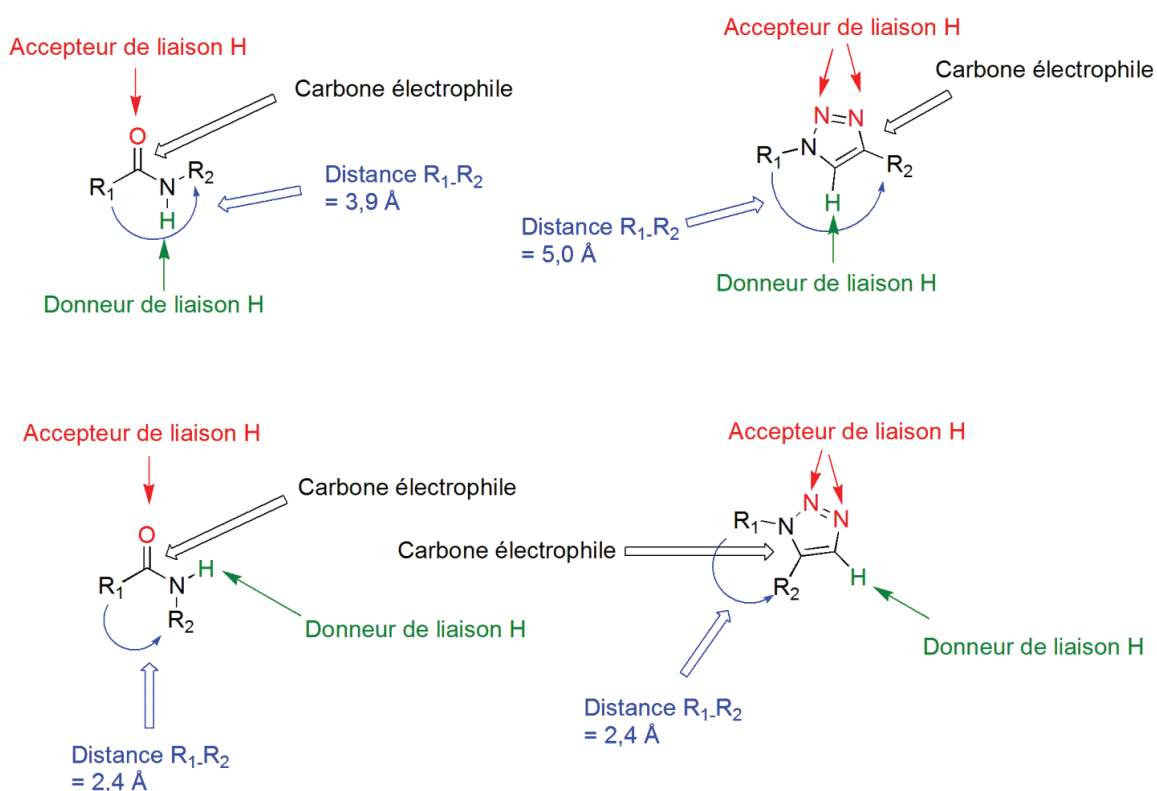


Figure 31: comparaison entre le triazole et la liaison amide^{99,101,108}

Malgré cette similitude, le triazole possède un autre accepteur de liaison hydrogène, le moment dipolaire global du triazole (environ 5D) est plus élevé que celui de la liaison amide (environ 3,5 D). Ses propriétés de donneur et d'accepteurs de liaison hydrogène sont plus importantes que celles de la liaison amide. La plus grande différence structurale entre le triazole et la liaison amide *trans* est la distance qui sépare les deux substituants. En effet, ces derniers sont séparés par deux atomes dans la liaison amide (3,9Å) et par trois atomes dans le triazole-1,4 (5,0Å). Cette comparaison nous permet de constater qu'il y a bien des

ressemblances mais aussi de grandes différences, malgré ces différences, depuis quelques années et de façon surprenante, le triazole est considéré comme un bon mime voire dans certaines publications comme un mime parfait de la liaison amide sans qu'il n'y ait eu d'études complètes des relations structure/activité des peptides modifiés^{109,110}

C. Effet du remplacement de la liaison amide par 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué sur des peptides à activité biologique

Nous avons choisi d'illustrer l'impact du remplacement de la liaison amide par 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué sur des composés à activité biologique, au travers de 5 exemples (3 peptides cycliques, une petite molécule et deux peptides linéaires structurés en hélice α) que nous avons jugés pertinents.

Sewald et al. rapportent la synthèse d'analogue de l'anticancéreux la Cryptophycine-52, deux voies de synthèses ont été utilisé pour obtenir le macrocycle (Figure 32). La première méthode consiste à la formation de macrocycle à partir d'une cycloaddition catalysée par le cuivre entre l'azoture et l'alcyne pour donner le macrocycle avec un rendement modeste de 32%, la baisse de rendement est due à la formation d'un dimère cyclique. Alors que la deuxième méthode utilisée pour la macro cyclisation a été effectuée avec HATU/DIEA pour donner le macrocycle avec un rendement de 74%.

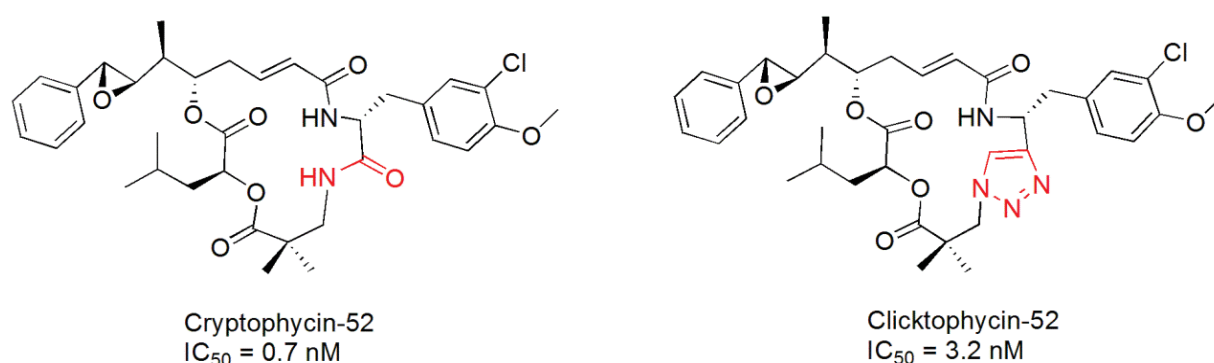


Figure 32 : structure de cryptophycin-52 et la clicktrophycin-52⁸⁹

L'analogue synthétisé est quatre fois moins actif par rapport au peptide naturel. De plus, les auteurs rapportent que l'incorporation de triazole dans le peptide a changé le déplacement

chimique de la plupart des protons et carbones. Dans cette publication, les auteurs considèrent le 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué comme un bio équivalent de la liaison amide.⁸⁹

Dans le même esprit, Maareseveen et son équipe ont utilisé la chimie click pour synthétiser trois analogues d'un inhibiteur de tyrosinase le cyclo-[Pro-Val-Pro-Tyr]. La CuAAC a été utilisée comme outil de cyclisation puisque les méthodes classiques de cyclisation se sont avérées inefficaces dans ce cas. Mais également parce que le 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué était considéré par les auteurs, comme un isostère de la liaison amide (Figure 33).^{87,111}

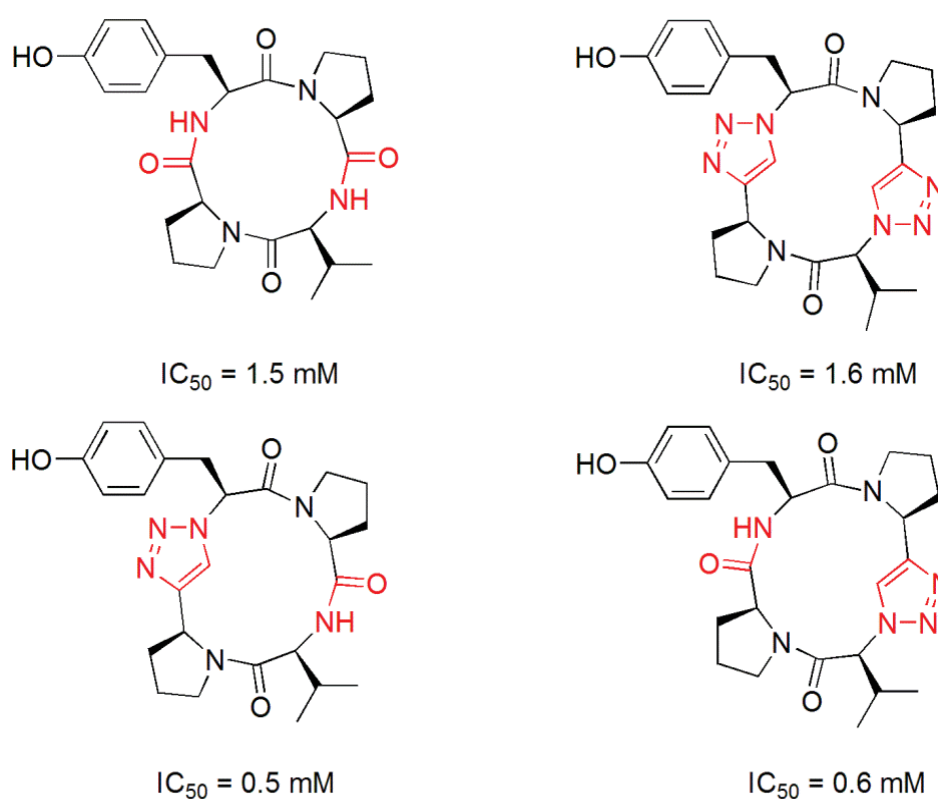


Figure 33 : activité inhibitrice vis-à-vis de la tyrosinase des analogues de peptides cycliques

Nous pouvons constater que dans le cas des mono-triazolo-peptides il y a une légère augmentation d'activité et dans le cas de bis-triazolo-peptide l'activité est conservée.

Dans le même contexte, Appendino et al. ont substitué la liaison amide de la capsaïcine, indispensable pour son activité biologique, par 1,2,3-triazoles-1,4 et 1,5-disubstitués (Tableau 1).¹⁰² Cette étude nous permet de constater une grande perte d'activité sur le récepteur

agoniste et antagoniste, une inversion d'activité sur le récepteur CB₁ et une activité constante sur le récepteur CB₂:

-dans le cas de la substitution de la liaison amide par un 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué l'activité sur le récepteurs agoniste est divisée par 3 et sur le récepteur antagoniste est divisé par 69.

-Dans le cas de la substitution de la liaison amide par un 1,2,3-triazole-1,5-disubstitué l'activité sur le récepteurs agoniste est divisée par 10 et sur le récepteur antagoniste est divisée par 370.

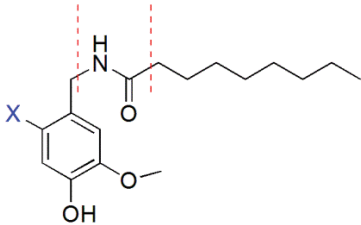
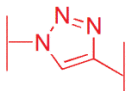
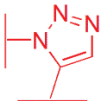
Activité sur les récepteurs à vanilloïdes et cannabinoïdes				
Structure	hTRPV1	hTRPV1	hCB ₁	hCB ₂
	(agoniste)	(antagoniste)	K_i [μ M]	K_i [μ M]
	EC ₅₀ ±SE [nM]	IC ₅₀ ±SE [μ M]		
	(X=H) 63.1± 4.2	-	>5.6	>7.9
	(X=I) >10000	0.01± 0.002	>5.6	>7.9
	(X=H) 170± 38	-	4.0	7.9
	(X=I) >10000	0.69± 0.16	0.44	7.9
	(X=H) 661± 167	-	>5.6	7.9
	(X=I) >10000	3.7± 0.5	5.6	7.9

Tableau 1: comparaison de l'activité agoniste/antagoniste de la capsaïcine et ces analogues sur les récepteurs à vanilloïdes et cannabinoïdes

D'après cette étude on peut constater que la substitution de la liaison amide par des 1,2,3-triazoles 1,4 ou 1,5-disubstitués conduit à une inversion ou une baisse d'activité. Malgré cette baisse significative d'activité les auteurs considèrent que le triazole peut être un mime de la liaison amide.

D. Effet du remplacement de la liaison amide par 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué sur des peptides linéaires structurés en hélice.

Jusqu'à aujourd'hui on recense uniquement deux publications qui illustrent l'impact d'incorporation de triazoles dans les peptides structurés en hélice, la première étude a été réalisée dans l'équipe de Ghadiri et la deuxième par l'équipe de Clayden.^{112,113}

L'équipe de Ghadiri a été la première à étudier l'effet d'incorporation de triazole dans un peptide structuré en hélice, cette étude consiste à incorporer un triazole dans trois endroits différents dans le peptide pLI-GCN4 de 33 acides aminés structuré en hélice α . Les auteurs démontrent par étude par diffraction des rayons X et dichroïsme circulaire que le triazole déstabilise légèrement la structure hélice.

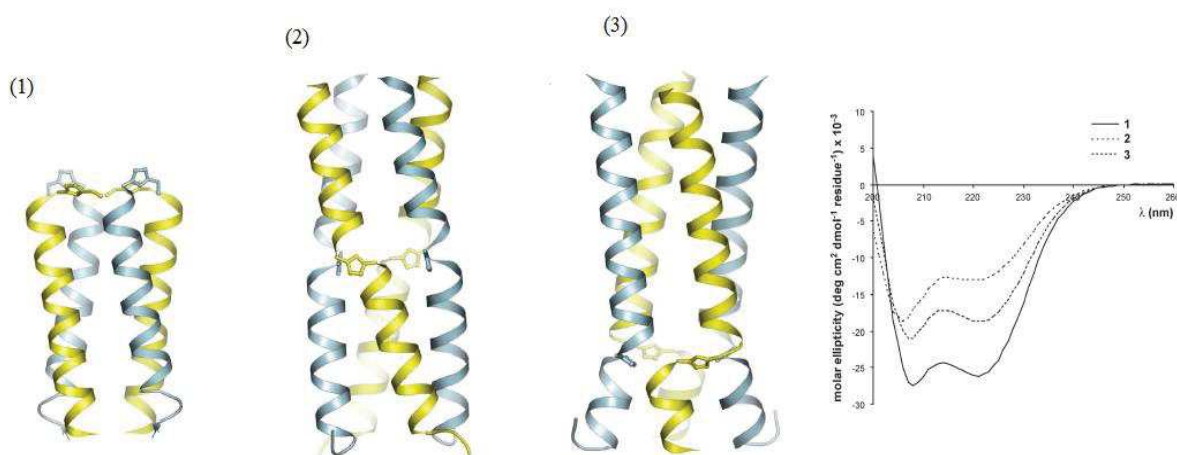


Figure 34 : structure cristallographique à rayons X et le CD de trois analogues de pLI-GCN4

Le peptide pLI-GCN4 présente une structure de type super-hélice (coiled coil) à leucine zipper c'est-à-dire une structure quaternaire. Par ailleurs on constate que les substitutions de liaison amide ont été faites sur la face hydrophobe du peptide correspondant à la zone de

contact des hélices ce qui se traduit par un amortissement de l'effet du triazole sur la structure secondaire. Par ailleurs, une autre information importante qui manque dans cette étude, concerne l'impact de ce remplacement sur l'affinité de ce peptide pour l'ADN qui est sa cible. Récemment l'équipe de Clayden¹¹³ a incorporé le triazole au milieu d'un peptide structuré en hélice et ils ont démontré que le triazole dans ce cas joue le rôle d'un interrupteur d'hélicité. Toutefois, ce modèle laisse un certain nombre de questions en suspens, en effet la structure hélice du peptide étudié n'est pas stable^{113,114}.

E. Conclusion et objectifs

Les différents exemples décrits jusqu'à présent ont démontré l'importance de la chimie click dans la synthèse peptidique et le développement de nouveaux médicaments. Cette méthode est particulièrement appréciée pour sa simplicité de mise en œuvre sa robustesse et sa régio- et chimiosélectivité.

Pour mieux exploiter toutes les propriétés de motif 1,4-triazole, il faut tout d'abord comprendre l'effet de ce motif sur la structure et l'activité des peptides modifiés, sachant que jusqu'à aujourd'hui aucune étude de SAR des triazolo peptides n'a été rapportée :

Pour répondre à ces questions et mieux comprendre l'impact de la substitution de la liaison amide par un triazole dans un peptide structuré, nous avons choisi deux modèles d'étude le premier est un cyclodepsipeptide la tamandarine et le deuxième est constitué par des peptides linéaires structurés en hélice α de la famille des peptaibols.

Notre hypothèse de travail est simple, l'incorporation d'un triazole dans un peptide structuré peut avoir deux conséquences ; soit la structure est conservée et l'activité biologique ne sera pas impactée ; soit la structure et l'activité sont affectées par cette modification.

**Chapitre 2: les Peptaibols des peptides
linéaires constituant un modèle idéal pour
l'étude du remplacement de la liaison amide
par des triazoles.**

Partie 1: Les peptaibols, présentation générale

Les Peptaibols sont des peptides linéaires à activité antibiotique, d'origine fongique produits par diverses espèces de champignons filamenteux d'origine marine ou terrestre du genre *Trichoderma*.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Le terme peptaibol a été proposé pour la première fois en 1983 par Toniolo¹¹⁸ pour définir ces peptides linéaires acétylés en N-terminal caractérisé, d'une part, par un nombre élevé d'acides aminés non protéinogènes essentiellement l'acide α -aminoisobutyrique (Aib) ou l'isovaline (Iva) et d'autre part par la présence du côté C-terminal d'un amino-alcool, le phenylalaninol et le leucinol étant les plus communs.

Récemment Brückner et al ont introduit le terme peptaibiotiques, suite à l'identification croissante de nouvelles séquences, ce terme définit les molécules présentant les caractéristiques structurales des peptaibols mais pour lesquelles l' amino-alcool en C-terminal n'est pas défini.^{119,120} Aujourd'hui les peptaibols sont considérés comme une sous classe de la famille de peptaibiotiques de masse moléculaire comprise entre 500 et 2200 Da et biosynthétisé par voie NRPS et NRPS/PKS.

A. Structure des peptaibols

1. Structure primaire

Les peptaibols se composent essentiellement de 14 acides aminés codés et non codés. A l'exception des résidus Aib et Gly qui ne possède pas de carbone asymétrique, ces acides aminés sont de configuration (L) sauf l'isovaline qui peut être trouvée sous la forme (D). En fonction du nombre d'acides aminés contenu dans leurs séquences les peptaibols sont classés en trois catégories,

- Les peptaibols longs de 18 à 21 résidus
- Les peptaibols moyens de 11 à 16 résidus

- Les peptaibols courts de taille inférieure à 11 résidus.

Les peptaibols de la famille de l'alaméthicine^{121,122} sont les premiers peptaibols à avoir été isolés. Ils sont constitués de 20 résidus et comptent plusieurs dizaines d'analogues séparés en deux groupes principaux les alaméthicines F30 et F50 qui se distinguent respectivement par la présence en position 18 d'un acide glutamique (Glu) ou d'une glutamine (Gln) (Figure 35).

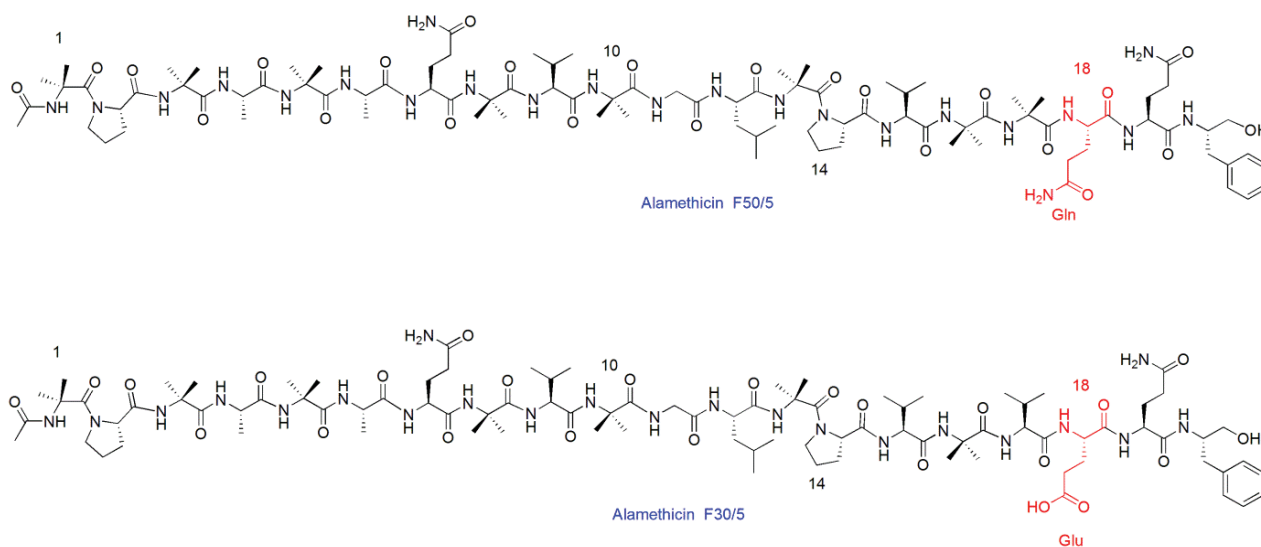


Figure 35 : Structure d'Alaméthicine F50/5 et F30/5^{121,122}

2. Structure secondaire

La structure secondaire des peptides qui contiennent des Aib y compris les peptaibols ont été étudiées par plusieurs techniques analytiques RMN, CD, RX et par modélisation moléculaire.

Les résultats de ces travaux ont montré que la présence des acides aminés α,α -dialkylés plus spécialement l'Aib (U), réduit considérablement le degré de liberté conformationnelle du squelette peptidique. En effet, la présence d'un groupement CH_3 additionnel sur le carbone alpha impose une restriction des angles $\varphi = \pm 57$ et $\psi = \pm 47$, rendant l'Aib fortement hélicogène. Ainsi les peptaibols présentent généralement une structure secondaire hélicoïdale rigide¹²³⁻¹²⁸ de type hélice α et/ou hélice 3_{10} dont le sens est imposé par la configuration absolue des acides aminés chiraux.¹²⁹

De manière générale, les peptaibols qui incluent moins de 8 acides aminés se structurent préférentiellement en hélice 3_{10} et les peptides qui possèdent entre 9 et 20 résidus sont structurés en hélice α .¹³⁰ Bien que l'hélice α soit la plus répandue dans les peptaibols, la structure de certains est un mélange de deux formes α et 3_{10} .^{131,132} Par ailleurs la présence de proline (Pro) ou d'hydroxyproline (Hyp)¹⁴ dans la séquence est responsable d'une angulation plus ou moins importante par rapport à l'axe de l'hélice, comme on peut le voir pour l'alaméthicine dont la structure a été déterminée pour première fois en 1982 par Fox et Richard. Cette structure à l'état solide est très proche de la structure déterminée en solution par RMN.^{133,134} Ainsi, l'alaméthicine est structurée sous forme d'une hélice α , présentant au niveau de la proline en position 14, un coude d'un angle de 20° par rapport à l'axe de l'hélice.¹²¹ La proline confère une certaine flexibilité aux peptaibols en agissant comme un interrupteur de l'hélicité et contribue de façon importante aux propriétés d'interaction de ces peptides avec les membranes biologiques.¹³⁵

Les chaînes latérales des résidus Gln (en position 7), Glu ou Gln (en position 18) et les C=O des acides aminés centraux particulièrement les résidus Aib (en position 10) et la Gly (en position 11), définissent une face hydrophile parallèle à l'axe de l'hélice (Figure 36). Cette disposition particulière est responsable du caractère amphipathique de l'alaméthicine. Cette propriété donne par la suite la capacité aux peptaibols de former de pores dans les membranes.¹³⁶

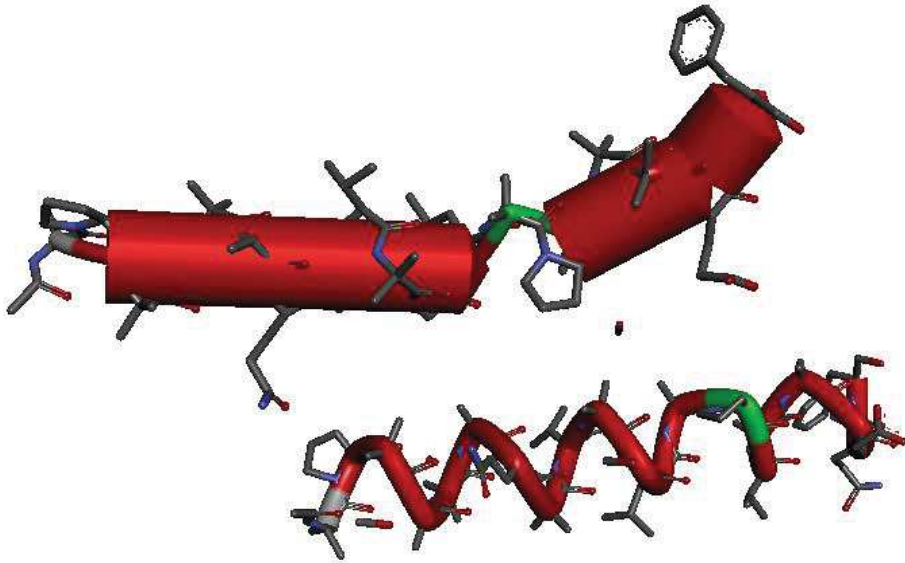


Figure 36: structure secondaire de l'alamethicin F30

Ce type de structure se retrouve dans les peptaibols à longue séquence comme la Longibrachin et la Suzukacillin.¹³⁶ Les peptaibols de taille moyenne adoptent une structure en hélice α présentant des caractéristiques similaires.¹³⁷

B. Origine biologique et rôle écologique

Les peptaibols sont des métabolites secondaires produits par différents genres de champignons d'origine marine ou terrestre et fréquemment rencontrés dans les sols ou sur les matières végétales en décomposition.¹³⁸ Le genre *Trichodema*, avec $\approx 75\%$ des séquences décrites jusqu'à présent est le principal organisme producteur.¹³⁹

Au sein de l'écosystème, ces peptides semblent être un moyen de défense, protection et compétition pour les ressources nutritives. Par leur bio activité, les peptaibols contribuent à la survie et au dynamisme des organismes producteurs. Dans plusieurs cas, ils sont capables d'inhiber la croissance d'autres organismes contigus et/ou protègent les spores de la consommation par des prédateurs.^{140,141} Il a récemment été démontré que les peptaibols peuvent être utilisés comme agent de lutte biologique contre des phytopathogènes fongiques.¹²¹

1. Voie de Bio-synthèse

Les peptaibiotiques sont bio-synthétisés par les voies NRPS ou NRPS/PKS. Ces voies de synthèse sont à l'origine de la grande diversité des structures produites. Les peptaibols sont fréquemment trouvés sous forme de séquences analogues de même nombre de résidu.^{142,143} Ces différences ponctuelles dans les séquences entraînent des variations dans la charge, la polarité et par conséquent la bioactivité des peptaibols analogues.¹⁴⁴

Des travaux récents ont permis la mise en évidence et la caractérisation des protéines synthétases impliquées dans la bio synthèse des peptaibols au sein de plusieurs souches de champignons. Par exemple en 2003, l'équipe de Schwecke¹⁴⁵ a caractérisé et isolé deux protéines impliquées dans la bio-synthèse des ampullosporins, peptaibols de 15 résidus, produit par *Sepedonium ampullosporum*. L'une de ces protéines, comporte un module PKS responsable de l'acylation de peptaibols en N-terminal et deux modules NRPS impliqués dans l'incorporation des résidus Trp et Ala. Ce dipeptide est ensuite transféré sur la seconde protéine comportant 13 modules NRPS permettant l'élongation de la chaîne peptidique et incluant une réductase catalysant la formation de l'amino-alcool C-terminal et la libération du peptaibol final (Figure 37).

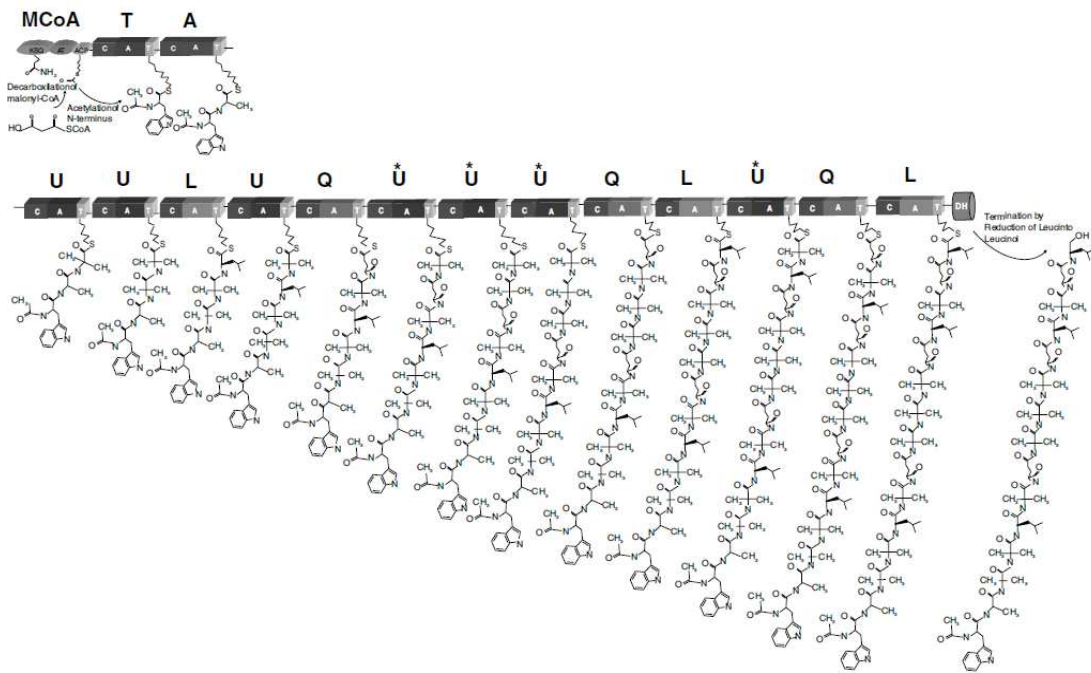


Figure 37 : Modèle proposé par Schwecke expliquant la bio synthèse des ampullosporins¹⁴⁵

Certains modules NRPS présentant une manque de spécificité cela expliquerait la diversité des analogues produits par substitution de certains acides aminoisobutyriques par l’alanine, ce phénomène a été observé aussi par l’équipe de Raap lors de l’étude des zervamicines.¹⁴⁶

2. Propriétés membranaires et biologiques des peptaibols

a. Interactions des peptaibols avec les membranes cellulaires

La conformation hélicoïdale des peptaibols définit l’existence d’un moment dipolaire selon l’axe de l’hélice et contribue à l’insertion de ces peptides dans les membranes cellulaires. Le pôle positif se situe du côté N-terminal généralement hydrophobe, et le pôle négatif est porté par la partie C-terminale généralement hydrophile. Les interactions des peptaibols avec les membranes cellulaires conduisent à la formation des pores ou canaux ioniques voltage-dépendants transmembranaires, qui s’accompagnent d’un déséquilibre ionique et d’une dépolarisation de la membrane qui peut aboutir à la mort de la cellule (Figure 38 et Figure 39).^{147,148}

Bien que le mécanisme d'action exact des peptaibols reste un sujet de controverse, plusieurs études ont été réalisées et ont permis de proposer différents modèles pour expliquer la formation et l'activation de ces canaux ioniques.¹⁴⁷⁻¹⁵³

Il est établi que les peptaibols à caractère amphipathique perturbent sélectivement la membrane cellulaire. La charge cationique permet aux peptaibols d'interagir avec les charges négatives des phospholipides des membranes bactériennes. Après leur fixation, les peptaibols s'insèrent aux phospholipides de membrane bactérienne via un de trois modèles :

-Le modèle dit en douves de tonneaux (barrel-stave) est largement admis pour expliquer la structure des canaux formés par l'alaméthicine et ces analogues à longue séquence (Figure 40). Ces canaux sont constitués d'une agrégation de plusieurs monomères peptidiques (entre 6 et 10 en général) orientés comme les planches d'un tonneau, la face externe du canal est constituée par les domaines hydrophobes de l'hélice en contact direct avec les lipides de la membrane, et la face interne par les domaines hydrophiles.

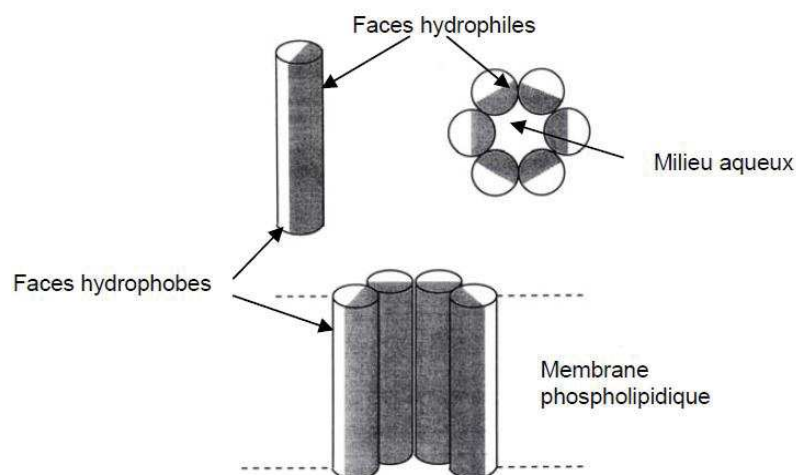


Figure 38 : organisation des hélices pour former un canal ionique¹⁴⁸

Dans le cas d'alaméthicine, les chaînes latérales des acides aminés Gln (position 7), Glu/Gln (position 18) et Gln (position 19) et les groupement C=O des acides aminés Aib (position 10) et Gly (position 11) constitue la face interne du canal. L'ensemble est stabilisé par des interactions peptide-peptide et peptide-lipide.^{147,149,154,155}

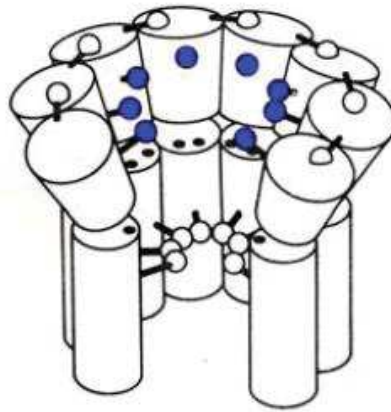


Figure 39: Organisation de l'alamethicin pour former un canal ionique. Les sphères au centre en bleu sont les résidus Glu en position 18, les sphères blanches au sommet et au milieu sont les résidus Gln en position 19 et 7 respectivement¹³³

La formation des pores transmembranaires se fait en plusieurs étapes incluant la fixation des monomères à la membrane, suivie par l'insertion des hélices peptidiques dans zone hydrophobe de la membrane. L'addition progressive d'autres monomères induit une augmentation du diamètre des pores qui conduit à la fuite du contenu de la cellule.^{153,156}

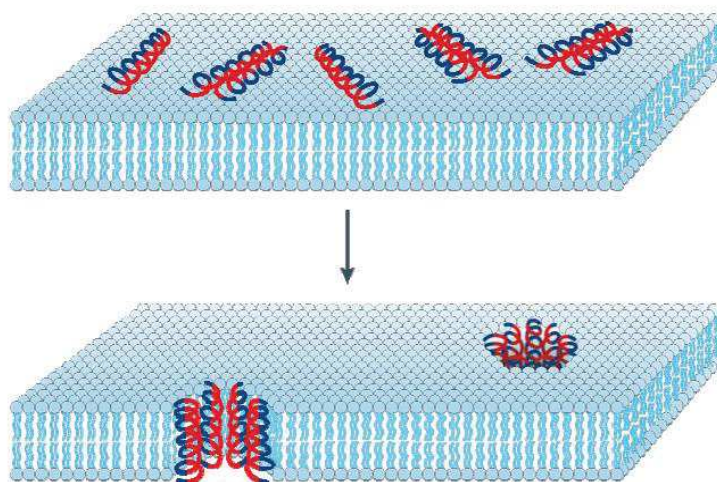


Figure 40: modèle 'douve de tonneaux' (barrel stave).¹⁵⁶

-Le modèle pore toroïdaux (toroidal-pore)diffère du modèle précédent par le fait que les peptides restent toujours fixés à la tête des monocouches lipidiques même quand ils sont insérés dans la bicouche lipidique (Figure 41).^{157,158} Ce type de pore transmembranaire a été démontré dans le cas des maganines, protégrines et de la mélittine.^{153,156-158}

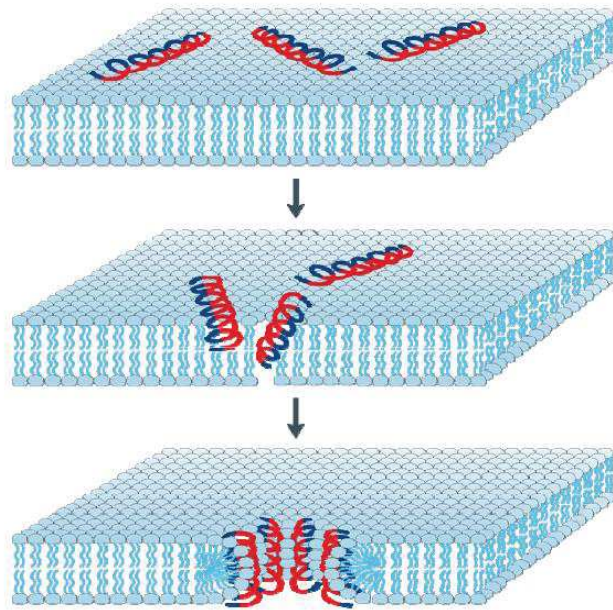


Figure 41 : modèle pores toroïdaux (toroidal-pore)¹⁵⁶

-Le modèle en tapis a été proposé pour la première fois dans l'équipe de R. B. Merrifield pour décrire le mode d'action de la cecropin et ces analogues.¹⁵⁹ Dans ce modèle les peptides se fixent à forte concentration à la surface de la membrane et ne forme pas des pores. Après leur fixation, les monomères de peptides s'alignent sur la surface de la membrane et s'accumulent en induisant une perturbation de la membrane qui finit par être perforée et son contenu cytoplasmique peut s'échapper (Figure 42).^{153,156}

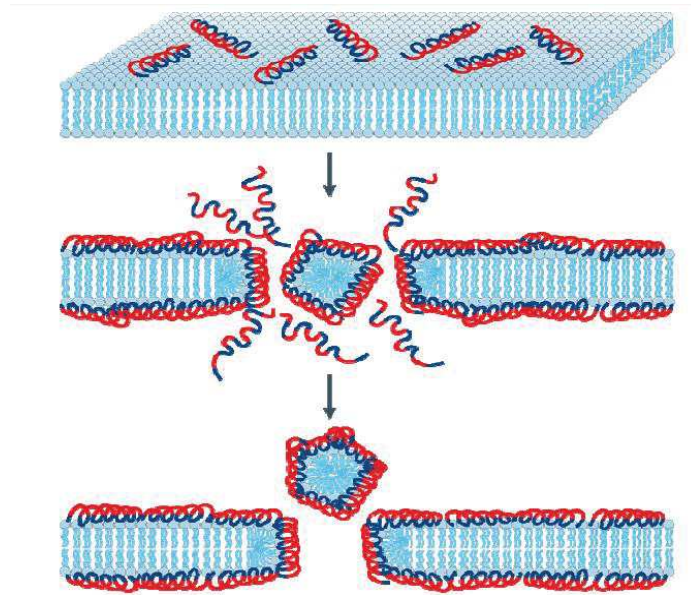


Figure 42: modèle tapis (carpet)¹⁵⁶

Récemment, d'autres mécanismes d'action ont été proposés dans lesquels les peptides antimicrobiens n'interagissent pas avec la membrane cytoplasmique. Dans ce cas, les peptides inhibent la synthèse des acides nucléiques et/ou des protéines en entravant l'activité enzymatique bactérienne.¹⁵⁶

b. Activité biologiques des peptaibols

Les peptaibols présentent un large spectre d'activités biologiques, grâce à leur capacité d'interaction avec les membranes phospholipidiques dont ils perturbent les propriétés.¹⁴⁷ Une fois encore, l'alaméthicine constitue le peptaibol modèle le plus utilisé dans la réalisation de ces tests biologiques.^{121,122} Les activités biologiques principales recensées pour les peptaibols sont :

antibactériennes (les peptaibols sont généralement actifs sur les bactéries à Gram positif et dans la moindre mesure sur les bactéries à Gram négatif),^{121,122}

antifongiques,¹³⁰

antitumorales,¹⁶⁰

insecticides,¹⁶¹

antivirales.¹⁶²

Ce sont ces différentes activités biologiques qui ont poussé les chimistes à s'intéresser à la synthèse des peptaibols, pour d'une part en confirmer la structure et d'autre part en étudier les relations structure/activité.

C. Synthèse des peptaibols

La synthèse des peptaibols est un défi. Cette difficulté de synthèse est due principalement à l'encombrement stérique de l'Aib et aux difficultés de couplage qu'il occasionne.^{163,164} Par ailleurs, les dipeptides Aib-Pro ou Aib-Hyp fréquemment trouvés dans les peptaibols sont acido-labiles, ce qui induit leur clivage par l'acide trifluoroacétique (TFA) lors de l'ultime étape de la synthèse.¹⁶⁵ De plus cet enchaînement a tendance à conduire à une dicétopipérazine pendant le coulage^{166,167} ce qui diminue le rendement de la synthèse. Ainsi le clivage de la jonction Aib-Pro, les difficultés de couplage du résidu Aib conduisent à la formation de nombreux produits secondaires qui engendrent des difficultés de purification ou la mise en œuvre de synthèses complexes pour sursoir à ces difficultés. Ces difficultés sont d'autant plus marquées si l'on envisage la synthèse des peptaibols longs.

Nous avons choisi d'illustrer la difficulté de synthèse des peptaibols au travers de trois exemples que nous avons jugés pertinents portant sur la synthèse de l'alaméthicine. En effet, ce peptaibol de vingt résidus est le mieux étudié tant du point de vue de sa structure que de son activité biologique. Nous comparerons les synthèses de ce peptide en solution et en SPPS.

1. Synthèse de l'alaméthicin F50/5 en solution.

En 2004, Toniolo et ses collaborateurs ont décrit la synthèse totale de l'alaméthicine F50/5 en solution par une stratégie convergente (Figure 43). Cette synthèse s'appuie sur l'analyse rétrosynthétique de la molécule et prend en compte la fragilité de la liaison Aib-Pro au niveau des positions 1-2 et 13-14.

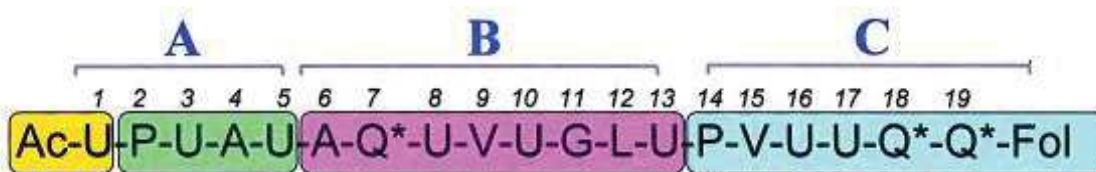


Figure 43: synthèse convergente d'alamethicin F50/5.¹⁶⁸

Leur méthode consiste à synthétiser cinq fragments qui ont été assemblés préalablement en utilisant la stratégie Z/OtBu comme groupements protecteurs et EDC/HOAt comme agent de couplage (Figure 44).

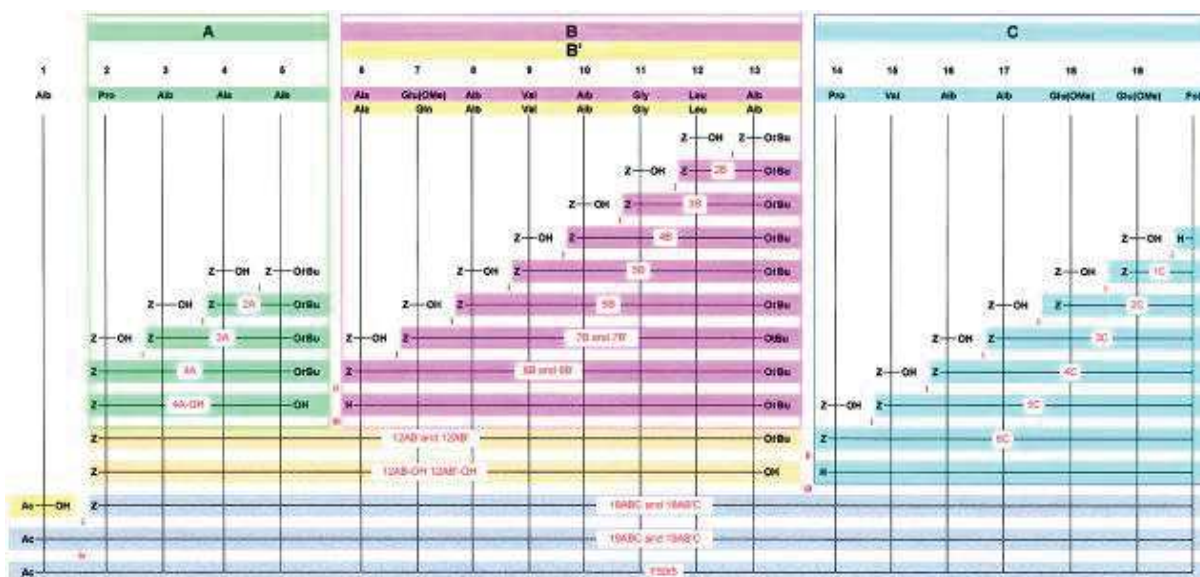


Figure 44 : préparation de l'alamethicin F50/5 et ces analogues. (i) déprotection du groupement (Z) avec $H_2/(Pd)/MeOH$ suivie d'une réaction de couplage avec EDC/(HOAt). (ii) déprotection du groupement (OtBu) au niveau de C-terminale avec TFA/ CH_2Cl_2 et le groupement de N-terminal avec $H_2/(Pd)/MeOH$. (iii) couplage avec EDC/HOBt (HOAt). (iv) Glu(OMe) aminolyse.¹⁶⁸

Le rendement de chaque étape varie entre 30 et 95%, après 22 étapes et 8 semaines de travail l'alaméthicine F50/5 est obtenue avec un rendement global de 10%.

2. Synthèse des peptaibols en SPPS

Vu les difficultés de couplage qu'occasionne le résidu Aib lorsque des agents de couplages classiques sont utilisés, les chimistes ont eu recours à une méthode originale qui consiste à

utiliser l'intermédiaire «fluorure d'acyle» pour surmonter cette difficulté et synthétiser l'alaméthicine.

Deux stratégies ont été employées pour obtenir l'intermédiaire «fluorure d'acyle»:

La première méthode développée par Carpino consiste à utiliser le réactif de couplage TFFH développé en 1995, dont la particularité est de générer le fluorure in situ (Figure 45). Malgré que ce réactif soit cité comme l'un des agents les plus puissants pour l'activation d'acides aminés *N*-méthylés ou de l'Aib, le rendement global en alaméthicine ne dépasse pas 11% après purification et est comparable à celui obtenu en solution en terme de rendement.^{169,170}

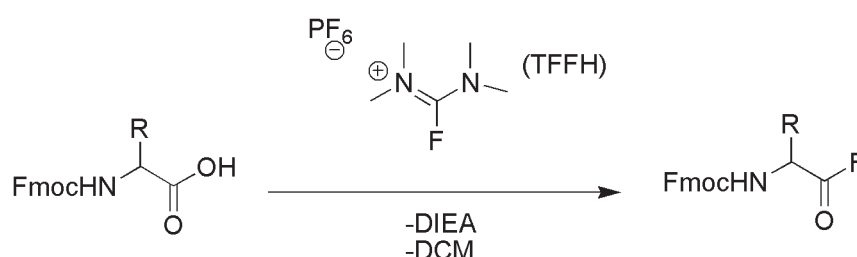


Figure 45 : Activation de la fonction acide par le TFFH

La deuxième méthode développée par Skrydstrup¹⁷¹ consiste à utiliser l'intermédiaire Fmoc-Aib-F préparé préalablement à partir du Fmoc-Aib-OH en utilisant le fluorure cyanurique (Figure 46).

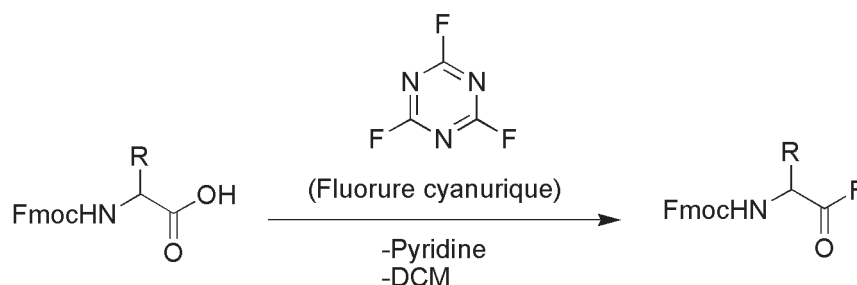


Figure 46: Activation de la fonction acide par le fluorure cyanurique

Cette méthode est particulièrement efficace et permet d'augmenter le rendement de l'alaméthicine jusqu'à 24% après purification.

3. Bilan des différentes synthèses de l'alaméthicine

Jusqu'à aujourd'hui, deux principales méthodes de synthèse d'alaméthicine ont été développées soit en solution soit en SPPS en utilisant une activation de l'Aib sous forme de fluorure d'acyle. Si on compare ces méthodes nous constatons que la synthèse de l'alaméthicine en solution est longue, fastidieuse et le rendement est faible par contre la synthèse en SPPS est nettement plus avantageuse en terme de rapidité mais le rapport rendement/ coût de synthèse est loin d'être satisfaisant.

En conclusion si les stratégies de synthèse des peptaibols sont nombreuses, il existe très peu de méthodologies permettant d'accéder aux peptaibols longs avec de bons rendements à un faible coût.

Partie 2 : Développement d'une stratégie simplifiée d'obtention des peptaibols par SPPS.

A. Présentation de la synthèse.

En 2009, le groupe du professeur Albericio a introduit l'additif Oxyma pure en synthèse peptidique. Cet additif permettant la formation de l'ester activé a montré des performances supérieures par rapport à l'HOBt et équivalente à l'HOAt en ce qui concerne le couplage, et une capacité remarquable à réduire la racémisation que ce soit en solution ou en SPPS.^{172,173}

Dans notre laboratoire nous avons choisi de combiner le DIC/Oxyma pure avec la technique micro-onde pour faciliter la synthèse des peptaibols en phase solide. Pour tester l'efficacité de la méthode, nous avons sélectionné dans la base de données deux peptaibols de tailles et structures différentes¹⁵² :

L'alaméthicine F50/5 est le peptaibol qui nous servira de modèle car il a déjà été obtenu par plusieurs méthodes ce qui nous permettra de comparer l'efficacité de notre stratégie (Figure 47). Il comporte huit résidus Aib et deux fragments Aib-Pro.

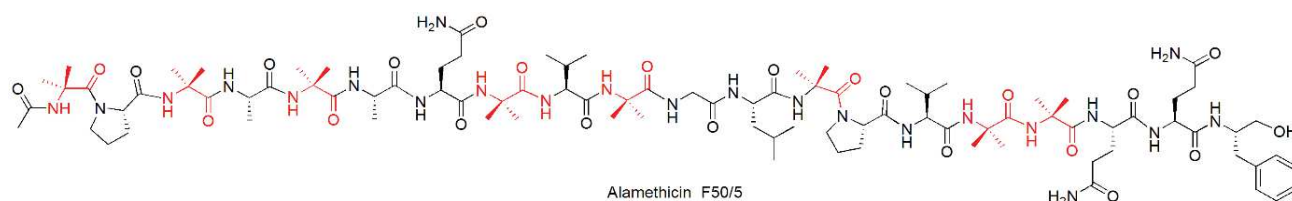


Figure 47 : Structure de d'Alamethicine F50/5

La Bergofungine D1 est un peptaibol de taille moyenne avec 14 résidus (**Error! Reference source not found.**). Il comporte des enchaînements difficiles tels que Aib-Aib-Hyp et Aib-Hyp-Aib. Cet analogue a été déjà synthétisé ce qui nous permettra aussi de comparer l'efficacité de notre stratégie¹⁷¹. Dans un premier temps concernant ce peptide nous avons souhaité développer un analogue simplifié la Bergofungine D2 ou l'hydroxyproline a été

remplacé par la proline, moins onéreuse à l'achat (**Error! Reference source not found.**). L'étude structurale de ce peptide devrait par ailleurs nous permettre d'appréhender l'importance des hydroxyprolines sur la structure secondaire du peptide.

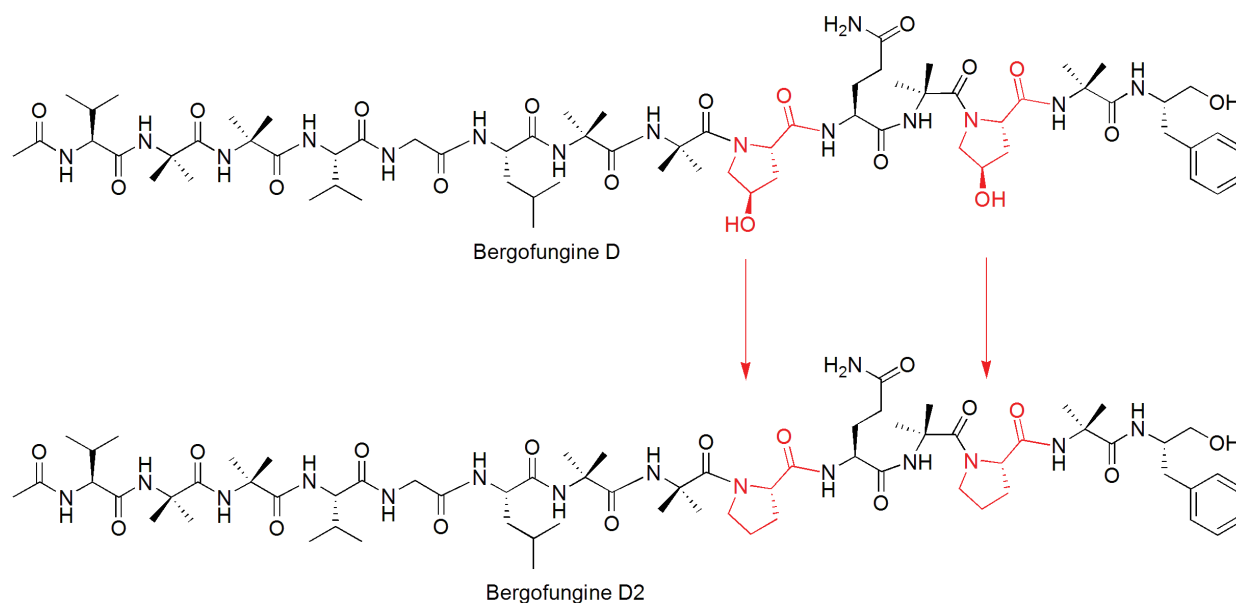


Figure 48 : Bergofungine D1 et son analogue deshydroxylé la Bergofungine D2

La synthèse mise en œuvre pour l'obtention de ces composés consiste en une stratégie pas à pas où les acides aminés sont introduits séquentiellement sur une résine chlorotryl commerciale portant le phénylalaninol. Cinq équivalents d'acides aminés par rapport au taux de substitution de la résine sont utilisés et la fonction acide est activée par le cocktail DIC/Oxyma. Pour assurer un couplage optimal, le mélange réactionnel est irradié 20 min sous microonde pour atteindre une température finale de 70°C. La déprotection de la fonction Fmoc est classiquement réalisée par ajout d'une solution à 20% de pipéridine dans le DMF. Après l'acétylation de la fonction amide N-terminale le produit est libéré de la résine par clivage en milieu acide en utilisant une solution d'acide trifluoroacétique à 50% dans le dichlorométhane. A l'issue de cette étape, nous avons observé par LC/MS la formation d'un ester de trifluoroacétique en position C-ter pouvant représenter jusqu'à 50% du produit cible, Ce phénomène est déjà décrit dans la littérature lors de clivage des peptides qui contiennent de la serine. (Figure 49).

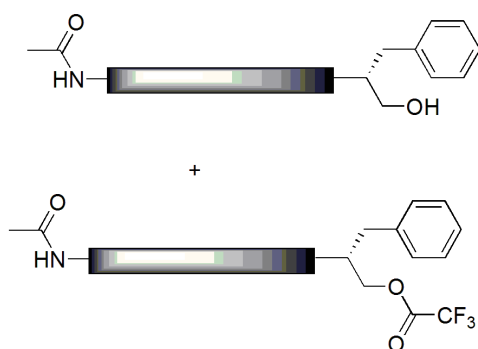


Figure 49 : Trifluoroacétylation de l'alcool C-terminal des peptaibols

Ce dernier est ensuite quantitativement hydrolysé par ajout d'une solution saturée de carbonate de sodium ou bicarbonate de sodium avant purification par HPLC semi-préparative. Les peptaibols cibles sont obtenus avec des rendements compris entre 50 et 35% ce qui est bien au-dessus des rendements précédemment rapportés dans la littérature. L'ensemble de ces résultats est résumé dans l'article suivant paru dans *Organic letters* en 2014 : Efficient Microwave-Assisted One Shot Synthesis of Peptaibols Using Inexpensive Coupling Reagents.

B. Article 1: Efficient Microwave-Assisted One Shot Synthesis of Peptaibols Using Inexpensive Coupling Reagents

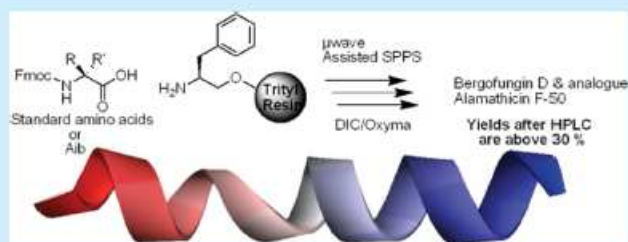
Efficient Microwave-Assisted One Shot Synthesis of Peptaibols Using Inexpensive Coupling Reagents

Khoubaib Ben Haj Salah and Nicolas Inguibert*

Université de Perpignan Via Domitia, Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE) USR CNRS 3278, Centre de Phytopharmacie, bâtiment T, 58 avenue P. Alduy, 66860 Perpignan, France

S Supporting Information

ABSTRACT: A diisopropylcarbodiimide/Oxyma (ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate) coupling cocktail was successfully incorporated into the automated microwave-assisted synthesis of two peptaibols and one analogue, whose previously reported syntheses were complicated by steric hindrance. This method utilizes commercially available reagents and affords alamethicin F50/5 and bergofungin D in high yields and purities along with an appreciable reduction of synthesis time and cost when compared to previously reported methods.



α -Helices account for 30% of a protein's secondary structure while β -strands account for 20%; therefore, considerable interest in the design and application of small helical *de novo* peptides can be observed in the literature.^{1,2} For example, peptide helices have been exploited as protein/protein interaction disruptors,^{3,4} and studying their self-association provides clues toward understanding their pathogenicity.⁵ These exquisite properties allow helices to find numerous applications in medicine as well as in the design of nanomaterials.^{6,7}

Studies concerning the development of peptides designed to self-associate or to adopt a stable helical confirmation led us to consider peptaibols as a template. Peptaibols are a class of nonribosomally synthesized peptides from a diverse set of fungi that include *Trichoderma*, *Gliocladium*, and *Stibella*.⁸ Usually linear, these peptides contain 4 to 20 residues and are characterized by a high content of α,α -dialkyl α -amino acids such as α -aminoisobutyric acid (Aib, U) and D- or L-isovaline (Iva). They possess an acetylated N-terminus along with a β -amino alcohol, generally phenylalaninol (Fol) or leucinol (Lol), at their C-terminus. These peptides show antibiotic activity through formation of voltage-dependent pores in biological membranes.⁹ Pore formation of this type requires that peptides have a high propensity to form 3_{10} - or α -helical structures, a conformation sterically induced by the constrained C_{α} carbon of the Aib residue.^{10,11} Because of their intriguing channel forming properties and small size, peptaibols have attracted considerable interest as model peptides and numerous syntheses have been reported.¹² However, the synthesis of peptaibols is significantly hampered by steric hindrance in residues such as Aib, where reactivity during the coupling reaction is diminished in comparison to other amino acid residues. Overcoming the poor reactivity of such residues requires the use of very efficient but expensive coupling reagents that sufficiently activate the Aib carboxylic functional group. These include HATU, HCTU, TFFH, and more

recently COMU.¹³ Most of the reported syntheses of peptaibols rely on in-solution strategies based on segment condensation that lead to tedious flash chromatography separations to purify each fragment and the final compound.^{14,15} It is noteworthy that this arduous solution-based approach is still a popular method for synthesizing peptaibols.^{16,17} Consequently, solid-phase peptide synthesis (SPPS) is a convenient alternative that avoids lengthy intermediate purification steps.¹⁹ However, few examples of peptaibols synthesized on solid-phase resin have been reported thus far.^{20,21} The present paper focuses on the synthesis of two peptaibols: alamethicin F50/5, which is considered the archetype of peptaibols, and bergofungin D, which has been synthesized previously with only an 11% yield.^{21–25} Using the method herein both compounds were obtained cost effectively by SPPS in high yield and purity.

To compare *de novo* peptaibols on the basis of architectural design it is necessary to optimize the synthetic strategy for preparing peptaibols of varying lengths. A cost-effective and automated synthetic strategy would avoid the following characteristics: (1) The use of expensive coupling reagents such as HATU or TFFH (TFFH was shown to be efficient for the synthesis of ampullosporin A, but was not sufficiently automated^{21,22}); (2) the preparation of ready-to-couple amino acids such as α -amino acid fluoride;^{20,21} (3) reprogramming the peptide synthesizer or changing coupling reagents during the synthesis;^{21,22} (4) the use of double-coupling steps for Aib residues or subsequent residues also sterically hindered by Aib.²¹

An Fmoc-based strategy in conjunction with a DIPC/ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino) acetate (Oxyma) coupling cocktail proved ideal for accomplishing these goals. Encouraging results

Received: February 14, 2014

Published: March 12, 2014

have been observed previously by Albericio and co-workers for the coupling of Aib residues in model peptides such as the enkephalin analog YUUFNLNH₂ and by our group for the cyclization of marine peptide; however, this approach has yet to be applied to peptaibols.^{28,29} Among the numerous advantages of incorporating these reagents are reduced racemization and a lower cost, making them 15 and 30 times cheaper than HATU and TFFH, respectively. As reported for the enkephalin analog, it was necessary to use a 4 h double-coupling step at the Aib residue to drive the synthesis.²⁸ More recently, microwave irradiation has been effective in shortening the reaction time and increasing product purity, while being compatible with both oxyma-derived COMU and DIC/Oxyma activation methods.^{30,31}

To test the DIC/Oxyma and microwave combination approach, two challenging peptaibols were selected. Alamethicin F50/5 (1) (Figure 1) was chosen for its 20-residue length

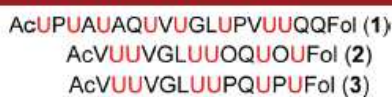


Figure 1. Structures of alamethicin F50/5 (1), bergofungin D (2), and its analog (3). U: Aib, O: Hyp.

which contains eight Aib (U) residues, two of which are located at adjacent positions and two of which are coupled to sterically hindered proline. Bergofungin D (2) (Figure 1) is challenging because it contains two UU motifs, one of which is followed by hydroxyproline (O) as well as another UO motif. Previous methods offered only satisfactory crude purity (<24%) and low purified yield (11%) despite synthesis optimization.²¹ Compound 3 is an analog of compound 2 in which the (2*S*,4*R*)-4-hydroxyproline residue is replaced with a proline residue for initial synthesis optimization at lower cost.

Solid-phase synthesis was carried out using a CEM Liberty One peptide synthesizer. Compounds 1, 2, and 3 were assembled on 0.28 g, 0.1 mmol of a preloaded Fmoc-phenylalaninol *o*-chlorotrityl resin (0.36 mmol/g). The optimized protocol for the synthesis of the target peptides was accomplished on a 0.1 mmol scale using Fmoc-protected amino acids, DIC, and Oxyma each in 5-fold excess with regard to the resin capacity. The most efficient reaction conditions affording complete coupling of Aib were found to be microwave irradiation at 70 °C for 20 min. A 20% solution of piperidine in DMF was used for Fmoc deprotection after each coupling step, and the fulvene–piperidine adduct was quantified by UV absorption (301 nm) to estimate coupling efficacy (Supporting Information (SI)). Acetylation was performed on a solid support by treatment with a solution of acetic anhydride in DMF for 10 min. After completion peptides were cleaved from the resin using dilute TFA in dichloromethane to ensure complete peptide cleavage without degradation of the acid labile Aib-Pro bond.

Compounds 1, 2, and 3 were obtained in high crude purity (Table 1), as determined by HPLC for which an evaporative light scattering detector was used to detect even small amounts of impurities (Figure 2).^{33,34}

The three compounds were purified by semipreparative HPLC, and single products were obtained. LC/MS electrospray analysis provided the singly, doubly, and triply charged pseudomolecular ions $[M + H]^+$, $[M + 2H]^{2+}$, and $[M + 3H]^{3+}$ for each of the compounds (Table 2 and SI). During

Table 1. Analysis and Purity of Synthesized Peptides

compd	t (h) ^a	crude purity (%)	reported crude purity (%)	purified yields (%-mg)	reported purified yields (%)
1	15	91	53 ^b	35-68	24 ^b
2	10	97	24 ^b	50-72	11 ^b
3	10	95	–	49-68	–

^aTotal duration of the synthesis (h: hour). ^bReference 21.

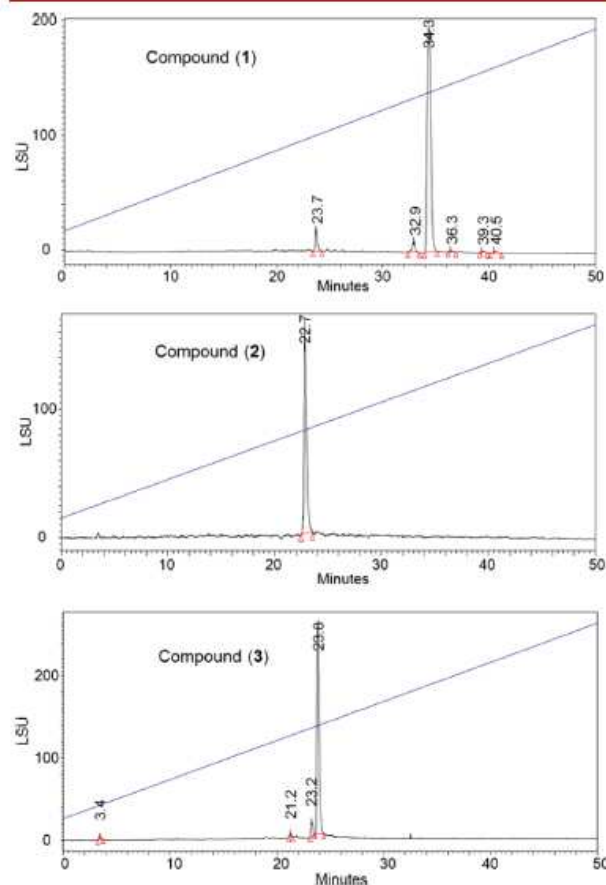


Figure 2. HPLC profiles of the crude alamethicin F50/5 (1), bergofungin D (2), and its analog (3) with ELSD detection. The HPLC analysis was conducted on a Waters 2695 HPLC system with a Grace Vydac 218MS 5 μ M C-18 column (250 mm \times 4.6 mm) using a gradient mixture of water with 0.1% FA (Buffer A) and ACN with 0.1% FA (Buffer B). All compounds were eluted with a 0.9 mL/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

Table 2. Observed Ions in Full ESI Mass Spectra of Compounds 1, 2, and 3

compd	$[M + H]^+$	$[M + 2H]^{2+}$	$[M + 3H]^{3+}$	b ions	y ions
1	1963.52	981.95	654.92	b ₁₃ : 1189.09	y ₇ : 774.22
2	1425.97	714.26	–	b ₈ : 751.05 b ₁₁ : 1076.85	y ₆ : 676.15 y ₃ : 350.07
3	1393.92	697.61	–	b ₈ : 751.06 b ₁₁ : 1060.83	y ₆ : 644.11 y ₃ : 334.07

analysis the labile Aib-Pro peptide bond breaks to yield the expected fragments b₁₃ and y₇ of 1 even in full scan mode.³⁵

The same phenomenon is observed at the two Aib-Hyp peptide bonds of **2** and two Aib-Pro peptide bonds of **3** yielding fragments b_8 and b_{11} with their corresponding fragments y_6 and y_3 (Table 2 and SI).

An obvious concern when dealing with peptide couplings and deprotection at elevated temperature is the risk of amino acid racemization.³⁶ However, the peptides we have synthesized do not contain any amino acids that are known to be prone to racemization such as Cys, His, or Ser. Furthermore even for these amino acids specific coupling conditions under microwave irradiation are reported to suppress the racemization by lowering the temperature to 50 °C.³⁷ Therefore based on these previous reports a study of the racemization was deemed unnecessary, and this was confirmed by HPLC which has only shown sharp peaks and ¹H NMR studies for which the CH α and NH regions are well-defined (SI).

These results demonstrate a rapid and efficient method for the synthesis of peptaibols offering products of higher purities and yields than the previously reported methods (Table 1). This method allows the use of inexpensive resins and of a low cost DIC/Oxyma-based activation scheme with standard reagent excesses. These results highlight the effectiveness of Oxyma in SPPS by demonstrating a significant improvement in speed and efficiency, particularly for the synthesis of difficult sterically hindered peptides. Future synthesis of these peptides should take advantage of the recent evolution of peptide synthesizers.³⁸

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

UV quantification of the fulvene–piperidine adduct obtained after Fmoc deprotection with piperidine. HPLC trace of purified peptides. LCMS analysis of pure peptides. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: nicolas.inguibert@univ-perp.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants of la Ligue Nationale Contre le Cancer and the Bonus Qualité Recherche of Perpignan University. The spectroscopic experiments have been performed using the Biodiversité et Biotechnologies Marines (Bio2Mar, <http://bio2mar.obs-banyuls.fr/fr/index.html>) facilities at the University of Perpignan.

■ REFERENCES

- Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balam, P. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3131.
- Seebach, D.; Hook, D. F.; Glättli, A. *Pept. Sci.* **2006**, *84*, 23.
- Isabel Garcia-Aranda, M.; Gonzalez-Lopez, S.; Maria Santiveri, C.; Gagey-Eilstein, N.; Reille-Seroussi, M.; Martin-Martinez, M.; Inguibert, N.; Vidal, M.; Teresa Garcia-Lopez, M.; Angeles Jimenez, M.; Gonzalez-Muniz, R.; Perez de Vega, M. *J. Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1896.
- Donatella, D.; Di Stasi, R.; De Rosa, L.; Isernia, C.; D'Andrea, L. D.; Fattorusso, R. *J. Pept. Sci.* **2013**, *19*, 214.
- Pannuzzo, M.; Raudino, A.; Milardi, D.; La Rosa, C.; Karttunen, M. *Sci. Rep.* **2013**, *3*.
- Hosseinkhani, H.; Hong, P.-D.; Yu, D.-S. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4837.
- Zhao, X.; Pan, F.; Xu, H.; Yaseen, M.; Shan, H.; Hauser, C. A. E.; Zhang, S.; Lu, J. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3480.
- Brückner, H.; Toniolo, C. *Chem. Biodiversity* **2013**, *10*, 731.
- Vedovato, N.; Baldini, C.; Toniolo, C.; Rispoli, G. *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 1338.
- Fox, R. O., Jr.; Richards, F. M. *Nature* **1982**, *300*, 325.
- Higashimoto, Y.; Kodama, H.; Jelokhani-Niaraki, M.; Kato, F.; Kondo, M. *J. Biochem. (Tokyo)* **1999**, *125*, 705.
- Blaser, P.; Altherr, W.; Linden, A.; Heimgartner, H. *Chem. Biodiversity* **2013**, *10*, 920.
- El-Faham, A.; Funosas, R. S.; Prohens, R.; Albericio, F. *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15*, 9404.
- Peggion, C.; Coin, I.; Toniolo, C. *Biopolymers* **2004**, *76*, 485.
- Baldini, C.; Bellanda, M.; Peggion, C.; Djontu, A. L.; Atagua, C.; Mammi, S.; Toniolo, C. *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 1129.
- Nelissen, J.; Nuyts, K.; De Zotti, M.; Lavigne, R.; Lamberigts, C.; De Borggraeve, W. M. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51708.
- De Zotti, M.; Biondi, B.; Peggion, C.; Formaggio, F.; Park, Y.; Hahm, K.-S.; Toniolo, C. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1285.
- Altherr, W.; Linden, A.; Heimgartner, H. *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 1144.
- Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Haber, H.; Seydel, J. K.; Krause, E.; Bienert, M.; Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Albericio, F. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 405.
- Hjorringgaard, C. U.; Pedersen, J. M.; Vosegaard, T.; Nielsen, N. C.; Skrydstrup, T. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1329.
- Nguyen, H.-H.; Imhof, D.; Kronen, M.; Schlegel, B.; Härtl, A.; Gräfe, U.; Gera, L.; Reissmann, S. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2781.
- Hung, K.; Harris, P. W. R.; Brimble, M. A. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5784.
- De Zotti, M.; Biondi, B.; Peggion, C.; Park, Y.; Hahm, K.-S.; Formaggio, F.; Toniolo, C. *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 585.
- Kirschbaum, J.; Krause, C.; Winzheimer, R. K.; Brückner, H. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 799.
- Leitgeb, B.; Szekeres, A.; Manczinger, L.; Vágvolgyi, C.; Kredics, L. *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 1027.
- Jung, G.; Redemann, T.; Kroll, K.; Meder, S.; Hirsch, A.; Boheim, G. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 784.
- Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15*, 9394.
- Boyaud, F.; Mahiout, Z.; Lenoir, C.; Tang, S.; Wdzieczak-Bakala, J.; Witczak, A.; Bonnard, I.; Banaigs, B.; Ye, T.; Inguibert, N. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3898.
- Pedersen, S. L.; Tøfteng, A. P.; Malik, L.; Jensen, K. J. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1826.
- Coantic, S.; Subra, G.; Martinez, J. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2008**, *14*, 143.
- Subirós-Funosas, R.; Acosta, G. A.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6200.
- Megoulas, N. C.; Koupparis, M. A. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2005**, *35*, 301.
- Adnani, N.; Michel, C. R.; Bugni, T. S. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 802.
- Psurek, A.; Neustüß, C.; Degenkolb, T.; Brückner, H.; Balaguer, E.; Imhof, D.; Scriba, G. K. E. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 279.
- Bacsa, B.; Horváti, K.; Bösze, S.; Andraea, F.; Kappe, C. O. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7532.
- Palasek, S. A.; Cox, Z. J.; Collins, J. M. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 143.
- Collins, J. M.; Porter, K. A.; Singh, S. K.; Vanier, G. S. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 940.

C. Résultats complémentaires

1. Etude structurale de la bergofungine D et de son analogue.

Peu après avoir synthétisé la bergofungine D, nous avons constaté que deux structures coexistaient sous le même nom selon la source bibliographique consultée. Ainsi la structure de la bergofungine D initialement rapportée correspond à la formule 1 de la Figure 50¹⁷⁴, alors que la bergofungine D était référencée avec la structure 2 dans la peptaibols database¹⁵² et dans le premier article rapportant sa synthèse totale.¹⁷¹ Afin de différencier l'analogue synthétique de la bergofungine D il sera appelé bergofungine D1 dans le reste du manuscrit.

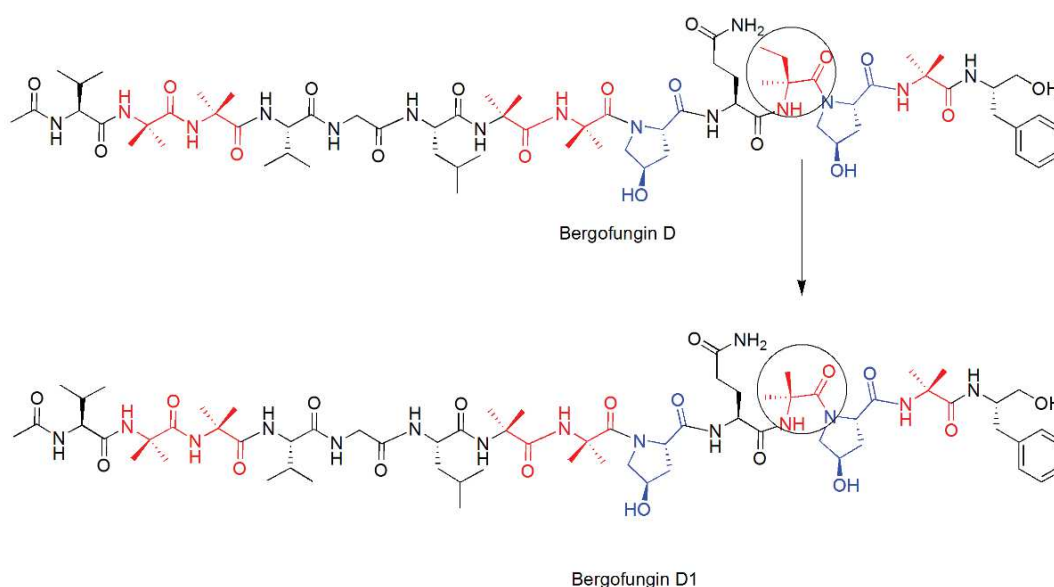


Figure 50: structure de la Bergofungin D et la Bergofungin D1

Ainsi la bergofungine D1 se différencie du produit naturel par la substitution en position 11 d'une L-isovaline par un résidu Aib. Cette erreur nous a amené à étudier l'impact de cette modification mineure sur la structure tridimensionnelle de la bergofungine D, afin de nous assurer que le composé synthétisé restait structuré en hélice α .

Nous avons donc tout d'abord comparé la bergofungine D à des analogues naturels présentant une forte homologie de séquence, tels les cephaibols¹⁷⁵, l'antiamoebine¹⁷⁶, l'émerimicine¹⁷⁷,

l'heptaibine¹⁷⁸, la samarosporine¹⁷⁹ et la stilbelline¹⁸⁰ (Tableau 2). Pour l'ensemble de ces composés on remarque que le résidu Aib est fréquemment remplacé par un résidu isovaline (Iva). Une comparaison des structures tridimensionnelles obtenues par diffraction des rayons X pour les cephaibols B et Crévèle que le remplacement des Aib en position 5 et 12 par des résidus Iva n'a pas d'influence significative sur la structure en hélice (Figure 51).

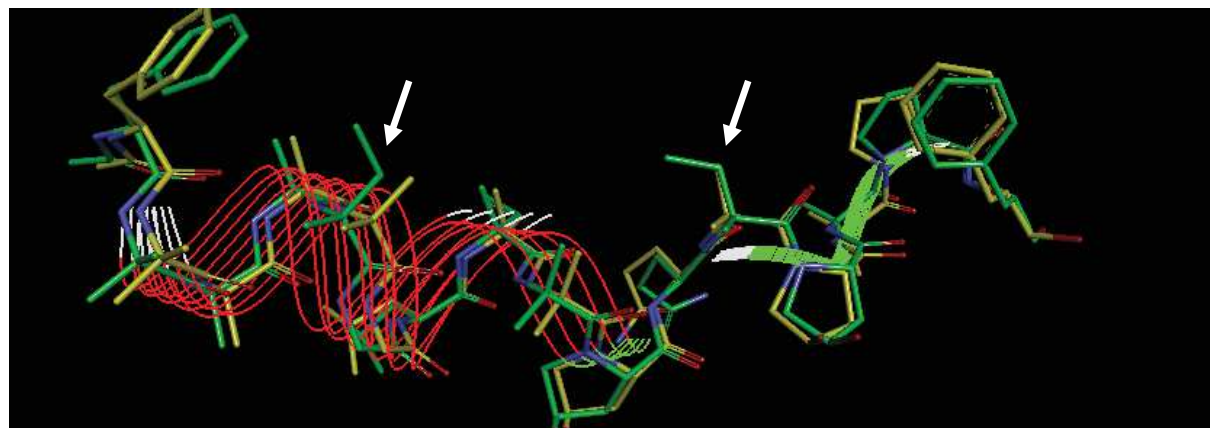


Figure 51: Superposition des structures tridimensionnelles des céphaibols B et C.

Ainsi la modification de structure introduite dans la bergofungine D ne devrait pas affecter sa structure. Toutefois, afin de vérifier cette hypothèse une étude structurale a été entreprise d'une part sur la bergofungine D1 et sur son analogue pour lequel les hydroxyprolines ont été remplacées par des prolines.

La structure en hélice de la bergofungine D1 a été confirmée expérimentalement par dichroïsme circulaire puis par modélisation de la structure sous contrainte RMN, ces expériences ont été réalisées par Baptiste Legrand à l'institut de biologie Max Mousseron (IBMM). En dichroïsme circulaire la bergofungine D1 présente la signature caractéristique d'une hélice avec un maximum à 190 nm et deux minima à 208 et 220 nm. La structure en solution de la bergofungine D1 en utilisant les contraintes NOE déterminées par RMN converge également vers une hélice α (Figure 52).

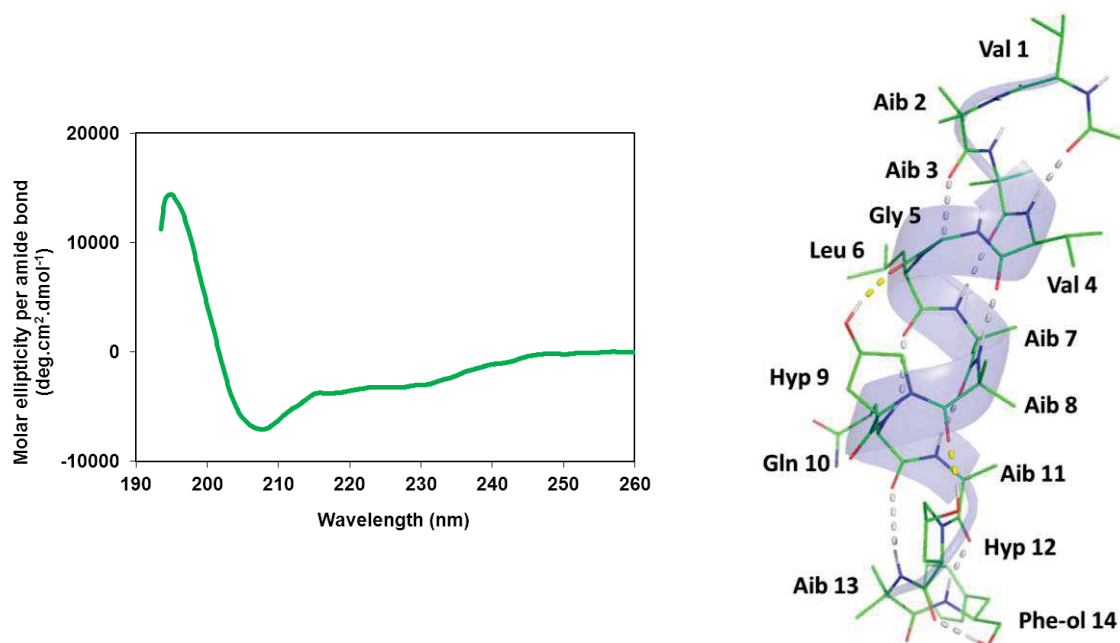


Figure 52: Spectre de dichroïsme circulaire et structure tridimensionnelle de la bergofungine D1.

D'une façon analogue l'étude de la structure de l'analogue de la bergofungine D1 où les hydroxyprolines sont remplacées par des prolines a été entreprise, cet analogue sera nommé D2 dans la suite du manuscrit. Dans ce cas nous sommes parvenus à obtenir des monocristaux par évaporation lente d'une solution de méthanol qui ont pu être analysés par diffraction des rayons X. Une structure hélicoïdale est obtenue, qui permet de confirmer que les substituants hydroxy des prolines n'interviennent pas dans l'établissement de la structure secondaire de la Bergofungine D1 (Figure 53). La maille cristalline contient deux peptides en position tête bêche chacun d'eux étant sous forme d'une hélice majoritairement 3_{10} un repliement classiquement observé pour les peptaibols^{181,179}.

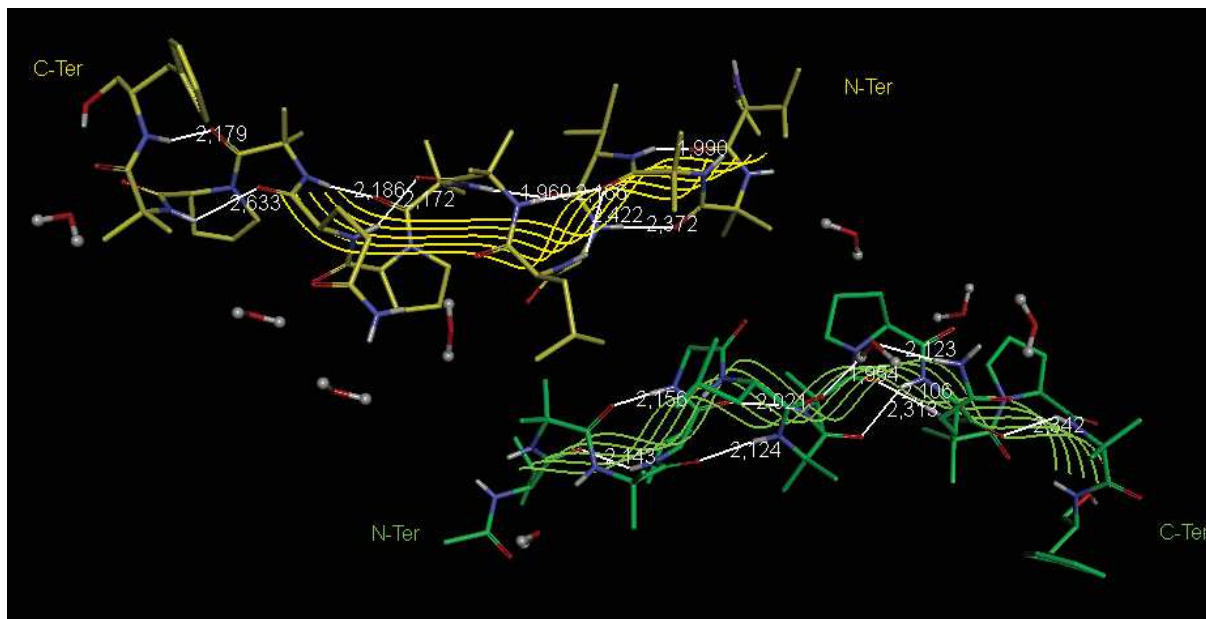


Figure 53 : Structure tridimensionnelle de la bergofungine D2.

Une superposition des structures des céphaïbol C¹⁷⁵ et de la bergofungine D2 révèle une organisation tridimensionnelle très similaire avec un RMSD de 1.9Å pour les 14 résidus servant à la superposition (Figure 54). Toutefois, la partie N-terminale du céphaïbol adopte un repliement en hélice alpha classique jusqu'à l'hydroxyproline 10 et au-delà est structuré en hélice 3₁₀ alors que la bergofungine D2 est principalement sous forme d'hélice 3₁₀.

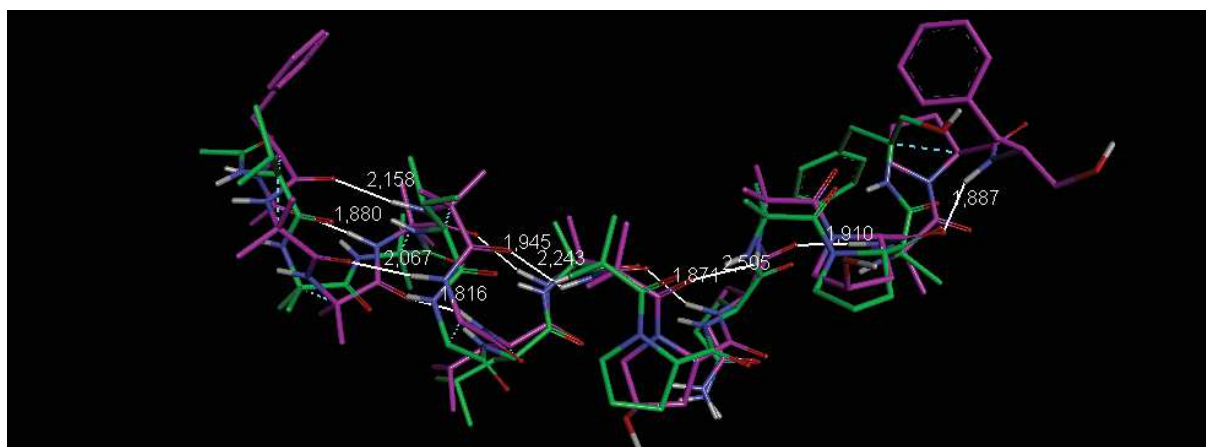


Figure 54 : Superposition des structures de la bergofungine D2 et du céphaïbol C.

Ces résultats complémentaires devraient être rapportés dans « Journal of Peptide Sciences ».

Tableau 2: comparaison des séquences primaires d'analogues de la bergofungine D

Compound Name	Sequence Length	Mod.N.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	PdB Code
Cephaibol A	16	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Aib	Gly	Leu	Iva	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib	Pro	Pheol	1OB4
Cephaibol B	16	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Iva	Gly	Leu	Iva	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib	Pro	Pheol	1OB6
Cephaibol C	16	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Aib	Gly	Leu	Iva	Aib	Hyp	Gln	Aib	Hyp	Aib	Pro	Pheol	1OB7
Antiamoebin I	16	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Iva	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib	Pro	Pheol	2M1F
Antiamoebin II	16	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Iva	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Pro	Aib	Pro	Pheol	
Antiamoebin III	16	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Aib	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib	Pro	Pheol	
Antiamoebin IV	16	Ac	Phe	Aib	Aib	Ala	Iva	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib	Pro	Pheol	
Antiamoebin IX	16	Ac	Phe	Aib	Ala	Aib	Iva	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib	Pro	Pheol	
Antiamoebin VI	16	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Aib	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Aib	Hyp	Aib	Pro	Pheol	
Antiamoebin VIII	16	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Iva	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Aib	Hyp	Aib	Pro	Pheol	
Antiamoebin XII	16	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Aib	Gly	Leu	Ala	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib	Pro	Pheol	
Antiamoebin XIII	16	Ac	Val	Aib	Aib	Aib	Aib	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib	Pro	Pheol	
Antiamoebin XIV	16	Ac	Val	Aib	Aib	Aib	Val	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib	Pro	Pheol	
Antiamoebin XV	16	Ac	Leu	Aib	Aib	Aib	Aib	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib	Pro	Pheol	
Antiamoebin XVI	16	Ac	Leu	Aib	Aib	Aib	Iva	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib	Pro	Pheol	
Emerimicin III	15	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Val	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib		Pheol	
Emerimicin IV	15	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Val	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Ala		Pheol	
Heptaibin	15	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Val	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Aib	Hyp	Aib		Pheol	
Samarosporin I	15	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Val	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Ala		Pheol	4G13
Stilbellin I	15	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Val	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Ala		Pheol	
Stilbellin II	15	Ac	Phe	Aib	Aib	Aib	Val	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib		Pheol	
Bergofungin A	15	Ac	Val	Aib	Aib	Aib	Val	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib		Pheol	
Bergofungin B	15	Ac	Val	Aib	Aib	Aib	Val	Gly	Leu	Val	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib		Pheol	
Bergofungin C	15	Ac	Val	Aib	Aib	Aib	Val	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Aib	Hyp	Aib		Pheol	
Bergofungin D	14	Ac	Val		Aib	Aib	Val	Gly	Leu	Aib	Aib	Hyp	Gln	Iva	Hyp	Aib		Pheol	

2. Extension à l'obtention d'alaméthicine porteuse d' α,α -dialkyl-aminoacide présentant une chaîne latérale silylée.

a. Introduction

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Florine Cavalier et le Dr. Roberto Fanelli de l'IBMM Montpellier, nous avons étendu la stratégie de synthèse développée pour l'alaméthicine à l'obtention d'analogues. Cette extension visait à tester l'utilisation en synthèse peptidique d'un résidu bis-triethylsilyl-dipropylglycine (TES-Dpg) considéré comme un analogue fortement hydrophobe de l'Aib (Figure 55).

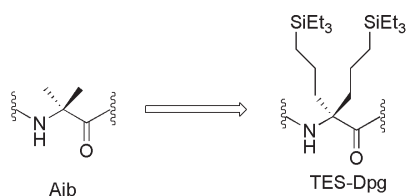


Figure 55: structure de la TES-Dpg

b. Choix de la position de substitution.

Afin d'appréhender au mieux l'impact de cet acide α,α -dialkylé sur la structure secondaire de l'alaméthicine et sur son activité biologique, celui-ci a été introduit dans différentes positions de la séquence du peptide de référence. L'alaméthicine interagissant fortement avec les lipides de la membrane lorsque celle-ci y est insérée, nous avons recherché à renforcer cette interaction en insérant le TESDpg dans la partie hydrophobe de l'hélice amphipathique, c'est-à-dire en positions 1, 5 et 13 (Figure 56). A l'inverse la position 10 a été choisie car elle correspond à la face hydrophile, pour laquelle le carbonyle de l'Aib est exposé au milieu physiologique (Figure 56).

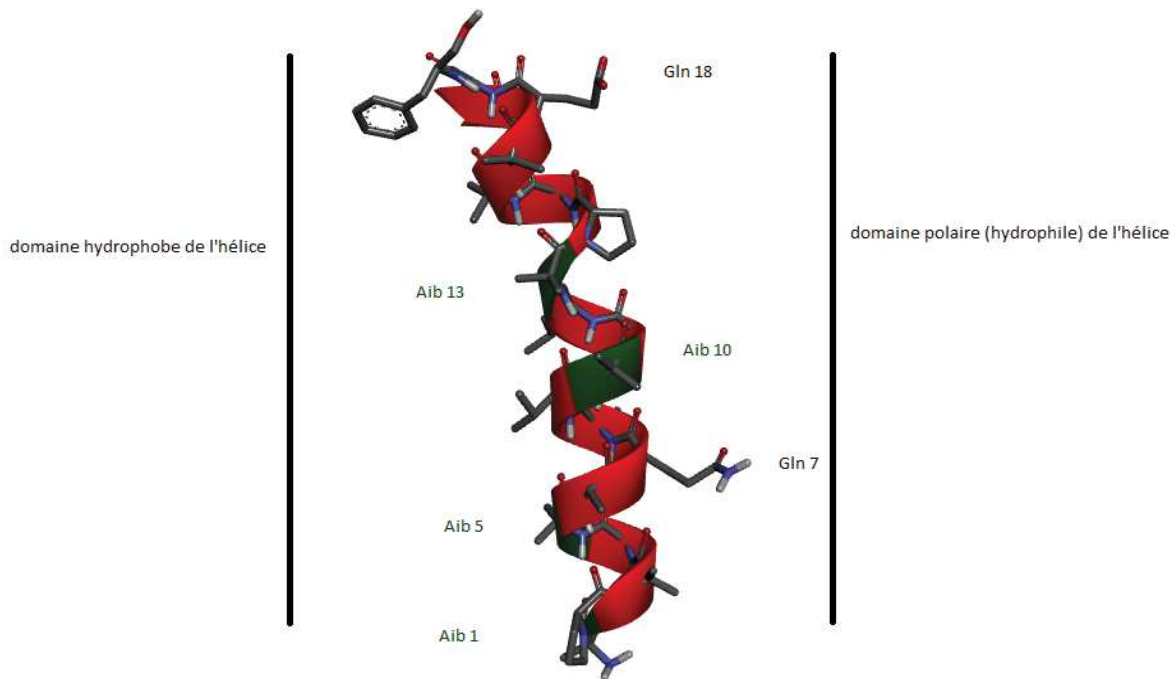


Figure 56: Structure tridimensionnelle amphipathique de l'alaméthicine F50/5

Un autre point ayant guidé notre choix de substitution est l'existence d'un gradient croissant de difficulté de couplage du TESDpg à greffer sur une glycine, une alanine ou une proline. Mais également la possibilité de tester les éventuelles difficultés de couplage que pourrait rencontrer l'acide aminé devant se coupler à sa fonction amine. Ainsi la position 1 permettait de tester la N-acétylation qui constitue un moyen classique de protection des peptides. Les positions 5, 10 et 13 correspondent respectivement aux couplages d'acides aminés, faiblement encombrés l'alanine, bêta-disubstitué comme la valine qui peut occasionner dans le cas de répétition des couplages difficiles et fortement hydrophobe tel la leucine.

c. Optimisation de la synthèse de l'alaméthicine et application à l'insertion de TESDpg

Par ailleurs, le TESDpg étant relativement difficile à produire, nous avons optimisé la synthèse de l'alaméthicine. Pour cela nous avons conservé identique la durée et la température à laquelle s'effectuait le couplage et nous avons réduit à trois le nombre d'équivalents d'acide aminé par rapport à la charge initiale de la résine. Dans ses conditions optimisées l'alaméthicine F50/5 est obtenue avec un rendement de 35% identique à celui de notre

synthèse initiale dans laquelle cinq équivalents étaient utilisés (Tableau 3). Les analogues silylés sont obtenus avec des rendements qui varient entre 8 et 45% selon la position de la substitution. Malgré un double couplage, une chute importante du rendement a été observée lorsque l'acide aminé silylé fortement encombré est couplé sur la proline présentant une certaine rigidité conformationnelle peu propice pour la combinaison des deux contraintes. A l'opposé le couplage du TESDpg sur des acides aminés moins contraint procède sans difficulté notable et conduit à des rendements comparables à celui de l'alaméthicine native (Tableau 3). La purification des composés finaux (8-11) a été grandement facilitée grâce à la baisse importante de polarité induite par le TESDpg. En effet, les produits de déléition étaient très faiblement retenus alors que l'analogue silylé était élué en fin de gradient.

Tableau 3: Alaméthicine et ses analogues contenant un TESDpg, rendement et temps de rétention.

Produit	Sequences	Rdt ^a % - <i>Massemg</i>	T _r (min) % MeOH ^b
Alamethicin F50/5	AcUPUAUAQUVUGLUPVUUQQFol	35- 70	3.2 (82.6)
8	AcUPUA[TESDpg]AQUVUGLUPVUUQQFol	45 - 102	22 (97.6)
9	Ac[TESDpg]PUAUAQUVUGLUPVUUQQFol	8 - 18	20.2 (96.2)
10	AcUPUAUAQUVUGL[TESDpg]PVUUQQFol	9 - 20	20 (96)
11	AcUPUAUAQUV[TESDpg]GLUPVUUQQFol	34 - 75	19.2 (95.4)

a: Rendement après purification par HPLC semi-preparative HPLC. b % final de MeOH permettant l'éluion du peptide dans un gradient de 80% méthanol (éluent A) 20% H₂O (éluent B) à 100% éluent A en 25 min.

d. Etudes structurales des analogues d'alaméthicine

L'étude par dichroïsme circulaire des analogues de l'alaméthicine a été entreprise pour déterminer l'impact de la substitution des résidus Aib par le TESDpg. Dans le méthanol, les quatre analogues montrent un spectre équivalent à celui de l'alaméthicine native

caractéristique d'une hélice alpha avec un maximum à 190 nm et deux minima à 208 et 222 nm (Figure 57)

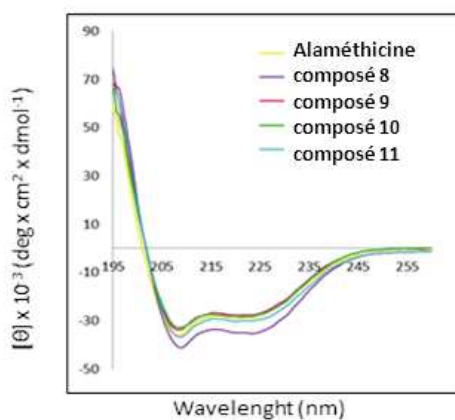


Figure 57: Comparaison des spectres de dichroïsme circulaire de l'alaméthicine et de ses analogues silylés.

e. Effet de la substitution des Aib par le TESDpg sur l'activité biologique.

L'étude de l'activité biologique de ces composés a été réalisée en collaboration avec V. Andreu doctorante de notre laboratoire. L'augmentation du caractère hydrophobe des analogues s'accompagne d'une diminution très importante de leur solubilité qui empêche de réaliser des études d'inhibition de croissance de souche bactérienne. Cette perte de solubilité en milieu aqueux a été démontrée en réalisant une étude par HPLC sur le composé 8. Ce composé dissous dans le méthanol à une concentration de $50 \mu\text{M}/\text{ml}$ puis injecté juste après la mise en solution et à 24h ne montre pas de variation de l'aire sous la courbe. A la même concentration dans du milieu de culture dès le T0 près de 50% du composé a précipité et au bout de 24h celui-ci est indétectable dans la solution mère que ce soit après décantation ou centrifugation (Figure 58)

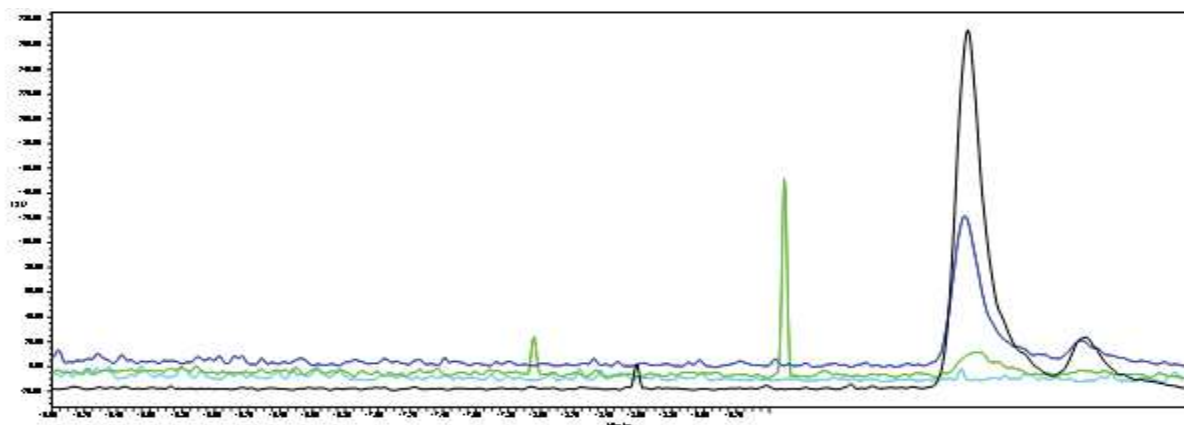


Figure 58 : Etude de la solubilité du composé 8 dans le milieu de culture :(méthanol à t = 24h, milieu de culture t=0h, milieu de culture t=24hcentrifugation, milieu de culture t=24h décantation)

Pour essayer de s'affranchir de ce problème, les tests ont donc été réalisés en boîte de Petri sur gel d'agar en déposant sur des disques buvard les analogues et l'alaméthicine dans 100% de DMSO. La source bactérienne utilisée est *Bascillus subtilis* une bactérie gram positive sensible à l'alaméthicine. Pour réaliser ce test un volume de 10 μ L de DMSO équivalent à celui permettant la solubilisation des composés sert de témoin négatif. Dans ce cas aucune inhibition de la croissance bactérienne n'est observée. Le chloramphénicol un antibiotique à la concentration de 20 μ g/mL sert de témoin positif et un halo d'inhibition de 22 mm de diamètre est observé. Pour une dose identique l'alaméthicine présente un halo de 17 mm. Par contre il n'y a pas d'inhibition pour les analogues déposés à 20 μ g par disque, on constate en effet que les colonies bactériennes viennent dans tous les cas au contact du disque (Figure 59). Ces résultats ont été confirmés par des tests de croissance bactérienne réalisés à l'IBMM.

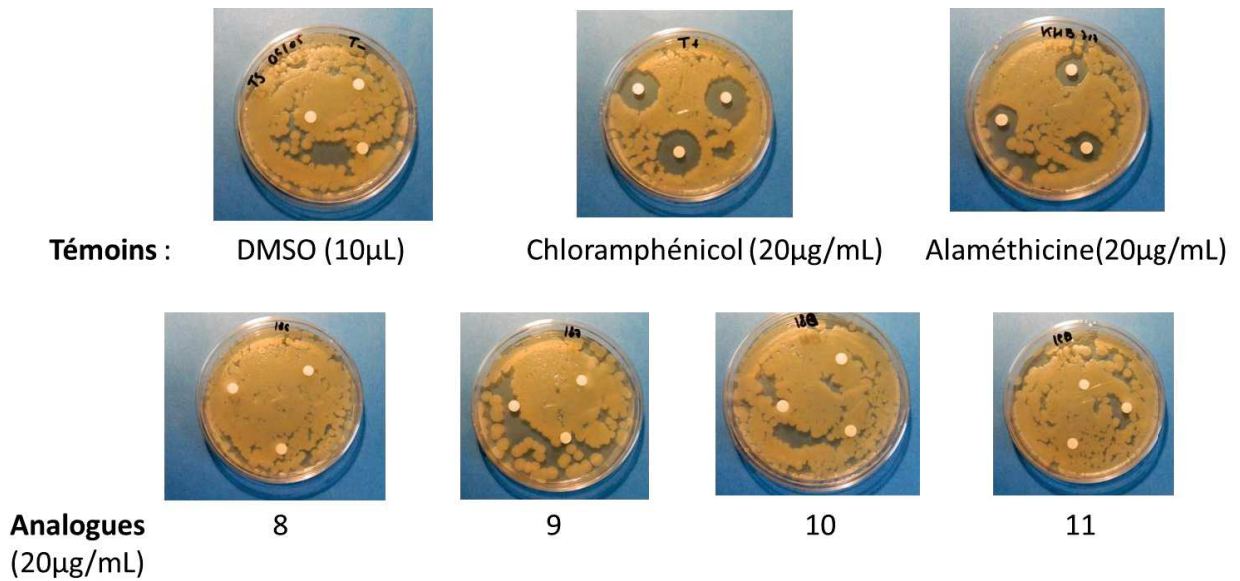


Figure 59 : Inhibition de la croissance de colonies de *Bascillus subtilis*.

f. Hypothèse quant à la perte d'activité biologique.

L'absence d'effet biologique des analogues 8-10 peut éventuellement s'expliquer par l'encombrement stérique des groupements TESDpg qui empêche l'autoassociation des monomères d'alaméthicine pour former les pores.^{182,183} En effet quel que soit la position du résidu Aib résidu Aib substitué celui-ci se trouve à l'interface entre deux hélices (

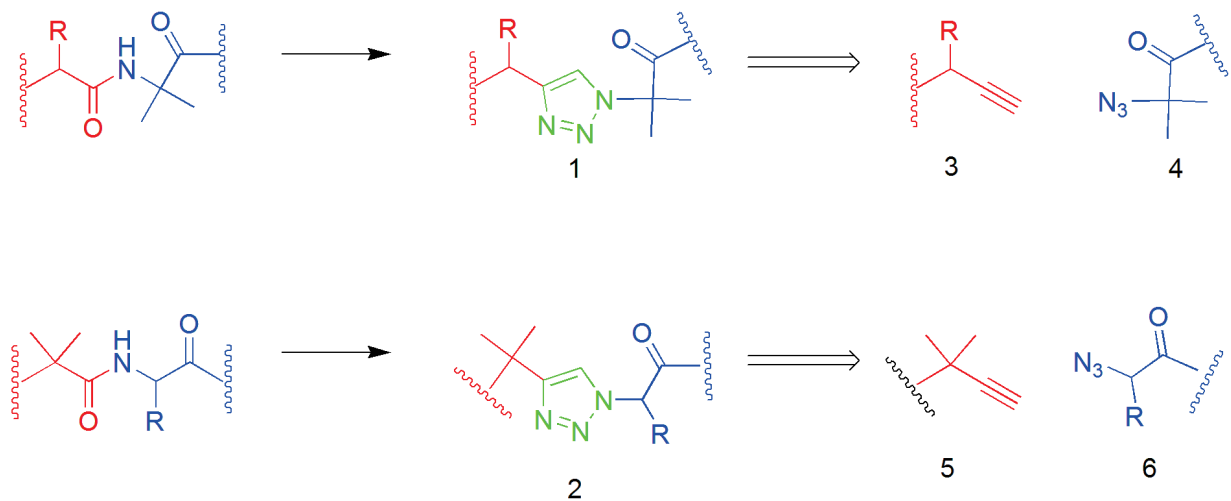
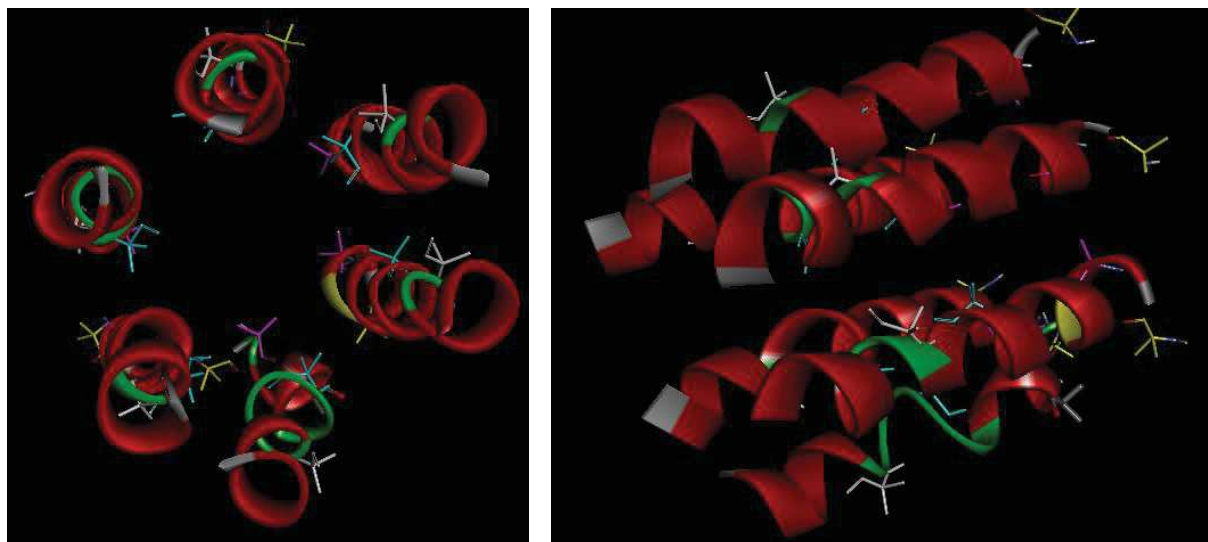
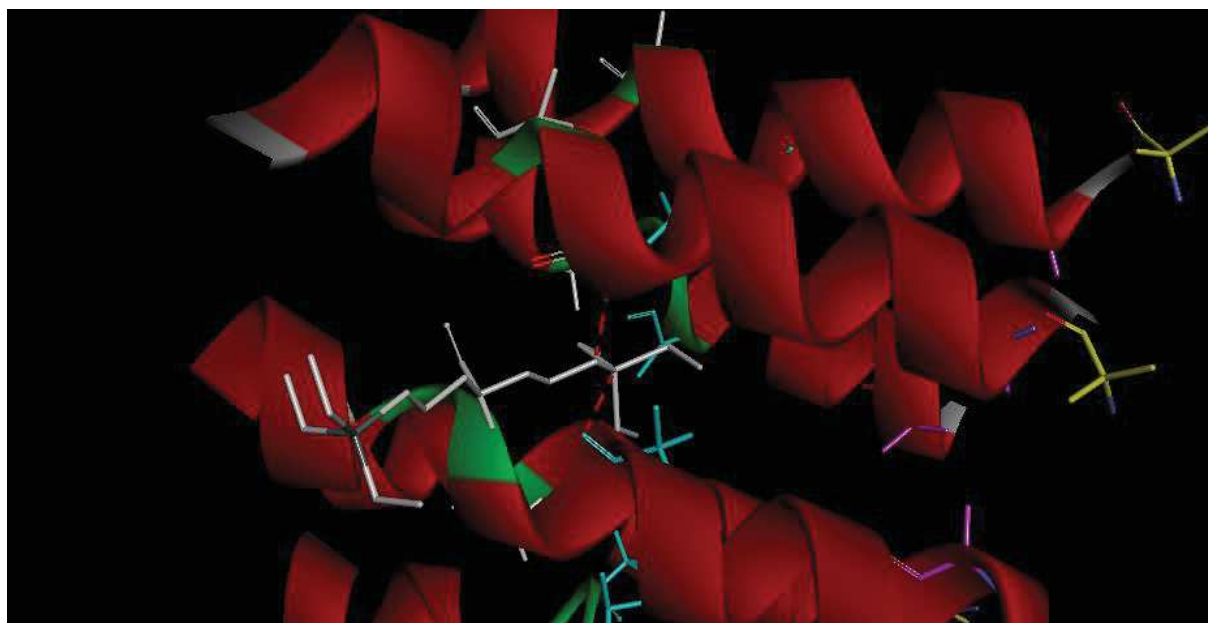


Figure 61). Cette hypothèse est en cours d'étude.



Vue de dessus du pore membranaire Vue de côté du pore

Résidus Aib substitués : Aib 1 (jaune) ; Aib 5 (rose) ; Aib 10 (cyan) ; Aib 13 (blanc)



Reconstruction du TESDpg remplaçant l'un des Aib 13 mettant en évidence des gênes stériques (pointillé rouge)

Figure 60 : Exemple d'autoassociation de six alaméthicides pour former un pore¹⁸³

L'ensemble de ces résultats est développé dans un article qui a été accepté dans Organic letters. Ma participation à ce travail a consisté en la synthèse des analogues d'alaméthicine et en leurs purifications.

D. Article 2: Access to α,α -Disubstituted Disilylated Amino Acids and Their Use in Solid-Phase Peptide Synthesis

Access to α,α -Disubstituted Disilylated Amino Acids and Their Use in Solid-Phase Peptide Synthesis

Roberto Fanelli,^{*,†} Khoubaib Ben Haj Salah,[‡] Nicolas Inguibert,[‡] Claude Didierjean,[§] Jean Martinez,[†] and Florine Cavalier^{*,†}

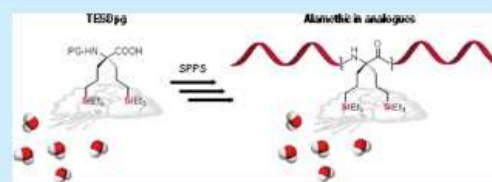
[†]Institut des Biomolécules Max Mousseron, IBMM, UMR-5247, CNRS, Université Montpellier, ENSCM, Place Eugène Bataillon, Montpellier34095 Cedex 5, France

[‡]Université de Perpignan Via Domitia, CRIOBE USR 3278, 58 avenue P. Alduy Bât T, 66860 Perpignan, France

[§]CRM2 (UMR UL-CNRS 7036) Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine, 70239 Boulevard des Aiguillettes, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

S Supporting Information

ABSTRACT: A concise synthetic pathway yielding to hydrophobic α,α -disubstituted disilylated amino acids based on a hydrosilylation reaction is described. As a first example of utilization in solid-phase peptide synthesis, TESDpg was introduced in replacement of Aib in an alamethicin sequence, leading to analogues with modified physicochemical properties and conserved helical structures. This study highlights the potential of these new amino acids as tools for peptide modulation.



Unnatural amino acids (UAAs) are attractive tools for application in a large variety of areas such as biomaterials or bioactive compounds in medicinal chemistry.¹ Non-proteogenic amino acids are largely used for the synthesis of peptides with the aim of overcoming stability issues by preventing degradation by endogenous proteases and to improve their biological activities. In particular, the class of α,α -disubstituted α -amino acids has always been of great interest and has gained considerable attention in the past decades.² Their incorporation into peptides results in both the modulation of their physical and chemical properties and their secondary structural conformation.^{2f} Silicon-containing molecules and amino acids are very attractive for the interesting properties of the silicon atom including its large covalent radius and electron density³ and its high lipophilicity. On the other hand, when incorporated into peptides, silicon-containing amino acids increase their resistance to degradation⁴ and stabilize their secondary structure.⁵ Despite their attractiveness, they are still rare and limited in diversity (Figure 1). Some of them have been successfully used for the preparation of biological active compounds.⁶

We have previously described disubstituted amino acids bearing one silylated side chain and their incorporation into active peptides.⁷ However, the synthesis of disubstituted disilylated amino acids still remained a challenge. Unsaturated amino acids have been proven to be good chemical precursors for

the achievement of chemical diversity and are also useful starting materials for access to silicon-containing amino acids.⁸

In this study, we present the first example of a new class of nonproteogenic α,α -dialkylated amino acids presenting a silicon moiety in both side chains. Due to their unique characteristics both in terms of bulkiness and lipophilicity, this new class of amino acids is very promising. We also describe in this paper their possible use in solid-phase peptide synthesis (SPPS).

The synthesis of disubstituted disilylated amino acid derivatives was performed in five steps starting from commercially available starting materials. The Schiff base benzophenone imine glycine ester was prepared in quantitative yield and then alkylated with allyl bromide using potassium *tert*-butoxide as base, leading to compound 2. The reaction was quantitative and performed at room temperature within 30 min. The crude resulting product was hydrolyzed under mild acidic conditions with a solution of citric acid in water to yield the free amine 3.⁹ Compound 3 was treated with (benzyloxy)carbonyl chloride to afford the (benzyloxy)carbonyl (Z) *N*-protected dialkylated unsaturated amino ester 4 that provided the protected disilylated amino acids 5a–c after hydrosilylation (Scheme 1). Orthogonal protection allows either coupling on the amino function or on the carboxylic acid.

Although silicon-containing amino acids can be prepared through alkylation with halomethylsilane,¹⁰ the hydrosilylation reaction was exploited to avoid direct alkylation with bulkier reagent.¹¹ We chose to introduce the silicon moiety at the end of the synthesis in order to be able to modulate the steric hindrance and lipophilicity of the final compounds. To conserve the

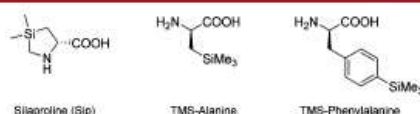
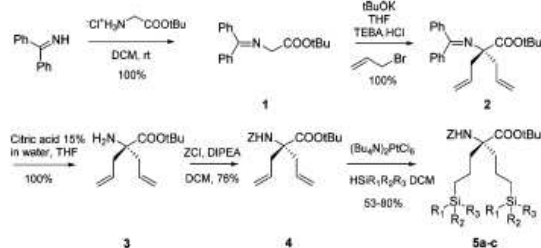


Figure 1. Examples of silicon-containing amino acids.

Received: July 27, 2015

Published: September 8, 2015

Scheme 1. Synthesis of Disilylated Amino Acids^a

^aR₁, R₂, and R₃ are defined in Table 1.

versatility of the synthesis, simple and commercially available silanes were used. Furthermore, the compounds were designed with side chains counting three methylene groups that facilitate the double addition of the silylated agent to the unsaturation and to obtain a constrained hindered new amino acid suitable for efficient coupling reactions. In addition, the resulting compounds are more stable than those in which the silicon is directly inserted at the α -position of the amino acid.^{4b} We studied the hydrosilylation reaction conditions (Table 1). The reaction

Table 1. Optimization of Reaction Conditions

entry	HSiR ₁ R ₂ R ₃	catalyst	cat. equiv	solvent	product	yield ^a (%)
1	HSiEt ₃	(Bu ₄ N) ₂ PtCl ₆	0.05	DCM	5a	38
2	HSiEt ₃	(Bu ₄ N) ₂ PtCl ₆	0.05	ACN	5a	0
3	HSiEt ₃	(Bu ₄ N) ₂ PtCl ₆	0.01	DCM	5a	53
4	HSiEt ₃	(Bu ₄ N) ₂ PtCl ₆	0.1	DCM	5a	41
5	HSiEt ₃	H ₂ PtCl ₆ ·H ₂ O	0.05	DCM	5a	32
6	HSiEt ₃	H ₂ PtCl ₆ ·H ₂ O	0.05	ACN	5a	19
7	HSi(Me) ₂ tBu	(Bu ₄ N) ₂ PtCl ₆	0.01	DCM	5b	63
8	HSi(Me) ₂ Ph	(Bu ₄ N) ₂ PtCl ₆	0.01	DCM	5c	80

^aYield of the isolated product.

proceeds with Pt⁰ catalyst as already reported.¹¹ Speier's catalyst, H₂PtCl₆·6H₂O, as well as the platinum complex analogue, tetrabutylammonium hexachloroplatinate (Bu₄N)₂PtCl₆, were tested. As demonstrated by Skoda-Földes, the regioselectivity of the hydrosilylation depends on the functionalities in the vicinity of the alkene, and the choice of a suitable catalyst allows insertion of the silicon to be oriented at the α or β position. Nevertheless, in our case, such a neighboring effect could not be expected and the reaction has a classic anti Markovnikov outcome.¹² A slight increase in the reaction yield was obtained with (Bu₄N)₂PtCl₆ (entries 1 and 5). The catalytic amount was reduced to 1% molar ratio (entry 4) in dichloromethane as solvent, while the reaction was ineffective in acetonitrile (entry 2). Despite our efforts to optimize the reaction conditions, the yield of compound 5a (53%, entry 3) remained moderate albeit acceptable considering the steric hindrance of the bulky silicon group. We also observed formation of undesired side products such as the monosilylated derivative and of compounds where one or both unsaturated side chains were reduced by platinum-induced catalytic transfer hydrogenation with triethylsilane¹³ (see the Supporting Information). The yields increased for compound 5b (63%, entry 7) and for compound 5c (80%, entry 8) bearing a dimethyl-*tert*-butyl and dimethylphenyl substitution on the silicon atom, respectively.

Crystals of compound 5a were obtained by slow evaporation of a dichloromethane/*n*-hexane solution. The structure observed

for compound 5a could be attributed to the space group P2₁ with Z = 4. All atoms of the two independent molecules were connected by an inversion center with the exception of two terminal methyl groups of one silylated side chain. We have also considered the possibility that the space group could be P2₁/c for this structure. The corresponding refinement, however, gave an unsatisfactory convergence with an R factor much higher (0.114) than that obtained in the space group P2₁ (0.071). Disilylated amino acid 5a exhibited, as expected,^{2c} a fully extended conformation ($\varphi = -179.9^\circ$ and $\psi = 164.4^\circ$) (see Supporting Information). This conformation, also called the C₅ conformation, is the basic unit of the 2.0₅-helix motif.¹⁴ Both side chains also adopted an extended conformation, with the χ^{II} and χ^{D} values close to +60° (g⁺) and -60° (g⁻), respectively. Although homopeptides containing α,α -dialkylated amino acids like diethylglycine (Deg), di-*n*-propylglycine (Dpg), and di-*n*-butylglycine (Dbg) were usually observed in the C₅ conformation, several studies with heteromeric sequences revealed several examples of Dpg and Dbg containing peptides in helical conformations.¹⁵

To extend the possible use of these new amino acids, particularly in solid-phase peptide synthesis (SPPS), the Fmoc-protected amino esters were easily prepared (Scheme 2), yielding readily available Fmoc-building blocks after selective TFA ester removal (Table 2).

Scheme 2. Preparation of the Fmoc-Protected Disilylated Amino Esters

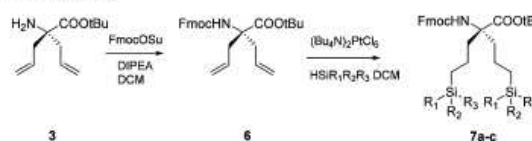


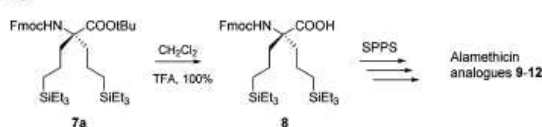
Table 2. Fmoc-Protected Derivatives

entry	HSiR ₁ R ₂ R ₃	catalyst	cat. equiv	solvent	product	yield ^a (%)
1	HSiEt ₃	(Bu ₄ N) ₂ PtCl ₆	0.01	DCM	7a	52
2	HSi(Me) ₂ tBu	(Bu ₄ N) ₂ PtCl ₆	0.01	DCM	7b	66
3	HSi(Me) ₂ Ph	(Bu ₄ N) ₂ PtCl ₆	0.01	DCM	7c	94

^aYield of the isolated product after purification on silica gel.

To evaluate the reactivity of these derivatives in SPPS, as well as the effect on polarity and secondary structure conformation, compound 8 was prepared in quantitative yield by cleavage of the *tert*-butyl ester in a mixture of CH₂Cl₂ and TFA (Scheme 3). It

Scheme 3. Preparation of the Fmoc-amino Acid 8 Suitable for SPPS



was introduced in positions 1, 5, 10, and 13, respectively, in place of aminoisobutyric acid (Aib) into the highly hydrophobic amphipathic α helical peptide alamethicin F50/5 (Alm) (Table 3). The substitutions were carried out in the first half of the alamethicin helix corresponding to the well-organized one extending from Aib1 to Aib13. Peptides of the alamethicin family are one of the most studied peptaibols. They are rich in the

Table 3. Alamethicin Analogues

compound	sequence	yield ^a , (%)	R _t , (min), % MeOH ^b	Log <i>k'</i>
Alm	AcUPUAUAQVUVGLUPVUUQQFol	35	3.2	-1.16
			82.6	
9	AcUPUA[TESDpg]AQUVU GLUPVUUQQFol	45	22	0.88
			97.6	
10	Ac[TESDpg]PUAUAQVU GLUPVUUQQFol	8	20.2	0.87
			96.2	
11	AcUPUAUAQVUVGL[TESDpg]PVUUQQFol	9	20	0.83
			96	
12	AcUPUAUAQVU[TESDpg]GLUPVUUQQFol	34	19.2	0.81
			95.4	

^aAfter purification by semipreparative HPLC. ^bFinal percentage of MeOH allowing the elution of peptide in a 25 min gradient from 80% methanol (eluent A)/20% H₂O (eluent B) to 100% eluent A.

helix promoter Aib, and the alamethicin structure has been extensively studied.¹⁶

Therefore, alamethicin constitutes a model of choice to investigate the impact of insertion of compound 8, namely TESDpg, into secondary structured peptides. Although the incorporation of α,α -disubstituted amino acids via SPPS represents a challenge, this was achieved by applying an already reported procedure that was further optimized to spare compound 8.¹⁷ Indeed, for the stepwise microwave-assisted SPPS, the amount of amino acids was reduced to 3 equiv with respect to resin loading, without affecting the final yield. This synthetic strategy was then applied to derivatives 9–12 with moderate to good yields depending on the substitution position. The drop of the overall yield (compounds 10 and 11) was observed for the coupling of the bulky silylated amino acid on the proline residue even after a double coupling procedure. On the other hand, coupling of compound 8 on a less hindered amino acid such as glycine or alanine proceeded without loss of efficacy (compounds 9 and 12) (Table 3).

Purification of the final products was facilitated thanks to the exceptional decrease of the polarity of compound 9–12, enabling us to discard secondary deletion products formed during the synthesis. RP-HPLC elution times of TESDpg-containing peptides 9–12 compared to native alamethicin perfectly reflect the drastic difference in their hydrophobicity (Table 3). The peptide analogues 9–12 differed from the natural compound by a single insertion of TESDpg that profoundly affected the polarity. After the drastic increase of hydrophobicity and the decrease of solubility in water induced by the replacement of one Aib by one TESDpg, the substitution was limited to one residue at a time. In order to more easily visualize the variation of hydrophobicity the retention factor $\log k'$ was used.¹⁸ A negative value of $\log k'$ indicates a polar peptide, while a positive value reflects a highly hydrophobic compound. In agreement with this, the ratio of hydrophobicity of compounds 9–12 compared to the native form was almost of a factor of 100. Moreover, the overall hydrophobicity of TESDpg-containing peptides was not significantly affected, whether the TESDpg residue was inserted either on the polar (compounds 9–11) or on the apolar (compound 12) face of the helix, since they all share comparable $\log k'$ values.

The far-UV-CD spectra of the four TESDpg-containing alamethicin analogues were investigated to study the effect of the introduction of this new disilylated amino acid on the secondary

structure. Different solvent systems were investigated, in particular, methanol, 2,2,2-trifluoroethanol, and the more lipophilic 1-octanol. Studies were also performed in a SDS 100 mM solution in water as a membrane-mimicking environment (Figure 2).¹⁹

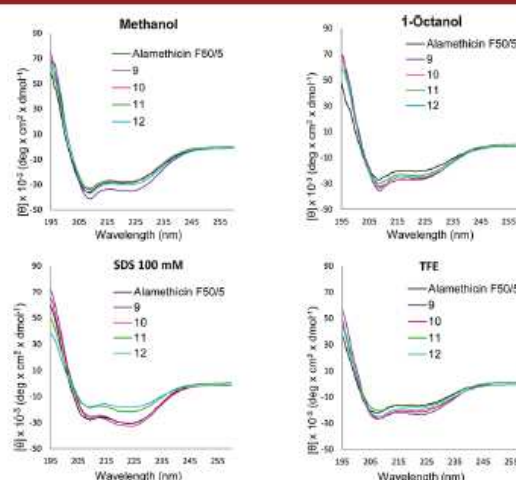


Figure 2. CD spectra of alamethicin F50/5 and compounds 9–12 (0.1 mM) in MeOH, 1-octanol, SDS (100 mM) in water, and TFE.

Under each of the four experimental conditions examined, the analogues exhibited a similar spectral shape with respect to the spectra of the reference compound alamethicin F50/5 at 0.1 mM concentration. All of the CD spectra were indicative of a right-handed, predominantly α -helical structure showing the three typical Cotton effects: the $n-\pi^*$ transition at 222 nm (–) and the two $\pi-\pi^*$ bands at 208 nm (–) and 190 nm (+). The *R* ratio between θ_{222} and θ_{208} was calculated for each compound in all solvent systems. The results are summarized in Table 4. In all of

Table 4. *R* Ratios between the Intensities of the Two Negative Bands at 222 and 208 nm in Different Media

compd	<i>R</i> in			
	MeOH	1-Oct	TFE	SDS
Alm	0.79	0.77	0.76	1.13
9	0.87	0.82	0.89	1.24
10	0.82	0.77	0.79	1.26
11	0.87	0.80	0.86	1.23
12	0.82	0.75	0.80	1.04

the alcoholic environments, $R = 0.8 \pm 0.07$ indicating a typical monomeric α -helical structure (Figure 2). When the CD spectra of all compounds were recorded in the presence of SDS micelles, R was >1.0 , typical for an aqueous solution. The major feature of these spectra was the large ellipticity excess of the band near 222 nm ($n-\pi^*$ transition) over the band around 208 nm ($\pi-\pi^*$) characteristic of parallel helical coiled coils.²⁰ This observation may suggest the presence of supramolecular interactions and of a α -helical self-assembly (Figure 2).

The effect of temperature on the spectra of alamethicin analogues 9–12 was also investigated. The range of temperatures explored was from 5 to 75 °C. Notwithstanding the decrease of R for all compounds, they were revealed to be stable for temperatures up to 75 °C in methanol and TFE maintaining a ratio of $R > 0.7$. A pronounced decrease of R was observed in the

strongly lipophilic solvent 1-octanol already at temperatures above 30 °C. This effect has already been reported for alamethicin (Supporting Information).²¹ In order to confirm the hypothesis of parallel helical coiled coils, the CD spectra in a 1:1 100 mM mixture of TFE in SDS were recorded for all compounds at 0.1 mM concentration (see Supporting Information). TFE is known to enhance intramolecular α -helicity but to decrease intermolecular interactions.²² A destruction of the homocoiled-coil binding motif results in a significant decrease in the $\theta_{222}/\theta_{208}$ ratio from SDS to 50% TFE in SDS.¹⁹ For all compounds, the *R* decrease, confirmed the supramolecular organization of peptides in aqueous sodium dodecyl sulfate.

All of the synthesized analogues were tested in an agar bacterial growth assays at a dose of 20 μ g/disk on Gram-positive *Bacillus subtilis*, and only the native alamethicin was found active. Therefore, we could suspect that due to steric hindrance the hexameric self-association of alamethicin needed to form the pore supramolecular structure is prevented.²³

In conclusion, this study reports an easy access to α,α -disubstituted disilylated amino acids. These original amino acid derivatives are directly usable in SPPS and permit to conserve the helicoidal secondary structure of the peptide in which they are inserted. This amino acid surrogate of the Aib offers the possibility to strengthen the hydrophobicity of the peptide, and one can expect they would certainly reinforce their ability to cross membranes.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.orglett.5b02175.

Experimental procedures and characterization data (PDF)
X-ray data for 5a (CIF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: florine.cavelier@univ-montp2.fr.

*E-mail: roberto.fanelli@univ-montp1.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

N.I. acknowledges the "Comité des Pyrénées Orientales de la Ligue Nationale Contre le Cancer and the BQR de l'Université de Perpignan Via Domitia" for financial support. Dalila Argentin (University of Milan) is gratefully acknowledged. The Plateforme de mesures de diffraction X of the "Université de Lorraine" is thanked for crystallographic facilities.

■ REFERENCES

- (1) Stevenazzi, A.; Marchini, M.; Sandrone, G.; Vergani, B.; Lattanzio, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5349.
- (2) (a) Yamashita, H.; Demizu, Y.; Misawa, T.; Shoda, T.; Kurihara, M. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 2241. (b) Zhang, J.; Liu, X.; Wu, C.; Zhang, P.; Chen, J.; Wang, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 7104. (c) Curto, J. M.; Kozłowski, M. C. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5359. (d) Vogt, H.; Brase, S. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 406. (e) Tanaka, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 349. (f) Crisma, M.; Valle, G.; Bonora, G. M.; Toniolo, C.; Lelj, F.; Barone, V.; Fraternali, F.; Hardy, P. M.; Maia, H. L. S. *Biopolymers* **1991**, *31*, 637.

- (3) Vivet, B.; Cavelier, F.; Martinez, J.; Didierjean, C.; Marraud, M.; Aubry, A. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **2000**, *56*, 1452.

- (4) (a) Franz, A. K.; Wilson, S. O. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 388. (b) Mortensen, M.; Husmann, R.; Veri, E.; Bolm, C. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1002. (c) Cavelier, F.; Vivet, B.; Martinez, J.; Aubry, A.; Didierjean, C.; Vicherat, A.; Marraud, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2917.

- (5) (a) Martin, C.; Legrand, B.; Lebrun, A.; Berthomieu, D.; Martinez, J.; Cavelier, F. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 14240. (b) Martin, C.; Lebrun, A.; Martinez, J.; Cavelier, F. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2013**, *51*, 3103.

- (6) (a) Qi, Y.; Sieburth, S. M. In *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*; Wiley-VCH: New York, 2009; p 261. (b) Sieburth, S. M. In *Bio-Inspired Silicon-Based Materials*; Zelisko, P. M., Ed.; Springer: Dordrecht, 2014; Vol. 5, p 103. (c) Dwyer, M. P.; Keertikar, K. M.; Zeng, Q.; Mazzola, R. D.; Caldwell, J. P.; Tang, H.; Nair, A. G.; Shankar, B. B.; Rosenblum, S. B.; Kozłowski, J. A.; Silyl-containing heterocyclic compounds and methods of use thereof for the treatment of viral diseases. US Patent 20140378416A1, 2014. (d) Pujals, S.; Fernandez-Cameado, J.; Kogan, M. J.; Martinez, J.; Cavelier, F.; Giralt, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8479. (e) Cavelier, F.; Marchand, D.; Martinez, J.; Sagan, S. *J. Pept. Res.* **2004**, *63*, 290.

- (7) Cavelier, F.; Marchand, D.; Martinez, J. *Chem. Biodiversity* **2008**, *5*, 1279.

- (8) Fanelli, R.; Jeanne-Julien, L.; René, A.; Martinez, J.; Cavelier, F. *Amino Acids* **2015**, *47*, 1107.

- (9) Brunel, J. M. *Protein Pept. Lett.* **2005**, *12*, 281.

- (10) (a) Rene, A.; Vanthuyne, N.; Martinez, J.; Cavelier, F. *Amino Acids* **2013**, *45*, 301. (b) Tacke, R.; Schmid, T.; Merget, M. *Organometallics* **2005**, *24*, 1780. (c) Merget, M.; Günther, K.; Bernd, M.; Günther, E.; Tacke, R. *Organomet. Chem.* **2001**, *628*, 183. (d) Vivet, B.; Cavelier, F.; Martinez, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *2000*, 807. (e) Martin, C.; Vanthuyne, N.; Miramon, H.; Martinez, J.; Cavelier, F. *Amino Acids* **2012**, *43*, 649.

- (11) Marchand, D.; Martinez, J.; Cavelier, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 3107.

- (12) (a) Min, G. K.; Skrydstrup, T. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 5894. (b) Skoda-Földes, R.; Kollár, L.; Heil, B. *J. Organomet. Chem.* **1991**, *408*, 297.

- (13) Eaborn, C.; Pant, B. C.; Peeling, E. R. A.; Taylor, S. C. *J. Chem. Soc. C* **1969**, 2823.

- (14) (a) Barone, V.; Lelj, F.; Bavoso, A.; Di Blasio, B.; Grimaldi, P.; Pavone, V.; Pedone, C. *Biopolymers* **1985**, *24*, 1759. (b) Peggion, C.; Moretto, A.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Toniolo, C. *Biopolymers* **2013**, *100*, 621.

- (15) Karle, I. L.; Kaul, R.; Rao, R. B.; Raghothama, S.; Balam, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12048.

- (16) (a) Yang, P.; Wu, F.-G.; Chen, Z. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 3358. (b) Peggion, C.; Jost, M.; De Borggraeve, W. M.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Toniolo, C. *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 1256. (c) Futaki, S.; Asami, K. *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 1313. (d) Fox, R. O.; Richards, F. M. *Nature* **1982**, *300*, 325.

- (17) Ben Haj Salah, K.; Inguibert, N. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1783.

- (18) Valkó, K.; Bevan, C.; Reynolds, D. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2022.

- (19) De Zotti, M.; Ballano, G.; Jost, M.; Salnikov, E. S.; Bechinger, B.; Oancea, S.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Formaggio, F. *Chem. Biodiversity* **2014**, *11*, 1163.

- (20) Zhou, N. E.; Zhu, B.-Y.; Kay, C. M.; Hodges, R. S. *Biopolymers* **1992**, *32*, 419.

- (21) Jung, G.; Dubischar, N.; Leibfritz, D. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *54*, 395.

- (22) Lau, S. Y.; Taneja, A. K.; Hodges, R. S. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 13253.

- (23) Tieleman, D. P.; Hess, B.; Sansom, M. S. P. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2393.

E. Conclusion

Nous pouvons conclure de cette première partie que la méthode de synthèse des peptaibols est généralisable, présente une grande flexibilité, est avantageuse en terme de rapidité et le rapport rendement/coût de synthèse est très satisfaisant. Par ailleurs d'une façon générale les peptaibols présentent une structure secondaire stable qui s'accommode de modifications sans que cela affecte l'hélicité de la structure comme l'ont montré les résultats obtenus pour les bergofungine D1 et D2 mais également dans le cas des dérivés de l'alaméthicine comportant des aminoacides silylés fortement encombrés tels le TESDpg. Par contre des changements dans la capacité d'autoassociation de l'alaméthicine s'accompagnent d'une perte de l'activité biologique. Ces résultats initiaux nous ont confortés dans notre choix des peptaibols comme modèle pour étudier l'impact de l'insertion d'un triazole sur leur conformation en relation avec leur activité biologique.

Partie 3 : Précurseurs dipeptidiques AibΨ[Tz]-Xaa, synthèse et application.

A. Introduction de la stratégie adoptée pour un scan triazole sur les peptaibols.

Après avoir mis au point une synthèse flexible des peptaibols, nous avons pu nous consacrer au deuxième objectif de ma thèse qui concerne la synthèse d'analogues de peptaibols comportant dans leur séquence un ou plusieurs noyaux triazoles en remplacement de la liaison amide. Idéalement le noyau triazole devrait se trouver à proximité des résidus Aib qui est un acide aminé fortement hélicogène afin de juger au mieux de l'influence de ce remplacement sur la structure secondaire du peptaibols. Ainsi deux schémas de substitution de la liaison amide

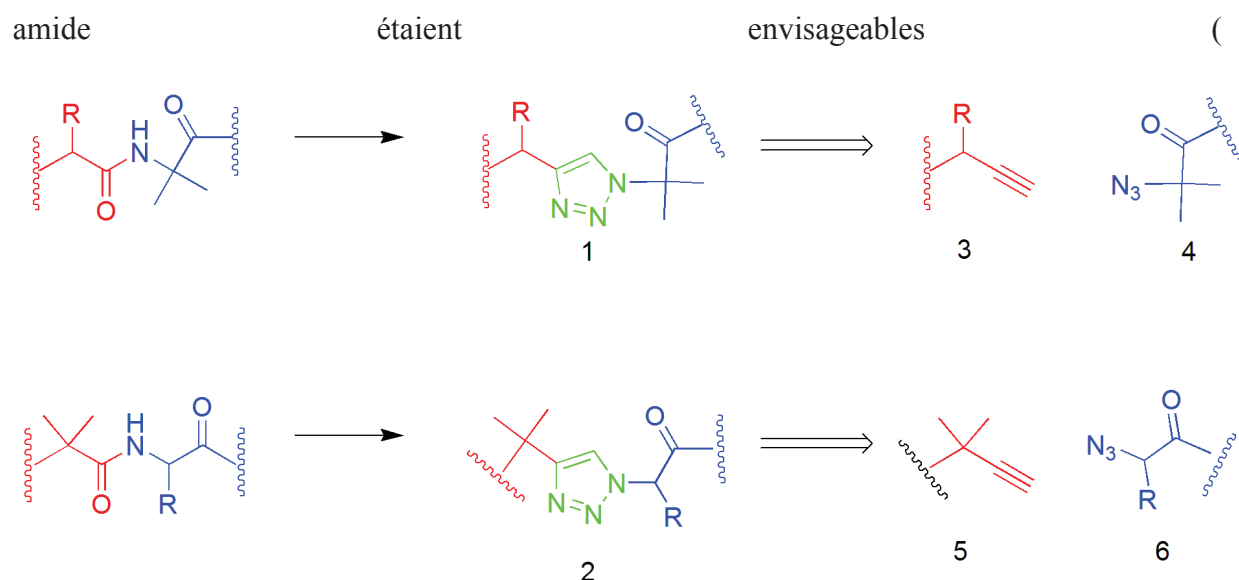


Figure 61). Le premier du côté N-terminal du résidu Aib conduit d'un point de vue rétrosynthétique à un alcyne **3** et un azoture dérivant de l'Aib. L'alcyne **3** devrait être préparé par la procédure de Bestmann-Ohira précédemment décrite. La seconde du côté C-terminal de l'Aib impliquerait la formation d'un azoture **6** facilement accessible par réaction de diazotransfert à partir des acides aminés. L'alcyne **5** qui est mis en jeu dériverait alors de la 2,2-dimethylpropargylamine commerciale. En raison de sa facilité de mise en œuvre c'est cette dernière approche que nous avons privilégiée.

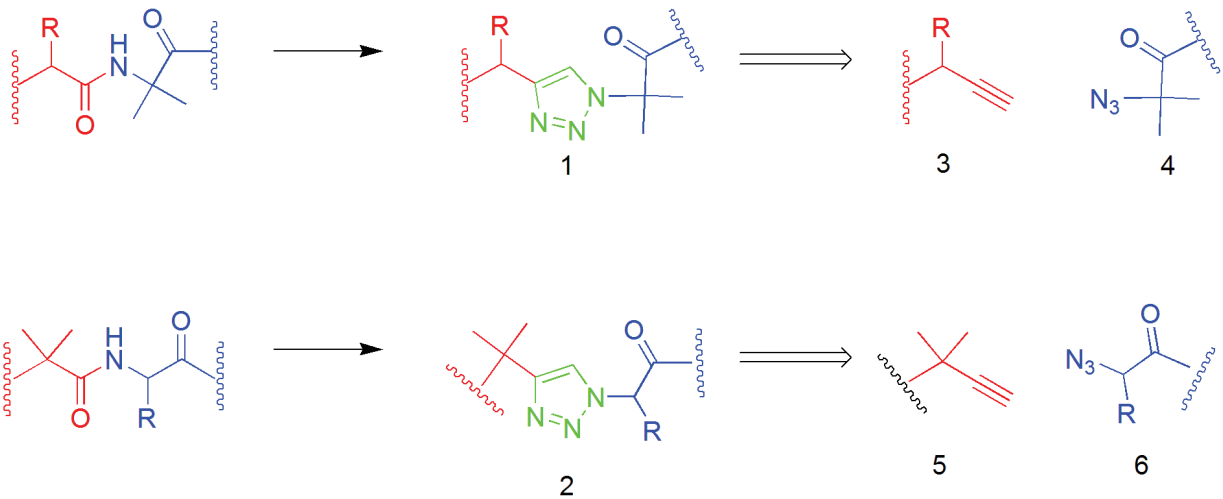


Figure 61: position envisageable pour la substitution d'un amide sur les extrémités C- ou N- terminales d'un résidu Aib.

La formation du triazole peut être envisagée selon deux méthodes :

-La première méthode consiste à former le triazole sur la résine par réaction successive entre un azoture terminal et un alcyne suivi du couplage d'un aminoacide (Figure 62). Cette technique est utilisée pour la synthèse de peptides contenant jusqu'à quatre triazoles.^{67,184}

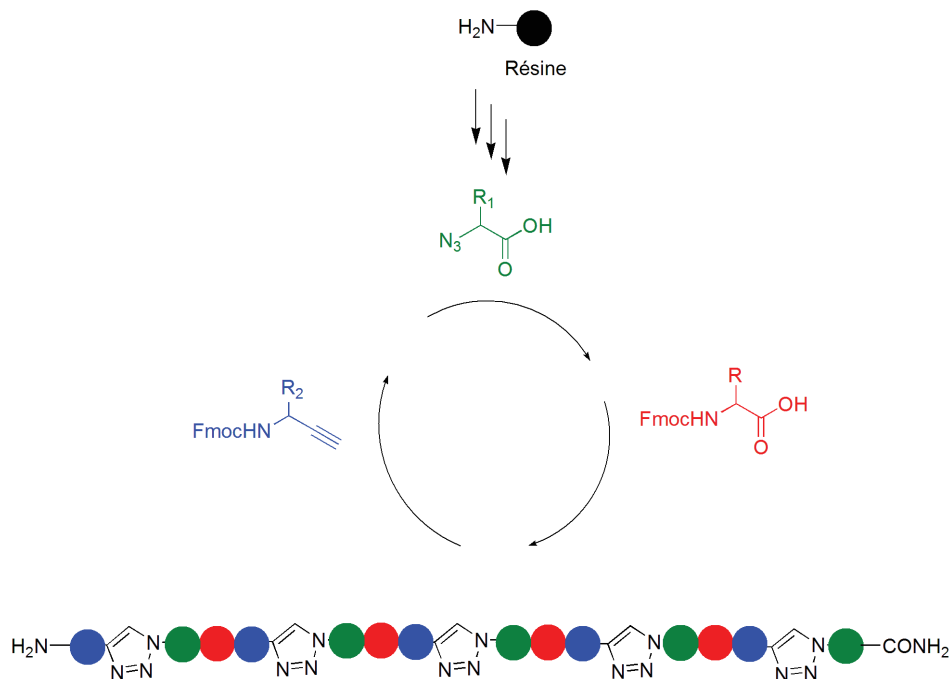


Figure 62: Synthèse de triazolomères sur résine.

L'inconvénient de cette stratégie est qu'elle nécessite des temps de réaction trop long, souvent une température élevée et un excès d'alcyne et de bases, ce qui rend cette

stratégie difficile à maîtriser lorsque la stratégie Fmoc/tBu est utilisée.^{63,67,97,184} En plus de cela, l'utilisation d'une quantité excessive de cuivre pourrait fausser les résultats biologiques. Au vue de ses inconvénients cette stratégie a été exclue. Ainsi, notre choix s'est porté sur une stratégie permettant d'éviter d'avoir à réaliser la réaction de CuACC sur la résine. La nouvelle approche choisie consiste à réaliser la synthèse d'un précurseur de type Fmoc-Aib ψ [Tz]Xaa-OH dans lequel la liaison amide a été remplacée par un triazole, ensuite ce précurseur va être utilisé pour la synthèse des polytriazoles sur support solide (Figure 63).

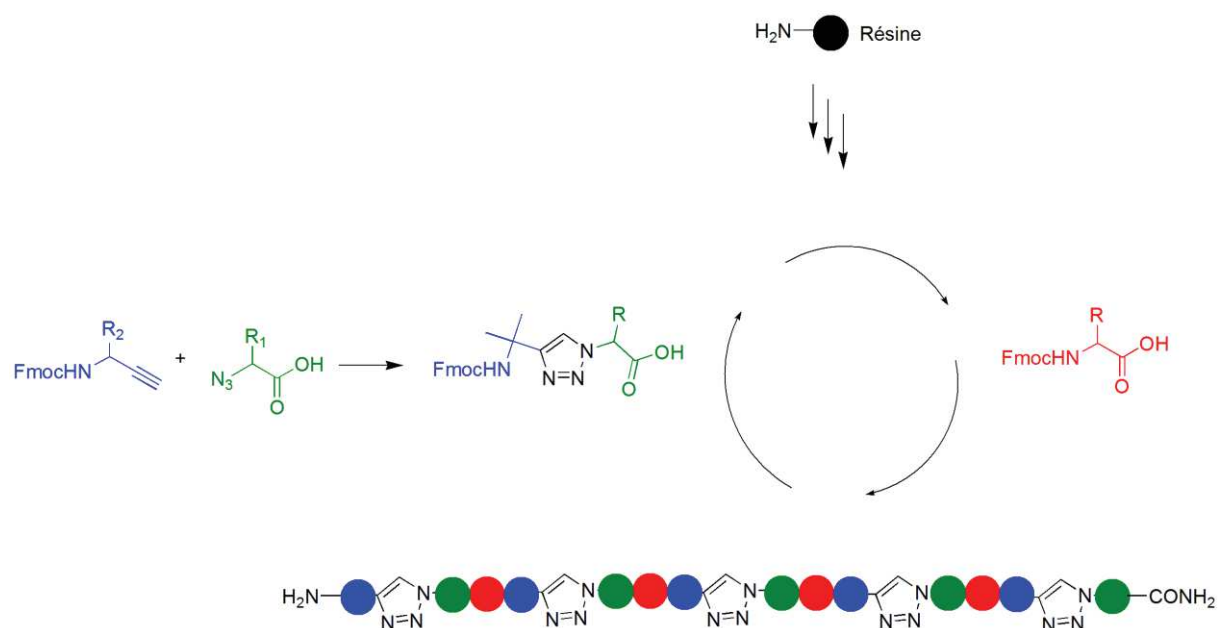


Figure 63 : Synthèse des polytriazoles en SPPS en utilisant le précurseur Fmoc-Aib ψ [Tz]Xaa-OH

Ce remplacement est symbolisé par la notation ψ [Tz]. La synthèse des pseudodipeptides Fmoc-Aib ψ [Tz]Xaa-OH, leurs utilisations en synthèse peptidique et les résultats préliminaires sur leurs capacité à se structurer ont fait l'objet d'une publication dans « Biopolymers Peptide Sciences ».

B. Article 3: Straightfoward strategy to substitute amide bond by 1,2,3-triazoles in peptaibols analogs using Aib Ψ [Tz]-Xaa dipeptides

Straightforward Strategy to Substitute Amide Bonds by 1,2,3-Triazoles in Peptaibols Analogs Using Aib ψ [Tz]-Xaa Dipeptides

Khoubuib Ben Haj Salah,¹ Baptiste Legrand,² Sanjit Das,¹ Jean Martinez,² Nicolas Inguibert¹

¹Université de Perpignan Via Domitia, Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE), USR CNRS 3278, centre de phytopharmacie, bâtiment T, 58 avenue P. Alduy, 66860, Perpignan, France

²Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247 CNRS, Université de Montpellier, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093, Montpellier Cedex 5, France

Received 13 January 2015; revised 2 March 2015; accepted 7 March 2015

Published online 18 March 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/bip.22641

ABSTRACT:

Structured peptides gained more attention over a decade because of their biological properties, biocompatibility and ability to act as modulators of protein/protein interactions, antibiotics, analgesics, immunosuppressants or as imaging agents to cite a few relevant applications. However, their poor bioavailability due in part to the susceptibility of the peptide bond to proteolytic cleavages often impaired their development and considerably limited their therapeutic use. To circumvent these problems, many efforts are undertaken to discover stable amide bond mimics resistant to proteolytic degradation. Among them the 1,2,3-triazole emerged as a highly stable analogue of the trans-peptide bond to generate bioactive peptides. Here we report a convenient approach to readily substitute amide bonds by triazole rings in Aib-containing peptides using Aib ψ [Tz]-Xaa dipeptide-like units. We defined their application in solid phase synthesis and generated short model peptide sequences to study the impact of the triazole incorporation on their confor-

mations in solution by circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectroscopies. © 2015 Wiley Periodicals, Inc. *Biopolymers (Pept Sci)* 104: 611–621, 2015.

Keywords: click chemistry; 1,2,3-triazole; solid phase peptide synthesis; amide bond mimics; structural studies

This article was originally published online as an accepted preprint. The “Published Online” date corresponds to the preprint version. You can request a copy of any preprints from the past two calendar years by emailing the *Biopolymers* editorial office at biopolymers@wiley.com.

INTRODUCTION

Peptides are ubiquitous in the nature where they serve various functions, as hormones, growth factors, neurotransmitters, but also as toxins or means of defenses against infection. Therefore, they attract great deal of interest as drug candidates because of their high potency and selectivity resulting from their secondary structure allowing them to act as inhibitors of enzymes or disruptors of protein/protein interactions.¹ Furthermore, linear peptides within the size 5–50 amino acids are easy to synthesize enabling the generation of compounds libraries for deciphering the mechanism of action of a broad range of biological targets. Nevertheless, they suffer from weak stability *in vivo* leading to a poor bioavailability due to their rapid degradation by proteases and a fast clearance. One way to outweigh these issues is to render peptides more resistant to the proteolytic cleavages by replacing the amide scissile bond by a non-hydrolytic mimetic or by avoiding their recognitions by the

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Correspondence to: Nicolas Inguibert, Université de Perpignan Via Domitia, Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE), USR CNRS 3278, centre de phytopharmacie, bâtiment T, 58 avenue P. Alduy, 66860 Perpignan, France; e-mail: nicolas.inguibert@univ-perp.fr

Contract grant sponsor: comité des pyrénées orientales de la Ligue Nationale Contre le Cancer and the Bonus Qualité Recherche de l'université de Perpignan Via Domitia.

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

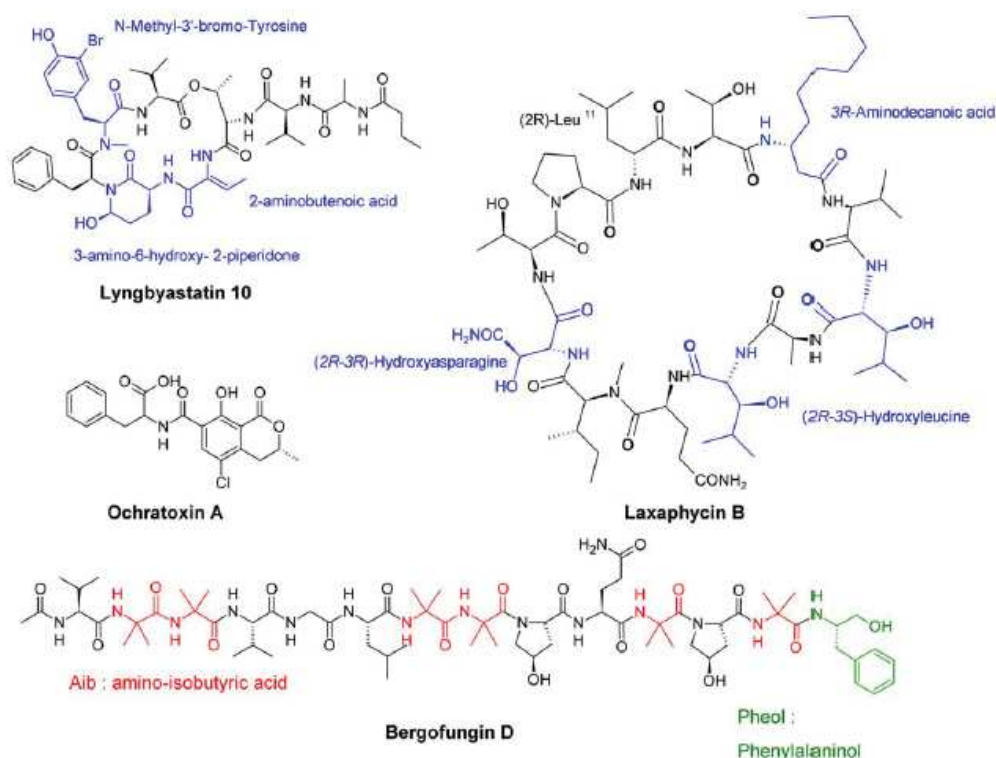


FIGURE 1 Examples of natural sources peptides: Bergofungin D a peptaibols⁴ and ochratoxin A⁵ isolated from fungi. Lyngbyastatin-10⁶ and laxaphycin B⁷ are marine peptides produced by cyanobacteria. Non-ribosomal amino acids, aminoisobutyric acid and the C-terminal alcohol are highlighted respectively in blue, red, and green.

enzyme binding sites using non proteinogenic amino acids: natural non-ribosomal-encoded amino acids or amino acids-like compounds designed *de novo*.

Nature contributes greatly to influence chemists because natural peptides isolated for example from cyanobacteria,² from fungi³ can include in their primary sequences non-canonical residues which promote their stability *in vivo* and/or induce well defined structures that account for their remarkable biological activities (Figure 1).⁴⁻⁷

These natural products can contain D-amino acids together with the 20 common L-series, and in addition can be halogenated, hydroxylated, N-methylated, dehydrated and homologated at their N or C terminus.⁸ Though, the use of such kind of amino acids in a biomimetic approach is impaired by the necessity of synthesizing them separately by using lengthy synthetic procedures. Moreover, their incorporation to design potent peptidomimetics is hazardous since their impact on the three-dimensional structures and activities of the original peptides is not predictable. Thus, modified amino acids are difficult to use routinely⁹ and need to fulfill several criteria: they must be easily synthesized in acceptable quantities, suitable

for solid-phase peptide synthesis (SPPS) and could be introduced in peptide sequence without affecting their propensity to adopt a stable secondary structure. In this context, various bioactive pseudopeptides were previously described as the β -, γ -, δ -, aza- and aza- β ³ peptides, peptoids, oligoureas,¹⁰ proline chimeras.¹¹ Most of them are able to fold as helices, a particular attractive secondary structure involved in many drugs to target interactions and which lures the researchers for the modulation of protein/protein interactions that are believed to constitute the next generation therapeutic targets.¹²⁻¹⁴

Another strategy to considerably increase the half-life of peptides *in vivo* is to use stable amide bond mimics such as the 1,2,3-triazole.¹⁵ Indeed, 1,4-disubstituted-1,2,3-triazole regioselectively prepared by copper (I) catalyzed dipolar cycloaddition between alkyne and azide (CuAAC)^{16,17} attracted considerable attention in most chemistry fields.¹⁸⁻²⁰ This heterocycle was extensively used in peptide chemistry because of its homology with the peptide bond due to the presence of hydrogen bond donor and acceptor atoms, its planar shape and dipolar moment.²¹ Therefore the triazole moiety is very often regarded as a peptide bond mimics offering better

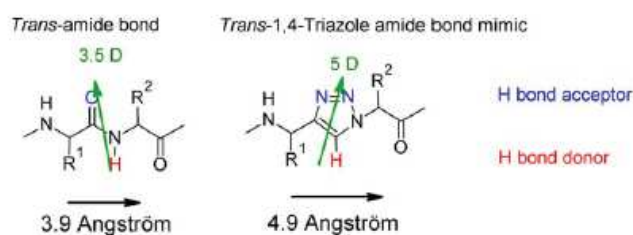


FIGURE 2 Comparison of trans amide bond and its 1,4-disubstituted-1,2,3-triazole counterpart.

proteolytic and metabolic stability than its counterpart.²² Nevertheless, considering that the distance between the side chains of two consecutive residues is increased when the amide bond is replaced by a triazole moiety, such a modification should have an impact on the biological and conformational properties of the peptides (Figure 2). In addition, the modification of peptide backbones by insertion of the triazole moiety as a peptide bond mimic is poorly understood^{23,24} and its influence on the folding behavior of peptide was scarcely explored.^{25–28} In this context, we propose to study the ability of 1,4-disubstituted-1,2,3-triazole to mimic the trans-amide bond monitoring its impact on the conformation and the biological activity of peptaibols. The replacement of amide bonds by triazole rings should not dramatically improve their proteolytic stability because this peptide class is already remarkably stable.²⁹ These 5 to 20 residues long peptaibols typically contain numerous amino-isobutyric acid (Aib, U) a strong helix promoter, and have at their C-terminus an alcohol functionality in the form of a leucinol or phenylalaninol as the most common (Figure 1).^{30,31} They adopt characteristic remarkably stable bend helical structures and display antimicrobial activities. Since their discovery four decades ago, peptaibols were studied as template for Aib surrogates regarding their secondary structure and biological activities.³²

In this work, we describe a straightforward strategy to generate peptaibols incorporating 1,4-disubstituted-1,2,3-triazole in place of amide bonds taking advantage of the high occurrence of Aib residues. Importantly, we started from an achiral and commercially available precursor to synthesize Aibψ[Tz]Xaa dipeptide motif in few steps and used it as fragment in a classical SPPS strategy. Instead of preparing the triazole from an amino alkyne derived from an amino acid by a three steps method which involves the successive synthesis of a Weinreb amide reduced to an α-amino aldehyde finally homologated by a Seyferth-Gilbert reaction³³. Finally, we synthesized a template peptide and its analogue where the Aib-Xaa dipeptides were substituted by their presupposed isosteric Aibψ[Tz]Xaa counterpart to

investigate the impact of the triazole incorporation on the conformation of this model peptide.

RESULTS AND DISCUSSION

To illustrate our approach, we chose to limit our study to the most representative AibXaa fragments occurring in peptaibols using the peptaibols database.^{30,31} We determined that most amino acids following the Aib residue are hydrophobic, except glutamine, and rarely bear a functionalized lateral chain (Figure 3). The most represented Aib-Xaa couples were when Xaa = Pro, Aib, Gln, Gly and Ala which composed more than 300 peptaibol sequences. In contrast, the Aib-Trp, Aib-Met, Aib-Thr, Aib-Cys, Aib-Asp, Aib-His, Aib-Arg and Aib-Lys combinations were never found, whereas Trp, Arg, Lys and Thr are still represented in peptaibols sequences. In this context, we started our investigation with the synthesis of six representative Fmoc-Aibψ [Tz]Xaa (3) derivatives where Xaa is Aib, Gln, Gly, Ala, Leu, Val, and Tyr. These various dipeptides allowed us to study the effect of steric hindrance, coupling difficulties increasing lipophilicity and compatibility of side chain protections. Besides, the sole limitation of our strategy resides in the impossibility to directly mimic the well represented Aib-Pro dipeptide. Indeed, the synthesis of the corresponding 1-diazoproline is not achievable thus precluding the formation of its surrogate. Then we ensured that the dipeptides were amenable to SPPS to synthesize peptidotriazole oligomers (6 and 7) and that the presence of multiple triazole units in their backbone do not affect the elongation of sequence.

Synthesis of FmocAibψ[Tz]XaaOH (3) and Study of Their Optical Purities

These compounds were prepared starting from azido-compounds 1 resulting from the conversion of the corresponding amino acid with the imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride thanks to a fully stereoselective diazo transfer

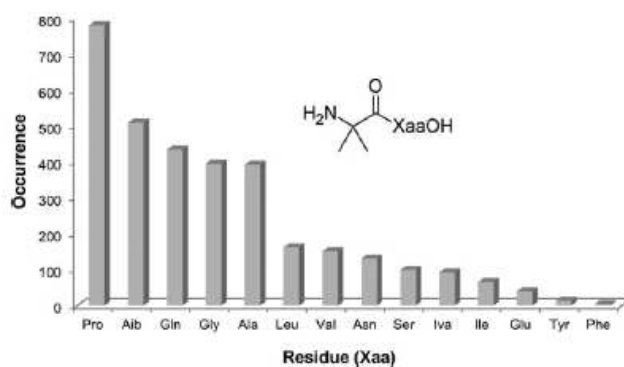


FIGURE 3 Occurrence of the AibXaaOH dipeptide motifs in peptaibols.

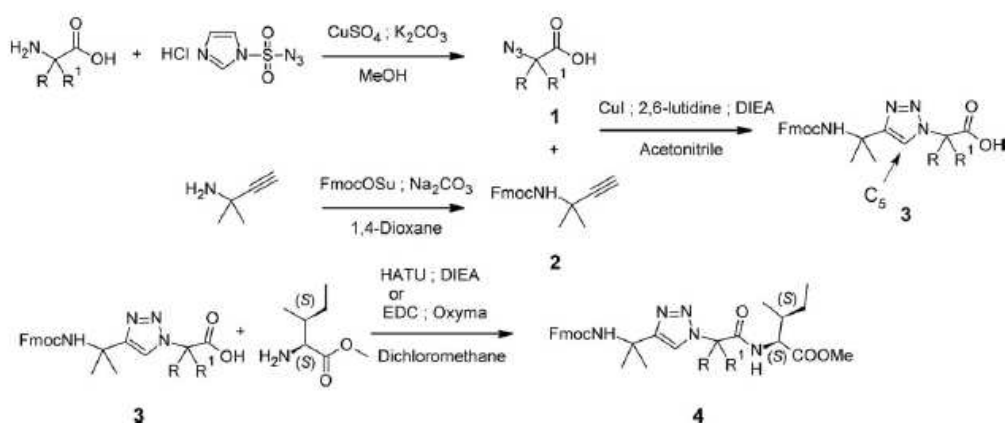


FIGURE 4 Synthesis of dipeptides 3 and tripeptides 4 for enantiopurity controls.

reaction.^{34,35} Compounds (1) were engaged in the next step shortly after preparation in a classical CuAAC using copper (I) iodide as catalyst, 2,6-lutidine and diisopropylethylamine (DIEA) as bases and Fmoc-2,2-dimethylpropargylamine (2) to earn dipeptides (3) (Figure 4 and Table I). In order to ascertain their optical purities and to explore if a racemization could occur at the carbon next to the N¹ of the triazole by enolization, products (3) were coupled with L-isoleucine methyl ester using 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU/DIEA) or EDC/ethylcyanoglyoxylate-2-oxime (Oxyima) as coupling reagents, and the crudes were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC)-mass spectroscopy (MS; Figure 4 and Table I). In both case, the epimerization was negligible (<1%) independently from the coupling reagent. HATU was shown, as expected, to be more efficient in solution than EDC/Oxyima in terms of yields but the latter was superior regarding suppression of epimerization. In order to unequivocally prove that the racemization was negligible, the diastereoisomer 4f' containing a D-valine instead of the L-valine contained in 4f was prepared. As expected, the retention times of those compounds were significantly different and the chromatograms were traceless of a diastereomeric contamination (Table I and supporting information). These results confirm that neither the diazo-transfer reaction nor the CuAAC reaction induces epimerization. In addition, we could also state that compound 3 is not prone to proton abstraction by a base.³⁶ Furthermore, as expected for the CuAAC reaction, 1,5-disubstituted-1,2,3-triazoles were absent from the purified compounds 3, as confirmed by ¹³C NMR chemical shifts of the C₅ of 1,4-disubstituted-triazole observed at $\delta = 120 \pm 3$ ppm, while the chemical shift of C₄ for 1,5-triazole is at $\delta = 133 \pm 3$ ppm.³⁷ In summary the building blocks 3 are enantiopure, easy to couple in solution using standard reagents with very limited racemization and meet the required qualities to be used in SPPS.

Oligopeptidotriazoles (6) and Peptides (7) Synthesis

Even though CuAAC is one of the feasible and high yielding reactions known till date, dipeptide-like structures containing a triazole were rarely synthesized and directly inserted in a peptide backbone, therefore it was necessary to determine their conditions of use in SPPS.³⁸ In this particular case, it was crucial since our dipeptide units are closely related to Aib a very demanding amino acid in coupling reaction. Furthermore in order to examine the scope of application of compounds 3, we need to explore the synthesis of hydrophobic sequences resembling those of peptaibols. Hence, three types of peptide triazolomers were conceived on the basis of three repetitive tripeptide patterns observed in peptaibols, the first containing three Aib at a stretch, the second with one amino acid X intercalated between two Aib and the last consisting of the UXX sequence. These features were respectively represented by four N-acetylated model peptides: the heptamer 6a corresponding to the sequence Ac-FU ψ [Tz]UU ψ [Tz]VU ψ [Tz]GG-OH, 6c Ac-(U ψ [Tz]L)₆-NH₂ an hexamer of compound 3e. Compound 6d Ac-(FU ψ [Tz]A)₃-NH₂ was constructed by coupling phenylalanine to unit 3d and the sequence was repeated for three times and the last 7 Ac-(FUA)₃-NH₂ containing only amide bond which had a sequence equivalent to 6d (Table II). Oligomers were all synthesized at a 0.1 mmol scale using a five-fold excess of compounds 3 or amino acids with respect to resins' loading. Microwave heating reaching a final temperature of 70°C was used for the Fmoc deprotection and coupling steps. As incomplete coupling reactions at any step in the synthesis would lead to sequences with deleted amino acid, we ensured the coupling reaction using the inexpensive diisopropylcarbodiimide/Oxyima cocktail,³⁹ shown to be very efficient for the synthesis of difficult peptides.⁴⁰ For the model peptide 7 mounted onto a common Rink 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxyacetamido-methylbenzhydryl amine resin (MBHA) resin, 20 min coupling time (method

Table I Yields, Retention Times of Compounds 3 and 4 and ¹³C Chemical Shifts of the C₅ Carbon of Triazole Ring for Compounds 3

Cpds	XaaOH	Rt (min)	Yield (%)	δ (ppm) C ₅ of Triazole	Cpd	Rt (min)	Yield (%) and Racemization (%)
3a	Aib	24.2	70	120.3			
3b	Gln(trt)	34.3	60	121.7	4b	38.6	87 ^a ; ND; 99 ^b ; 0.4
3c	Gly	22.0	70	123.0			
3d	Ala	22.6	82	121.3	4d	29	84 ^a ; ND 00 ^b ; ND
3e	Leu	27.5	90	121.5	4e	34.1	95 ^a ; ND; 100 ^b ; ND
3f	Val	26	75	121.5	4f	31.7	100 ^b ; 0.1
3f'	D-Val	26	75	121.5	4f'	32.8	100 ^b ; ND
3g	Tyr(OMe)	28	90	121.8	4g	33	89 ^a ; ND 99 ^b ; 0.7

Coupling reagents. ND, Not Detected.

^a 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride / Oxyma.

^b HATU/ diisopropylethylamine.

A) was necessary for proper insertion of the Aib as already reported for peptaibols.⁴¹ For triazolo-peptides 6 we consider the possibility to reduce coupling time to speed up the synthesis. Two shorter coupling times were tested 10 min (method B) and 5 min (method C) affording comparable results in terms of yields and purity (Table II). Nevertheless as we can expect some coupling difficulties when the method will be extended to longer sequences, an intermediate coupling reaction time of 10 min was selected. Furthermore, considering that heating of an activated carboxylic ester for a prolonged period of time could increase the rate of epimerization at the alpha carbon of our building blocks 3, we synthesized compound 6b containing a D-valine instead the L-valin of 6a. As expected compounds 6a and 6b being diastereomers have a different retention times as evidenced by a coinjection, thus allowing to fully resolve by HPLC any of their traces in the crude. Both crudes of compounds 6a and 6b were free of a diastereomer contamination. Thereafter, thanks to the absence of racemization and efficacy, the coupling reaction time was set at 10 min for all the next synthe-

ses. After having coupled three different units 3 in the same peptide 6a, we next focused on the effect of an increasing hydrophobicity on the success rate of the coupling reaction. For this purpose we synthesized on a Rink amide MBHA resin a hexamer of unit 3d, pleasingly peptides' elongation proceeds smoothly and the final product was obtained with a correct yield and a crude purity of almost 90%, highlighting that the building blocks 3 are not prone to induce coupling difficulties. Finally we examined the insertion of an amino acid between two units 3 by synthesizing compound 6d, once again the synthesis was pursued without trouble. Thus this short study demonstrates that compounds 3 are suitable for SPPS using standard reaction conditions and that their insertion in peptide sequence could be effectively pursued without occurrence of epimerization.

Circular Dichroism and NMR Studies

We studied the influence of the peptide bonds substitution by 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles between the Aib-Xaa

Table II Sequence and Yields of Oligomers (6) and Peptide (7)

Cpds 6	Peptaibols Mimicked Motifs	Synthesized Sequences	Crude Purity (%)	Yields After Purification (%)	Rt (min)
6a	UUU	AcFU _{ψ(Tz)} UU _{ψ(Tz)} VU _{ψ(Tz)} GGOH	98 ^c 98 ^b	74	26.3
6b	UUU	AcFU _{ψ(Tz)} UU _{ψ(Tz)} vU _{ψ(Tz)} GGOH	98 ^b	72	25.9
6c	UXU	AcU _{ψ(Tz)} LU _{ψ(Tz)} LU _{ψ(Tz)} LU _{ψ(Tz)} LU _{ψ(Tz)} LU _{ψ(Tz)} LNH ₂	89 ^b	68	28.6
6d	UXX	AcFU _{ψ(Tz)} A FU _{ψ(Tz)} A FU _{ψ(Tz)} ANH ₂	90 ^b	50	15.1
7	UXX	AcFUAFUAFUANH ₂	95 ^a	70	17.19

Crude yields evaluated by HPLC evaporative light scattering detector using coupling procedures.

^a A: A 20 min μ wave heating.

^b B: 10 min μ wave heating.

^c C: 5 min μ wave heating.

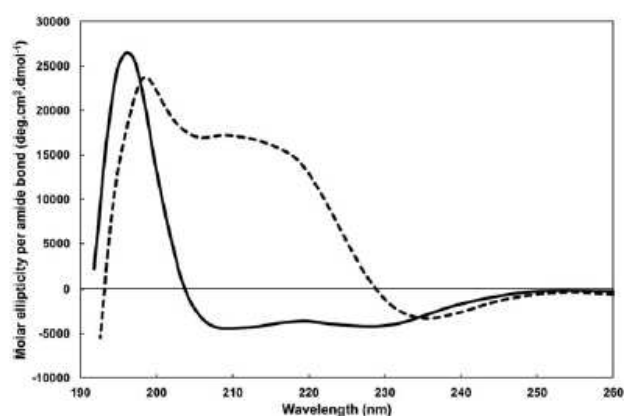


FIGURE 5 Circular dichroism spectra of compounds **7** (line) and the analogue **6d** (dotted line) in methanol at 20°C.

motifs on the overall structure of the model peptide **7** and the corresponding peptidomimetic **6d** in methanol. Far-UV spectra (190–260 nm) of both compounds were recorded at 20°C (Figure 5). The circular dichroism (CD) spectra of the compound **7** displayed a CD profile close to that of a α -helix with a positive maxima around 196 nm and two negative maxima around 209 and 228 nm. In contrast, an unusual signature was measured for **6d**, with three maxima two positive around 199 and 210 nm and a negative at 236 nm. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra show well dispersed signals for both compounds **7** and **6d** and all ^1H resonances were readily assigned (Supporting Information Table S1). Nevertheless, while the rotating-frame nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy (ROESY) spectrum of **7** displayed numerous Nuclear Overhauser Effect (NOE)s with typical $\text{HN}(i,i+1)$ and $\text{HN}(i),\text{H}\alpha(i-2)$ correlations, the spectra of **6d** exhibited much less cross-

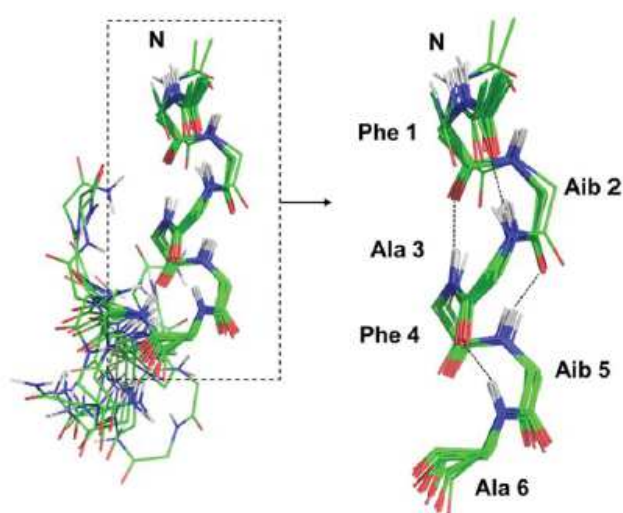


FIGURE 7 Superimposition of the backbone of the 15 lowest energy NMR structures of **7** in methanol. The side chains have been omitted for clarity. Hydrogen bonds are shown in dotted lines.

peaks (Figure 6 and Supporting Information Table S2). When NOEs were used as constraints for the NMR solution structure calculations of both compounds, the model peptide **7** globally displayed a helical scaffold according to the CD signature previously recorded, while the calculations for the triazole-incorporating analogue **6d** did not converge due to the lack of distance restraints (Figure 7). The lowest energy conformations of **7** exhibited a α -helix from the first to the sixth residue while the C-terminal moiety (Phe **7**, Aib **8** and Ala **9**) was disordered. In contrast, the compound **6d** did not exhibit any stable conformation in solution. In consequence, we showed that the triazole

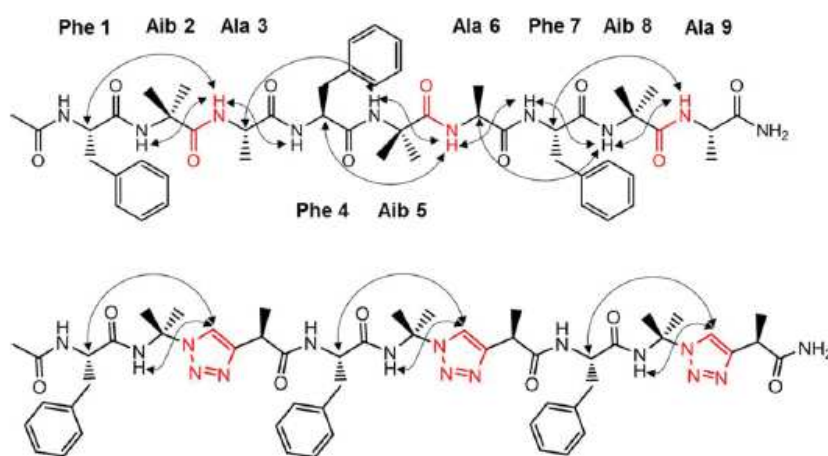


FIGURE 6 Characteristic NOEs observed on the ROESY spectra of **7** and **6b**.

replacement of three amide bonds along the sequence prevent this peptide to fold in a classical helix, certainly because the triazole rigidity irremediably alters the secondary structure of the model peptide 7.

CONCLUSION

To conclude, we have selected and synthesized a range of Aib/[Tz]AA dipeptide analogues containing the triazole linker which allows us to replace the amide bonds of the most representative Aib-Xaa dipeptides found in peptaibols, except Aib-Pro. Interestingly, such dipeptides can be directly introduced in peptide sequences through automated SPPS. As a proof of concept short triazolo-peptide sequences have been readily obtained on two types of classical resins i.e. the Wang and Rink amide resins. We showed that the dipeptide-like units were coupled with high efficiency despite the usual difficult coupling of Aib in peptide sequences. Apart from their ease of synthesis another advantage of our preassembled dipeptide units incorporating the triazole lies in their direct introduction as single or multiple copies in peptide backbone through automated SPPS rendering them particularly useful with a vision of a triazole scan on full length peptaibols. Finally, we showed that the incorporation of multiple triazoles along the sequence of a model helical peptide can prevent its folding. We further investigate the impact of triazole incorporation on the conformation of various peptides.

EXPERIMENTAL

Experimental Methods

Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) analysis was carried out using a Thermo Fisher Scientific liquid chromatography mass spectrometer, featuring an Accela HPLC coupled to a LCQ Fleet equipped with an electrospray ionization source and a 3D ion-trap analyzer. The analysis was performed with a Phenomenex Kinetex C-18 column (100 × 300 mm) using a gradient mixture of water with 0.1 % formic acid (FA; Buffer A) and acetonitrile (ACN) with 0.1 % FA (Buffer B).

Analytical HPLC. The HPLC analysis was conducted on a Waters 2695 HPLC system with a Grace Vydac 218MS 5 μ M C-18 column (250 × 4.6 mm) and an ELS-Detector using a gradient mixture of water with 0.1% FA (Buffer A) and ACN with 0.1% FA (Buffer B).

Semi-Preparative HPLC Purification Procedures A. Semi-preparative purification of peptides was performed using a Waters 1525 chromatography system with a UP50DB C-18

column (250 × 10 mm) and fitted with a Waters 2487 tunable absorbance detector set to 214 nm and 254 nm. Purification was performed using a gradient mixture of water with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA; Buffer A) and ACN with 0.1% TFA (Buffer B). All compounds were eluted with a 3 ml/min flow rate.

Procedure for the Preparation of α -Azido Acid (1). Imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride (1.2 mmol) was added to the amino acid (1 mmol), K_2CO_3 (3 mmol) and $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.01 mmol) in MeOH (10 ml) and the mixture was stirred at room temperature for 12 h.³⁴ The mixture was concentrated, diluted with diethylether (50 ml) and extracted with saturated $NaHCO_3$ (3 × 20 ml), the remaining aqueous layer phase was acidified to pH = 1 with a 1 M HCl solution and extracted three times with ethyl acetate (3 × 20 ml). The organic extract were washed with brine (2 × 30 ml) and dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure to afford the desired α -azido acid without any additional purification. Analytical data of azido acids were found to be identical to literature data.

2-azido-2-methylpropanoic acid (1a): yellowish oil, 65% yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.53 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 178.8, 62.9, 24.3.^{42,43}

(2S)-2-azido-5-(trityl-amino)-5-oxopentanoic acid (1b): yellowish oil, 75% yield. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.71 (s, 1H), 7.44 – 7.02 (m, 15H), 3.45 (dd, $J = 9.1$ Hz, 4.7 Hz, 1H), 2.39 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.00–1.91 (m, 1H), 1.74–1.58 (m, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ 174.4, 171.5, 145.0, 128.5, 127.4, 126.3, 69.1, 63.4, 33.1, 27.7.²⁵

Azidoacetic acid (1c): pale oil, in 55% yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.98 (s, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 174.5, 50.0.⁴³

(2S)-2-azido-propanoic acid (1d): yellowish oil, 77% yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.03 (dd, $J = 7.2, 14.3$ Hz, 1H), 1.55 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 176.6, 57.1, 16.7.⁴³

(2S)-2-azido-4-methyl-pentanoic acid (1e), yellowish oil, 80% yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.87 (dd, 1H, $J = 5.0$ and 8.0 Hz), 1.83–1.69 (m, 3H), 0.98 (t, 6H, $J = 6.5$ Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 177.1, 59.9, 39.6, 24.8, 22.4, 21.1.⁴³

(2S)-2-azido-4-methyl-butanoic acid (1f) and (2R)-2-azido-4-methyl-butanoic acid (1f'), yellowish oil, 95% yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.78 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 2.30–2.22 (m, 1H), 1.07 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.02 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 176.2, 67.9, 30.9, 19.4, 17.7.⁴³

(2S)-2-azido-3-(4-methoxyphenyl)-propanoic acid (1g), pale orange oil, 85% yield. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ

7.18 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.30 (dd, $J = 8.6, 5.0$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.04 (dd, $J = 14.2, 5.0$ Hz, 1H), 2.87 (dd, $J = 14.1, 8.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 172.04, 158.72, 130.83, 129.03, 114.32, 63.07, 55.57, 36.37.⁴⁴

Preparation of 9H-Fluoren-9-Ylmethyl (2-Methylbut-3-yn-2-yl)-Carbamate (2). The commercially available 2-Methyl-3-butyn-2-amine (5 g, 60 mmol) was dissolved in a 1/1 dioxane/water mixture (100 ml). Na_2CO_3 (25.5 g, 240 mmol) was added and the resulting solution was cooled in an ice bath. A cooled solution of 9-fluorenyl-methoxycarbonyl-N-hydroxysuccinimide (Fmoc-OSu) (21.31 g, 63 mmol) in dioxane (100 ml) was gradually added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 hours. The dioxane was evaporated and diluted with water (300 ml), the remaining aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3×100 ml). The combined organic layers were washed with 1M HCl (3×100 ml), brine (2×100 ml) and dried over MgSO_4 . The solvent was evaporated to yield the product as a white foam (17.4g, 94%). Rf 0.5 (25% ethyl acetate /Cyclohexane). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.35 (dt, $J = 16.0, 7.8$ Hz, 4H), 4.98 (s, 1H), 4.43 (s, 2H), 4.22 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 2.32 (s, 1H), 1.60 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 154.57, 144.05, 141.43, 127.76, 127.13, 125.12, 120.07, 87.13, 69.25, 66.44, 47.39, 47.34, 29.38. ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = (\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_2) [\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z =$ found 305.6, calculated 306.1.

Procedure for the Preparation of Building Blocks Fmoc-Aibψ[Tz]Xaa-OH (3). α -azido acid (1) (1.0 mmol) and compound (2) (1.0 mmol) were dissolved in degassed acetonitrile (10 ml).³⁸ To this solution, 2,6-lutidine (2 mmol) and diisopropylethylamine (2 mmol) were added under nitrogen. Copper(I) iodide (0.1 mmol) was then added to the solution. The reaction was stirred under nitrogen for 6 h. The mixture was diluted with EtOAc (150 ml). The solution was washed with 9:1 saturated $\text{NH}_4\text{Cl}:\text{NH}_4\text{OH}$ then washed with 1M HCl (3×50 ml), brine (2×50 ml) and dried over MgSO_4 , and filtered. After solvent evaporation the crude product was purified by column chromatography.

Fmoc-Aibψ[Tz]Aib-OH (3a): A white solid 2.87g (70%) was obtained starting from 1.22 g (9.44 mmol) of 1a and 2.88 g (9.44 mmol) of 2. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.97 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.72 (s, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.43 (dd, $J = 14.9, 7.5$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 4.20 (s, 3H), 1.81 (s, 6H), 1.61 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 173.34, 155.00, 153.16, 144.53, 141.28, 128.17, 127.62, 125.89, 120.64, 120.33, 65.63, 64.20, 50.77, 47.34,

28.98, 25.92. ESI-MS ($\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_4$) $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z =$ found 434.9, calculated 435.2.

Fmoc-Aibψ[Tz]Gln(Trt)-OH (3b). A yellow solid 2.0g (60%) was obtained starting from 2.0 g (7.8 mmol) of 1b and 1.47 g (4.82 mmol) of 2. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.61 (s, 1H), 7.95–7.84 (m, 3H), 7.76–7.65 (m, 2H), 7.62 (s, 1H), 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.36–7.28 (m, 2H), 7.28 – 7.12 (m, 15H), 5.24 (dd, $J = 8.6, 5.6$ Hz, 1H), 4.18 (s, 3H), 2.41–2.10 (m, 4H), 1.62 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 171.25, 170.64, 155.00, 153.52, 145.39, 144.53, 141.29, 129.08, 128.17, 128.00, 127.61, 126.89, 125.90, 121.67, 120.63, 69.86, 65.59, 62.10, 50.75, 47.34, 32.33, 28.97, 27.75. ESI-MS ($\text{C}_{44}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_5$) $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z =$ found 719.8, calculated 720.3.

Fmoc-Aibψ[Tz]Gly-OH (3c). A white solid 2.53 g, (70%) was obtained starting from 0.9 g (8.9 mmol) of 1c and 2.71 g (8.9 mmol) of 2. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.85–7.60 (m, $J = 32.0, 25.1$ Hz, 4H), 7.42 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 1.60 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 169.23, 154.96, 153.49, 144.52, 141.31, 128.22, 127.60, 125.93, 123.07, 120.71, 65.43, 50.91, 50.65, 47.27, 28.92. ESI-MS ($\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_4$) $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z =$ found 406.9, calculated 407.2.

Fmoc-Aibψ[Tz]Ala-OH (3d). A white solid 3.3 g (82%) was obtained starting from 1.11 g, (9.8 mmol) of 1d and 3.0 g, (9.8 mmol) of 2. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.93 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.74 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.42 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 5.44 (q, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.20 (s, 3H), 1.71 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.60 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 171.52, 154.99, 153.36, 144.52, 141.28, 128.19, 127.63, 125.88, 121.38, 120.66, 65.59, 57.95, 50.65, 47.31, 28.93, 17.82. ESI-MS ($\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_4$) $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z =$ found 420.8, calculated 421.2.

Fmoc-Aibψ[Tz]Leu-OH (3e). A white solid 3.42 g, (90%) was obtained starting from 1.28 g, (8.19 mmol) of 1e and 2.5 g (8.19 mmol) of 2. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.95 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.42 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 5.34 (dd, $J = 10.8, 4.9$ Hz, 1H), 4.18 (s, 3H), 2.10 (ddd, $J = 14.5, 10.9, 5.0$ Hz, 1H), 1.92 (ddd, $J = 13.9, 9.0, 5.0$ Hz, 1H), 1.60 (s, 6H), 1.21 – 1.11 (m, 1H), 0.83 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.77 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 171.15, 155.02, 153.48, 144.49, 141.28, 128.17, 127.59, 125.86, 121.49, 120.64, 65.65, 61.04, 50.81, 47.34, 29.08, 28.80, 24.86, 22.97, 21.67. *signal for methylene carbon on isobutyl side chain is buried under solvent peaks (DMSO ~ 39) and was detected by 2D experiment (HMQC). ESI-MS ($\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_4$) $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z =$ found 462.9, calculated 463.2.

Fmoc-Aibψ[Tz]Val-OH (3f) and Fmoc-Aibψ[Tz]-D-Val-OH (3f'). Were obtained as a white solid 2.75 g (75%) starting from 1.17 g, (8.19 mmol) of 1f or 1f' and 2.5 g (8.19 mmol) of

2. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.90 (s, 1H), 7.87 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 7.60 (s, 1H), 7.42 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 5.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.19 (s, 3H), 2.48–2.41 (m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 0.93 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.73 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 170.30, 155.05, 153.50, 144.50, 141.23, 128.17, 127.62, 125.84, 121.46, 120.64, 68.55, 65.61, 50.81, 47.33, 31.19, 29.08, 28.73, 19.55, 18.77. ESI-MS ($\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_4$) $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = found 448.9, calculated 449.2.

Fmoc-Aibψ/[Tz]Tyr(OMe)-OH (3g). A orange solid 3.72 g (90%) was obtained starting from 1.73 g, (7.8 mmol) of Ig and 2.4 g (7.8 mmol) of 2. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.72 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.48 (s, 1H), 7.42 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 6.95 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.70 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.47 (dd, $J = 10.1, 5.5$ Hz, 1H), 4.20 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.37 (ddd, $J = 23.8, 14.1, 7.8$ Hz, 2H), 1.56 (d, $J = 9.3$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 170.36, 158.54, 154.92, 153.28, 144.53, 141.27, 130.60, 128.56, 128.19, 127.65, 125.91, 121.87, 120.67, 114.10, 65.63, 64.15, 55.37, 50.59, 47.30, 36.90, 29.11, 28.77. ESI-MS ($\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_5$) $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = found 526.9, calculated 527.2.

Synthesis of compounds 4a-f Fmoc-Aibψ/[Tz]Xaa-Ile-OMe. The dipeptides 3 (0.1 mmol) were dissolved in anhydrous N,N' -dimethylformamide (DMF; 1 ml) and cooled to 0°C. To this was added *l*-Isoleucine methyl ester hydrochloride (0.11 mmol), DIEA (0.3 mmol), and HATU (0.12 mmol). For comparison purpose the same reaction was performed using Oxyma (0.12 mmol), and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (0.12 mmol). The reaction was allowed to warm to room temperature and stir overnight. The mixture was concentrated, diluted with ethyl acetate (20 ml) and washed with 10% HCl (2 × 10 ml), saturated NaHCO_3 (2 × 10 ml), and brine (10 ml). The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated to yield the crude product which was analyzed by HPLC evaporative light scattering detector and LC-MS to quantify the yields and the extent of racemization.

Fmoc-Aibψ/[Tz]Gln(Trt)-Ile-OMe (4b). ESI-MS ($\text{C}_{51}\text{H}_{55}\text{N}_6\text{O}_6$) $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = found 846.9, calculated 847.4

Fmoc-Aibψ/[Tz]Ala-Ile-OMe (4d). ESI-MS ($\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_5$) $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = found 548.0, calculated 548.2.

Fmoc-Aibψ/[Tz]Leu-Ile-OMe (4e). ESI-MS ($\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_5$) $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = found 590.0 calculated 590.3.

Fmoc-Aibψ/[Tz]Val-Ile-OMe (4f). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.80 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.87 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 7.76–7.67 (m, $J = 3.4, 1.4$ Hz, 2H), 7.67–7.60 (m, 1H), 7.40 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 5.10 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 4.16 (s, 3H), 4.14–4.08 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 2.34–2.26 (m, $J = 16.1, 6.1$ Hz, 1H), 1.79–1.70 (m, 1H),

1.57 (d, $J = 11.4$ Hz, 6H), 1.42–1.30 (m, 1H), 1.21–1.06 (m, $J = 11.2, 5.8$ Hz, 1H), 0.96 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.80 (s, 6H), 0.59 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 171.95, 168.67, 154.99, 153.75, 144.46, 141.26, 128.10, 127.63, 125.82, 120.64, 120.26, 68.43, 65.61, 57.40, 52.20, 50.70, 47.25, 36.57, 32.10, 29.01, 28.65, 25.39, 19.12, 15.69, 11.73. ESI-MS ($\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_5$) $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = found 576.0, calculated 576.3.

Fmoc-Aibψ/[Tz]-D-Val-Ile-OMe (4f'). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.94 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 7.72 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 7.66 (s, 1H), 7.41 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.33 (td, $J = 7.3, 3.7$ Hz, 2H), 5.18 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 4.32 (dd, $J = 7.9, 6.3$ Hz, 1H), 4.18 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 2.37–2.25 (m, 1H), 1.88–1.78 (m, 1H), 1.59 (d, $J = 11.9$ Hz, 6H), 1.45–1.40 (m, 1H), 1.29–1.24 (m, 1H), 0.93 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.89–0.81 (m, 6H), 0.58 (d, $J = 8.9$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172.01, 168.38, 155.02, 153.76, 144.43, 141.17, 128.06, 127.60, 125.86, 120.59, 120.29, 68.51, 65.63, 56.85, 52.35, 50.76, 47.31, 37.13, 32.10, 29.12, 28.66, 25.18, 19.30, 18.93, 16.06, 11.58. ESI-MS ($\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_5$) $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = found 576.0, calculated 576.3.

Fmoc-Aibψ/[Tz]Tyr(OMe)-Ile-OMe (4g). ESI-MS ($\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_6$) $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z = found 654.0, calculated 654.3

Synthesis of Triazole Oligomers and Peptides 6–7. SPPS was run on an automated microwave peptide synthesizer (CEM liberty one, Orsay, France) using Fmoc/O-tbutyl chemistry. All Fmoc-protected amino acids, N,N' -diisopropylcarbodiimide (DIC), Oxyma, Fmoc-Rink-Amid-MBHA resin (loading 0.38 g/mol) and Fmoc-Gly-Wang Resin (loading 0.75 g/mol) were purchased from Iris Biotech, Germany. Dichloromethane (DCM), DMF, cyclohexane, DIEA, acetic anhydride, TFA, triisopropylsilane, FA, ACN and piperidine for peptide synthesis were obtained from Aldrich (USA). SPPS was performed at a 0.10 mmol scale with DIC/Oxyma as coupling reagent and 20% piperidine in DMF for Fmoc deprotection. After transfer to the reaction vessel the resin was swelled using the standard protocol involving 1 h immersion in 10 ml of DMF the elongation was carried automatically using a five-fold excess of protected amino acids and coupling reagent. Microwave heating was used during residue coupling (Procedures: A 20 min, B 10 min and C 5 min μ wave heating), Fmoc deprotection and N-terminal acetylation to reach a final temperature of 70°C. After completion of the automatic synthesis the peptidyl-resin was washed twice with 10 ml of DCM. Cleavage and deprotection of the peptide was performed by treating the peptidyl-resin with 10 ml of a TFA/water/TIPS mixture in a 95:2.5:2.5 (v/v) ratios for 3h. After resins' filtration, the filtrate was concentrated and co-evaporated with cyclohexane. The peptide was precipitated with ice-cold diethyl ether, recovered by

centrifugation and washed with cold diethyl ether. Water was added and the mixture was lyophilized to yield crude peptide

Peptide (6a): Ac-PheAibψ[Tz]AibAibψ[Tz]ValAibψ[Tz]-GlyGly-OH. Compound (6a) was synthesized on a Fmoc-Gly-Wang Resin. Performing the synthesis using procedure C yields 85 mg, 100% of the crude peptide with a purity of 98%. Using the procedure B affords 83 mg, 100% of the crude peptide with a purity of 98% and 62 mg (74% yield) after purification. ESI-MS ($C_{39}H_{57}N_{14}O_7$) $[M+H]^+$ m/z = calculated 833.4, found 833.2

Peptide (6b): Ac-PheAibψ[Tz]AibAibψ[Tz]D-ValAibψ[Tz]-GlyGly-OH was obtained using procedure B on a Fmoc-Gly-Wang Resin with a crude yield of 85 mg, 100% and a purity of 98% and 60 mg (72% yield) after purification. ESI-MS ($C_{39}H_{57}N_{14}O_7$) $[M+H]^+$ m/z = calculated 833.4, found 833.2

Peptide (6c): Ac-(Aibψ[Tz]Leu)₆-NH₂. Compound (6c) was synthesized using procedure B, on a Fmoc-Rink-Amid-MBHA resin yielding 140 mg (100%) of the crude peptide with a purity of 89% and 95 mg (68% yield) after purification. ESI-MS ($C_{68}H_{114}N_{25}O_7$) $[M+H]^+$ m/z = calculated 1392.9, found 1392.8.

Peptide (6d): Ac-(PheAibψ[Tz]Ala)₃-NH₂ Compound (6d) was synthesized using procedure B on a Fmoc-Rink-Amid-MBHA resin yielding 105 mg (100% yield) of the crude peptide with a purity of 90%, and 54 mg (50% yield) after purification. ESI-MS ($C_{53}H_{69}N_{16}O_7$) $[M+H]^+$ m/z = calculated 1041.5, found 1041.5.

Peptide (7): Ac-(PheAibAla)₃-NH₂. Compound (7) was synthesized using procedure A on a Fmoc-Rink-Amid-MBHA resin to yield 100 mg of the crude peptide (100%) with a purity of 95%, and a 70% final yield after purification. ESI-MS ($C_{50}H_{68}N_{10}NaO_{10}$) $[M+Na]^+$ m/z = calculated 991.5, found 991.4.

CD measurements:

CD experiments were carried out using a Jasco J815 spectropolarimeter at 20°C. The spectra were obtained in methanol using a 1 mm path length CD cuvette over a wavelength range of 190–260 nm. Continuous scanning mode was used, with a response of 1.0 s with 0.2 nm steps and a bandwidth of 2 nm. The signal to noise ratio was improved by acquiring each spectrum over an average of two scans. Baseline was corrected by subtracting the background from the sample spectrum. The compound 7 and 6b were dissolved in a spectrophotometric grade methanol at 200 μm.

NMR and Molecular Modeling Studies. The NMR samples typically contained 5 mM of 6b and 7 dissolved in CD₃OH. All spectra were recorded on a Bruker Avance 600 AVANCE III spectrometer equipped with a 5 mm triple-resonance

cryoprobe (¹H, ¹³C, ¹⁵N). Homonuclear 2D spectra DQF-COSY, TOCSY (DIPS12) and ROESY were typically recorded in the phase-sensitive mode using the States-TPPI method as data matrices of 256 real (t1) × 2048 (t2) complex data points; 8–48 scans per t1 increment with 1.0 s recovery delay and spectral width of 6009 Hz in both dimensions were used. The mixing times were 80 ms for TOCSY and 350 ms for the ROESY experiments. Spectra were processed with Topspin (Bruker Biospin) and visualized with Topspin or NMRView on a Linux station. The matrices were zero-filled to 512 (t1) × 2048 (t2) points after apodization by shifted sine-square multiplication and linear prediction in the F1 domain. Chemical shifts were referenced to the tetramethylsilane (TMS).

¹H chemical shifts were assigned according to classical procedures. NOE cross-peaks were integrated and assigned within the NMRView software.⁴⁵ The volume of a ROE between methylene pair protons was used as a reference of 1.8 Å. The lower bound for all restraints was fixed at 1.8 Å and upper bounds at 2.7, 3.3 and 5.0 Å, for strong, medium and weak correlations, respectively. Pseudo-atoms corrections of the upper bounds were applied for unresolved aromatic, methylene and methyl protons signals as described previously.⁴⁶ Structure calculations were performed with AMBER 11⁴⁷ in two stages: cooking and simulated annealing in vacuum. The cooking stage was performed at 1000 K to generate 100 initial random structures. SA calculations were carried during 20 ps (20,000 steps, 1 fs long) as described elsewhere. First, the temperature was risen quickly and maintained at 1000 K for the first 5000 steps, then the system was cooled gradually from 1000 K to 100 K from step 5001–18000 and finally the temperature was brought to 0 K during the 2000 remaining steps. For the 3000 first steps, the force constant of the distance restraints was increased gradually from 2.0 kcal.mol⁻¹.Å to 20 kcal.mol⁻¹.Å. For the rest of the simulation (step 3001 to 20000), the force constant is kept at 20 kcal.mol⁻¹.Å. The 15 lowest energy structures with no violation > 0.3 Å were considered as representative of the peptide structure. The representation and quantitative analysis were carried out using MOLMOL⁴⁸ and PyMOL.⁴⁹

The spectroscopic experiments have been performed using the Biodiversité et Biotechnologies Marines (Bio2Mar, <http://bio2-mar.obs-banyuls.fr/fr/index.html>) facilities at the University of Perpignan. We dedicate this article to, Professor Stephen Kent, University of Chicago (USA), a key developer of native chemical ligation, Professor Fernando Formaggio, University of Padova (Italy) for his major contribution for the synthesis of peptaibols, and Professor William D. Lubell, Université de Montréal (Québec, Canada) for his significant contribution in the synthesis of peptidomimetics.

REFERENCES

- Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. *Chem Biol Drug Des* 2013, 81, 136–147.
- Banaigs, B.; Bonnard, I.; Witczak, A.; Inguibert, N. In *Outstanding Marine Molecules*; Barre, S. L.; Kornprobst, J.-M., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014; pp. 285–318.
- Duclohier, H. *Chem. Biodivers.* 2007, 4, 1023–1026.
- Berg, A.; Ritzau, M.; Ihn, W.; Schlegel, B.; Fleck, W. F.; Heinze, S.; Grafe, U. *J. Antibiot.* (Tokyo) 1996, 49, 817–820.
- Steyn, P. S.; V. D. Merwe, K. *J. Nature* 1966, 211, 418–418.
- Kwan, J. C.; Taori, K.; Paul, V. J.; Luesch, H. *Mar. Drugs* 2009, 7, 528–538.
- Boyaud, F.; Mahiout, Z.; Lenoir, C.; Tang, S.; Wdzieczak-Bakala, J.; Witczak, A.; Bonnard, I.; Banaigs, B.; Ye, T.; Inguibert, N. *Org Lett* 2013, 15, 3898–3901.
- Walsh, C. T.; O'Brien, R. V.; Khosla, C. *Angew Chem Int Ed* 2013, 52, 7098–7124.
- Stolze, S.; Kaiser, M. *Synthesis* 2012, 44, 1755–1777.
- Martinek, T. A.; Füllöp, F. *Chem Soc Rev* 2012, 41, 687–702.
- Mothes, C.; Caumes, C.; Guez, A.; Boulet, H.; Gendrineau, T.; Darses, S.; Delsuc, N.; Moumné, R.; Oswald, B.; Lequin, O.; Karoyan, P. *Molecules* 2013, 18, 2307–2327.
- Basse, M. J.; Betzi, S.; Bourgeas, R.; Bouzidi, S.; Chetrit, B.; Hamon, V.; Morelli, X.; Roche, P. *Nucleic Acids Res* 2013, 41, D824–D827.
- Azzarito, V.; Long, K.; Murphy, N. S.; Wilson, A. *J Nat Chem* 2013, 5, 161–173.
- Estieu-Gionnet, K.; Guichard, G. *Expert Opin Drug Discov* 2011, 6, 937–963.
- Massarotti, A.; Aprile, S.; Mercalli, V.; Del Grosso, E.; Grosa, G.; Sorba, G.; Tron, G. C. *ChemMedChem* 2014, 9, 2497–2508.
- Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J Org Chem* 2002, 67, 3057–3064.
- Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew Chem* 2002, 114, 2708–2711.
- Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem Rev* 2008, 108, 2952–3015.
- Holub, J. M.; Kirshenbaum, K. *Chem Soc Rev* 2010, 39, 1325–1337.
- Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. *Chem Rev* 2013, 113, 4905–4979.
- Angell, Y. L.; Burgess, K. *Chem Soc Rev* 2007, 36, 1674–1689.
- Valverde, I. E.; Mindt, T. L. *Chimia* 2013, 67, 262–266.
- Ke, Z.; Chow, H.-F.; Chan, M.-C.; Liu, Z.; Sze, K.-H. *Org Lett* 2011, 14, 394–397.
- Milli, L.; Larocca, M.; Tedesco, M.; Castellucci, N.; Ghibaudi, E.; Cornia, A.; Calvaresi, M.; Zerbetto, F.; Tomasini, C. *J Org Chem* 2014, 79, 5958–5969.
- Valverde, I. E.; Bauman, A.; Kluba, C. A.; Vomstein, S.; Walter, M. A.; Mindt, T. L. *Angew Chem Int Ed* 2013, 52, 8957–8960.
- Proteau-Gagné, A.; Rochon, K.; Roy, M.; Albert, P.-J.; Guérin, B.; Gendron, L.; Dory, Y. L. *Bioorg Med Chem Lett* 2013, 23, 5267–5269.
- Horne, W. S.; Yadav, M. K.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. *J Am Chem Soc* 2004, 126, 15366–15367.
- Angelo, N. G.; Arora, P. S. *J Org Chem* 2007, 72, 7963–7967.
- Claudio Toniolo; Hans Brückner. In *Peptaibiotics: fungal peptides containing alpha-dialkyl alpha-amino acids*; Zürich: Weinheim; New York: Verlag Helvetica Chimica Acta; Wiley-VCH, 2009.
- Whitmore, L.; Chugh, J. K.; Snook, C. F.; Wallace, B. A. *J Pept Sci* 2003, 9, 663–665.
- Stoppacher, N.; Neumann, N. K. N.; Burgstaller, L.; Zeilinger, S.; Degenkolb, T.; Brückner, H.; Schuhmacher, R. *Chem Biodivers* 2013, 10, 734–743.
- Castro, T. G.; Micaelo, N. M. *J Phys Chem B* 2014, 118, 649–658.
- Dickson, H. D.; Smith, S. C.; Hinkle, K. W. *Tetrahedron Lett* 2004, 45, 5597–5599.
- Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V. *Org Lett* 2007, 9, 3797–3800.
- Ye, H.; Liu, R.; Li, D.; Liu, Y.; Yuan, H.; Guo, W.; Zhou, L.; Cao, X.; Tian, H.; Shen, J.; Wang, P. G. *Org Lett* 2013, 15, 18–21.
- Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. *J Saudi Chem Soc* 2012, 16, 97–116.
- Creary, X.; Anderson, A.; Brophy, C.; Crowell, F.; Funk, Z. *J Org Chem* 2012, 77, 8756–8761.
- Horne, W. S.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. *J Am Chem Soc* 2003, 125, 9372–9376.
- Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem Eur J* 2009, 15, 9394–9403.
- Collins, J. M.; Porter, K. A.; Singh, S. K.; Vanier, G. S. *Org Lett* 2014, 16, 940–973.
- Ben Haj Salah, K.; Inguibert, N. *Org Lett* 2014, 16, 1783–1785.
- Chan-Seng, D.; Lutz, J.-F. *ACS Macro Lett* 2014, 3, 291–294.
- Lundquist; Pelletier, J. C. *Org Lett* 2001, 3, 781–783.
- Dorow, R. L.; Gingrich, D. E. *J Org Chem* 1995, 60, 4986–4987.
- Johnson, B. A.; Blevins, R. A. *J Biomol NMR* 1994, 4, 603–614.
- Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic acids*; Wiley-Interscience: New York, 1986.
- Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossvary, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Hsieh, M.-J.; Hornak, V.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A.; Roberts, B. P. *AMBER 11*, University of California, San Francisco, 2010.
- Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K. *J Mol Graph* 1996, 14, 51–55.
- DeLano, W. L. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4* Schrödinger, LLC 2002.

Partie 4 : Triazole scan sur les peptaibols.

A. Introduction

Après avoir étudié le champ d'application des dipeptides Fmoc-Aib ψ [Tz]Xaa-OH et démontré qu'ils pouvaient être utilisés en SPPS pour la synthèse de polytriazoles peptidiques, nous avons étendu cette approche à la synthèse d'analogues de l'alaméthicine F50/5 et de la Bergofungin D1.

Pour l'alaméthicine F50/5, six substitutions utilisant un motif Aib ψ [Tz]Xaa-OH peuvent être envisagées tout en conservant à l'identique la chaîne latérale de l'acide aminé (Xaa) se trouvant du côté C-terminal de l'Aib (Figure 64). De façon analogue trois substitutions peuvent être envisagées pour la bergofungine D1 (Figure 64). Toutefois une des limitations de la stratégie choisie résidait dans l'impossibilité de générer le dipeptide Aib ψ [Tz]Pro-OH. Or dans l'alaméthicine, mais également pour les autres peptaibols la proline se trouvant au milieu de la seconde moitié de l'hélice induit un coude et les deux fragments forment par rapport à l'axe de l'hélice un angle de 20°. ^{185,179} Aussi avons-nous choisi de mimer cette contrainte par le fragment Aib ψ [Tz]Aib-OH en émettant l'hypothèse que le triazole pourrait jouer le même rôle que la proline et séparer le peptide en deux segments hélicoïdaux.

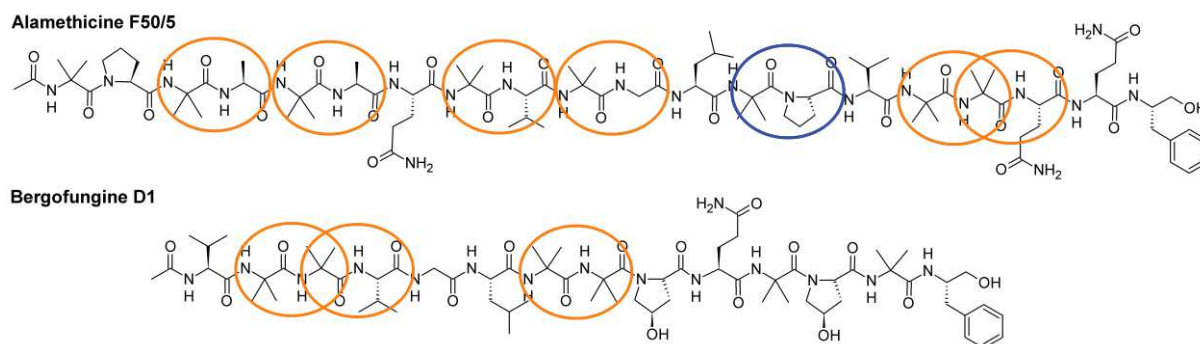


Figure 64 : Point de substitution possible de la liaison amide des enchainement AibXaa par des motifs à triazole de type Aib ψ [Tz]Xaa au sein de l'alaméthicine F50/5 et de la bergofungine D1.

B. Résumé de la synthèse des peptaibols à motifs triazoles

La synthèse des analogues de deux peptaibols a été réalisée en utilisant un synthétiseur automatique assisté par microondes à une échelle de 0,10 mmol. Les couplages sont effectués sur une résine de type 2-chlorotrityle préchargée avec phénylalaninol (loading 0.67 g/mol) avec 5 équivalents d'acides aminés, 5 équivalents de DIC/Oxyma sous irradiation microondes pendant 20 minutes à 70°C. La déprotection du Fmoc est réalisée avec la pipéridine à 20% dans le DMF, l'adduit N-(9-fluorénylméthyl)-pipéridine issu de la déprotection est analysé à l'aide d'un spectrophotomètre UV afin d'évaluer l'efficacité de couplage. Aucune difficulté particulière n'a été observée lors de l'introduction de dipeptides Fmoc-Aibψ[Tz]Xaa-OH. Il est intéressant de noter que pour éviter le clivage de la séquence Aib-Pro (Hyp)¹⁶⁵ nous avons utilisé des conditions de clivage relativement douces (TFA/DCM/TIS/H₂O 47:47:4:2 (v/v) pendant 60 min filtration puis le filtrat est coévaporé avec du cyclohexane pour faciliter l'élimination du TFA). Malgré ces précautions, nous avons constaté dans quelques cas la formation de l'ester de trifluoroacétate en position C-terminale du peptaibols (Figure 65). D'une manière générale le pourcentage de l'ester est aléatoire et peut aller jusqu'à 50%.

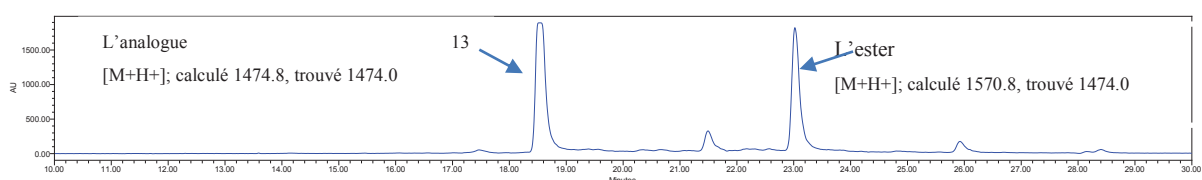


Figure 65 : profil HPLC-ELSD d'un analogue trifluoroacétylé en position C-terminale.

Nous pensons que l'ester se forme lors de l'élimination du TFA et de l'eau à l'aide de l'évaporateur rotatif, la température du bain-marie étant maintenue entre 40 et 45°C. A cette température l'estérification est une réaction secondaire importante (Figure 66).

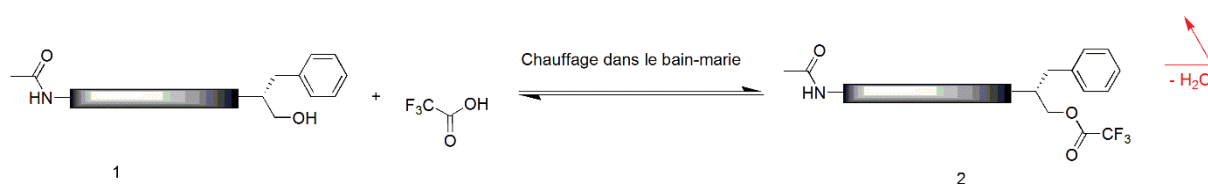


Figure 66 : Réaction d'estérification catalysée par le chauffage

Ce problème est résolu facilement par simple hydrolyse de l'ester avec une solution saturée de Na_2CO_3 ou NaHCO_3 (≈ 1 ml) qui permet une hydrolyse instantanée de l'ester sans dégradation du peptide (Figure 67).

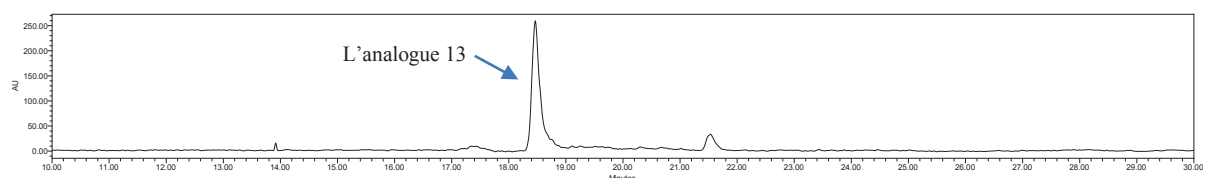


Figure 67 : profil HPLC-ELSD de brut après Hydrolyse de l'ester

Ces résultats et l'étude structurale de ces peptides sont résumés dans une publication en cours de finalisation que nous souhaitons prochainement soumettre à « *Angewandte Chemie International Edition* ». Ces résultats seront complétés par une étude complète de modélisation des peptides issus du scan triazole sous contrainte de RMN réalisée à l'IBMM par le Dr. B. Legrand. De plus le Dr. C. Didierjean de l'université de Lorraine réalise une étude par diffraction des rayons X sur des monocristaux du composé **5h** de la future publication. Cet analogue de l'alaméthicine contient un le dipeptide Aib ψ [Tz]Aib-OH remplaçant l'enchaînement l'Aib₁₃-Pro₁₄ et présente en dichroïsme circulaire une signature identique à celle du peptide natif. Toutefois, il demeure inactif dans les tests biologiques que nous avons réalisés. Ainsi, ce résultat permettrait d'appréhender les préférences conformationnelles induites par le noyau triazole lorsqu'il est inséré dans une séquence peptidique et d'expliquer en partie les résultats biologiques obtenus. Ce résultat conditionnera le choix final du journal.

C. Article 4: 1,2,3-triazole are not so well-disposed as amide bond mimetic. A case study on peptaibols.

1,2,3-triazole are not so well-disposed as amide bond mimetic. A case study on peptaibols.

Khoubab Ben Haj Salah,^[a] Baptiste Legrand,^[b] Nicolas Ruiz,^[c] Vanessa Andreu,^[d] Jean Martinez,^[b] and Nicolas Inguibert*^[a]

Abstract: A 1,2,3-triazole scan allowing the systematic replacement of peptide bond at the C-terminal side of Aib residues was implemented on two helical peptaibols. Structural impacts of these modifications were studied in solution using CD and NMR spectroscopy and correlated with biological activities. While introduction of triazole at the extremities of peptaibols slightly affects the overall structure of peptaibols and consequently their biological activities, other replacements are detrimental for both a correct folding and preserved activities. Thus, 1,2,3-triazole insertion in peptide aiming to stabilize structured peptides must be used with caution since this replacement is not fully conservative of the geometry induced by amide bond, therefore 1,2,3-triazole should not be qualified as an amide bond mimic.

During the last decade, use of 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles (Tz) has generated an huge interest in most of the field of chemistry^[1] thanks to the concomitant discovery by Meldal and Sharpless to render the azide-alkyne cycloaddition first described by Huisgen fully 1-4-regioselective by using copper (I) salts.^{[2],[3],[4]} This reaction now termed copper (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) is one prominent example of click chemistry and was reviewed for its applications in drug development,^{[5],[6],[7]} molecular imaging,^[8] design of macromolecular systems^{[9],[10],[11]}. Introduction of a triazole in a structure generally allows to tune the biological activities through the formation of dendrimers,^{[12],[13]} multivalent ligands^[14] or by insertion onto lipids,^[15] sugars,^[16] phosphonates,^[17] but also by conjugating with reactive species for in situ protein imaging,^[18] and labelling with fluorescent probes^{[19],[20]} or radioactive tracers.^{[21],[22]} Other applications of triazoles included their ability to fix a defined conformation such as β -strand,^{[23],[24]} and α -helix.^{[25],[26],[27]} Furthermore they find applications as enzyme inhibitors,^[23] protein/protein interactions disruptors,^{[28],[29],[30]} mimics of natural products,^[31] self-assembling nanomaterials^{[32],[33]} and even as tools for exploring the chemical

space by diversity orientated synthesis.^[34]

Peptide chemistry is certainly one of the field that has benefited the most of click chemistry.^{[35],[36],[37],[38]} CuAAC was applied to the synthesis of otherwise inaccessible cyclic peptidomimetics, to the assembly of unprotected peptides fragments to yield triazole-containing proteins with conservation of their tertiary structures.^{[39],[40]} This tremendous interest is partly due to the fact that the 1,2,3-triazole ring is considered as an non-classical amide bond bioisostere.^{[41],[42]} Indeed, its hydrogen bonding capacity and planar character have raised considerable interest to use this heterocycle as a *trans* peptide bond surrogate (Figure 1). However the stretching of about 1 angström observed between the two consecutive C α carbons should induce conformational differences.

Consequently the concept of triazole as an amide bond mimic has emerged and was explored mainly on cyclic peptides with already locked conformation^{[43],[44],[45],[46]} but also on linear peptides such as enkephalin,^[47] bombesin,^[48] to judge how a triazole impact their biological activities or increase their metabolic stabilities. To the best of our knowledge only one study was reported to monitor triazole insertion along the sequence of peptides within a well-defined secondary structure of the alpha-helical coiled coil structure type.^[49] However in this case the peptides oligomerize in tetrameric states that in turn stabilize the helical structures and thus do not allow to fully define the amide to triazole substitution effect. Another drawback of the study is that the native sequence is not fully conserved because the XaaLeu (Xaa: Lys or Glu) dipeptides are replaced by Gly[ψ Tz]Leu **3b** thus offering more conformational flexibility permitting to counterbalance the stretching induce by triazole. It is also noteworthy that the systematic replacement of an amide bond in a peptide backbone is intrinsically impaired by the necessity to synthesize the enantiopure 2-propargylamine **1** as an amino acid equivalent which will be reacted with an alpha-azido acid **2** to yield the corresponding dipeptide **3** (Figure 1).

Thus to undertake an in-depth study of amide substitution by a triazole, structured model peptides presenting repetitive patterns of achiral amino acids were sought prompting us to consider the peptaibols as ideal candidates. Indeed, these antibiotic peptaibols are folded in solution as a stable helix due to a high proportion of aminoisobutyric acid (Aib) acting as helix inducer.^[50] The AibXaa dipeptides are evenly distributed in the sequence and their substitutions by Aib[ψ Tz]Xaa motives **3c** will allow not only to realize a triazole scan but also to monitor their structures and correlate them with their biological activities. In order to realize this study the 14 residues long bergofungin D **4a** and 20-mer alamethicin F50/5 **5a** have been selected on account of their ease of synthesis and different lengths.^[51] Furthermore a preliminary study have shown that dipeptides of general structure FmocAib[ψ Tz]XaaOH **2** were easily obtained and suitable for solid phase peptide synthesis.^[52]

Herein, we reported the solid phase peptide synthesis (SPPS) under microwave irradiation of five analogs of bergofungin D and nine analogs of alamethicin F50/5 containing

[a] K. Ben Haj Salah,^[*] Prof. N. Inguibert
Université de Perpignan Via Domitia, Centre de Recherche Insulaire
et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE), USR CNRS 3278,
centre de phytopharmacie, bâtiment T, 58 avenue P. Alduy, 66860
Perpignan, (France)

[b] Dr. B. Legrand,^[*] Prof. J. Martinez
Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247
CNRS, Université de Montpellier, 15 avenue Charles Flahault, BP
14491, 34093 Montpellier (France)

[c] Dr. N. Ruiz
Université de Nantes - UFR de Sciences pharmaceutiques et
biologiques – Laboratoire Mer Molécules Santé. 9 rue Bias - BP
53508 44035 Nantes (France)

[d] V. Andreu
Akinao, 58 avenue P. Alduy, 66860 Perpignan, (France).

[*] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document. *(Please delete this text if not appropriate)*

Bergofungin analog **4b** with a modification at the N-ter side partly retains its helical character while for the other analogs **4c-f** containing single **4b-d** or multiple **4e-f** mutations the helical structure is completely lost as shown by the flattening of the CD spectra (SI).

Next, biological activities of the compounds were evaluated in a dose-response cytotoxicity assay on KB cell lines. In complement, a growth inhibition assay on gram positive bacteria (*Bacillus subtilis*), a primary target of peptaibols, was performed at a dose of 50 µg/mL which is ten-fold higher than the IC50 determined for alamethicin. Unfortunately Bergofungin D and its analogs precipitate, when placed in aqueous solution even with 1% DMSO as a co-solvent thus precluding biological assays. In comparison with bergofungin D, the longer alamethicin presents a more defined CD spectra thus allowing to address more precisely the mutation effect (Figure 2). Indeed, mutations **5b**, **5f** and **5g** close from the N and C terminal sides affect only slightly the overall helical structure. Intriguingly, mutation of the Aib₁₃-Pro₁₄ dipeptide by the non-equivalent Aib_ψ[Tz]Aib motif yield to compound **5h**, which CD spectra is identical to the one of native alamethicin.

Accordingly to this, compounds **5b** and **5f** retained partly their biological activities, with a more pronounced activity drop when the modification occurs at the N terminal side which corresponds to the longer part of the helix. Surprisingly, compound **5g-h** were found inactive in both biological assays certainly because the triazole alters the hydrophilic face of the amphipathic helix thus certainly preventing the channel formation. For the other single **5c-e** or multiple **5i-j** mutations the analogs adopt a disordered conformation and are inactive.

(Introduire la partie RMN)

In summary, we report a triazole scan on helically folded bioactive peptaibols. Application of this strategy demonstrated that triazole strongly affect not only peptide's secondary structure but also as a consequence, decreases their bioactivities. In view of these results, we could conclude that the concept of triazole as an amide bond mimetic should be used with circumspection as the conformational preferences of the triazole are till yet unknown. Work are currently in progress to determine the geometry that triazole induces on simple peptides.

Experimental Section

Experimental Details.

Acknowledgements ((optional))

We thanks: Comité des Pyrénées Orientales de la Ligue Nationale Contre le Cancer and the Bonus Qualité Recherche of Perpignan Via Domitia University, MESR for financial supports. The spectroscopic experiments have been performed using the Biodiversité et Biotechnologies Marines (Bio2Mar, <http://bio2mar.obs-banyuls.fr/fr/index.html>) facilities at the University of Perpignan.

Keywords: Click Chemistry • Amide bond mimics • Peptaibols • keyword 4 • keyword 5

- [1] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [2] *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357–396.
- [3] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [4] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711.
- [5] P. Fabbrizzi, G. Menchi, A. Guarna, A. Trabocchi, *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 1467–1477.
- [6] P. Thirumurugan, D. Matosiuk, K. Jozwiak, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905–4979.
- [7] H. Li, R. Aneja, I. Chaiken, *Molecules* **2013**, *18*, 9797–9817.
- [8] C. Mamat, T. Ramenda, F. R. Wuest, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2009**, *6*, 21–34.
- [9] L. Xu, Y. Li, Y. Li, *Asian J. Org. Chem.* **2014**, *3*, 582–602.
- [10] B. Le Droumaguet, K. Velonia, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 1073–1089.
- [11] M. Meldal, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 1016–1051.
- [12] I. Dijkgraaf, A. Y. Rijnders, A. Soede, A. C. Dechesne, G. W. van Esse, A. J. Brouwer, F. H. M. Corstens, O. C. Boerman, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 935–944.
- [13] D. T. S. Rijkers, G. W. van Esse, R. Merks, A. J. Brouwer, H. J. F. Jacobs, R. J. Pieters, R. M. J. Liskamp, *Chem. Commun.* **2005**, 4581–4583.
- [14] M. Fiore, N. Berthet, A. Marra, E. Gillon, P. Dumy, A. Dondoni, A. Imberty, O. Renaudet, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7113–7122.
- [15] T. Wright, A. Brooks, A. Didsbury, J. McIntosh, K. Burkert, H. Yeung, G. Williams, P. Dunbar, M. Brimble, *Synlett* **2013**, *24*, 1835–1841.
- [16] D. J. Lee, K. Mandal, P. W. R. Harris, M. A. Brimble, S. B. H. Kent, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5270–5273.
- [17] S. H. Yang, D. J. Lee, M. A. Brimble, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5604–5607.
- [18] M. Morell, T. Nguyen Duc, A. L. Willis, S. Syed, J. Lee, E. Deu, Y. Deng, J. Xiao, B. E. Turk, J. R. Jessen, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9139–9148.
- [19] M. A. Kamaruddin, P. Ung, M. I. Hossain, B. Jarasrassamee, W. O'Malley, P. Thompson, D. Scanlon, H.-C. Cheng, B. Graham, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 329–331.
- [20] D. Ding, J. Liang, H. Shi, R. T. K. Kwok, M. Gao, G. Feng, Y. Yuan, B. Z. Tang, B. Liu, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *2*, 231–238.
- [21] A. Monaco, V. Zoete, G. C. Alghisi, C. Rüegg, O. Michelin, J. Prior, L. Scapozza, Y. Seimille, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6068–6072.
- [22] B. Shen, J. Jeon, M. Palner, D. Ye, A. Shuhendler, F. T. Chin, J. Rao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10511–10514.
- [23] A. D. Pehere, M. Pietsch, M. Gütschow, P. M. Neilsen, D. S. Pedersen, S. Nguyen, O. Zvarec, M. J. Sykes, D. F. Callen, A. D. Abell, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 7975–7981.
- [24] A. D. Pehere, A. D. Abell, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1330–1333.
- [25] S. Cantel, A. L. C. Isaad, M. Scrima, J. J. Levy, R. D. DiMarchi, P. Rovero, J. A. Halperin, A. M. D'Ursi, A. M. Papini, M. Chorev, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5663–5674.
- [26] M. Scrima, A. Le Chevalier-Isaad, P. Rovero, A. M. Papini, M. Chorev, A. M. D'Ursi, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 446–457.
- [27] L. Frankiewicz, C. Betti, K. Guillemyn, D. Tourvé, Y. Jacquot, S. Ballet, *J. Pept. Sci.* **2013**, *19*, 423–432.
- [28] J. Chen, Z. Nikolovska-Coleska, C.-Y. Yang, C. Gomez, W. Gao, K. Krajewski, S. Jiang, P. Roller, S. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3939–3942.
- [29] V. Goncalves, B. Gautier, A. Regazzetti, P. Coric, S. Bouaziz, C. Garbay, M. Vidal, N. Inguibert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5590–5594.
- [30] R. A. Turner, A. G. Oliver, R. S. Lokey, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5011–5014.
- [31] J. Zhang, J. Kemmink, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4498–4500.
- [32] W. S. Horne, C. D. Stout, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9372–9376.
- [33] A. D. Pehere, C. J. Sumbly, A. D. Abell, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 425.
- [34] A. Isidro-Llobet, T. Murillo, P. Bello, A. Cilibrizzi, J. T. Hodgkinson, W. R. J. D. Galloway, A. Bender, M. Welch, D. R. Spring, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 6793–6798.
- [35] Y. L. Angell, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1674–1689.
- [36] D. S. Pedersen, A. Abell, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 2399–2411.
- [37] X. Li, *Chem. - Asian J.* **2011**, *6*, 2606–2616.
- [38] J. M. Holub, K. Kirshenbaum, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1325–1337.

- [39] I. E. Valverde, F. Lecaille, G. Lalmanach, V. Aucagne, A. F. Delmas, *Angew. Chem.-Int. Ed.* **2012**, *51*, 718–722.
- [40] V. Aucagne, I. E. Valverde, P. Marceau, M. Galibert, N. Dendane, A. F. Delmas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11320–11324.
- [41] G. A. Patani, E. J. LaVoie, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3147–3176.
- [42] M. Nahrwold, T. Bogner, S. Eissler, S. Verma, N. Sewald, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1064–1067.
- [43] V. D. Bock, D. Speijer, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 971–975.
- [44] Y. Liu, L. Zhang, J. Wan, Y. Li, Y. Xu, Y. Pan, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10728–10734.
- [45] J. M. Beierle, W. S. Horne, J. H. van Maarseveen, B. Waser, J. C. Reubi, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.-Int. Ed.* **2009**, *48*, 4725–4729.
- [46] M. Tischler, D. Nasu, M. Empting, S. Schmelz, D. W. Heinz, P. Rottmann, H. Kolmar, G. Buntkowsky, D. Tietze, O. Avrutina, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3708–3712.
- [47] A. Proteau-Gagné, K. Rochon, M. Roy, P.-J. Albert, B. Guérin, L. Gendron, Y. L. Dory, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5267–5269.
- [48] I. E. Valverde, A. Bauman, C. A. Kluba, S. Vomstein, M. A. Walter, T. L. Mindt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8957–8960.
- [49] W. S. Horne, M. K. Yadav, C. D. Stout, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366–15367.
- [50] S. Aravinda, N. Shamala, R. S. Roy, P. Balaram, *J. Chem. Sci.* **2003**, *115*, 373–400.
- [51] K. Ben Haj Salah, N. Inguibert, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1783–1785.
- [52] K. Ben Haj Salah, B. Legrand, S. Das, J. Martinez, N. Inguibert, *Pept. Sci.* **2015**, n/a–n/a.
- [53] R. Subirós-Funosas, R. Prohens, R. Barbas, A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15*, 9394–9403.
- [54] J. M. Collins, K. A. Porter, S. K. Singh, G. S. Vanier, *Org. Lett.* **2014**, DOI 10.1021/ol4036825.
- [55] A. Berg, M. Ritzau, W. Ihn, B. Schlegel, W. F. Fleck, S. Heinze, U. Grafe, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1996**, *49*, 817–820.
- [56] L. Kredics, A. Szekeres, D. Czifra, C. Vágvölgyi, B. Leitgeb, *Chem. Biodivers.* **2013**, *10*, 744–771.
- [57] R. O. Fox, F. M. Richards, *Nature* **1982**, *300*, 325–330.
- [58] M. De Zotti, B. Biondi, C. Peggion, Y. Park, K.-S. Hahm, F. Formaggio, C. Toniolo, *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 585–594.

D. Résultats complémentaires. Amélioration de l'activité biologique de l'alaméthicine.

1. Introduction.

Un des freins actuels à l'utilisation de peptide à des fins thérapeutiques est leur faible capacité à traverser les membranes cellulaires, leur instabilité métabolique et leur biodisponibilité orale limitée.^{186,187} Toutefois, les peptides de par leur sélectivité et affinité pour leurs cibles moléculaires pourraient constituer les médicaments du futur si leur propriétés physicochimiques sont améliorées.¹⁸⁸ Pour développer des peptides présentant une biodisponibilité augmentée, la modification des propriétés physicochimiques peut faire intervenir la conjugaison à un composé lipophile contribuant à une meilleure biodisponibilité et simultanément à un PEG pour accroître la résistance à la protéolyse. C'est cette approche qui a été choisie pour générer des formes injectables d'insuline.¹⁸⁹ Cette approche présente néanmoins l'inconvénient d'ajouter deux nouvelles entités sur la molécule parente ce qui peut réduire son affinité pour sa cible. Une autre solution consiste à additionner au peptide cible de nouvelles fonctions permettant soit une reconnaissance par des récepteurs impliqués dans le transport actif des composés au travers des membranes, soit facilitant leur transport au travers de ces dernières. Nous avons pour notre part recherché un fragment de taille aussi réduite que possible, permettant à la fois d'augmenter le caractère lipophile du peptide mais également d'accroître sa résistance à la protéolyse. C'est dans ce cadre général que se situe l'approche que nous avons appliqué à l'alaméthicine car c'est un candidat idéal pour mener à bien des études visant à améliorer l'interaction de peptides avec les membranes cellulaires. En effet, si le mécanisme d'action des peptaibols reste encore débattu, de nombreuses études de ce peptide ont été réalisées au contact de membranes artificielles qui montrent que l'hélice amphipathique s'ancre à la surface de la membrane par sa face hydrophobe. Le peptide plonge ensuite dans la membrane par son côté N-terminal.^{183,149,190} Cette orientation de

l'alaméthicine dans les membranes a été confirmée également par RMN du solide dans des membranes artificielles de 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPMC). Pour cette étude les auteurs ont produit des analogues d'alaméthicine F30 dans laquelle les Aib, 5, 10 et 16 avaient été remplacés par leur isostère trifluoroalanine (Figure 68). Ces travaux ne mettent pas en évidence de variation de l'activité biologique de l'alaméthicine tant du point de vue de sa sélectivité pour les bactéries à gram+ qu'en termes d'affinité. Par ailleurs l'introduction des groupements trifluorométhyles n'occasionne pas de variation notable de la polarité de la molécule, en effet les temps de rétention en HPLC demeurent semblables. Par contre ils mettent en évidence une inclinaison de l'alaméthicine d'un angle τ de 8° par rapport à la verticalité, ce qui est compatible avec le modèle en tonneau (Figure 68).¹⁹¹

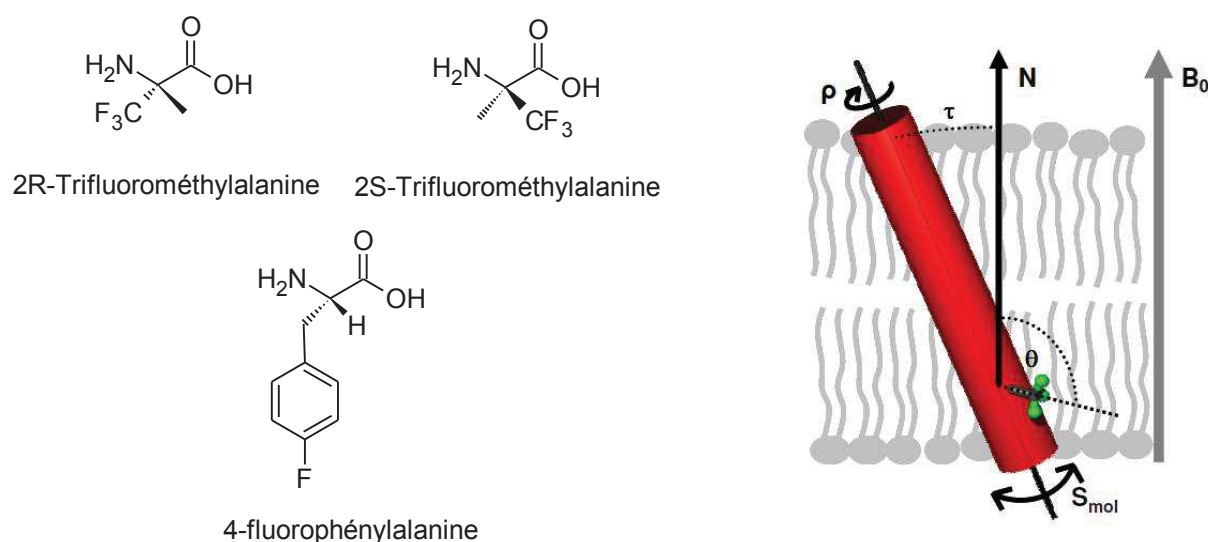


Figure 68: Aminoacides fluorés. Effet de la trifluorométhylalanine sur l'orientation de l'alaméthicine dans des membranes artificielles de DPMC.

Des résultats analogues aux précédents ont été obtenus en utilisant de la 4-fluorophénylalanine insérée dans de la trichogin GAIV, ou en introduisant un groupement trifluoroacétyl dans des séquences modifiées de l'alaméthicine.^{192,193}

Nous avons donc choisi d'utiliser des cycles aromatiques porteurs de substituants fluorés pour accroître le caractère lipophile et de les faire supporter par un triazole pour limiter la perte de solubilité.¹⁹⁴ Afin que ce groupement soit facile à introduire en SPPS nous avons décidé de le

placer du côté N-terminal de l'alaméthicine en remplacement du premier Aib N-acétylé (Figure 69).

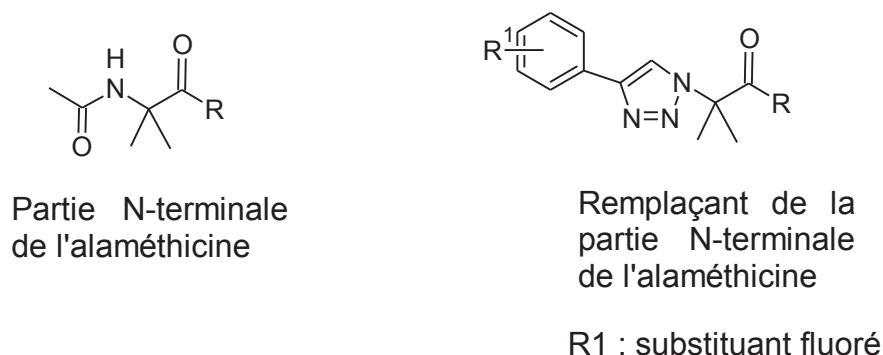


Figure 69: Stratégie adoptée pour le remplacement de la partie N-Ter de l'alamethicine.

Un des avantages de cette stratégie est qu'elle repose essentiellement sur des méthodologies que nous avons mises en place dans les étapes précédentes de notre étude.

2. Insertion d'un tag hydrophobe en partie N-terminale de l'alaméthicine et essais biologiques.

Les différents groupements utiles à cette étude ont été obtenus de façon classique. La première étape consiste en la transformation de l'acide amino-isobutyrique en azidoacide par une réaction de diazo transfert. L'azoture **1** ainsi formé est ensuite engagé en réaction avec l'alcyne aromatique pour conduire aux composés **2-4** (Figure 70).

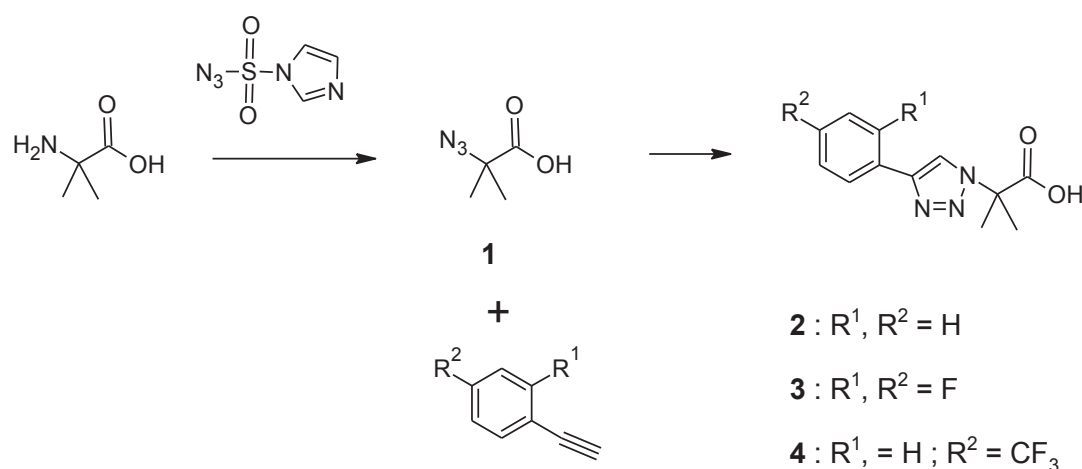


Figure 70 : Synthèse du tag hydrophobe.

Ces triazoles sont ensuite introduits dans la séquence de l'alaméthicine en utilisant la synthèse sur support précédemment développée pour conduire aux trois peptides avec des rendements après purification se situant autour de 40% (Figure 71). L'analyse par HPLC révèle que ces trois composés (5-7) ont des temps de rétention similaires et qu'ils sont plus hydrophobes que l'alaméthicine. Ainsi l'introduction du groupement phényltriazole ne modifie que légèrement la polarité de ces analogues en comparaison avec l'alaméthicine.

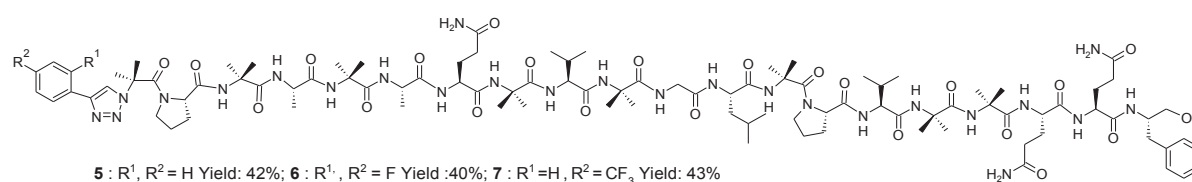


Figure 71 : Structures des alaméthicines porteuses d'un tag hydrophobe en N-ter.

Les produits synthétisés ont ensuite été testés de façon analogue aux composés précédemment synthétisés sur cellules KB et deux lignées de bactéries à gram positif. Le composé 5 portant uniquement sur le noyau triazole un groupement phényle présente une CI₅₀ comparable à celle de l'alaméthicine. Par contre l'introduction de groupement fluoré sur le noyau phényle s'accompagne d'un gain d'affinité d'un facteur 7 pour le composé 7 qui est le plus actif (Tableau 4).

Tableau 4: Résultats des tests des analogues d'alaméthicine sur la croissance cellulaire des cellules KB et de deux bactéries à gram positif (CI₅₀).

Composé	Alam F50/5	5	6	7
<i>Bacillus subtilis</i>	5 µg /ml	7 µg /ml	1.5 µg /ml	0.7 µg /ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	9 µg /ml	5 µg /ml	2.3 µg /ml	2.3 µg /ml
Cellules KB	18±0.6 µg /ml	6.3 µg /ml	3.9±0.8 µg /ml	2.9±0.2 µg /ml

Ces résultats étant encourageants ont conduit au dépôt d'une demande d'invention. Cette stratégie sera exemplifiée en modifiant la position et le type de substituant portés par le noyau

phényle. Nous envisageons également de modifier la nature de l'aromatique porté par le groupement triazole.

E. Conclusion.

La CuAAC par sa relative facilité de mise en œuvre demeure très largement utilisée dans le domaine de la chimie des peptides, ou elle reste une méthode de choix pour réaliser des réactions de ligations entre fragments peptidiques, des cyclisations, ou encore pour conjuguer une entité non peptidique à un peptide. Toutefois, cet hétérocycle bien que souvent décrit comme un analogue de la liaison amide ne possède pas les mêmes propriétés structurales que cette dernière. Ainsi l'insertion de noyau triazole en remplacement d'une liaison peptidique dans une séquence peptidique de faible taille possédant une structure secondaire établie doit être envisagée avec prudence comme l'ont démontré nos travaux portant sur le scan triazole des peptaibols, ou sur l'amélioration des propriétés physicochimiques de l'alaméthicine par remplacement du résidu acétyl en position N-terminale par un groupement phényltriazole.

Chapitre 3: Synthèse d'analogues simplifiés à motif triazole de la tamandarine.

Partie 1 : Présentation des composés dérivés de didemnine et tamandarine

A. Isolation et structure des didemnines et des tamandarines

La tamandarine et la didemnine sont des cyclodepséptides de la même famille qui ont été isolés d'ascidies. C'est en 1981 suite à leur extraction et purification de l'ascidie *Trididemnum solidum* récoltée en mer des Caraïbes que les structures des didemnines ont été rapportées pour la première fois.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ Peu de temps après, Vervoort et Fenical isolent les tamandarines A et B à partir d'une ascidie non identifiée de la famille *Didemnidae* prélevée sur un récif au large de la côte du village brésilien de Porto de Galinhas (Figure 72).¹⁹⁸

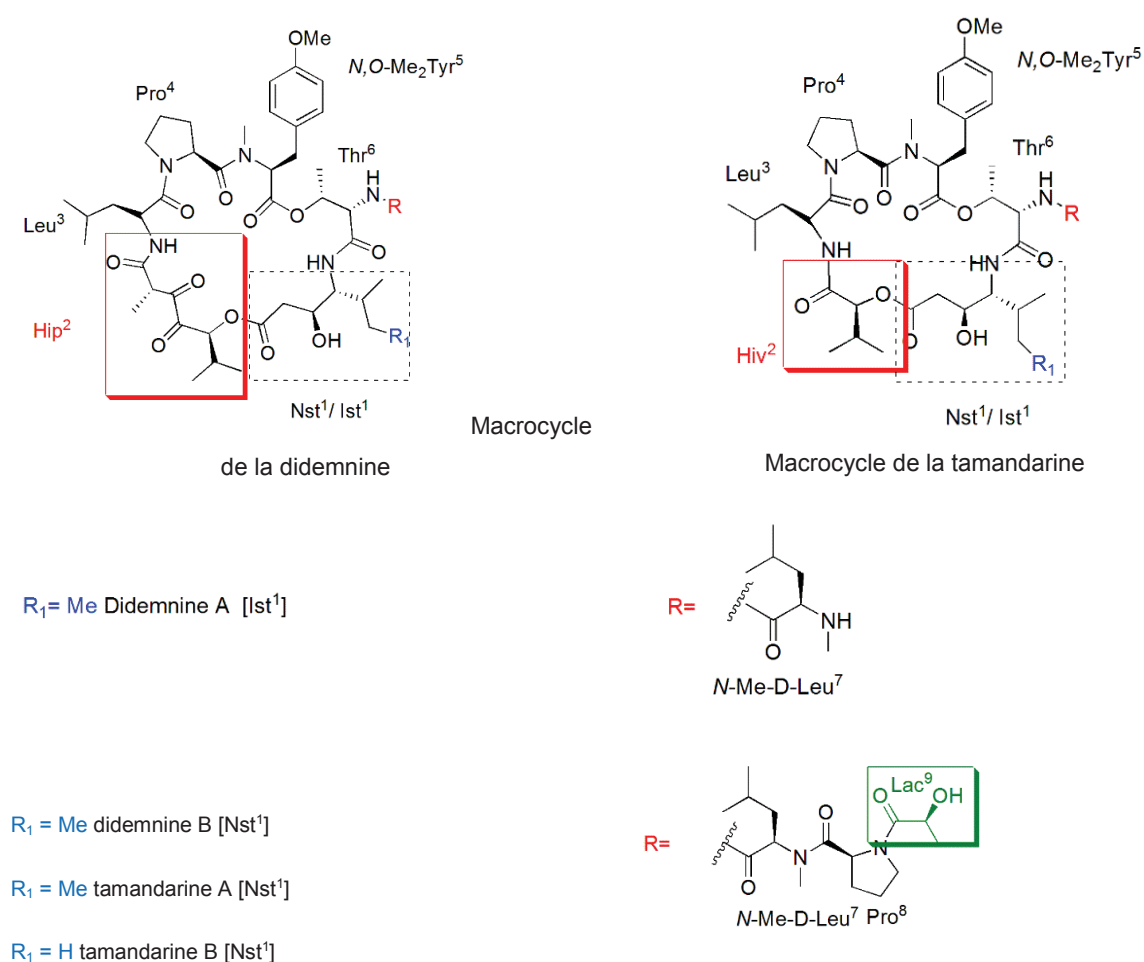


Figure 72 : Structures des didemnines et tamandarines majoritaires

Ces peptides se caractérisent par la présence dans le macrocycle d'acides aminés non protéinogéniques comme la norstatine ou l'isostatine, la N,O-diméthyltyrosine et d'un acide gras tel l'acide α -(- α -hydroxyisovaléryl) propionique (Hip) présent dans la didemnine alors

que le macrocycle de la tamandarine possède un fragment plus simple l'acidehydroxyisovalérique (Hiv). Ce macrocycle porte greffé à l'amine de la thréonine une chaîne pendante de un à plusieurs aminoacides, commençant toute par une N-méthyl-(D)-leucine. Ces caractéristiques structurales ne laissent aucun doute sur une biosynthèse hybride par voie NRPS/PKS. C'est ce qui a été récemment démontré.

B. Biosynthèse

Matsuzaki et al¹⁹⁹ ont suggéré que la didémnine B est synthétisée non pas par l'ascidie, mais par une bactérie *Tristrella mobilis* qui se trouve sur l'ascidie. Un peu plus tard, une voie de biosynthèse de la didemnine B a été proposée suite au séquençage du génome de la bactérie.²⁰⁰ L'analyse du génome de *Tristrella mobilis* a révélé la présence de huit gènes codant des NRPS et deux codant des PKS. Treize modules sont nécessaires pour la synthèse de la didémnine B, ils présentent l'organisation classique que nous avons décrite en introduction et comprennent les quatre principaux domaines : adénylation, condensation, thiolation et thioestérase (Figure 73).

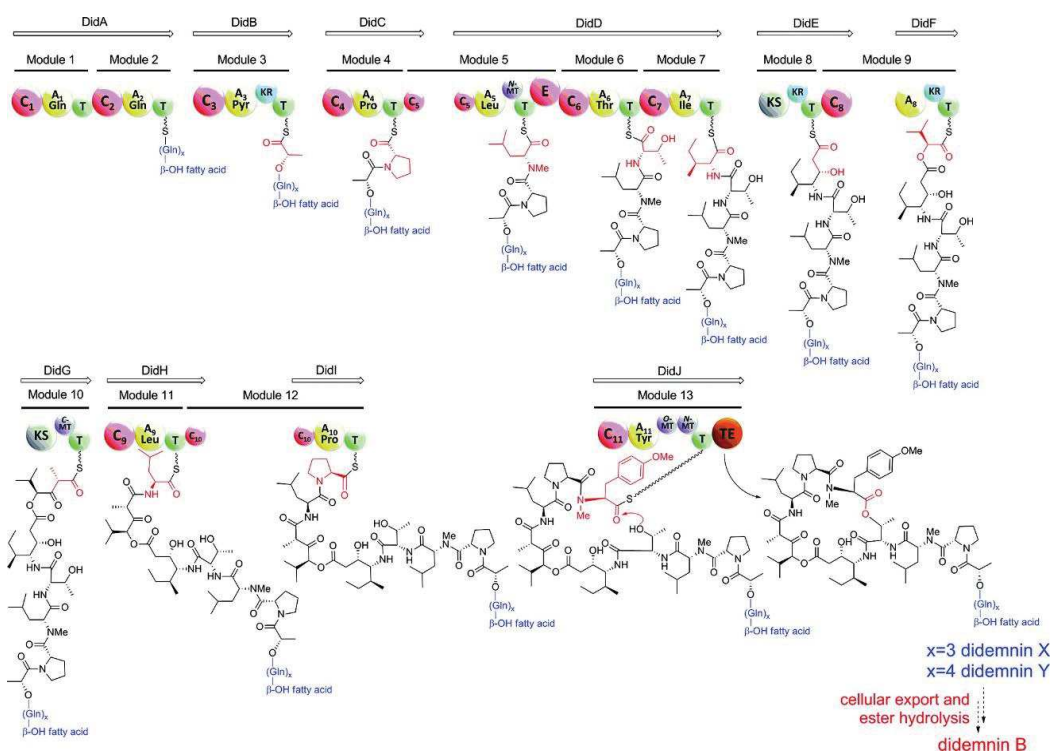


Figure 73 : Voie de biosynthèse proposée des didemnines [Domaine C (condensations) ; A (adénylation) ; E (épimérase) ; KR (cétoréductase) ; KS (β -cétocoacyl synthase) ; MT (méthyltransférase) ; T (thiolation) ; TE (thioestérase)].

Le domaine d'adénylation 2 supporte une séquence d'adressage à la membrane comportant plusieurs glutamines porteuses d'un acide gras. Son transfert au module 3 permet l'introduction du pyruvate qui est ensuite réduit en lactate par une kéto-reductase. Les modules 4 à 7 sont responsables de l'introduction du térapeptide Pro-DMeLeu-Thr-Ile. C'est sur le module 5 qu'une épimérase et une méthyltransférase assurent la transformation de la leucine. La synthèse se poursuit pas à pas par insertion successive des différents fragments jusqu'à la cyclisation qui est initiée par une thioestérase.

C. Activités biologiques des didemnines et tamandarines.

Dès le début de leur étude les didemnines ont montré des activités anti tumorale, antivirale et immunosuppressive à de très faibles concentrations puisque ça peut aller jusqu'au femtomolaires.²⁰¹ Ces activités impressionnantes ont très rapidement conduit au lancement des premiers essais cliniques, ce qui constituait une première pour produit naturel d'origine marine. Si les études d'activités biologiques initiales étaient relativement larges, elles se sont ensuite essentiellement concentrées sur l'effet antitumoral. L'activité anti-tumorale de ces deux peptides a été testée sur cellules L1210, les didemnines A et B ont montré une inhibition de croissance à 10 nM et 1 nM respectivement. La didemnine B était généralement plus efficace que la didemnine A *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats ont été confirmés sur d'autres types de cellule et d'une façon générale la didemnine B présente des activités supérieures à la didemnine A.^{196,202} Ainsi les résultats biologiques ont démontré l'importance de la chaîne pendante. Malgré ces résultats encourageants, les essais cliniques ont été abandonnés en raison de la toxicité de la didemnine B.^{203,204} En 1991 un nouvel analogue est isolé il s'agit de la dehydrodidemnine B, ce composé est trois fois plus actif que la didemnine B et est efficace dans le traitement de certaines formes de cancers leucémie, mélanome et poumon. La seule différence entre les deux composés se trouve au niveau de la chaîne latérale, la dehydrodidemnine B possède une fonction cétone au lieu d'un alcool secondaire.

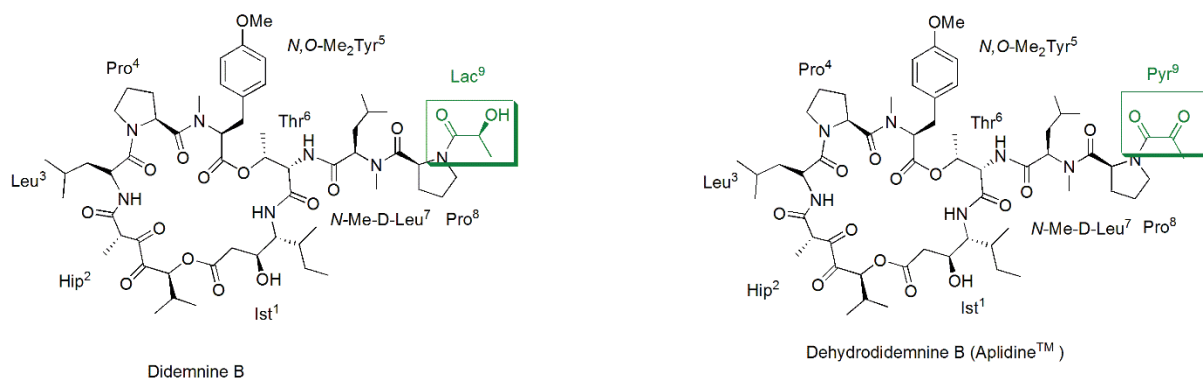


Figure 74 : structure de la Didemnine B et la dehydrodidemnine B (Aplidine™)

Il s'avère que la fonction cétone présente dans ce produit naturel a amélioré significativement sa valeur thérapeutique. Les résultats obtenus pendant les essais précliniques et cliniques en phase I, ont montré que l'activité antitumorale de la dehydrodidemnine B a été améliorée par rapport à la didemnine B de plus, la toxicité a été considérablement diminuée.^{197,205,206} À ce jour, ce composé a terminé les essais cliniques de phase II et est actuellement en phase III. L'aplidine a reçu en Europe et aux Etats-Unis le statut de médicament orphelin pour le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique et du myélome multiple des os.^{207,208}

Les activités de la tamandarine B et de la didemnine B ont également été comparées. Ces résultats montrent une activité antitumorale et cytotoxique de la tamandarine B légèrement plus importante que la didemnine B (Tableau 5).²⁰⁹

	CI ₅₀	CL50
Didemnine B	13 μM	3.8 μM
Tamandarine B	2.3 μM	1.4 μM

Tableau 5 : les tests biologiques ont été effectués sur des cellules tumorales NCI-60. Les concentrations pour l'inhibition de 50% de la croissance (IC₅₀) et la Concentration Létale (CL₅₀).

D. Etudes structurales

Afin d'affiner l'étude des relations structure/activité des études par RMN et diffraction des rayons X ont été entreprises pour déterminer si ces composés adoptaient une conformation particulière.^{210,211,198} En solution la dehydrodidemnine B existe sous deux conformères,

stabilisés par la mise en place d'un jeu de liaison hydrogène différent (Figure 75). Le premier est stabilisé par une liaison H entre l'hydrogène porté par la liaison amide du résidu Thr⁶ et le carbonyle du pyruvate. Pour le deuxième la liaison H s'établit entre la fonction cétone du pyruvate et l'hydrogène porté par la liaison amide de résidu Thr⁶.

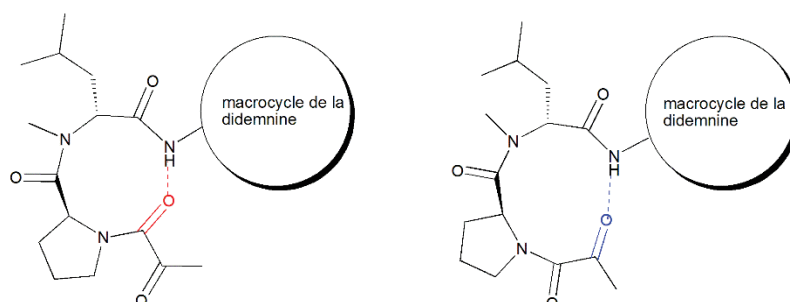


Figure 75 : Liaison hydrogène dans les didemnines contribuant à la formation de deux conformères. Ces deux conformères sont suffisamment stables pour être observés en HPLC sous forme de deux pics avec un ratio de 55/45. Cependant une coalescence des pics est observée lorsque la colonne est chauffée à 50°C. La structure 3D déterminée par RMN a montré que la conformation de la tamandarine A et de la didemnine B sont très similaires et les mêmes liaisons hydrogènes sont présentes. Il existe trois liaisons hydrogène stabilisant ces structures ; la première entre le carbonyle du résidu lactyl⁹ et le proton amide de la thréonine⁶ ; la deuxième entre le carbonyle de la *N*-méthyl-*D*-leucine⁷ et le proton amide de la leucine³, et la troisième entre le carbonyle de la leucine³ pour le proton de l'amine de l'isostatine.¹⁹⁸

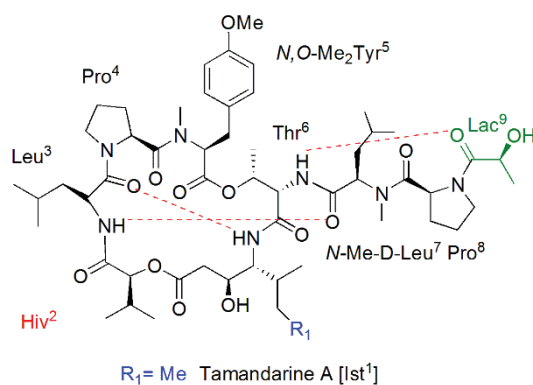


Figure 76 : Liaisons hydrogènes intramoléculaires stabilisant les conformères de la tamandarine.

Ces liaisons hydrogène produisent un macrocycle "plié sous la forme de huit".¹⁹⁸

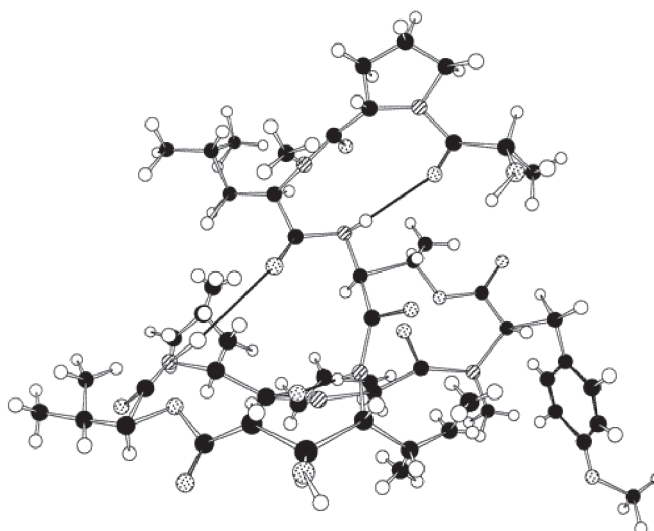


Figure 77 : Structure tridimensionnelle déterminée par RMN d'un conformère de la tamandarine

E. Synthèse des didemnines et les tamandarines

Depuis 1987, plusieurs stratégies de synthèse ont été appliquées à l'obtention des didemnines, tamandarines et de leurs analogues. Ces voies de synthèse se différencient principalement par le choix du point de macrocyclisation et le choix des agents de couplage.²¹² Ces synthèses sont réalisées en solution et reposent sur des approches convergentes. Ces dernières nécessitent la préparation de fragments peptidiques, sous forme de dipeptide ou tripeptide qui sont ensuite assemblés pour permettre la construction d'un précurseur linéaire qui est cyclisé sous haute dilution, telle que celles développées par l'équipe de Joullié pour la synthèse des tamandarines (Figure 78).^{209,213-216}

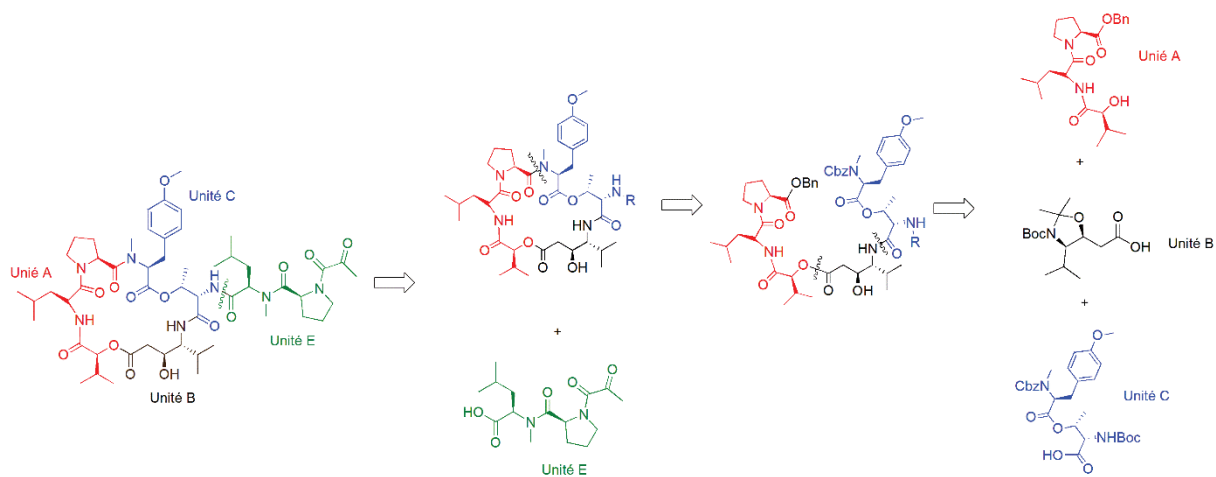


Figure 78 : Schéma rétrosynthétique de la tamandarine B.

F. Résumé des relations structure/activité établies pour les didemnines et les tamandarines

Les relations structure/activité des tamandarines et didemnines ont été intensément étudiées et rapportées dans plusieurs revues.^{197,212,23} La plupart des modifications ont porté sur la chaîne pendante et les dérivés ont généralement été obtenus par hémisynthèse à partir de la didemnine A. L'ensemble des résultats confirment l'importance du résidu N-méthyl-D-leucine et de la proline qui sont impliquées dans la formation d'un coude essentiel à l'activité biologique. Ainsi, la conformation de cette chaîne doit être conservée pour préserver l'activité biologique.

Au niveau du macrocycle différentes modifications ont été réalisées, tout d'abord dans le but de diminuer une instabilité métabolique liée aux ponts esters. Ainsi, les remplacements de la thréonine⁶ par l'acide (2S)-diaminopropanoïque et de l'acide hydroxyisovalérique par la valine n'altèrent pas la cytotoxicité (Figure 79).²¹⁷ Des tests ont ensuite été réalisés pour mettre en évidence l'importance du résidu isostatine. Le remplacement par une norstatine n'induit pas de variation de l'activité ainsi, le groupement isobutyl en position 5 peut être remplacé par un isopropyl que l'on trouve dans la tamandarine B (Figure 79). Différents stéréoisomères de l'isostatine ont été testés, montrant que la stéréochimie de ce composé sur l'activité des analogues dépend essentiellement du carbone 4, avec des variations des activités d'un facteur

2 à 100.²¹⁸ La déshydratation ou l'acétylation en position 3 de l'hydrostatine s'accompagne seulement d'une perte d'activité d'un facteur 7. La substitution de l'isostatine par un analogue contraint l'acide(S,S,S)-β-hydroxy-γ-aminocyclohexanecarboxylique (**1**) conduit à un composé présentant la même conformation que le produit natif, mais pour lequel la diminution de liberté conformationnelle s'accompagne d'une perte d'activité d'un facteur 20 (Figure 79).²¹⁹

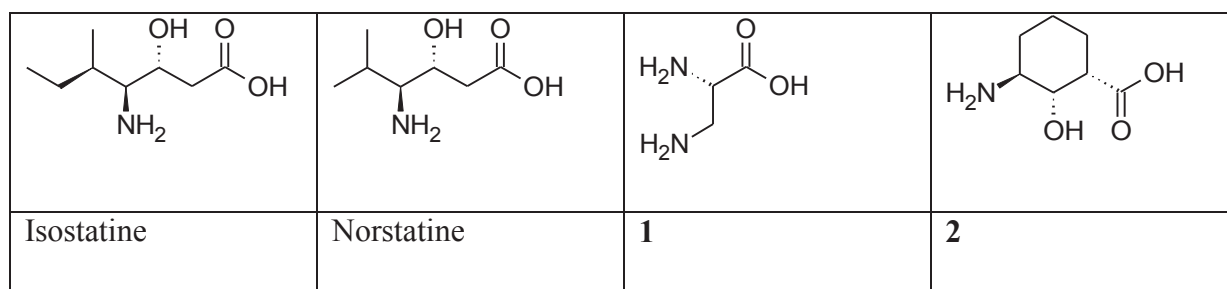


Figure 79 : Groupements utilisés dans l'étude du macrocycle.

Les autres modifications ont porté sur le remplacement de la N,O-diméthyltyrosine par la N-méthylphénylalanine sans perte d'activité.²²⁰

G. Proposition d'une simplification de structure de la tamandarine B.

Sur la base de ces études de relations structures activités, nous avons proposé la synthèse d'analogues simplifiés de la tamandarine B, qui pourrait être obtenus par SPPS et permettant d'introduire le motif triazole dans la structure. Ces choix ont été également guidés par le fait que nous souhaitons nous départir des aléas liés à l'approvisionnement en ascidie, mais également car cela offrait la possibilité de développer un nouveau motif dérivé du squelette de la tamandarine B plus simple à synthétiser. Nous proposons donc de supprimer les ponts esters de ces depsipeptides et de les remplacer par des liaisons amides métaboliquement plus stables en remplaçant l'acide hydroxyvalérique (Hiv) par une valine, la norstatine (Nst) par un acide glutamique et la thréonine⁶ (Thr⁶) par un acide 2,3-diaminopropionique (Dap).

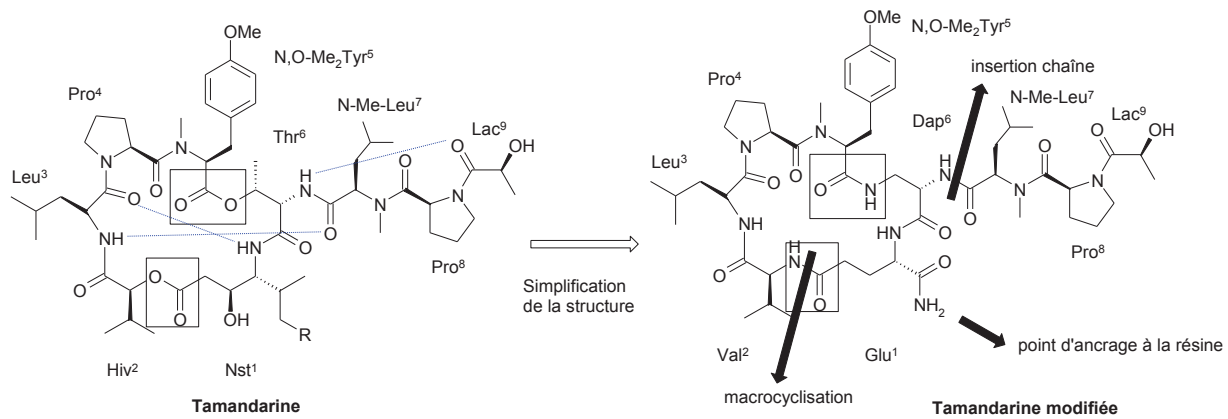


Figure 80 : Proposition de modification du squelette de la tamandarine B

Partie 2 : Synthèse d'analogues simplifiés de la tamandarine B.

La synthèse du macrocycle a été réalisée sur une résine Rink amide. Le choix de cette résine a été guidé par notre souhait d'obtenir un produit portant une charge finale neutre comme cela est le cas pour la tamandarine. Cette synthèse a été effectuée pas à pas en introduisant sur la résine l'acide glutamique protégé sur sa chaîne latérale par un groupement allyl. Puis, s'est poursuivie par l'introduction de l'acide (2S)-diaminopropanoïque dont la fonction amine en position 2 est protégée par un groupement Z pour permettre son hydrogénolyse ultérieure et ainsi l'introduction de la chaîne pendante. Les autres aminoacides constituant le peptide sont ensuite introduits pour aboutir à un précurseur linéaire qui est cyclisé sur support solide, puis libéré de la résine par clivage acide. Cette synthèse a permis l'obtention de trois macrocycles (1-3) avec des rendements corrects (Figure 81).

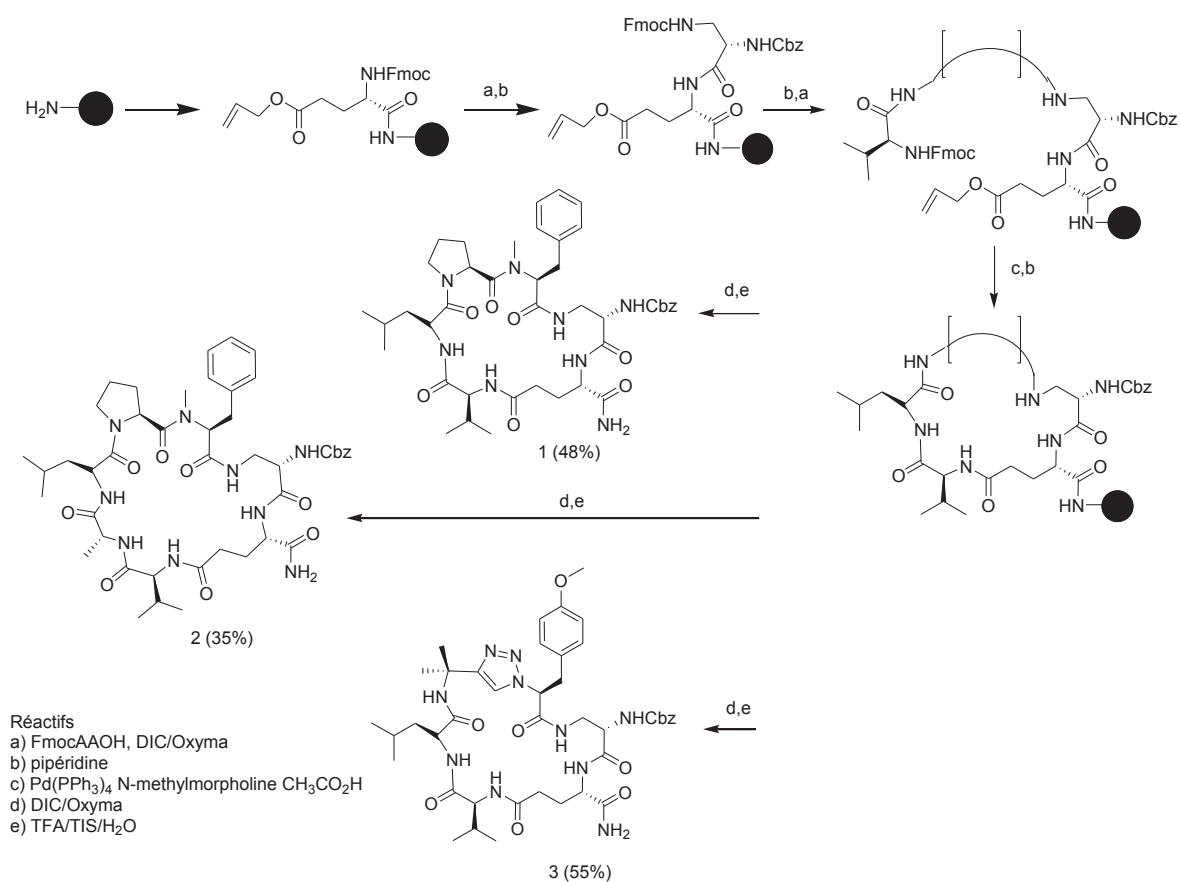


Figure 81 : Voie de synthèse générale des macrocycles, analogues de la tamandarine B.

La chaîne pendante a été synthétisée indépendamment selon une méthode adaptée de la synthèse décrite par le groupe de Joullié.²²¹ En effet, dans nos mains cette synthèse conduisait majoritairement à une dicetopipérazine à partir du composé **6** lorsque le mélange BOP/DIEA était utilisé pour le couplage de l'acide pyruvique. L'utilisation du cocktail COMU/Oxyma permet de résoudre ce problème (Figure 82).²²²

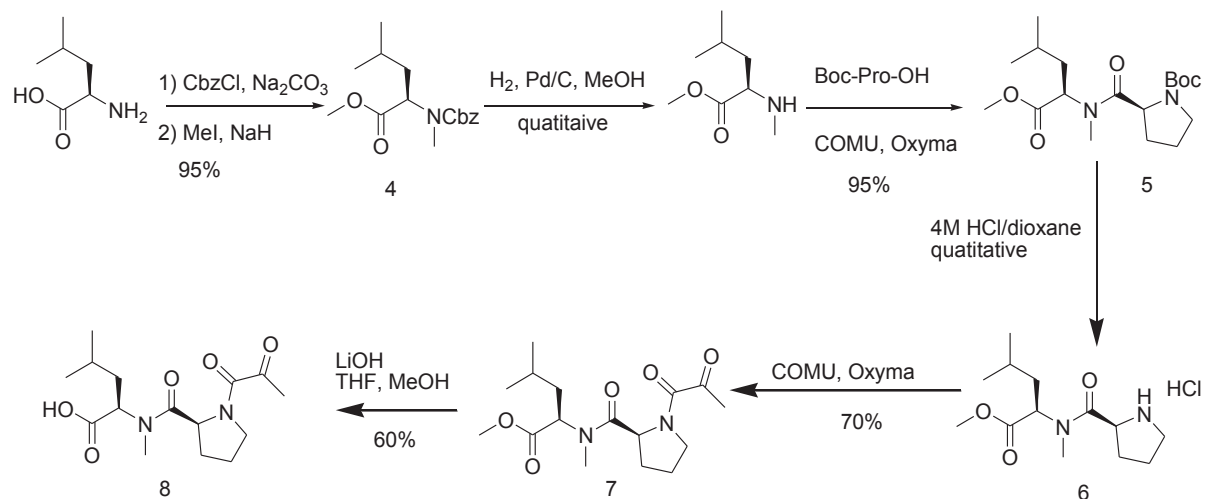


Figure 82 : Synthèse de la chaîne pendante de la tangerine

Après hydrogénélyse des groupements Z protégeant la fonction amine des macrocycles **1** et **3**, le composé **8** a été couplé en solution aux macrocycles déprotégés en utilisant de l'EDC en présence d'oxyma pour conduire à deux analogues de tangerine B (**9-10**) dont les activités biologiques sont en cours d'évaluation (Figure 83).

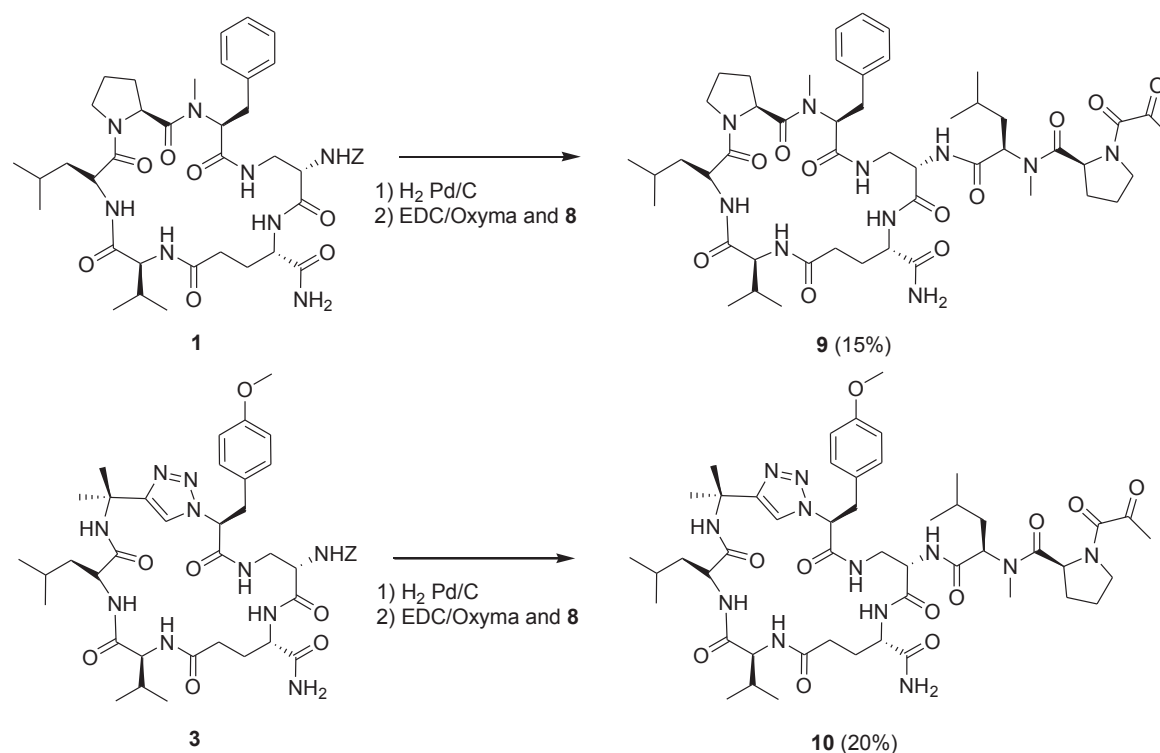


Figure 83 : Insertion de la chaîne pendante sur les macrocycles

Conclusion et perspectives

La synthèse des peptides et des peptidomimétiques par voie chimique est remarquable, car elle permet de s'affranchir de l'unique utilisation des 20 aminoacides naturels et permet donc d'atteindre une grande diversité chimique. Cette diversité chimique trouve une partie de son inspiration dans les molécules d'origine naturelle mais également dans le développement de nouvelles stratégies de synthèse. La combinaison de ces deux approches permet de générer des structures présentant des affinités importantes pour les récepteurs qu'elles ciblent mais également une stabilité accrue dans les fluides biologiques. Parmi ces approches la CuAAC a connu un essor considérable depuis sa découverte conjointe par Meldal et Sharpless en 2002, car elle permet non seulement de lier des fragments peptidiques pour générer des protéines de grande taille mais aussi de fonctionnaliser les protéines.

Toutefois, l'impact de l'insertion d'un triazole produit de la CuAAC sur la structure de peptides structurés restait encore insuffisamment étudié, ce qui a constitué un des principaux objectifs de ma thèse.

Au travers d'une étude de l'insertion de ce motif en remplacement de la liaison amide dans des peptaibols structurés en hélice, nous avons pu montrer que cette substitution n'était pas anodine, puisque la structure secondaire du peptide était généralement affectée et que cela se traduisait par une perte conjointe de l'activité biologique. Si ce résultat ne remet pas en cause l'utilité de la CuAAC, elle met en évidence le fait que le concept d'isostérie doit être manié avec prudence s'il s'agit de conserver la structure secondaire du peptide natif.

Pour compléter ce travail des études structurales par RMN et diffraction des rayons X sont en cours qui devraient permettre de définir les préférences conformationnelles induites par les triazoles lorsqu'ils sont insérés dans une séquence peptidique. Les efforts de cristallisation des peptides obtenus lors de cette thèse devront donc être poursuivis.

Ce travail a abouti à la mise au point d'une synthèse robuste et généralisable de peptaibols naturels ou modifiés qui devrait permettre en facilitant leur synthèse de s'engager plus en avant dans leur modification en vue d'en déterminer le mode d'action. Une des possibilités étant d'en améliorer l'activité ce à quoi nous sommes parvenus en adjoignant un tag hydrophobe en partie N-terminale des peptaibols. Cette approche devra être généralisée à d'autres types de peptides pour en définir le champ d'application.

En dernier lieu différentes modifications ont été réalisées sur la tamandarine B un peptide marin présentant des activités antitumorales remarquables. Malheureusement les résultats biologiques sur les produits synthétisés ne sont pas connus au moment de la rédaction de ce manuscrit. Ces modifications devront être poursuivies en tenant compte des résultats biologiques et vraisemblablement en essayant de se rapprocher un peu plus de la structure native car les modifications que nous avons réalisées risquent d'être trop drastiques pour prétendre à conserver une activité biologique valorisable. Ce dernier objectif n'a pas pu être totalement atteint par manque de temps.

Partie expérimentale

A. Partie expérimentale de l'article 1: Efficient Microwave-Assisted One Shot Synthesis of Peptaibols Using Inexpensive Coupling Reagents

Abbreviations: DIC, N,N'-diisopropylcarbodiimide; Oxyma, Ethylcyanoglyoxylate-2-oxime; DCM, Dichloromethane; DMF, N,N'-dimethylformamide; cHex, Cyclohexane; DIEA, Diisopropylethylamine; Ac2O, Acetic anhydride; TFA, Trifluoroacetic acid; TIS, Triisopropylsilane; FA, formic acid; ACN, Acetonitrile; HPLC, High-performance liquid chromatography; LC-MS, liquid chromatography mass spectrometry; ELSD, evaporative light scattering detector; SPPS, solid-phase peptide synthesis.

Experimental methods:

LC-MS: LC-MS analysis was carried out using a Thermo Fisher Scientific liquid chromatography mass spectrometer, featuring an Accela HPLC coupled to a LCQ Fleet equipped with an electrospray ionization source and a 3D ion-trap analyzer. The analysis was performed with a Phenomenex Kinetex C-18 column (100 x 300 mm) using a gradient mixture of water with 0.1 % FA (Buffer A) and ACN with 0.1 % FA (Buffer B). All compounds were eluted with a 0.5 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 30min then 10% B for 7 min for all LC-MS analyses.

Analytical HPLC: The HPLC analysis was conducted on a Waters 2695 HPLC system with a Grace Vydac 218MS 5 μ M C-18 column (250 x 4.6 mm) and an ELSD detector using a gradient mixture of water with 0.1% FA (Buffer A) and ACN with 0.1% FA (Buffer B). All compounds were eluted with a 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

Semi-preparative HPLC purification: Semi-preparative purification of peptides was performed using a Waters 1525 chromatography system with a UP50DB C-18 column (250 x 10 mm) and fitted with a Waters 2487 tunable absorbance detector set to 214 nm and 254 nm. Purification was performed using a gradient mixture of water with 0.1% TFA (Buffer A) and ACN with 0.1% TFA (Buffer B). All compounds were eluted with a 3 ml/min flow rate.

¹H NMR: High resolution one-dimensional ¹H NMR spectra of compounds **1**, **2** and **3** were recorded on a JEOL EX-400 spectrometer with water suppression using presaturation (2s, 10 dB) at 313 K with 32 k points and 128 scans in CD₃OH for compound **1** and DMSO-*d*₆ for compounds **2** and **3**. The samples for the NMR analysis were prepared by dissolving 7 mg of peptides (**1-3**) in 500 μ L of the solvent.

Experimental procedure for the SPPS of peptaibols: Alamethicin F-50/5, bergofungin D and the bergofungin D analog were prepared by SPPS on an automated microwave peptide synthesizer (CEM liberty one, Orsay, France) using Fmoc/O-t-butyl chemistry. All Fmoc-protected amino acids, DIC, Oxyma and H-L-Phe-ol-2CT resin (0.36 mmol/g) were purchased from Iris Biotech, Germany. DCM, DMF, CYHA, DIEA, Ac2O, TFA, TIS, FA, ACN and piperidine, for peptide synthesis were obtained from Aldrich (USA). SPPS was performed on a CEM Liberty One microwave-assisted peptide synthesizer on a 0.10 mmol scale. After transfer to the reaction vessel the resin was swelled using the standard protocol involving 1 h immersion in 10 mL of DMF. After completion of the automatic synthesis the peptidyl-resin was washed twice with 10 mL of DCM. Microwave heating was used during Fmoc deprotection, residue coupling and N-terminal acetylation.

Coupling cycle (0.1 mmol scale)

operation	reagent	vol	time	end temp
1) Fmoc deprotection	20% piperidine in DMF	7.0 mL \times 2	0.5 + 3 min	33 and 75 °C
2) drain and wash	DMF	7.0 mL \times 4	-	20°C
3) add amino acid	0.20 M Fmoc-AA-OH	2.5 mL	-	20°C
4) add DIC	0.5 M DIC in DMF	1.0 mL	-	20°C
5) add Oxyma	0.5 M Oxyma in DMF	1.0 mL	-	20°C
6) coupling step	-		20 min	70°C
7) drain and wash	DMF	7.0 mL \times 3	-	20°C

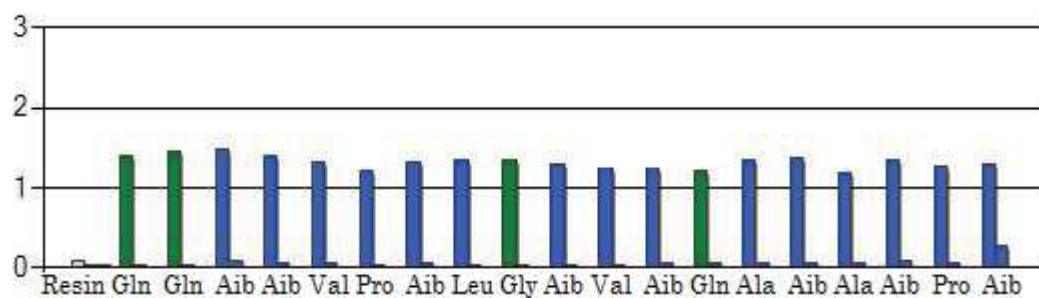
N-terminal acetylation cycle

operation	reagent	vol	time	end temp
1) Fmoc deprotection	20% piperidine in DMF	7.0 mL × 2	0.5 + 3 min	33 and 75 °C
2) drain and wash	DMF	7.0 mL × 4	-	20°C
3) add Ac ₂ O	Ac ₂ O/DIEA/DMF 1:2:7 (v/v)	10 mL	-	20°C
6) acetylation	-	-	10 min	70°C
7) drain and wash	DMF	7.0 mL × 3	-	20°C

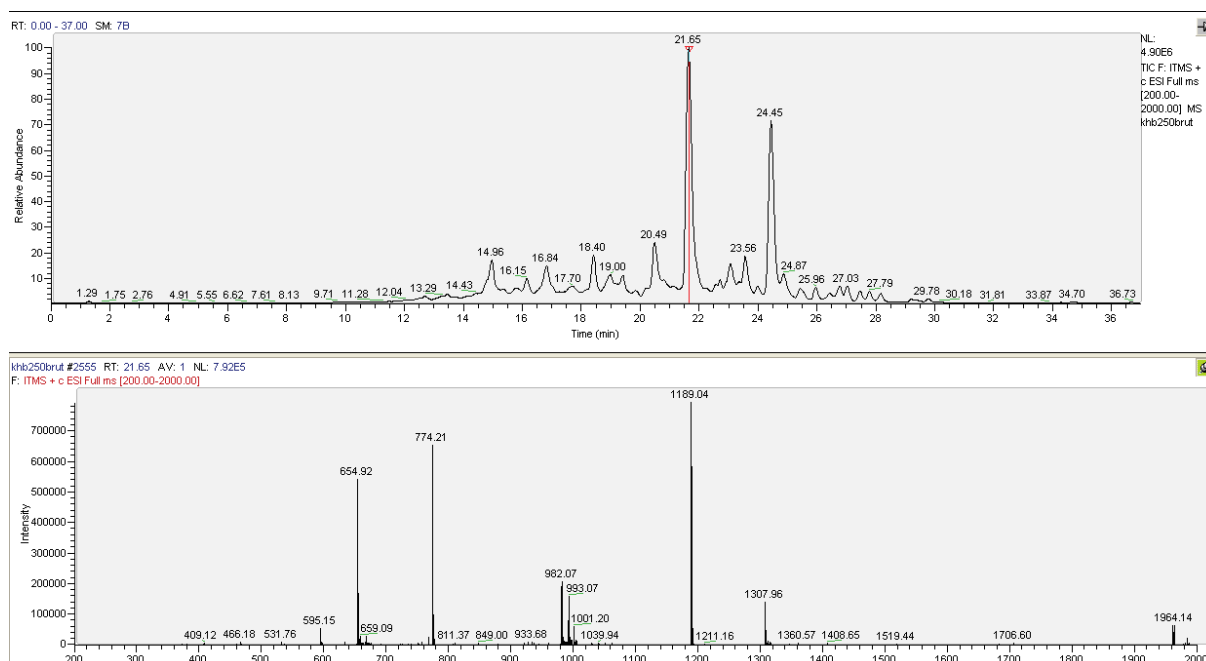
Alamethicin F-50/5: AcAibProAibAlaAibAlaGlnAibValAibGlyLeuAibProValAibAibGlnGlnPhol (1)

Compound (1) was synthesized using a 2-chlorotrityl chloride resin preloaded with phenylalaninol (0.10 mmol). Cleavage and deprotection of the peptide was performed by treating the peptidyl-resin with 10 mL of cleavage cocktail (TFA/DCM/water/TIPS in a 47:47:4:2 (v/v) ratio) for 60 min. The cleavage mixture was concentrated and co-evaporated with cyclohexane. Water was added and the mixture was lyophilized to yield crude peptide (220 mg, 100% yield). The crude peptide was dissolved in 3 ml of ACN and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 50% to 100% B in A over 35 min with a flow rate of 3 mL/min to yield alamethicin F-50/5 (68 mg, 35% yield, >98% purity). ESI-MS: C₉₂H₁₅₂N₂₃O₂₄ [M+H]⁺; calculated 1963.1, found 1963.5.

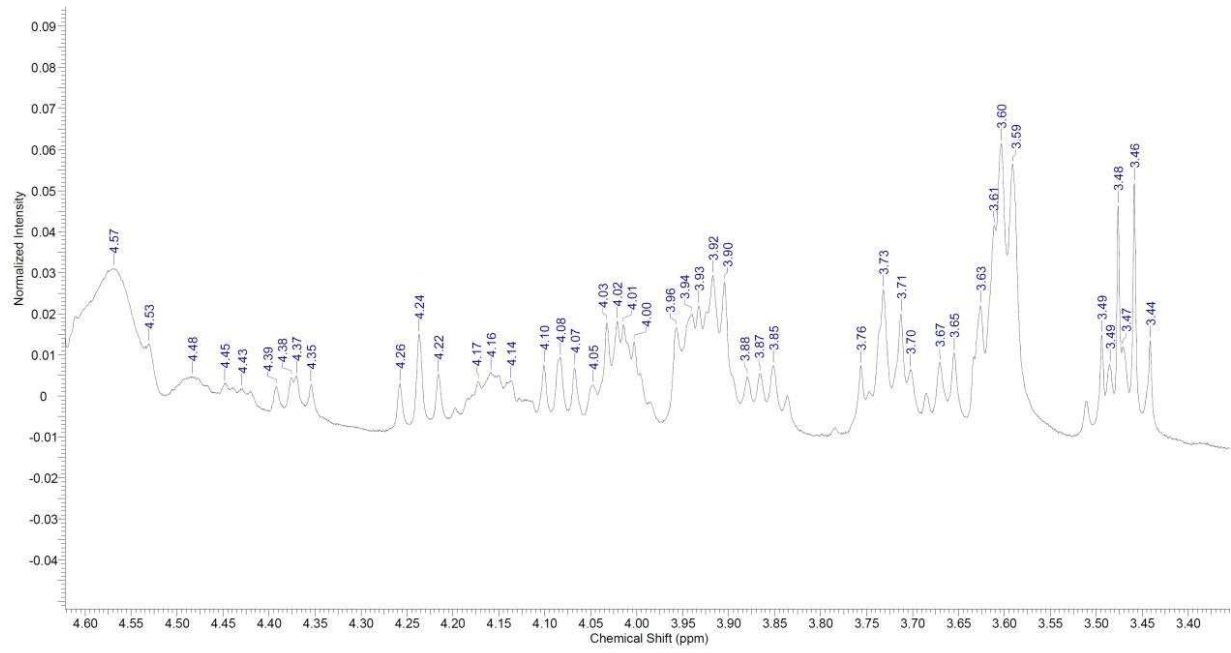
Trace from UV monitoring of Fmoc removal during synthesis of alamethicin F-50/5. Detector λ=301 nm.



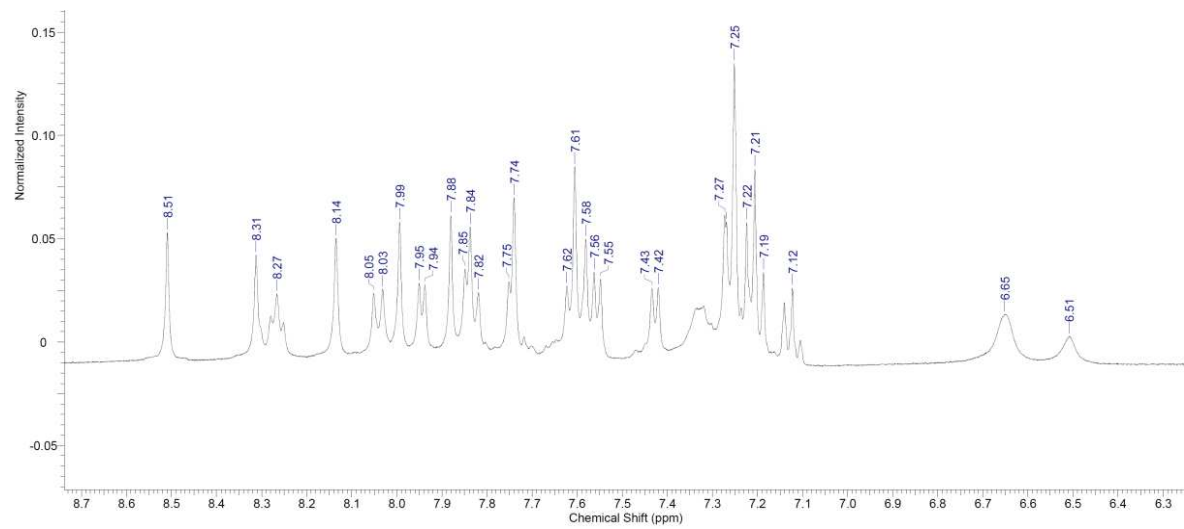
LC-MS: Crude compound (1)



CH- α region



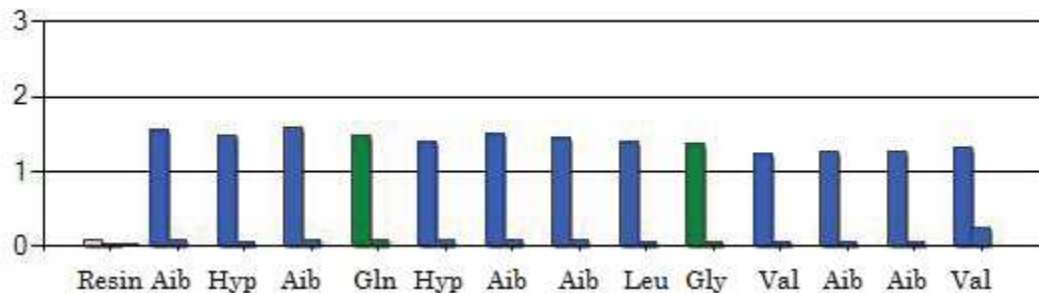
NH and phenylalaninol region



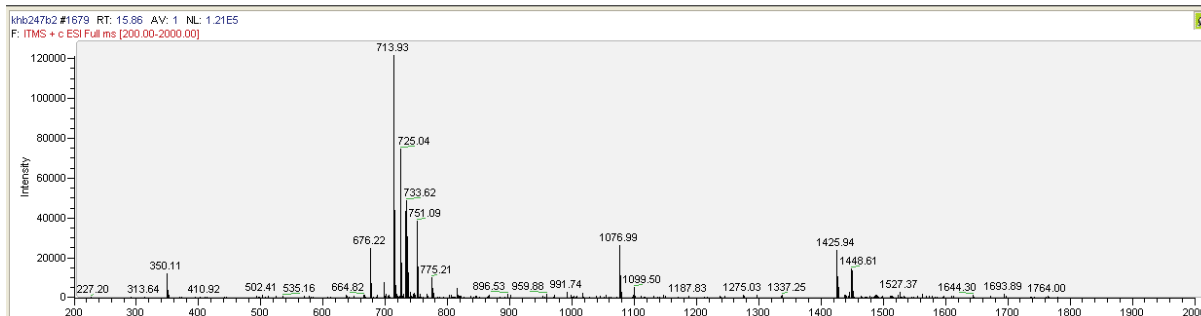
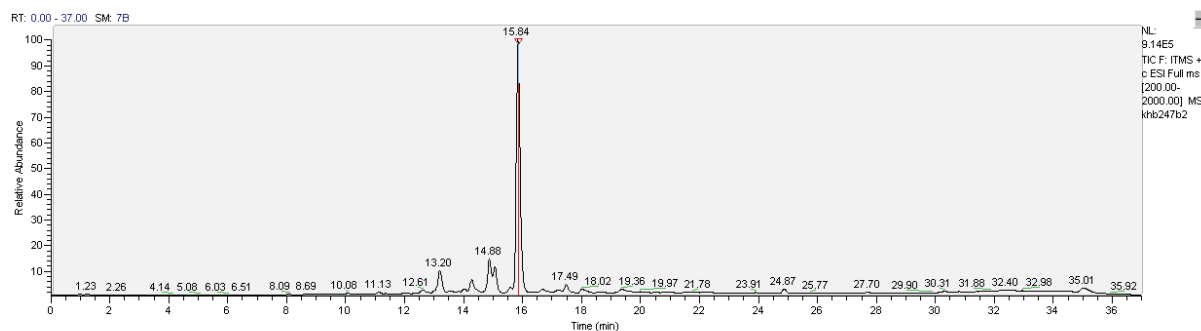
Bergofungin D: AcValAibAibValGlyLeuAibAibHypGlnAibHypAibPhol (2)

Compound (2) was synthesized using a 2-chlorotrityl chloride resin preloaded with phenylalaninol (0.10 mmol). Cleavage and deprotection of the peptide was performed by treating the peptidyl-resin with 10 mL of cleavage cocktail (TFA/DCM/water/TIPS in a 47:47:4:2 (v/v) ratio) for 60 min. The cleavage mixture was concentrated and co-evaporated with cyclohexane. Water was added and the mixture was lyophilized to yield crude peptide (155 mg, 100% yield). The crude peptide was dissolved in 3 ml of ACN and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 40 min with a flow rate of 3 mL/min to yield bergofungin D (72 mg, 50% yield, >98% purity). ESI-MS: C₆₈H₁₁₂N₁₅O₁₈ [M+H⁺]; calculated 1426.8, found 1425.

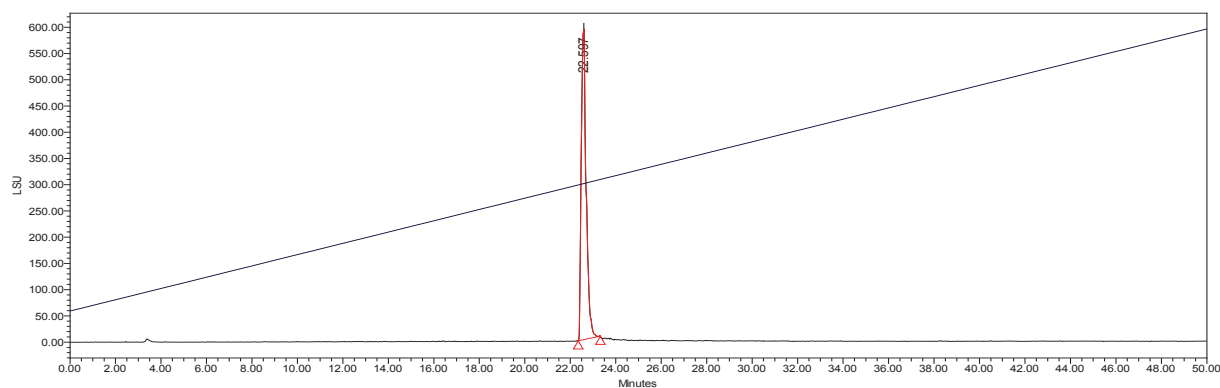
Trace from UV monitoring of Fmoc removal during synthesis of bergofungin D. Detector λ=301 nm.



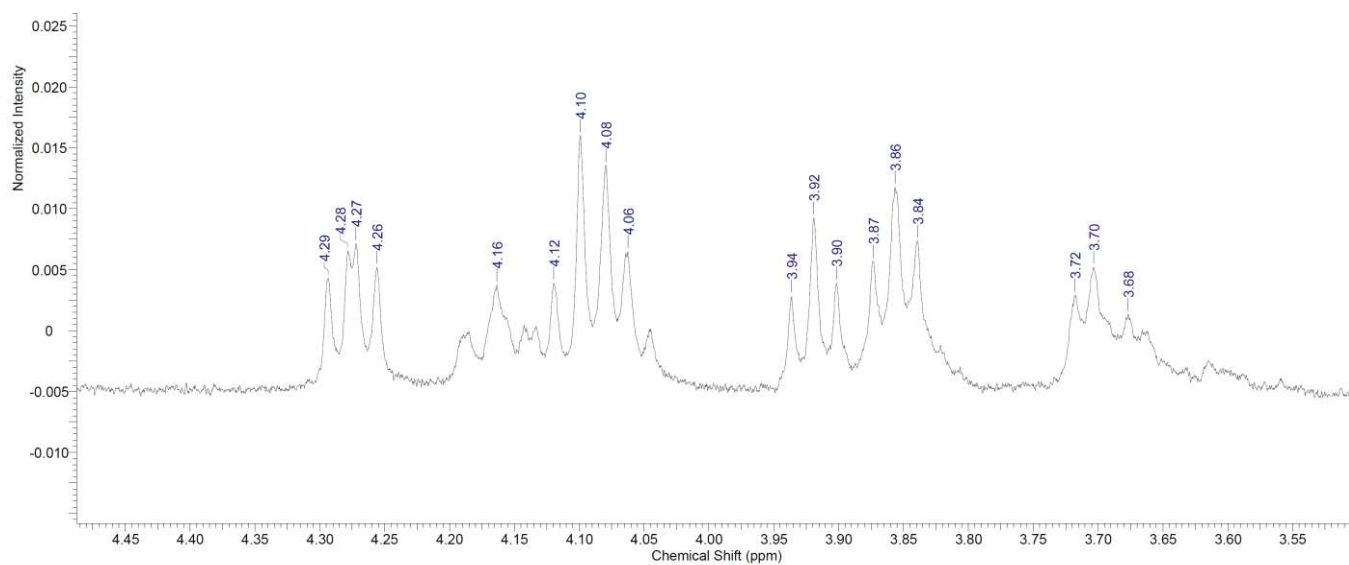
LC-MS: Crude compound (2)



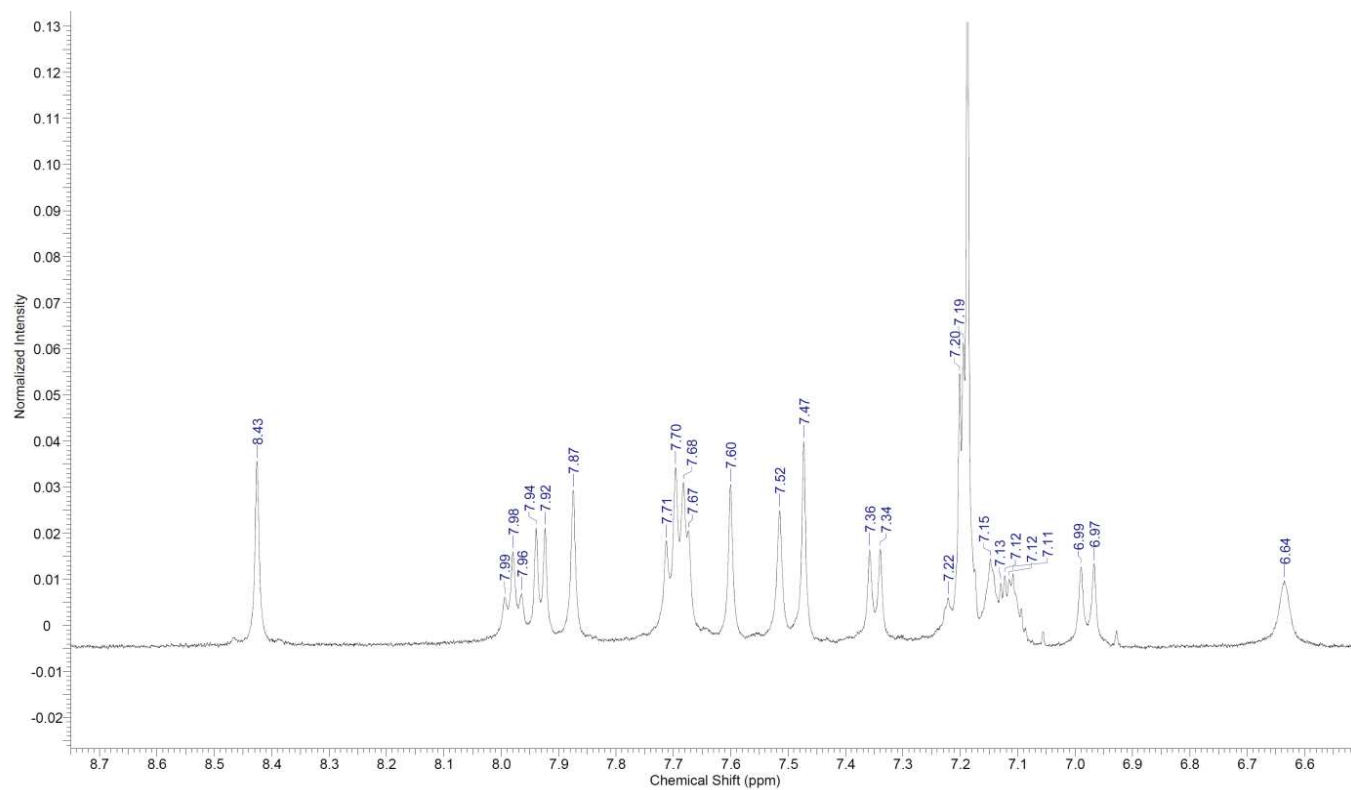
HPLC-ELSD: Purified compound (2)



CH- α region



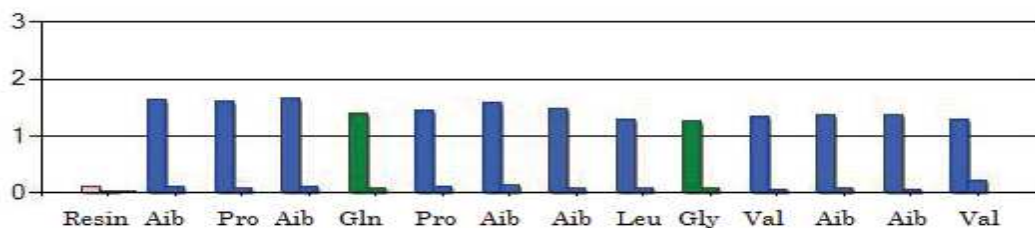
NH and phenylalaninol region



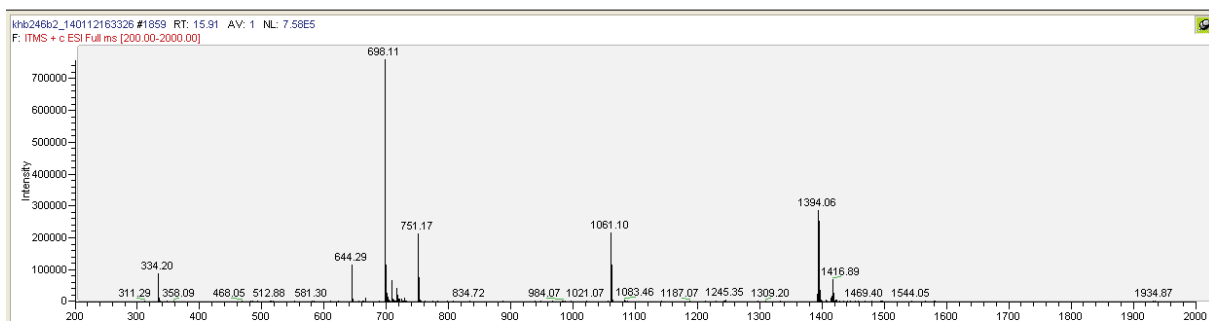
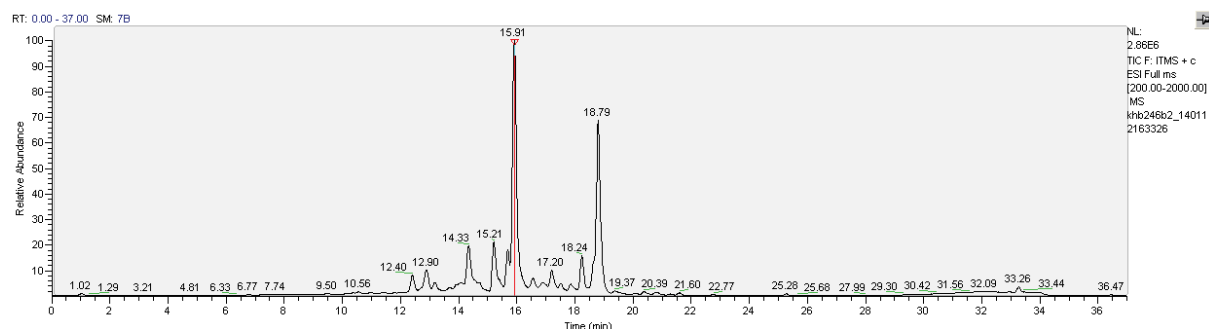
Bergofungin D analog: AcValAibAibValGlyLeuAibAibProGlnAibProAibPhol (3)

Compound (3) was synthesized using a 2-chlorotrityl chloride resin preloaded with phenylalaninol (0.10 mmol). Cleavage and deprotection of the peptide was performed by treating the peptidyl-resin with 10 mL of cleavage cocktail (TFA/DCM/water/TIPS in a 47:47:4:2 (v/v) ratio) for 60 min. The cleavage mixture was concentrated and co-evaporated with cyclohexane. Water was added and the mixture was lyophilized to yield crude peptide (140 mg, 100% yield). The crude peptide was dissolved in 3 ml of ACN and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 50% to 70% B in A over 30 min with a flow rate of 3 mL/min to yield the bergofungin D analog (68 mg, 49% yield, >98% purity). ESI-MS: $C_{68}H_{112}N_{15}O_{16}$ $[M+H]^+$; calculated 1394.8, found 1393.9.

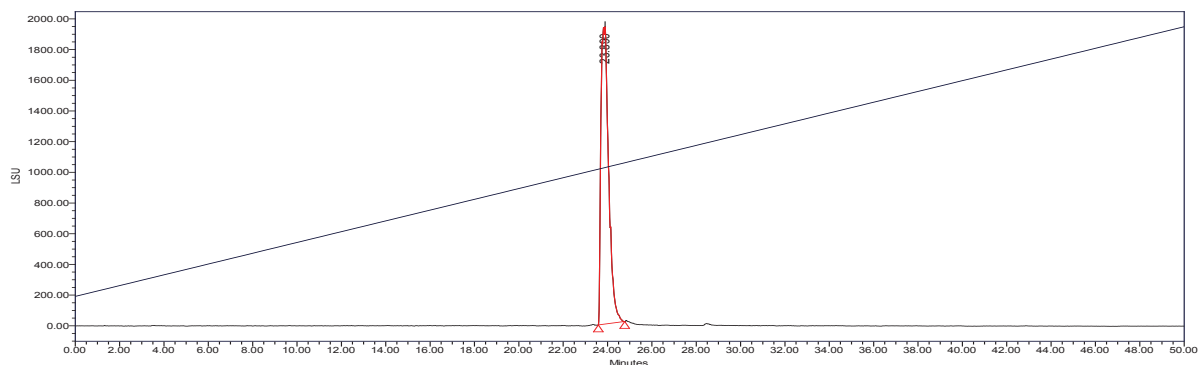
Trace from UV monitoring of Fmoc removal during synthesis bergofungin D analog. Detector $\lambda=301$ nm.



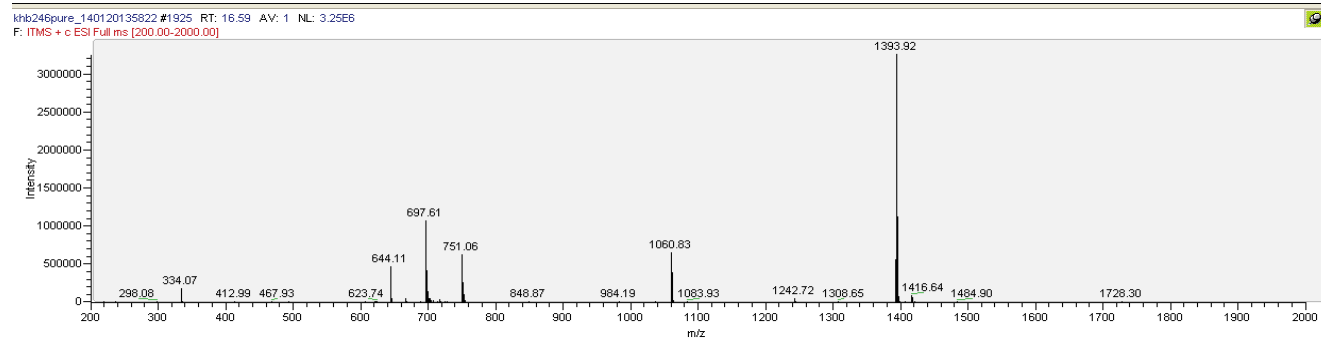
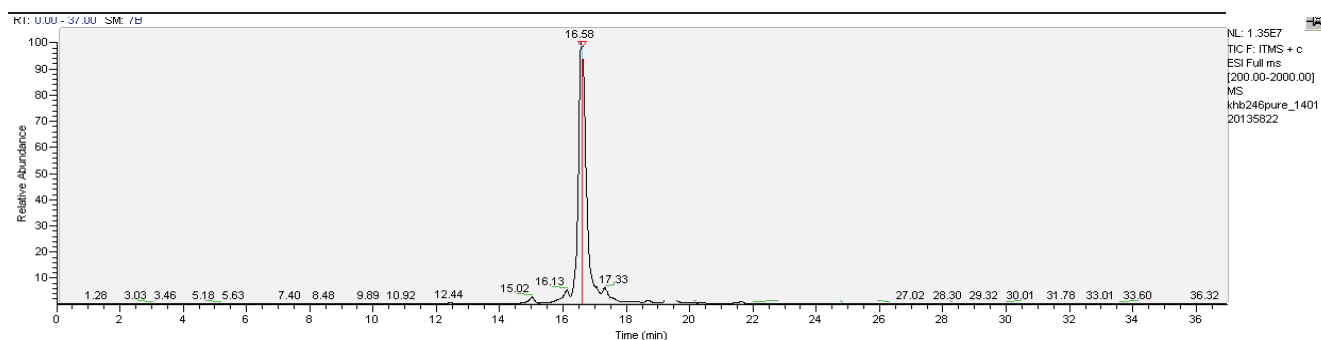
LC-MS: Crude compound (3)



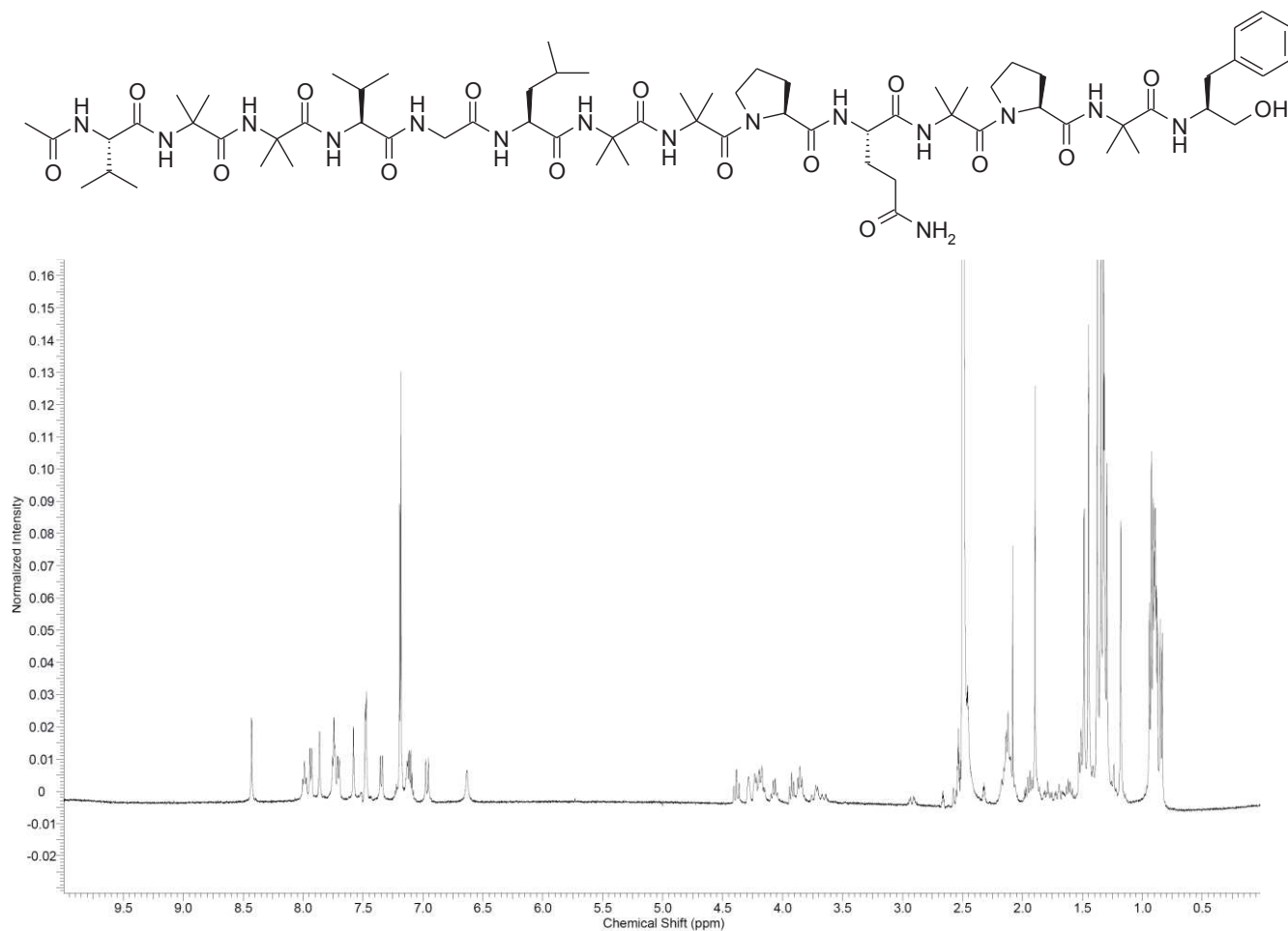
HPLC-ELSD: Purified compound (3)



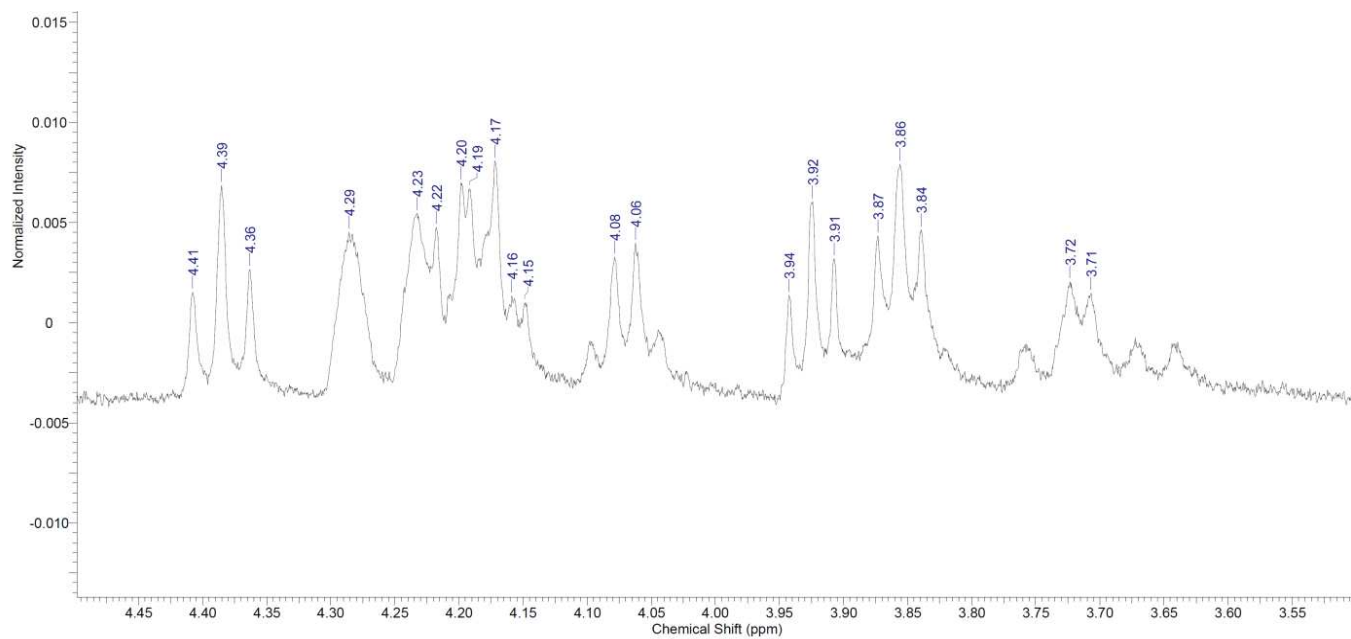
LC-MS: Purified compound (3)



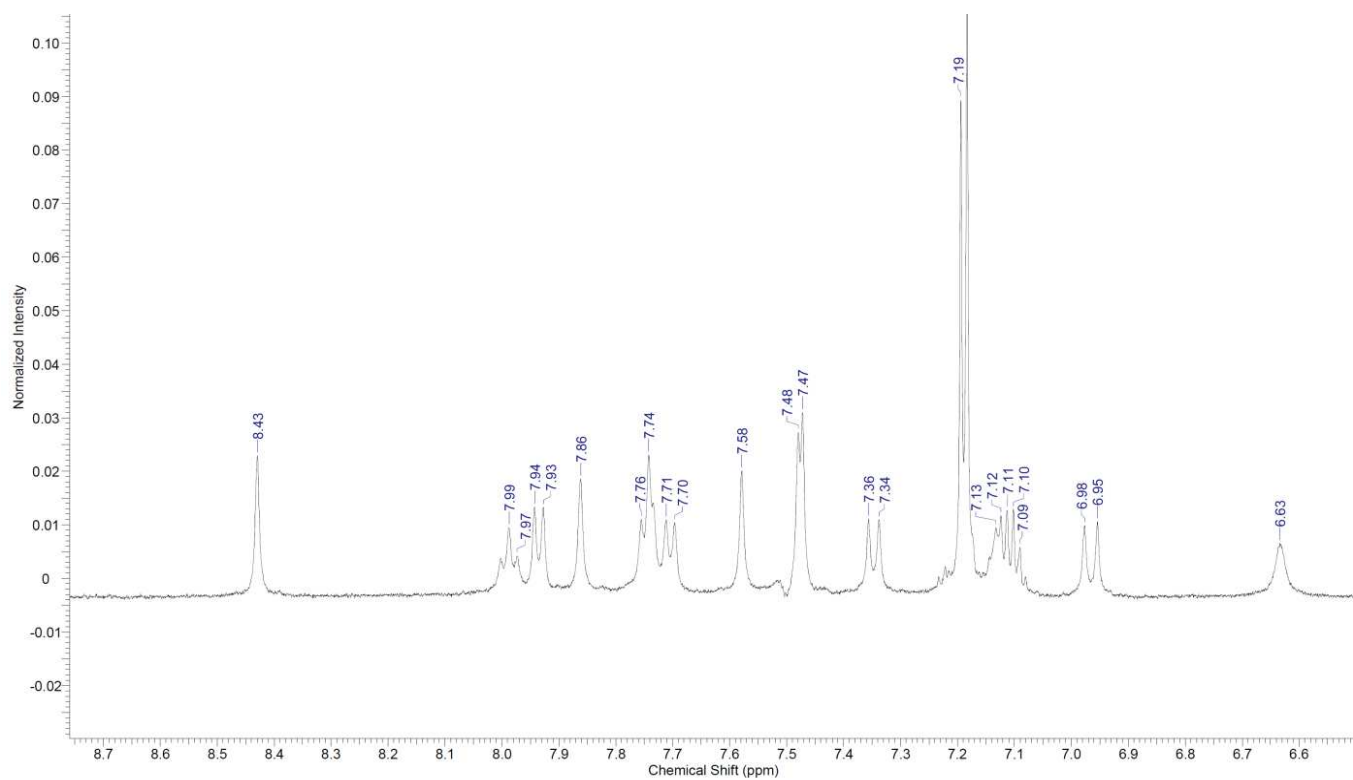
¹H NMR : Compound (3). Full spectrum



CH- α region



NH and phenylalaninol region



B. Partie expérimentale de l'article 2: Efficient access to the first example of α,α -disubstituted di-silylated amino acids and their uses in solid phase peptide synthesis.

Roberto Fanelli^a, Khoubuib Ben Haj Salah^b, Nicolas Inguibert^b, Claude Didierjean^c, Jean Martinez^a, Florine Cavelier^a

^aInstitut des Biomolécules Max Mousseron, IBMM, UMR-5247, CNRS, Université Montpellier, ENSCM, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France. ^bUniversité de Perpignan Via Domitia, CRIOBE USR 3278, 58 avenue P. Alduy Bât T, 66860 Perpignan, France. ^cCRM2 (UMR UL-CNRS 7036) Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine, 70239 Boulevard des Aiguillettes, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Email: florine.cavelier@univ-montp2.fr

General Procedures and New Compounds Characterization

1. General consideration

2. Experimental section

2.1 General procedure for the solid phase peptide synthesis

2.2 General procedure for hydrosilylation reaction

3. New compounds characterization

4. Circular dichroism studies

5. ¹H and ¹³C NMR spectra

6. Crystal Structure of 5a

1. General consideration

All solvents were purchased from Sigma Aldrich in gradient grade or reagent quality. All reactions involving air-sensitive reagents were performed under nitrogen or argon. Purifications were performed with column chromatography using silica gel (Merck 60, 230–400 mesh) or with a Biotage instrument Isolera 4 using SNAP KP-SIL flash cartridges. Proton nuclear magnetic resonance ¹H-NMR and carbon nuclear magnetic resonance ¹³C-NMR

spectra were recorded on a Bruker spectrometer avance 300 at 300 and 75 MHz, respectively. Chemicals shifts (δ) are reported from tetramethylsilane with the solvent resonance as the internal standard. Data are reported as follows: chemical shift (δ in ppm), multiplicity (s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quartet, br=broad, m=multiplet), integration, coupling constants ($J = \text{Hz}$) and assignment. Low resolution electrospray ionization (ESI) mass spectra were recorded on a micromass platform electrospray mass spectrometer. Spectra were recorded in the positive mode (ESI+). For the solid phase peptide synthesis, all Fmoc-protected amino acids, DIC, Oxyma, 2-chlorotriyl chloride resin preloaded with phenylalaninol (0.36 g/mol) were purchased from Iris Biotech (Germany).

2. Experimental section

2.1 General procedure for the solid phase peptide synthesis

SPPS was performed on a CEM Liberty One microwave-assisted peptide synthesizer at 0.10 mmol scale using DIC/Oxyma as coupling reagents and 20% piperidine in DMF for deprotection of the Fmoc group. After transfer to the reaction vessel, the resin was swelled in DMF for 1h, then the elongation was carried automatically using 3-fold excess of protected amino acid and coupling reagents and irradiation at 70 °C for 20 min. Deprotection cycles were carried out with 20% piperidine in DMF (7 ml for 30s at 33 °C and 7 ml for 3 min at 70 °C) and N-terminal acetylation was performed at 70 °C using 10 ml of Ac₂O/DIPEA/DMF 1:2:7 (v/v). After completion of the automated synthesis, the peptidyl-resin was washed twice with 10 ml of DCM. Cleavage from the resin and complete deprotection were performed by treating the resin with 10 ml of TFA/DCM/water/TIS 47:47:4:2 (v/v) for 60 min. The solution was sucked off, the filtrate was concentrated and co-evaporated with cyclohexane at a maximum temperature of 45°C. The peptide was precipitated with ice-cold diethyl ether, recovered by centrifugation and washed with cold diethyl ether. The crude peptide was

dissolved in water and freeze dried. Prior to purification the peptide was analysed by LC/MS for checking its purity. It is noteworthy that in some case the trifluoacetyl ester of the final peptide was detected and evidenced by a mass of +97 mass units. This compound was easily hydrolyzed adding 1 mL of saturated sodium carbonate to the crude. After dilution by 3 mL of methanol and filtration the product was purified by semi-preparative HPLC using a Waters 1525 chromatography system with a Vydac 218MS510 column (250 x 10 mm) and fitted with a Waters 2487 tunable absorbance detector set to 214 nm and 254 nm. Purification was performed using 0.1% TFA in water (Buffer A) and 0.1% TFA in MeOH (0.1% TFA) (Buffer B) with a linear gradient A/B (20:80) to A /B (0:100) in 20 min at a flow rate of 2.5 mL/min. After concentration the remaining solution were freeze dried to yield a white product with purity above 95%.

LC-MS analysis was carried out using a Thermo Fisher Scientific liquid chromatography mass spectrometer, featuring an Accela HPLC coupled to a LCQ Fleet equipped with an electrospray ionization source and a 3D ion-trap analyzer. MS spectra were recorded in positive and negative mode. The analysis was performed with a Phenomenex Kinetex C-18 column (100 x 300 mm) using a linear gradient of 0.1 % formic acid (FA) in water (Buffer A) and 0.1 % FA in methanol (Buffer B), A/B (20:80) to A /B (0:100) in 25 min then hold at B 100% for 15 min at a flow rate of 0.5 mL/min.

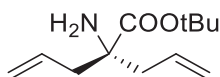
Analytical HPLC: The HPLC analysis was conducted on a Waters 2695 HPLC system with a Grace Vydac 218MS (250 x 4.6 mm) and an ELS-Detector using a linear gradient mixture of 0.1% FA in water (Buffer A) and 0.1% FA in MeOH (Buffer B); A/B (20:80) to A /B (0:100) in 25 min.

2.2 General procedure for hydrosilylation reaction:

The unsaturated compound (1 equiv.) was dissolved in dry dichloromethane (2.5 mL/mmol) under argon followed by addition of the catalyst $(\text{Bu}_4\text{N})_2\text{PtCl}_6$ (0.01-0.05 mmol) and the trialkylsilane (4 equiv.). The stirred mixture was heated to reflux for 2 – 3h (TLC and HPLC monitoring). The solvent was removed under reduced pressure and the product purified by silica gel chromatography (hexane/ethyl acetate 98:2) to give the silylated compound.

3. New compounds characterization

tert-butyl 2-allyl-2-aminopent-4-enoate **3**



A solution of allyl bromide (623 mg, 5.15 mmol), in dry THF (4ml) was added dropwise to a vigorously stirred solution of compound **1** (700 mg, 2.34 mmol) (for preparation see Fanelli, R.; Jeanne-Julien, L.; René, A.; Martinez, J.; Cavelier, F. *Amino Acids* **2015**, *47*, 1107), tBuOK 1.0 M in THF (5.15 ml) and triethylbenzylammonium chloride (107 mg, 0.47 mmol) in 4 ml of dry THF. The solution was stirred at room temperature and monitored by TLC. When the reaction was complete (30min), the reaction was quenched with a saturated solution of ammonium chloride (3 mL). THF was concentrated and the aqueous phase was extracted three times with ethyl acetate (3 x 20 mL). The organic phase was dried over MgSO_4 . After concentration, the crude product **2** was directly dissolved in THF (2 mL/mmol) and a solution of citric acid 15% (6 mL/mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 6 h. After removing THF in vacuo, the aqueous layer was extracted with diethylether (10 mL/mmol) in order to remove the ketone. Then, the pH was increased to 8-9 with potassium carbonate addition. The free amine was then extracted with dichloromethane (3 x 15 mL/mmol). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated to afford compound **4** in quantitative yield.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 1.46 (s, 9H), 1.58 (s br, 1H), 2.11-2.19 (m, 2H), 2.43-2.50 (m, 2H), 5.07-5.10 (m, 4H), 5.58-5.72 (m, 2H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 175.3, 132.6, 119.1, 81.0, 60.1, 44.3, 28.0

ESI-MS: 212.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

tert-butyl 2-allyl-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)pent-4-enoate **4**



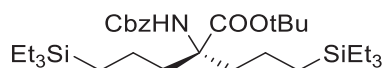
To a solution of compound **3** (486 mg, 2.3 mmol) in 11 ml of dichloromethane, was added N,N-diisopropylethylamine (400 μl , 2.3 mmol) followed by dropwise addition of benzyl chloroformate (647 μl , 4.6 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 24h. The organic layer was then washed with a solution of potassium hydrogensulphate (3 x 5 ml) and brine (1 x 5 ml), Then the organic layer was dried over MgSO_4 , concentrated and the crude product was purified on silica flash (hexane/Ethyl acetate) affording compound **4** (600mg, 76%).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 1.46 (s, 9H), 2.45-2.52 (m, 2H), 3.06-3.13 (m, 2H), 5.05-5.09 (m, 6H), 5.56-5.70 (m, 2H), 5.82 (s br, 1H), 7.33-7.37 (m, 5H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 171.2, 154.1, 132.2, 128.4, 127.9, 127.8, 118.8, 82.3, 66.1, 63.1, 39.7, 27.9.

ESI-MS: 346.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 368.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

tert-butyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(triethylsilyl)-2-(3(triethylsilyl)propyl)pentanoate **5a**



Compound **5a** (510 mg, 53%) was obtained following the general procedure of hydrosilylation reaction of **4** (570 mg, 1.65 mmol) with $(\text{Bu}_4\text{N})_2\text{PtCl}_6$ (0.01 equiv.).

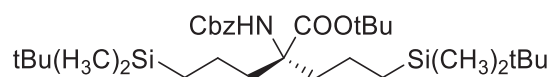
The reaction was conducted following the general procedure of hydrosilylation. in 0.2 mmol scale. The residue was purified by column chromatography on silica gel with petroleum ether/ethyl acetate (5:1 to 1:1) to afford the product **4a** (80% yield).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 0.54-0.62 (m, 16H), 1.1 (t, $J = 8.1$ Hz, 18H), 1.09-1.19 (m, 2H), 1.33-1.41 (m, 2H), 1.57 (s, 9H), 1.75-1.85 (m, 2H), 2.40-2.50 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 6.01 (s br, 1H), 7.38-7.45 (m, 5H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 173.2, 153.7, 128.4, 127.8, 127.7, 82.0, 65.8, 64.2, 39.9, 27.8, 18.3, 11.3, 7.4, 3.2.

ESI-MS: 578.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 600.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

tert-butyl2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(tert-butyltrimethylsilyl)-2-(3-(tert-butyltrimethylsilyl)propyl)pentanoate **5b**



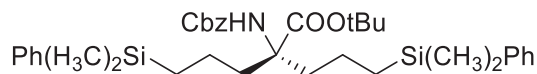
Compound **5b** (2.14 g, 63%) was obtained following the general procedure of hydrosilylation reaction of **4** (2.12 g, 5.82 mmol) with $(\text{Bu}_4\text{N})_2\text{PtCl}_6$ (0.01 equiv.).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 0.0 (s, 12H), 0.53-0.62 (m, 4H), 0.95 (s, 18H), 1.07-1.18 (m, 2H), 1.45-1.32 (m, 2H), 1.57 (s, 9H), 1.74-1.84 (m, 2H), 2.41-2.50 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 6.01 (s br, 1H), 7.40-7.40 (m, 5H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 173.0, 153.9, 136.9, 128.5, 127.9, 127.7, 82.0, 65.8, 64.2, 39.9, 27.9, 26.5, 18.7, 16.5, 12.5, -6.3.

ESI-MS: 578.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 600.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

tert-butyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(dimethyl(phenyl)silyl)-2-(3-(dimethyl(phenyl)silyl)propyl)pentanoate **5c**



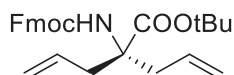
Compound **5c** (142 mg, 80%) was obtained following the general procedure of hydrosilylation reaction of **4** (100 mg, 0.29 mmol) with $(\text{Bu}_4\text{N})_2\text{PtCl}_6$ (0.01 equiv.).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 0.0 (s, 12H), 0.39-0.56 (m, 4H), 0.76-0.85 (m, 2H), 1.05-1.15 (m, 2H), 1.09 (s, 9H), 1.38-1.48 (m, 2H), 2.07-2.17 (m, 2H), 4.83 (s, 2H), 5.63 (s br, 1H), 7.09-7.12 (m, 10H), 7.23-7.26 (m, 5H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ (ppm) 172.8, 153.8, 139.3, 136.9, 133.5, 128.8, 128.5, 127.9, 127.7, 82.1, 65.9, 64.2, 39.6, 27.7, 18.4, 15.7, 14.1, -2.8, -3.2

ESI-MS: 618.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 640.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

tert-butyl 2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-2-allylpent-4-enoate **6**

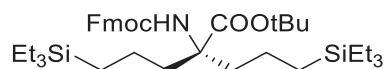


^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 1.41 (s, 9H), 2.37-2.44 (m, 2H), 3.02-3.09 (m, 2H), 4.14 (t, $J = 6.8$, 1H), 4.27 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.99-5.04 (m, 2H), 5.48-5.62 (m, 2H), 5.80 (s br, 1H), 7.21-7.70 (m, 8H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 171.7, 154.1, 144.0, 141.3, 132.2, 127.6, 127.0, 125.1, 119.9, 118.8, 82.6, 66.2, 63.2, 47.2, 39.7, 28.0.

ESI-MS: 434.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 456.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

tert-butyl 2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-(triethylsilyl)-2-(3-(triethylsilyl)propyl)pentanoate **7a**



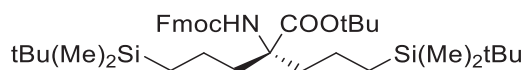
Compound **7a** (316 mg, 52%) was obtained following the general procedure of hydrosilylation reaction of **6** (400 mg, 0.92 mmol) with $(\text{Bu}_4\text{N})_2\text{PtCl}_6$ (0.01 equiv.).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 0.35-0.42 (m, 16H), 0.80 (t, $J = 8.1$ Hz, 18H), 0.94-0.98 (m, 2H), 1.21-1.28 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 1.60-1.64 (m, 2H), 2.25-2.35 (m, 2H), 4.12-4.23 (m, 3H), 5.90 (s br, 1H), 7.21-7.70 (m, 8H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 173.2, 153.8, 144.1, 141.2, 127.5, 127.0, 125.1, 119.9, 82.1, 66.4, 64.2, 47.2, 39.9, 27.9, 18.3, 11.3, 7.4, 3.2

ESI-MS: 666.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 688.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

tert-butyl 2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-(tert-butyldimethylsilyl)-2-(3-(tert-butyldimethylsilyl)propyl)pentanoate **7b**



Compound **7b** (406 mg, 66%) was obtained following the general procedure of hydrosilylation reaction of **6** (400 mg, 0.92 mmol) with $(\text{Bu}_4\text{N})_2\text{PtCl}_6$ (0.01 equiv.).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 0.00 (m, 12H), 0.57-0.63 (m, 2H), 0.94 (m, 19H), 1.00-1.19 (m, 3H), 1.37-1.47 (m, 3H), 1.58 (s, 9H), 1.77-1.87 (m, 2H), 2.44-2.54 (m, 2H), 4.31-4.43 (m, 3H), 6.09 (s br 1H), 7.37-7.89 (m, 8H).

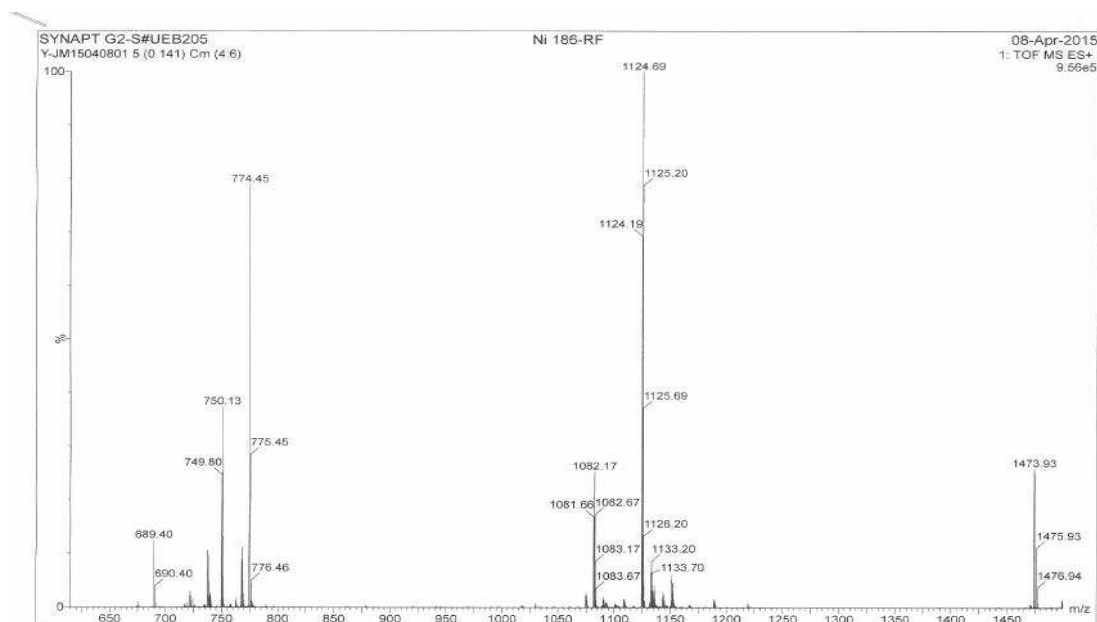
^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 0.31-0.77 (m, 16H), 0.80 t, ($J = 8.1$ Hz, 18H), 0.95-1.07 (m, 2H), 1.15-1.28 (m, 2H), 1.71-1.73 (m, 2H), 2.20-2.25 (m, 2H), 4.11 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 5.63 (s br, 1H), 7.18-7.68 (m, 8H), 7.69 (s br, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 143.9, 141.3, 127.7, 127.0, 125.0, 119.9, 66.6, 63.9, 47.2, 39.5, 18.3, 11.3, 7.4, 3.2.

ESI-MS: 610.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 632.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

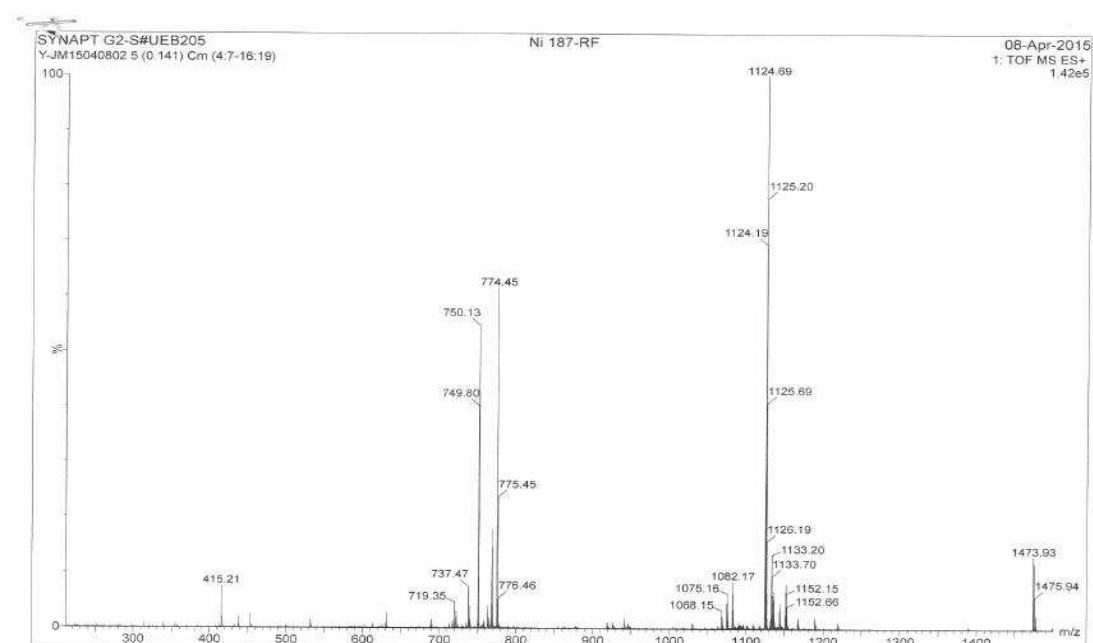
HRMS, LC/MS and comparison of HPLC retention times of peptides 8-11.

Compound 9 (102 mg, 45%)



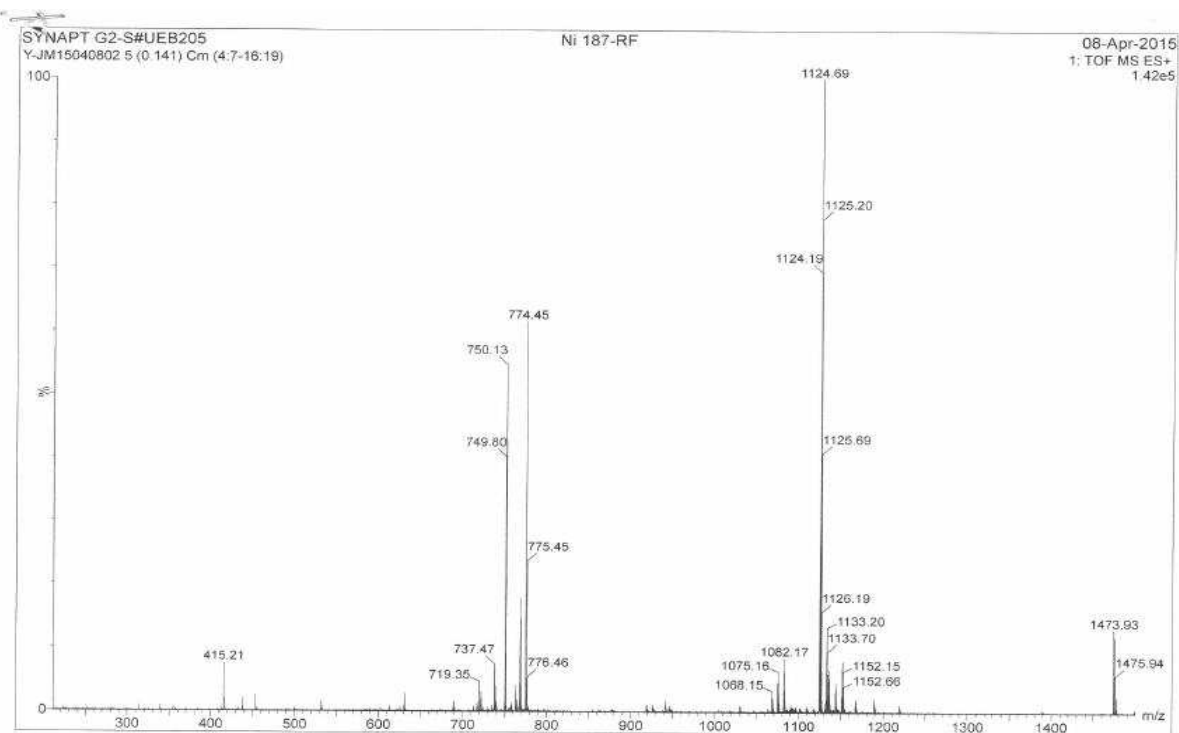
HRMS: m/z (ESI) calculated $[M+2H]/2$: 1124.6921, measured: 1124.6927

Compound 10 (18 mg, 8%)



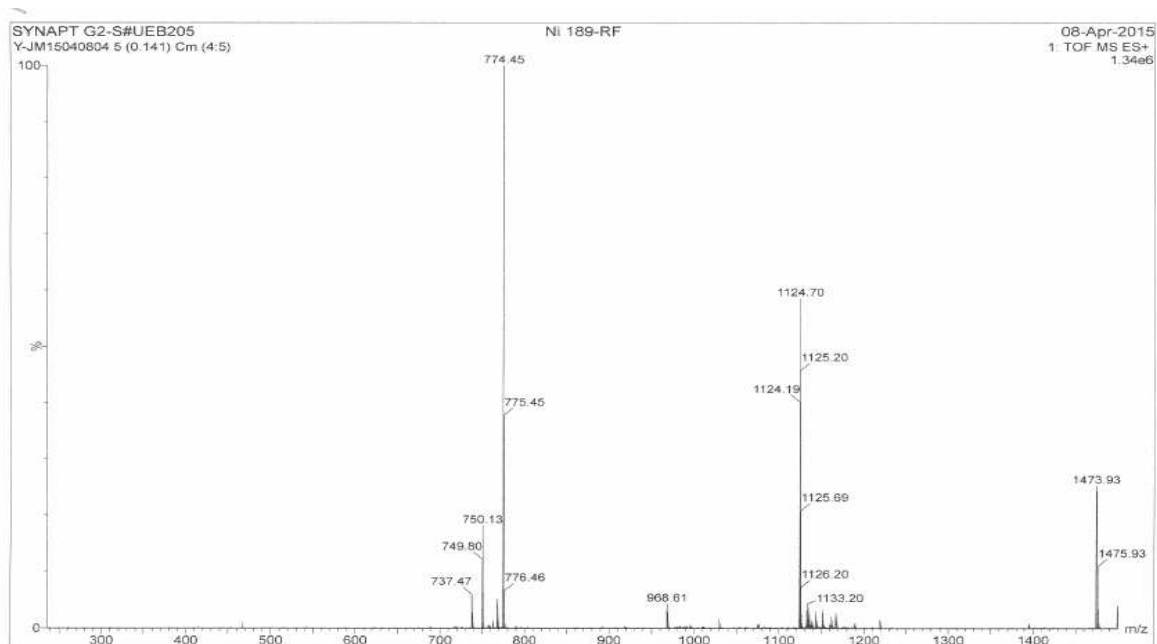
HRMS: m/z (ESI) calculated $[M+2H]/2$: 1124.6921, measured: 1124.6930

Compound 11 (20 mg, 9%)



HRMS: m/z (ESI) calculated $[M+2H]/2$: 1124.6921, measured: 1124.6941

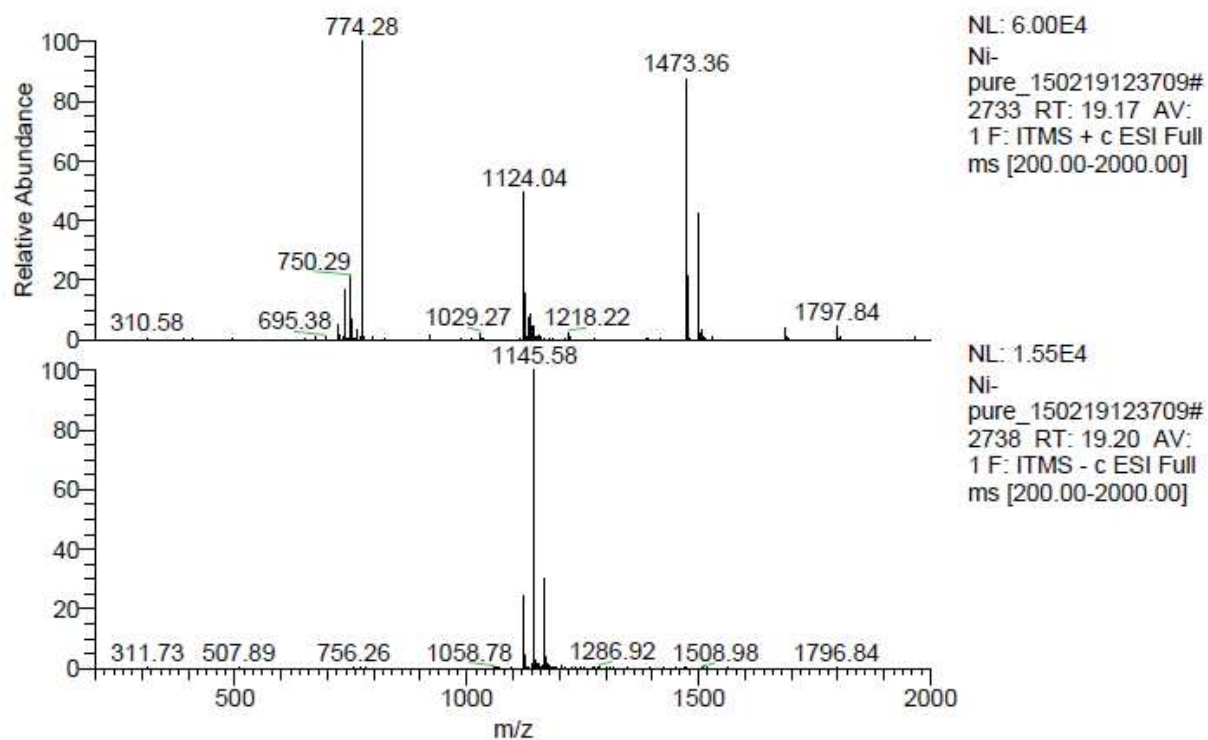
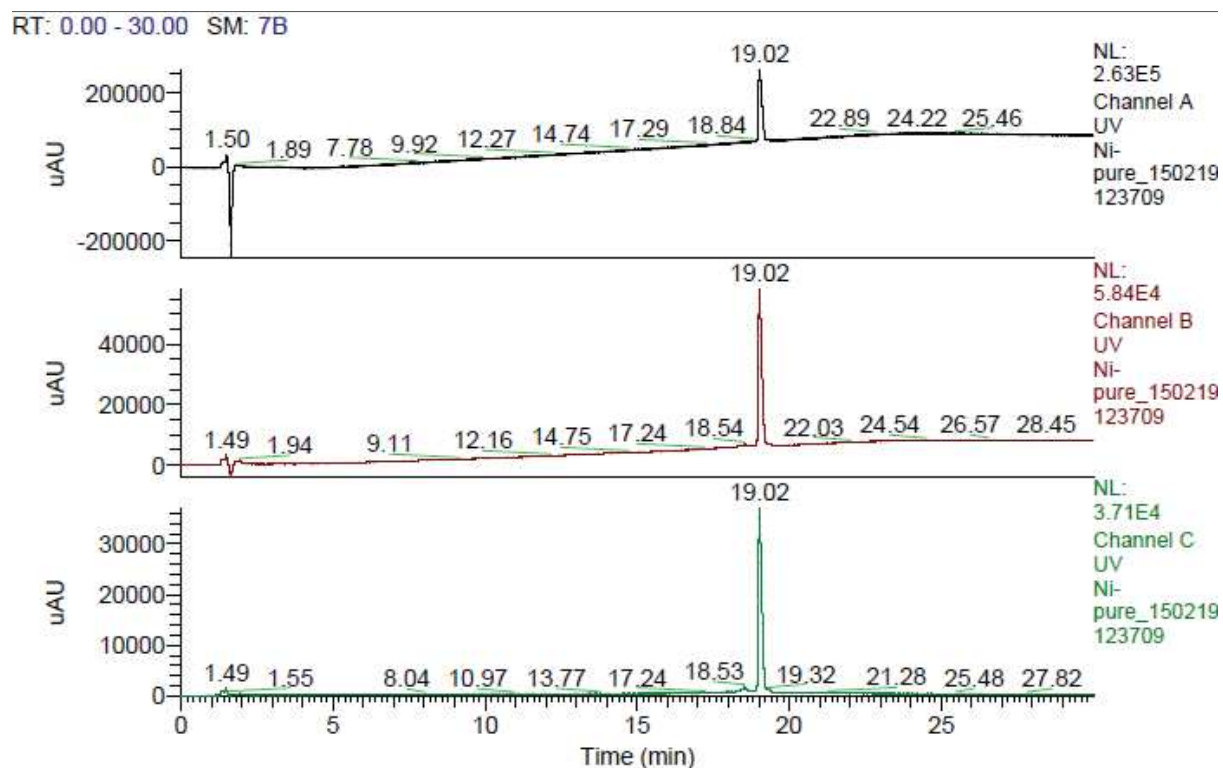
Compound 12 (75 mg, 34%)



HRMS: m/z (ESI) calculated $[M+2H]/2$: 1124.6921, measured: 1124.6936

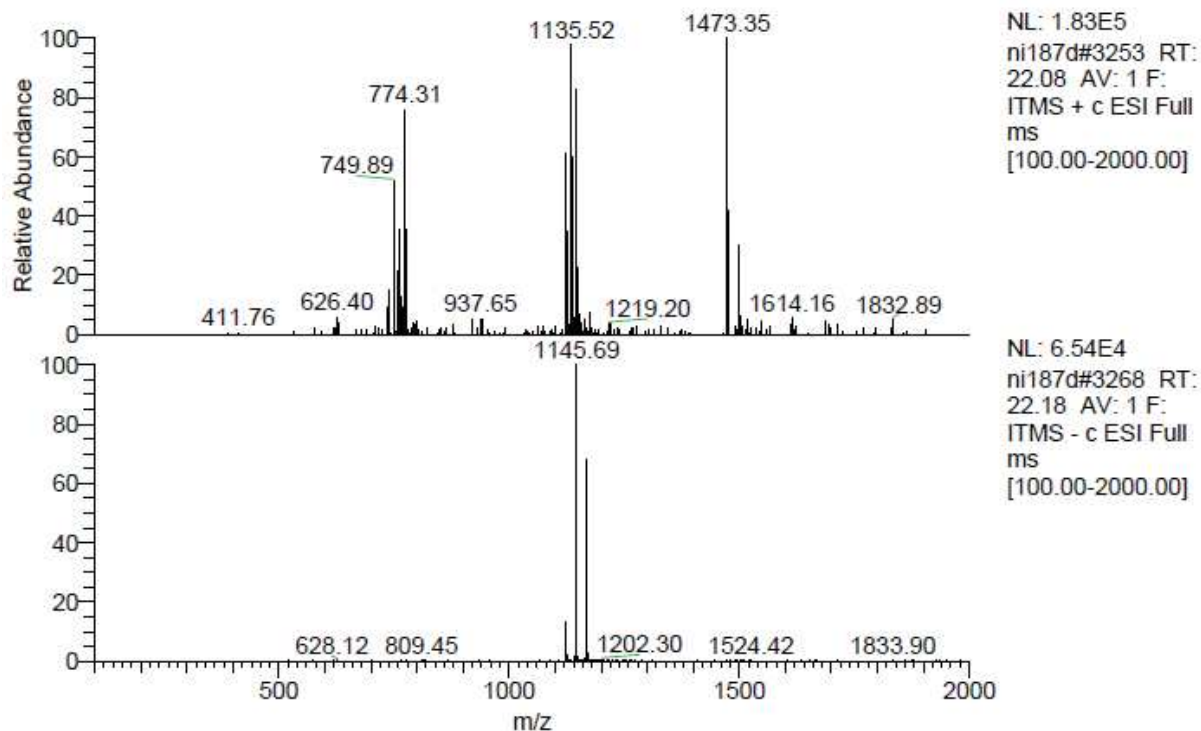
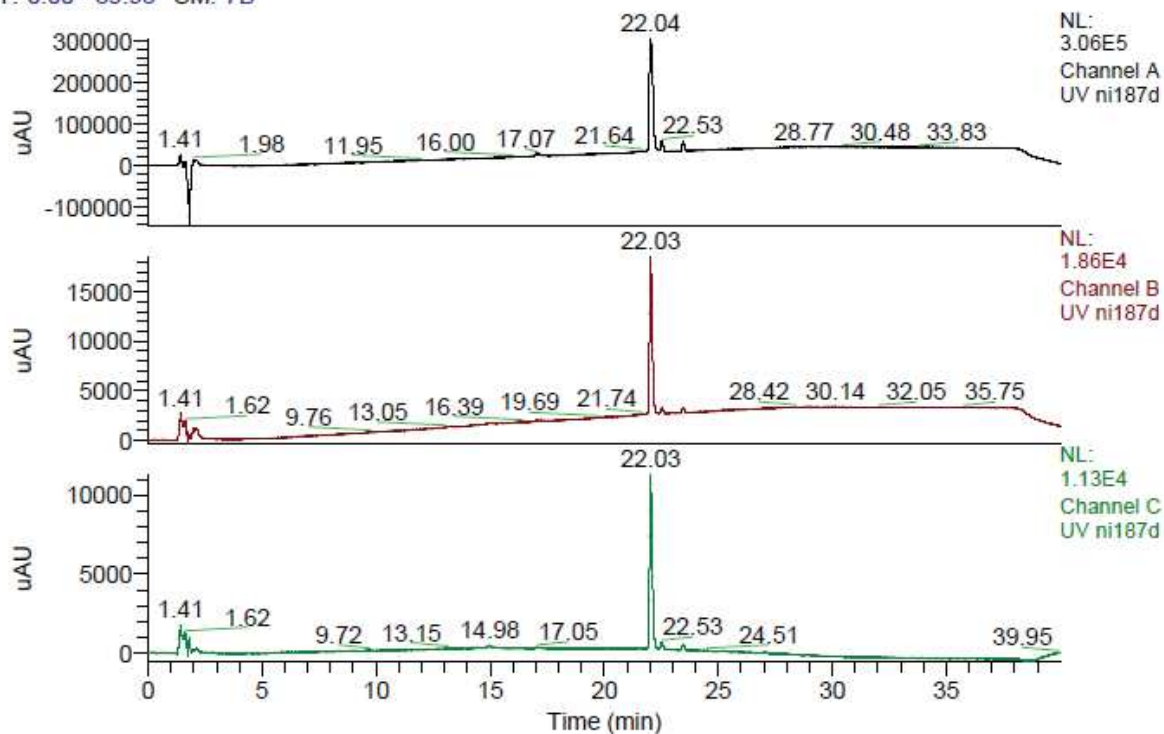
LC-MS of the peptides

Compound 9:

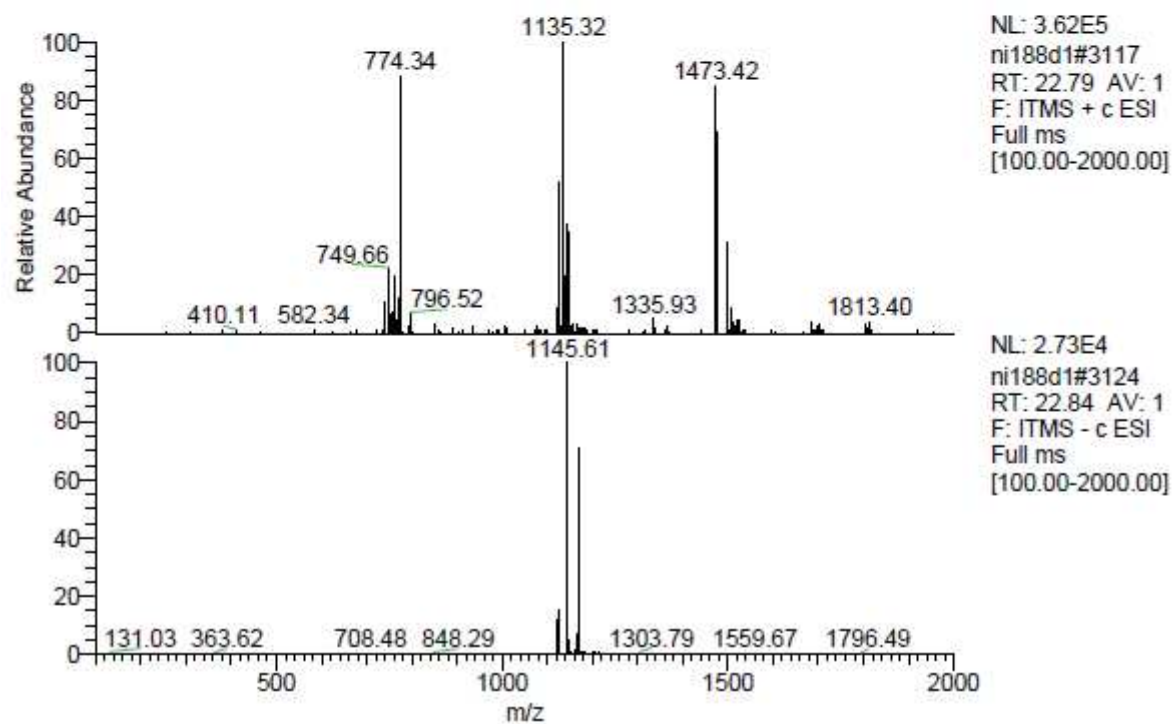
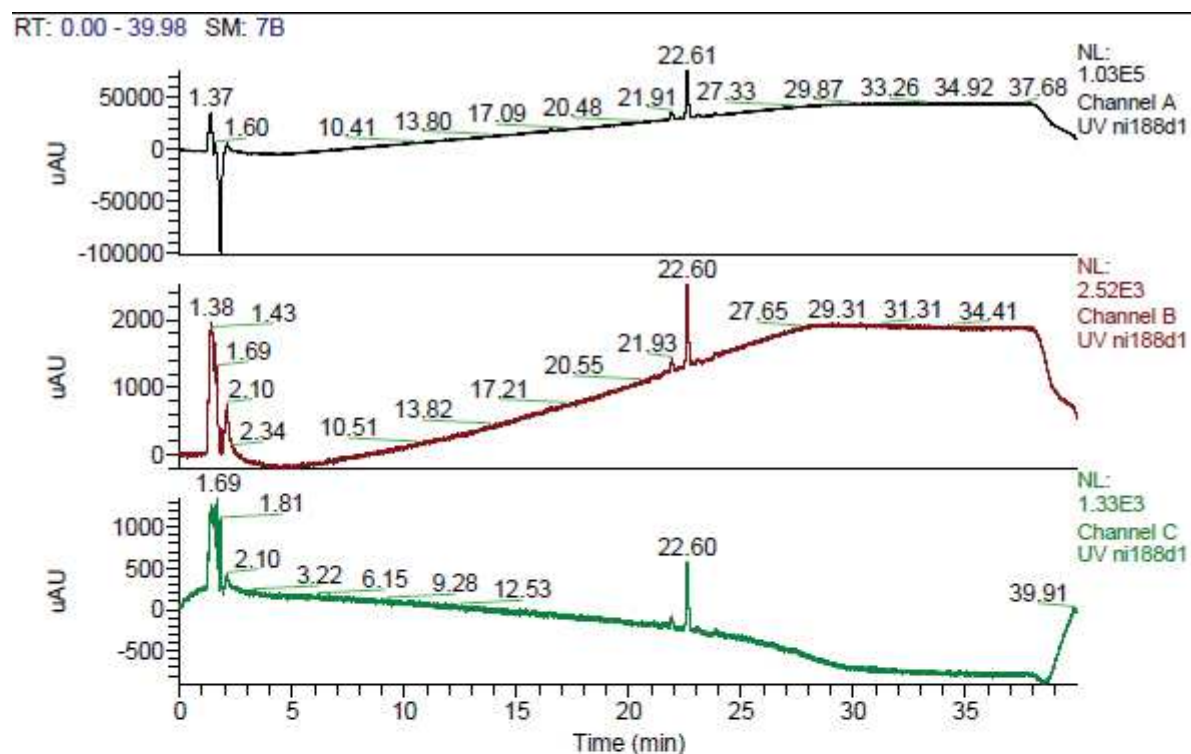


Compound 10:

RT: 0.00 - 39.98 SM: 7B

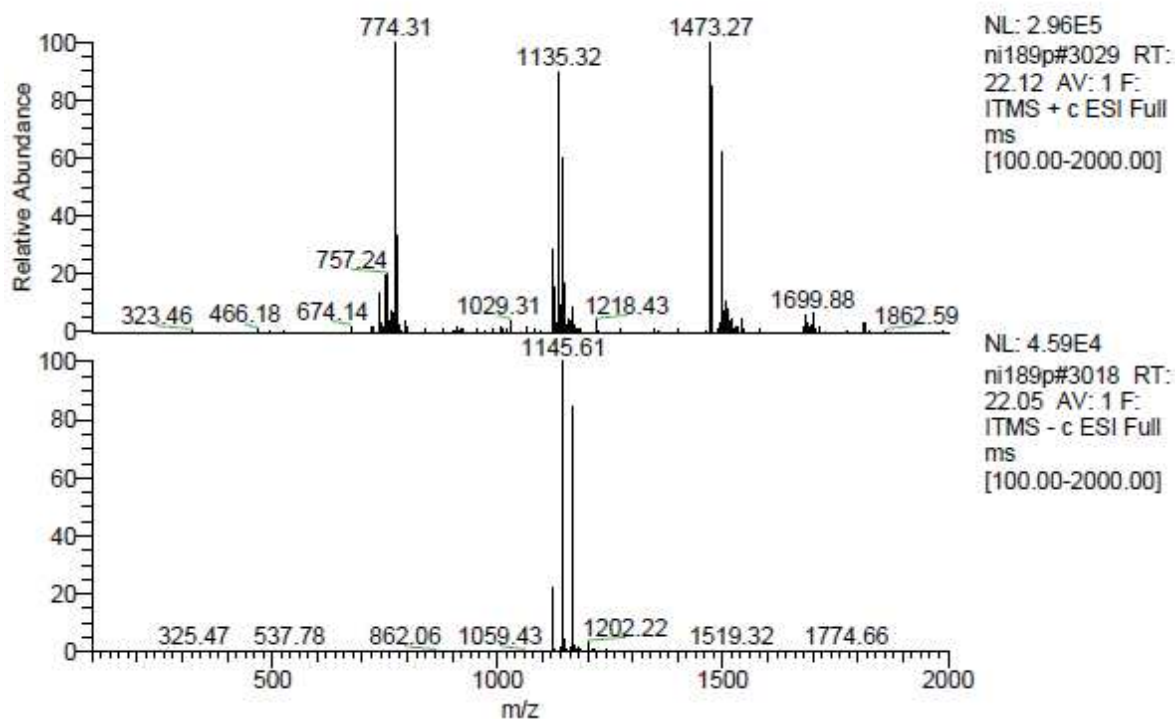
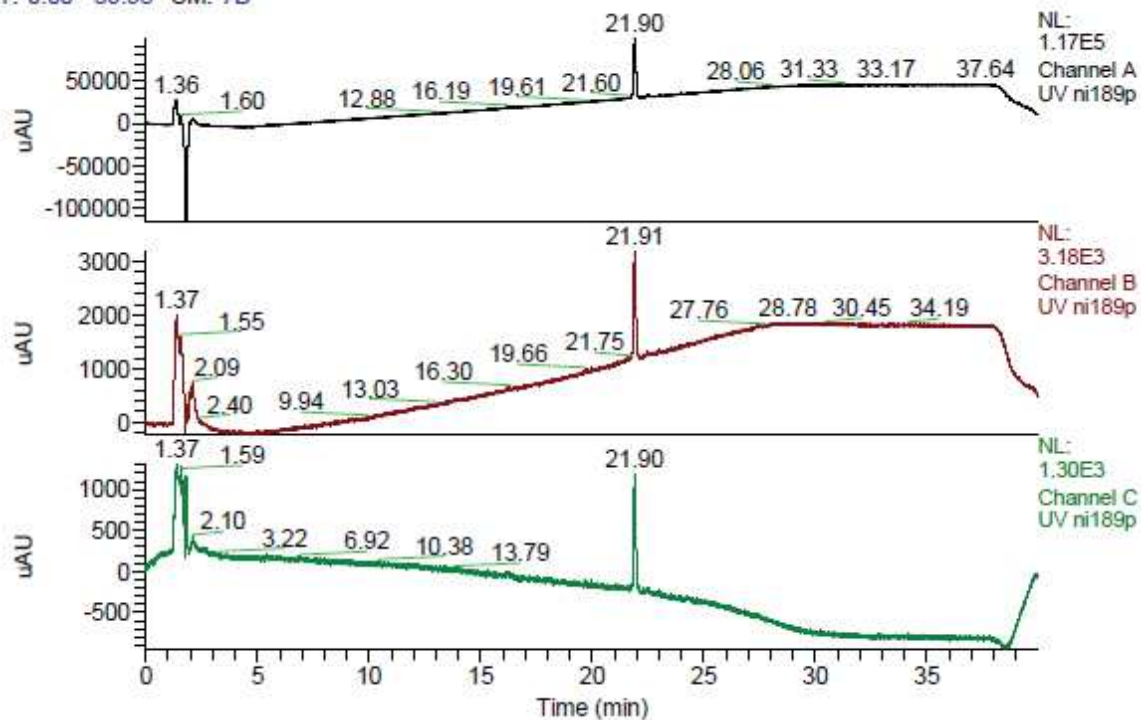


Compound 11:

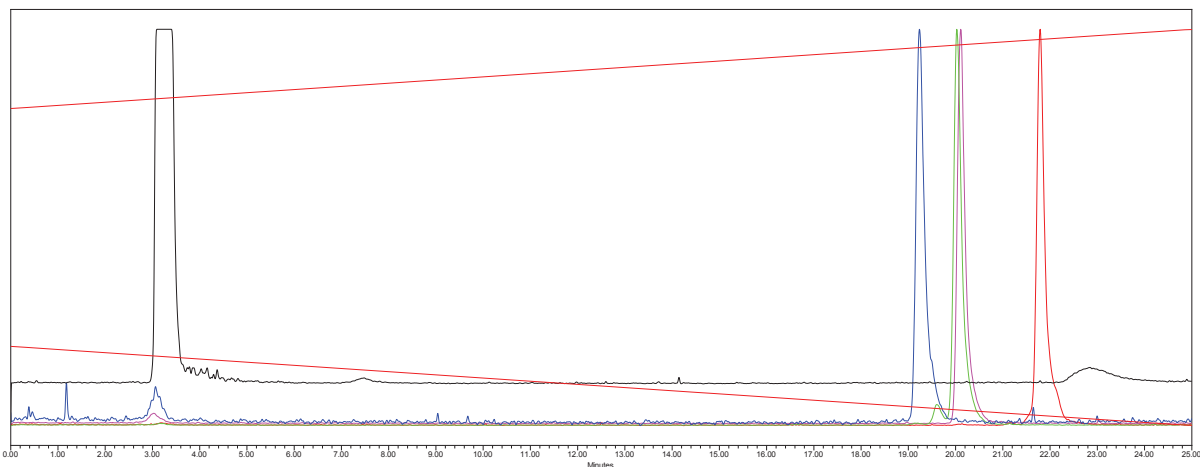


Compound 12:

RT: 0.00 - 39.98 SM: 7B



Stacked chromatograms of the analytical HPLC-ELSD of alamethicin and peptides 9-12.



Black alam, red (9), magenta (10), green(11), blue (12).

4. Circular dichroism studies

The CD spectra of peptides were recorded at a concentration of 0.1 mM in different media. Solution of peptides were prepared in spectrophotometric grade methanol, 1-Octanol, 2,2,2,-trifluoroethanol (TFE) and 100 mM sodium dodecyl sulphate (SDS) solution in water. CD experiments were carried out using a Jasco J815 spectropolarimeter. Spectra were recorded using a 1 mm path length CD cuvette, over a wavelength range of 190–260 nm, at room temperature. Continuous scanning mode was used, with a response of 1.0 s with 0.1 nm steps and a scan speed of 100 nm min⁻¹. The signal-to-noise ratio was improved by acquiring each spectrum over an average of three scans. The average baseline spectra were subtracted to the average sample spectra.

Temperature dependent CD spectra were obtained and controlled with an external sensor. Spectra were recorded from 260 nm to 190 nm, with data collected at 0.5 nm intervals with a 1 nm bandwidth and 1s reading. Each spectrum was acquired three times. The temperature range was 5 °C to 75 °C with a temperature gradient of 5.0 °C/minute and 5 s delay after reaching the set temperature. The average baseline spectra were subtracted to the average sample spectra.

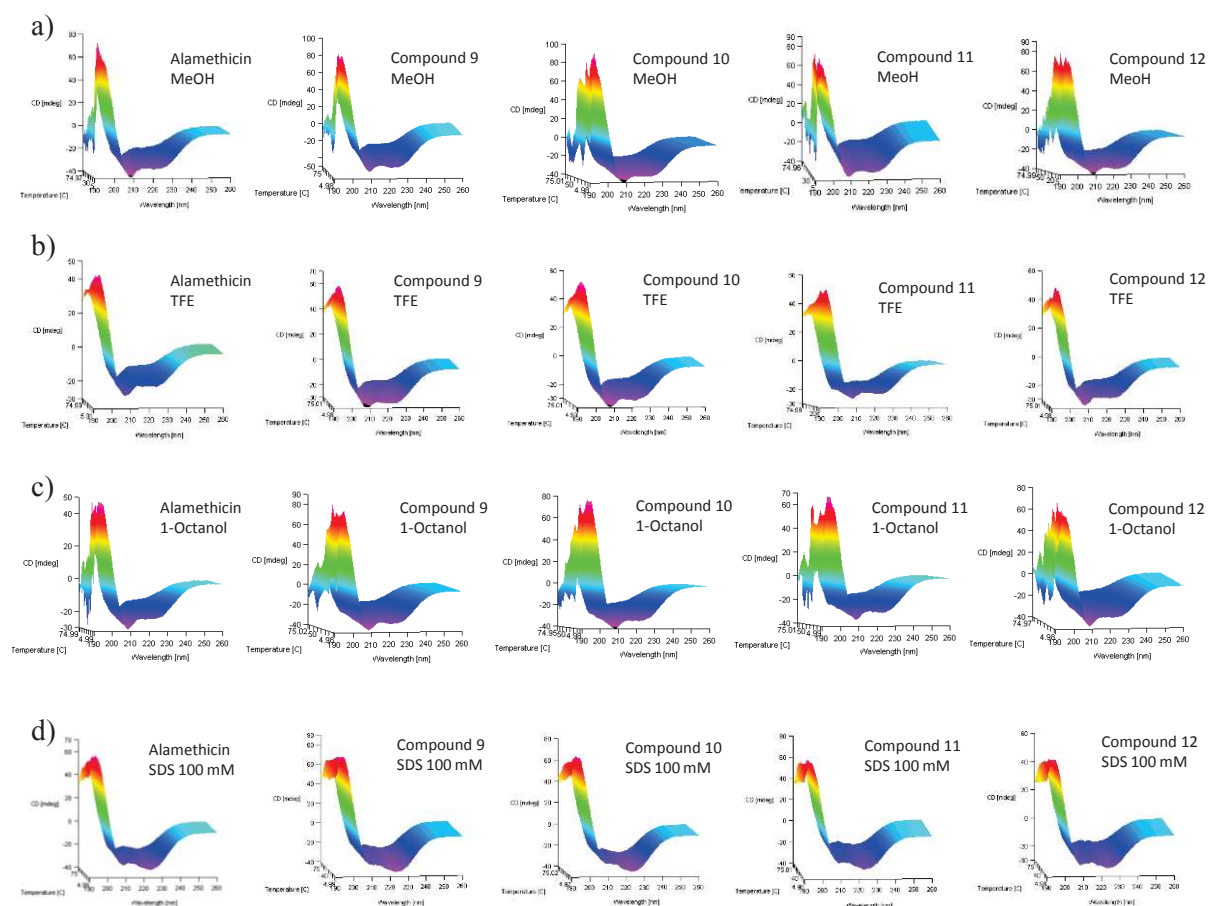


Figure 1. 3D CD spectra of temperature-dependence studies in a) MeOH, b) TFE, c) 1-octanol and d) SDS 100 mM in water.

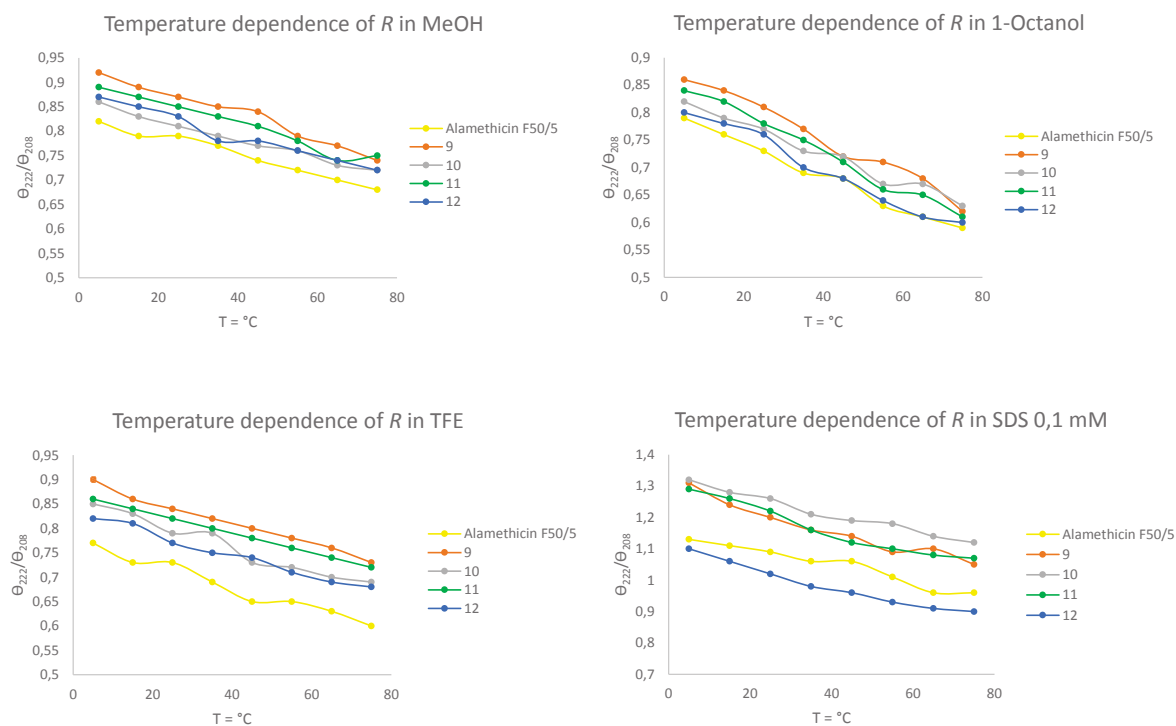
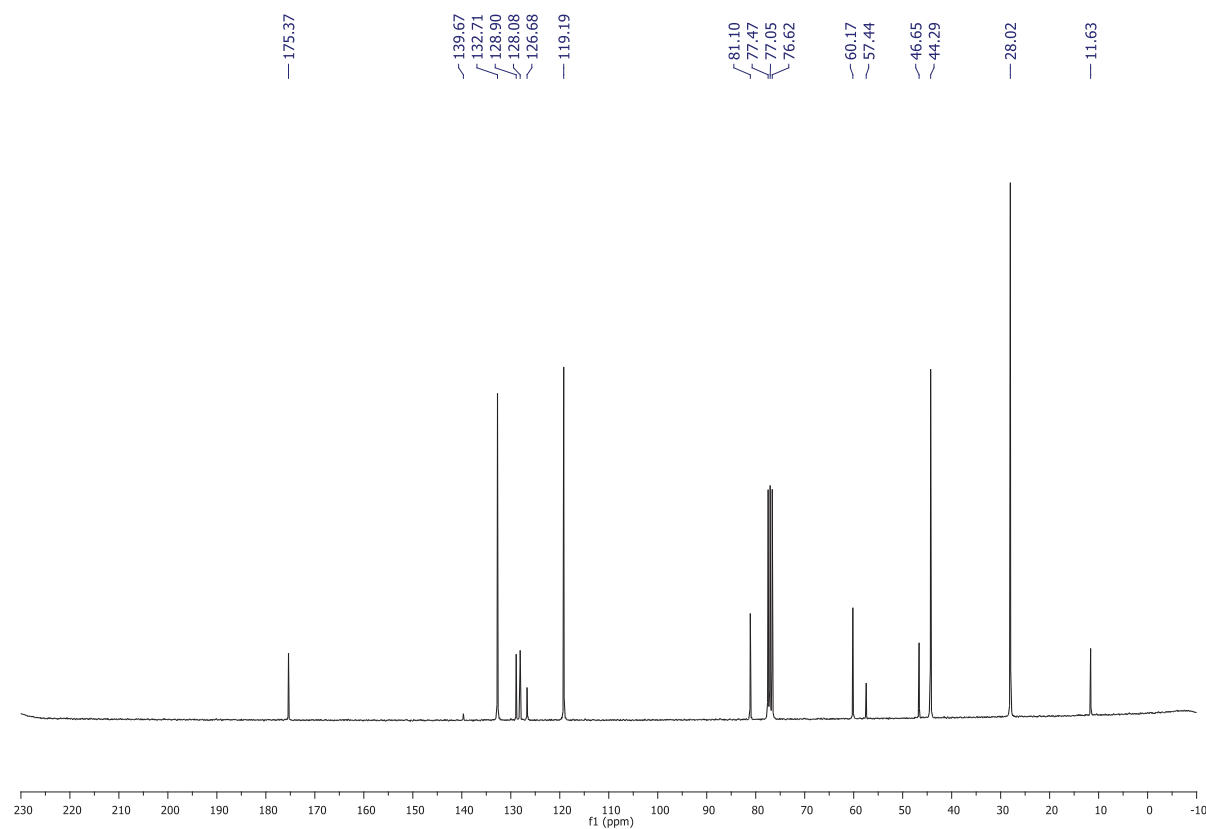
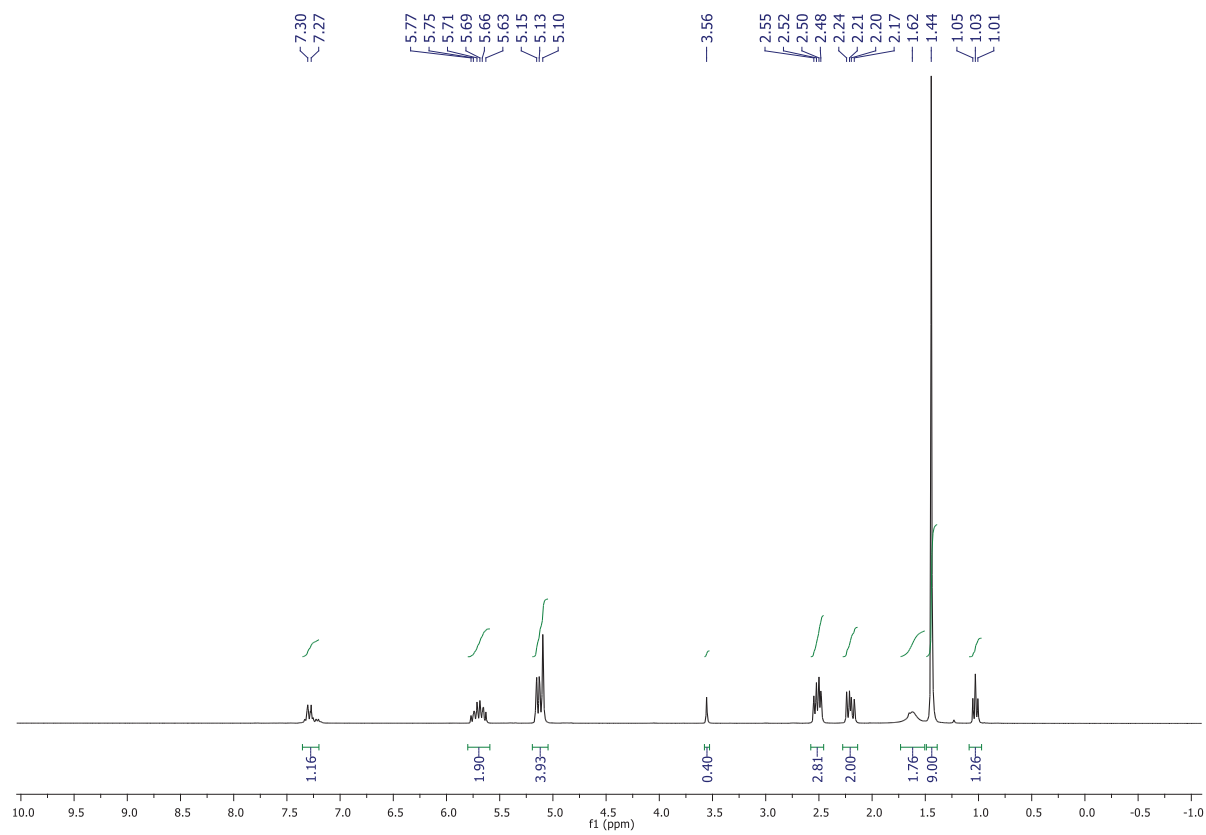


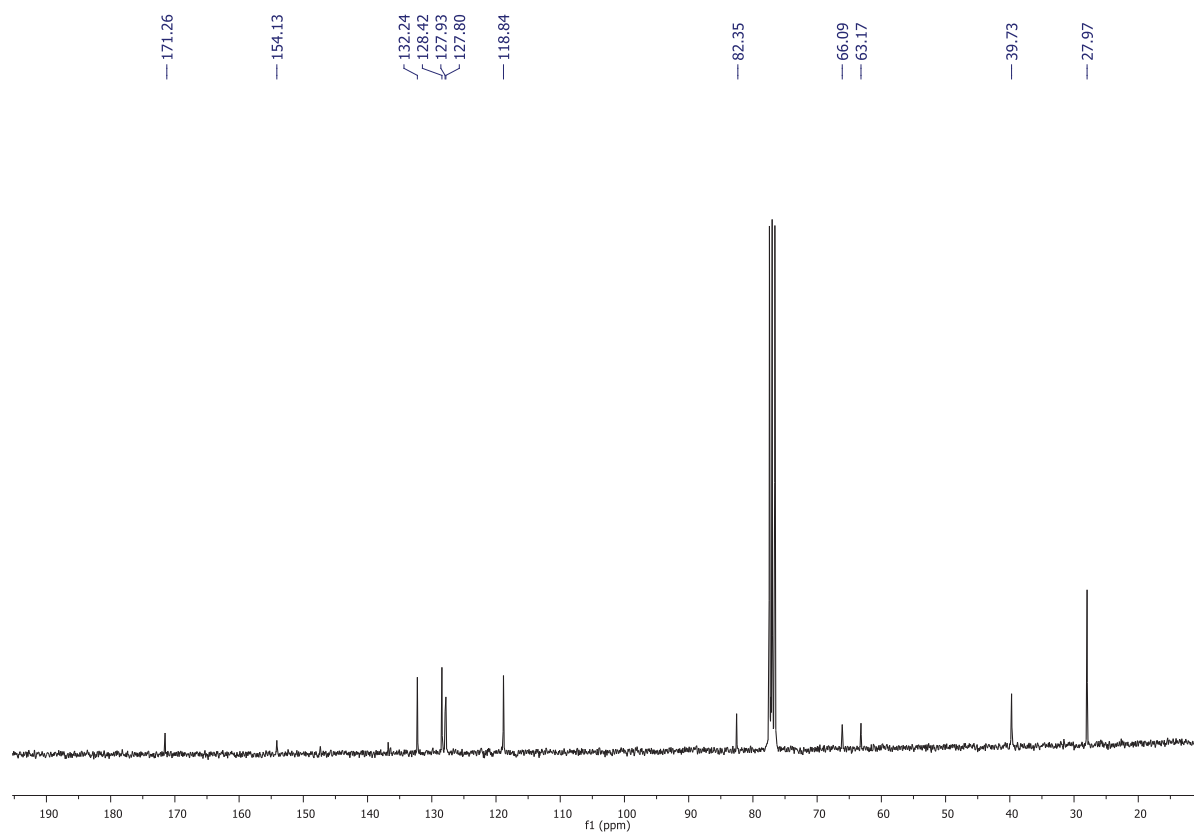
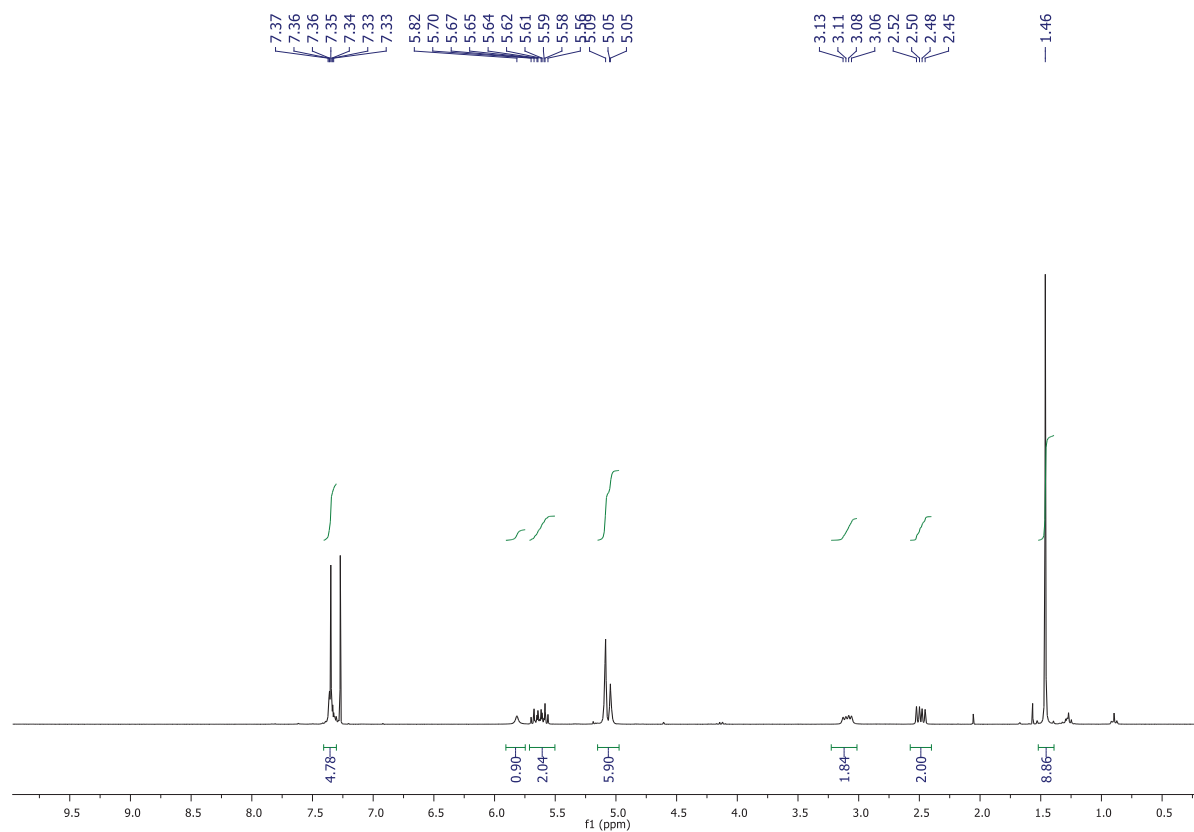
Figure 2. Temperature-dependence of R

5. ^1H and ^{13}C NMR spectra

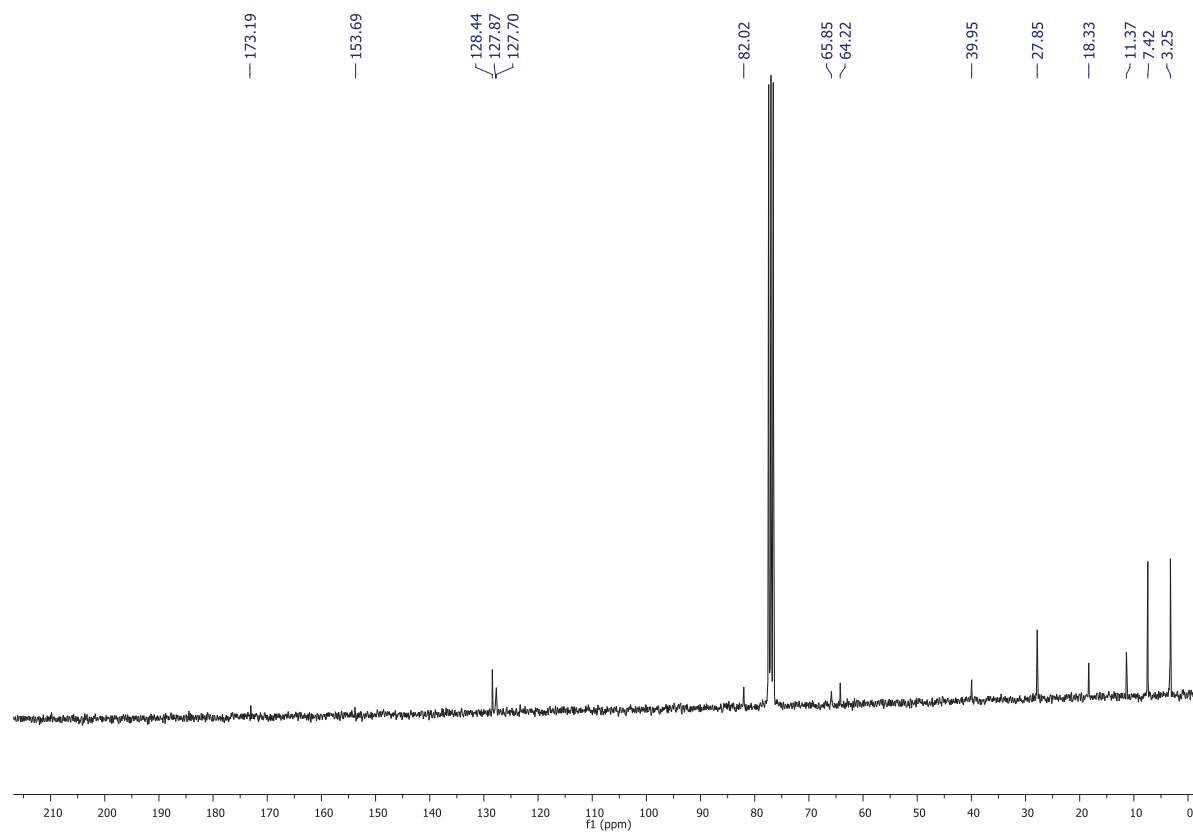
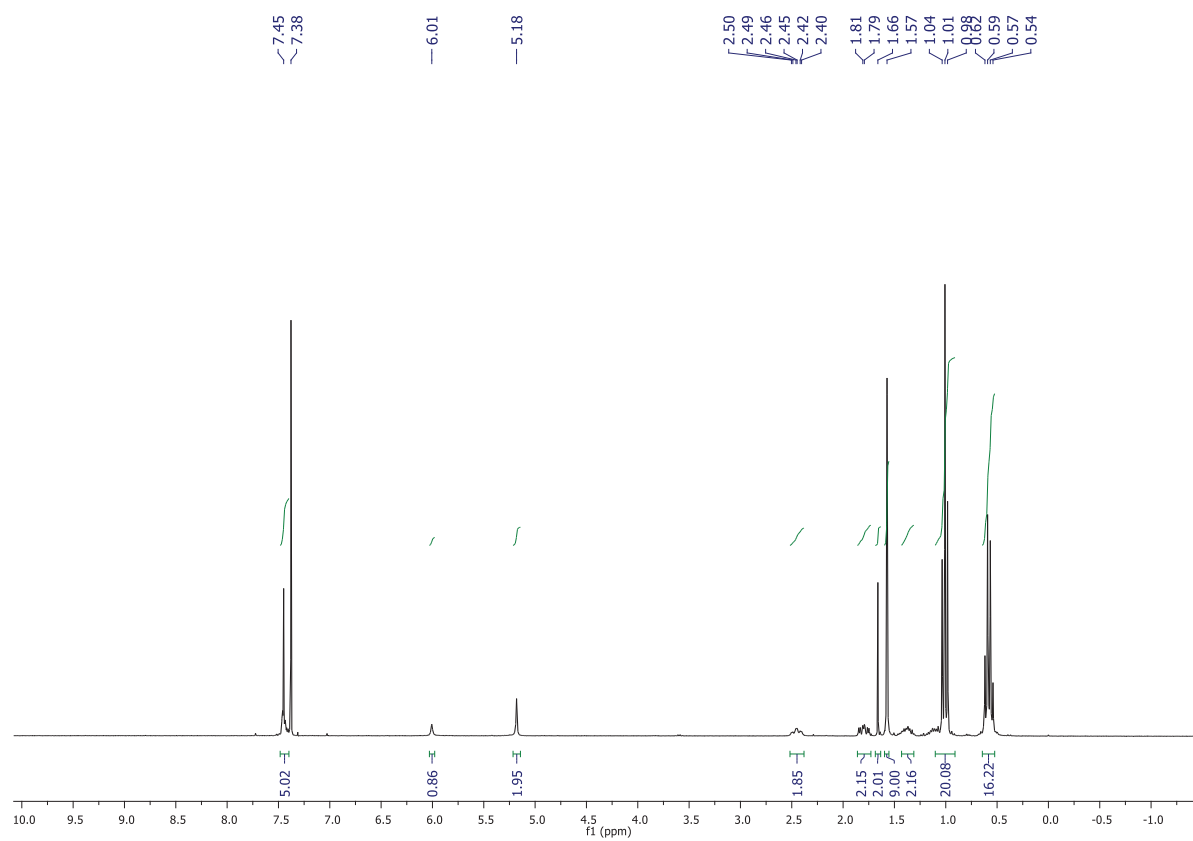
Compound 3



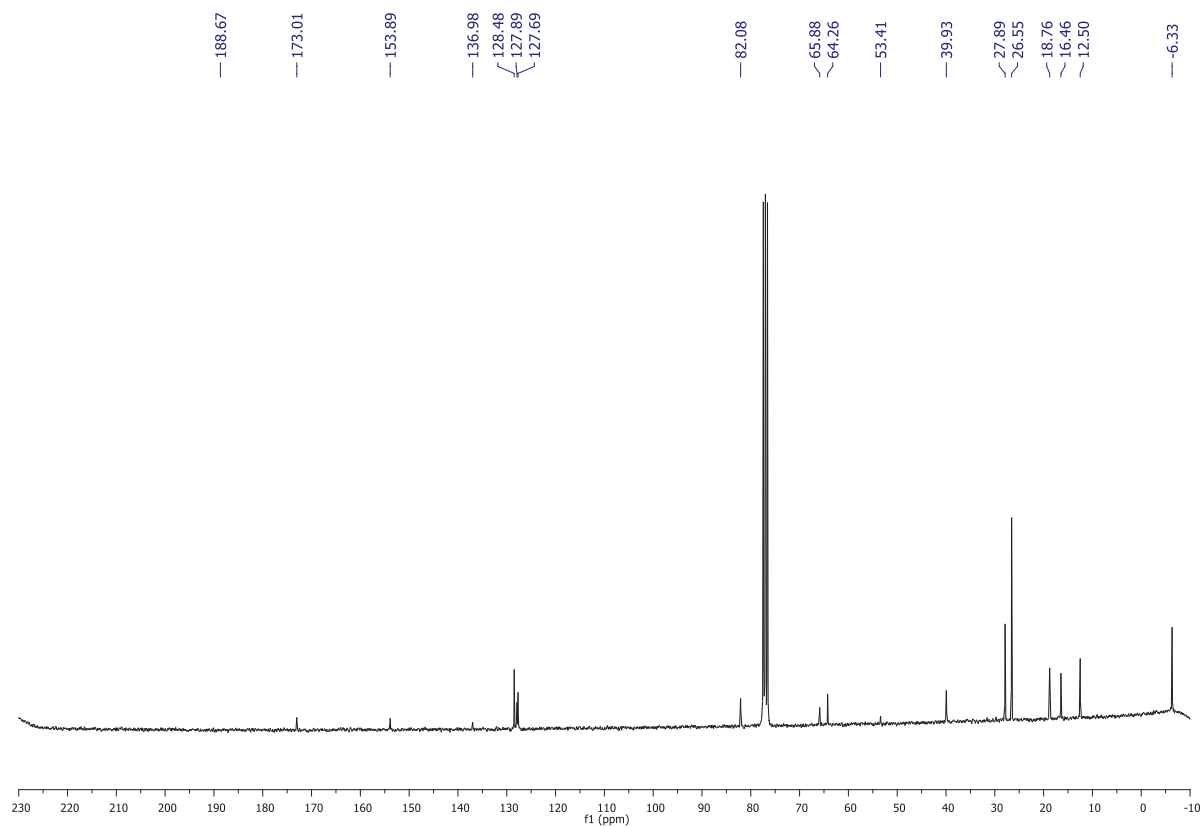
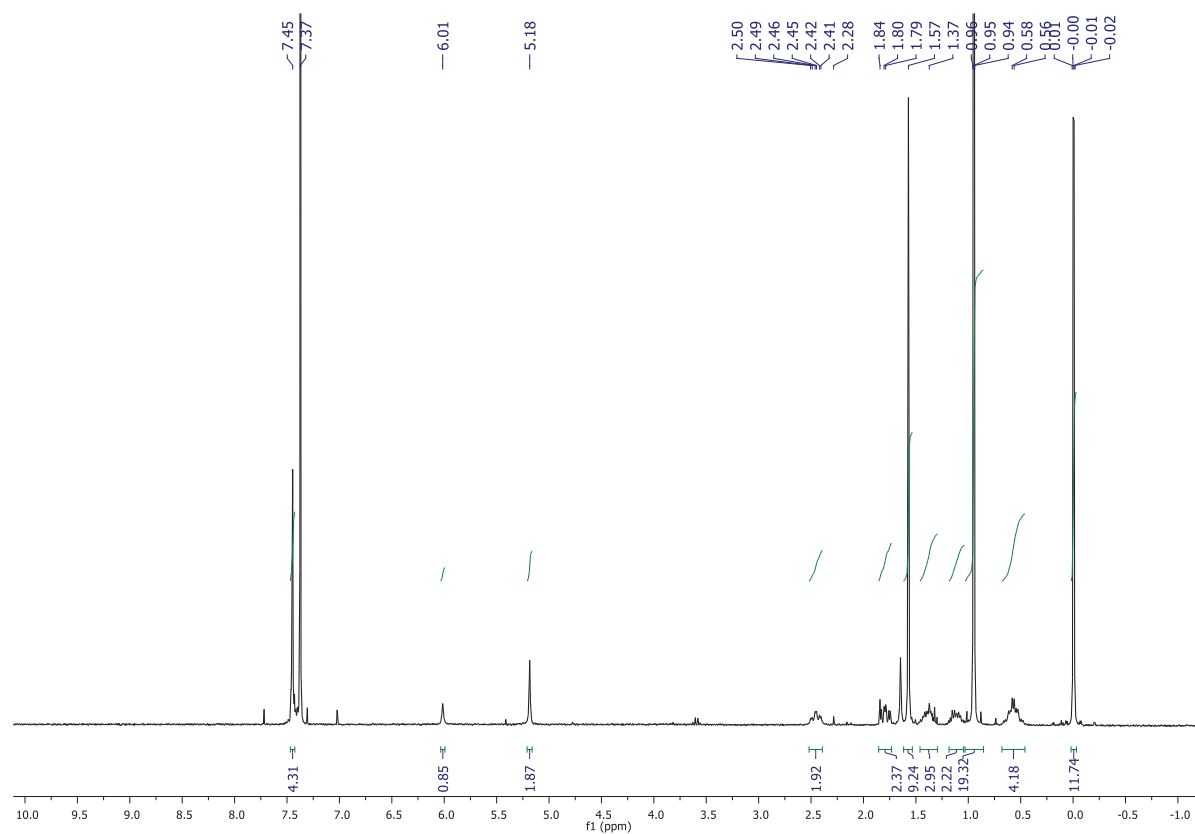
Compound 4



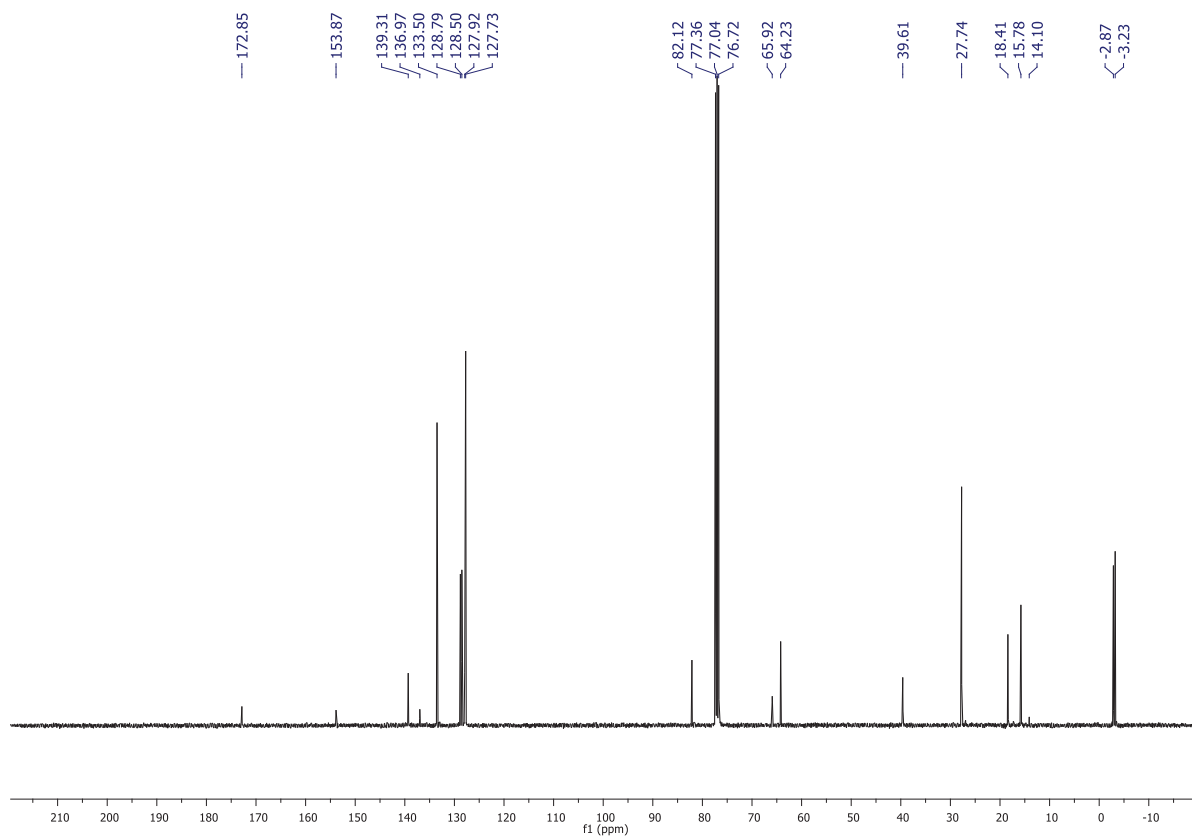
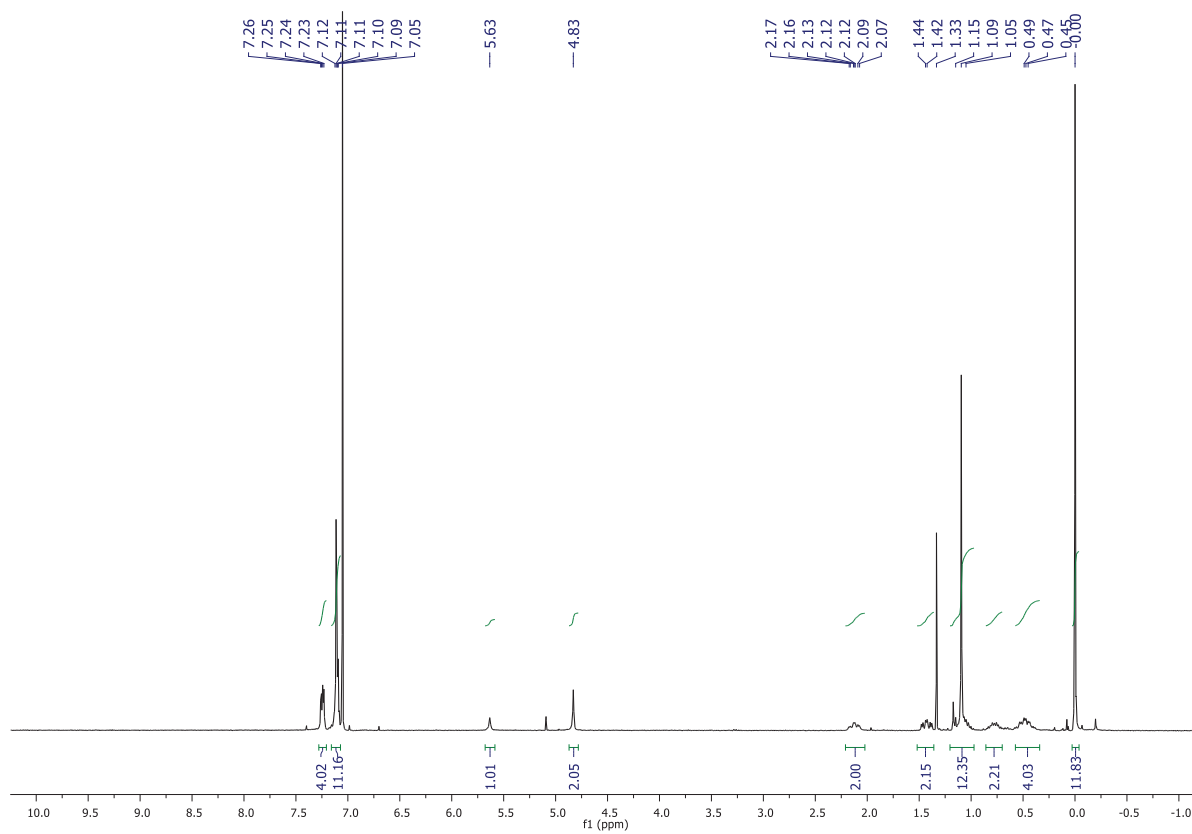
Compound 5a



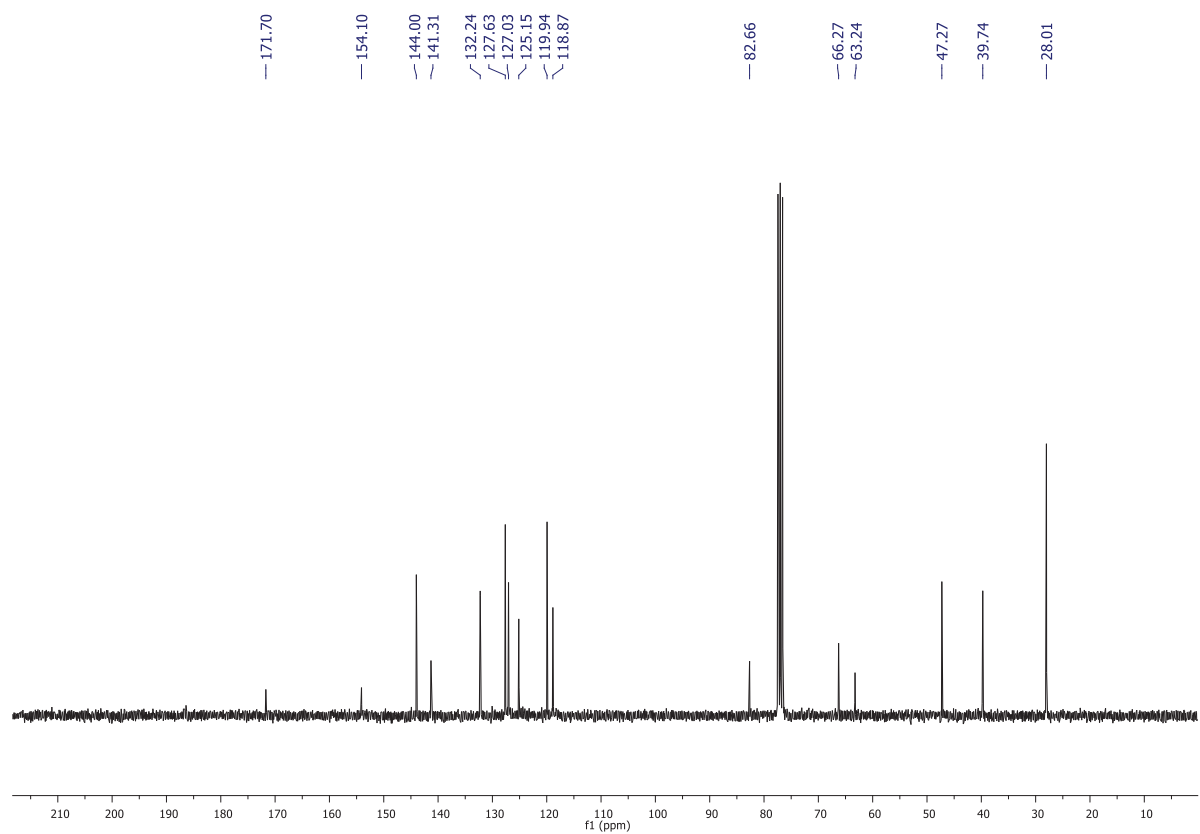
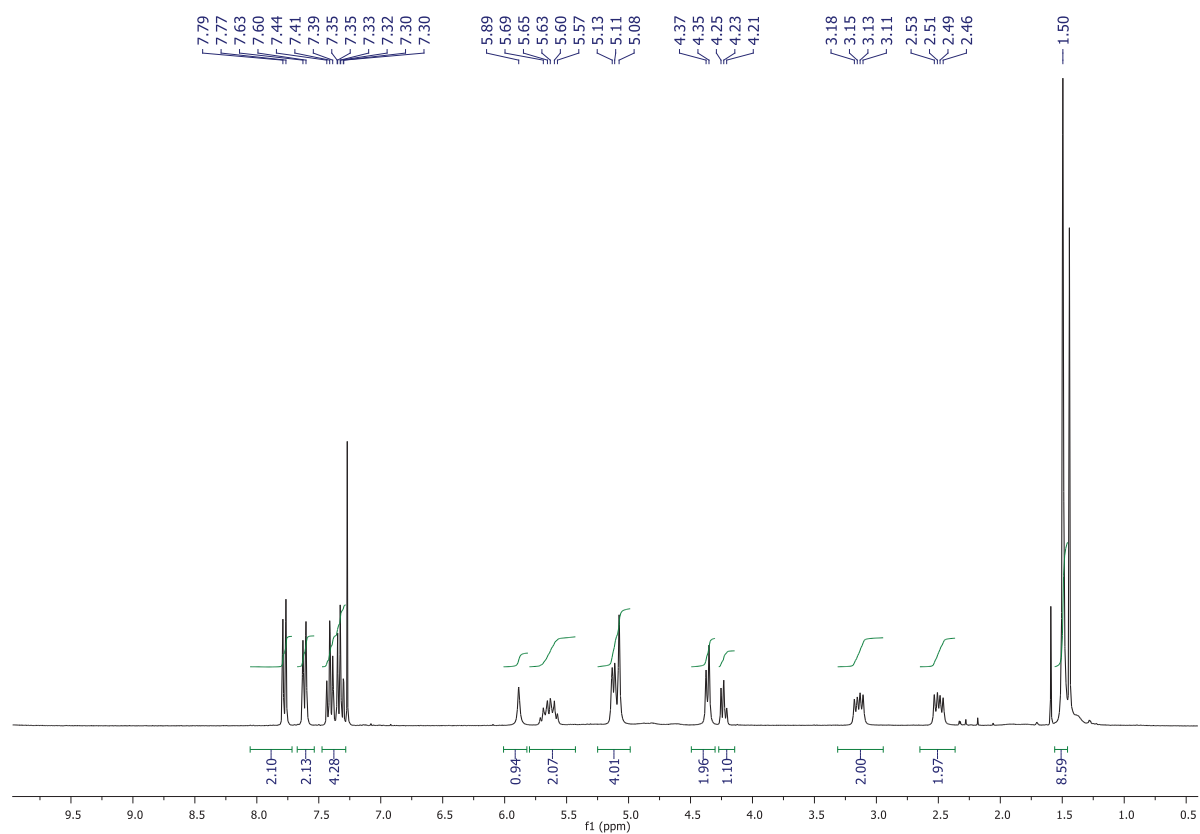
Compound 5b



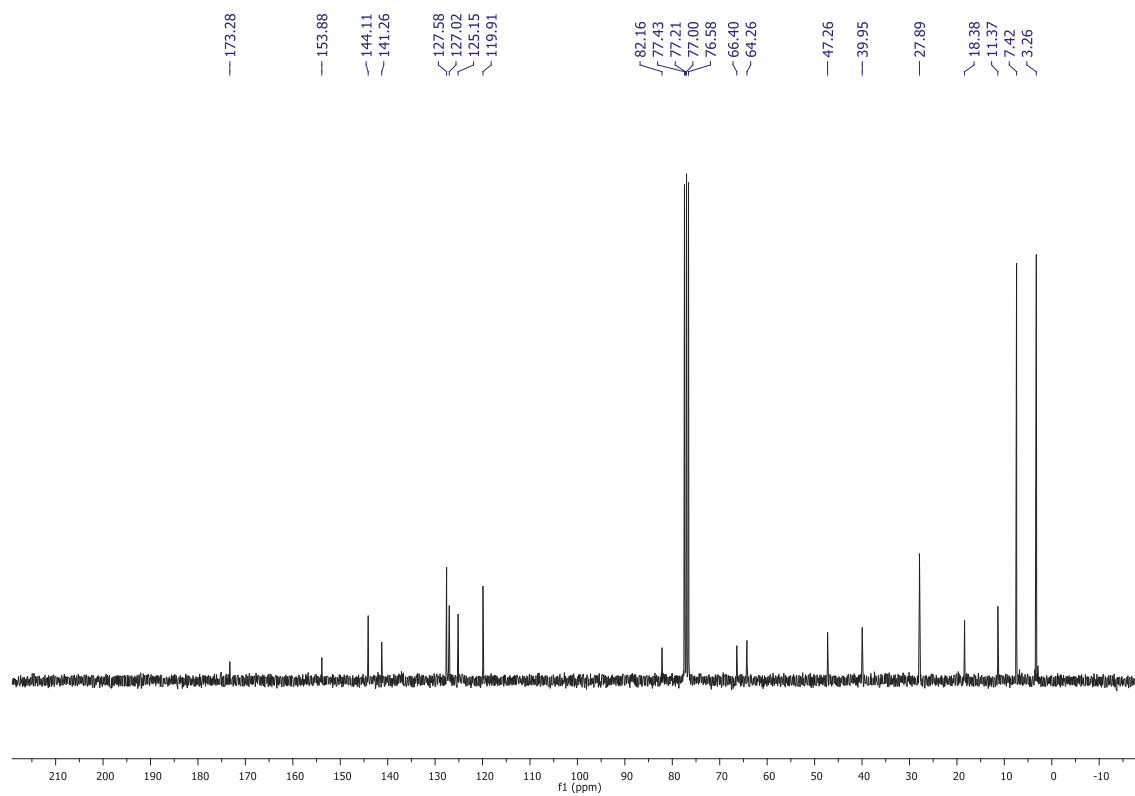
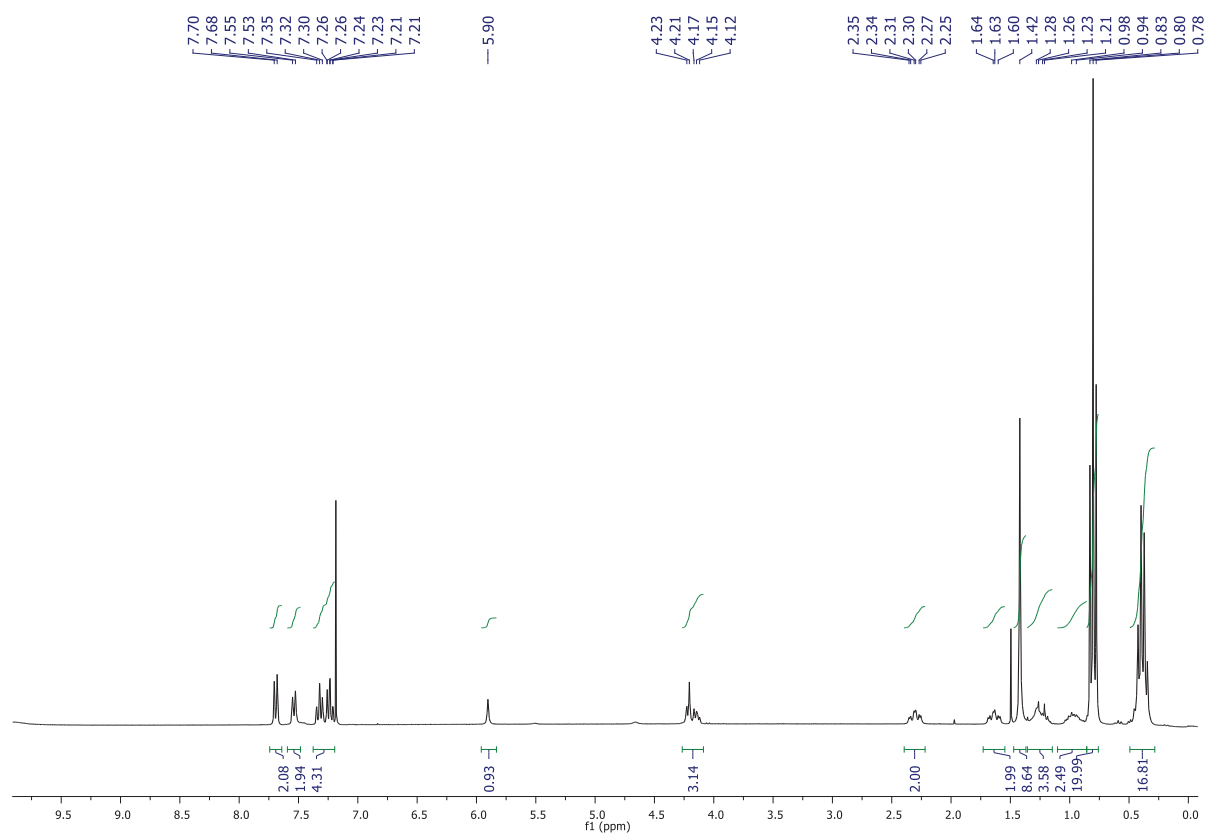
Compound 5c



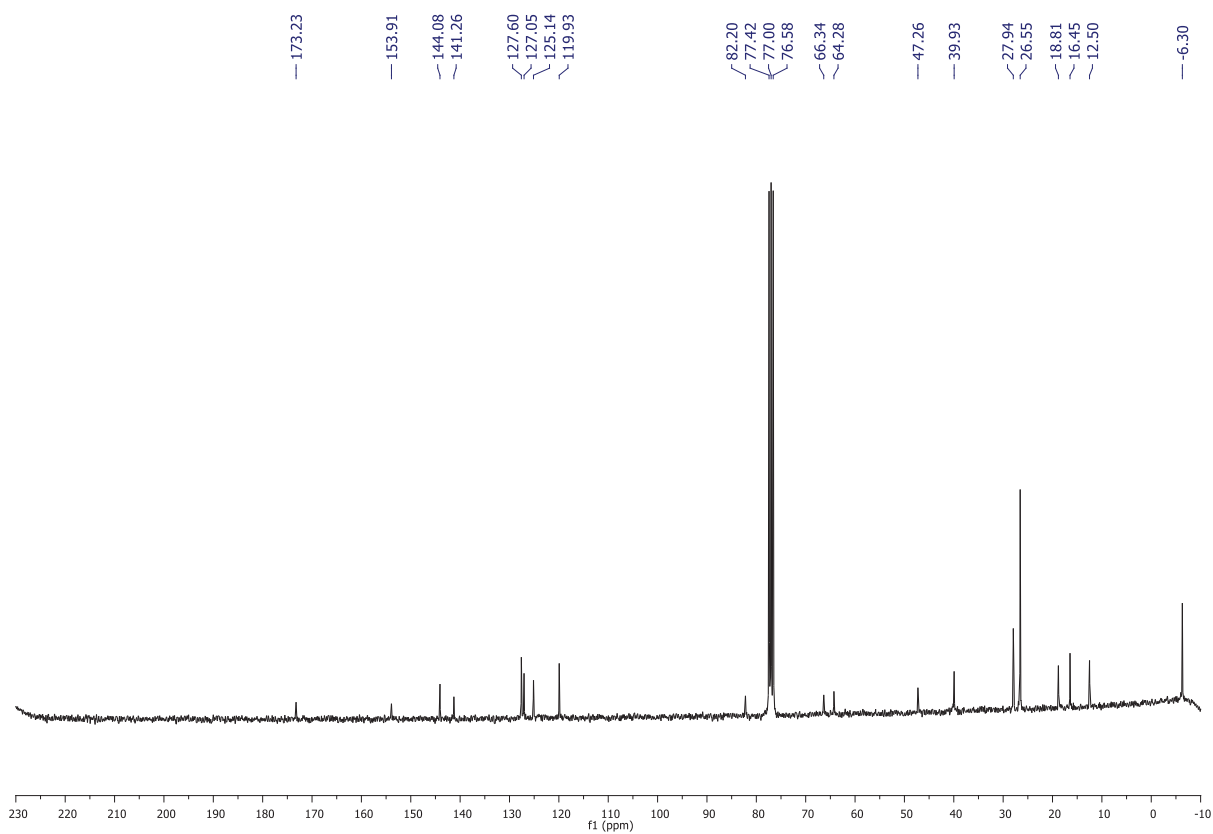
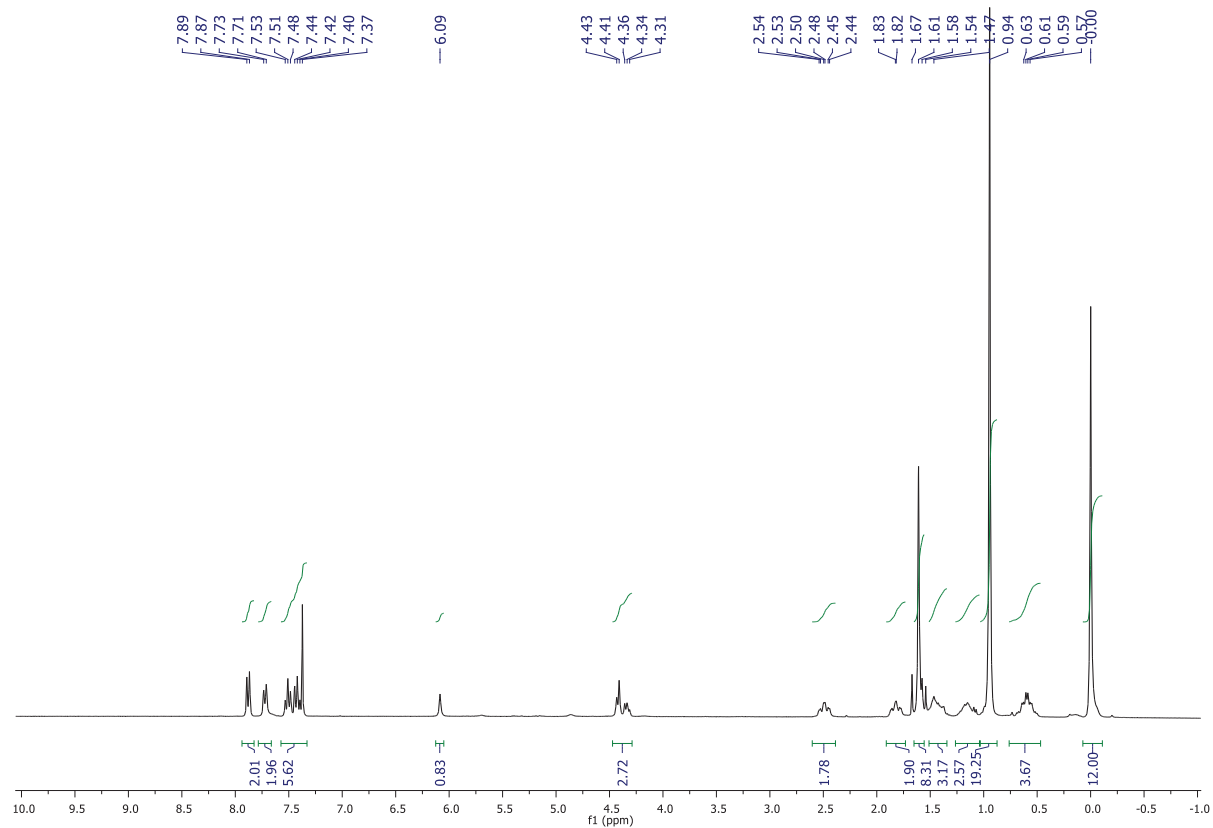
Compound 6a



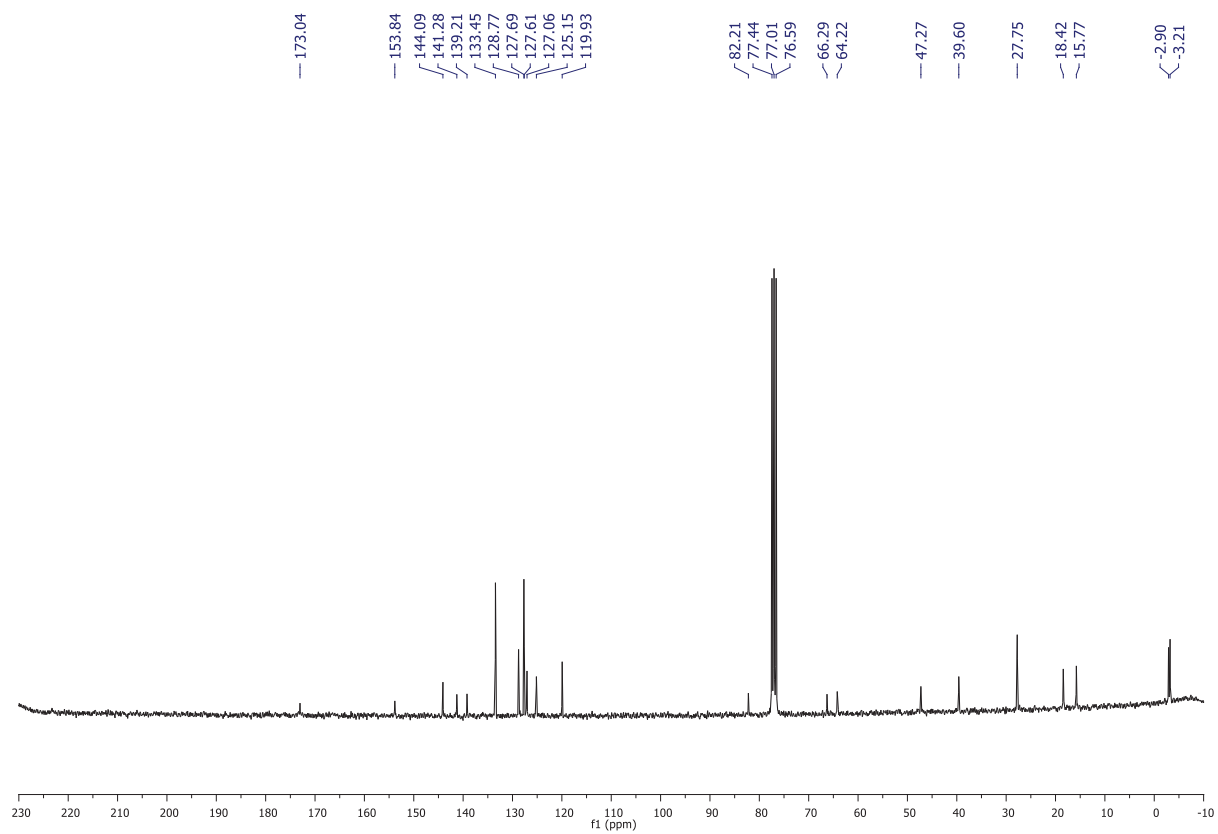
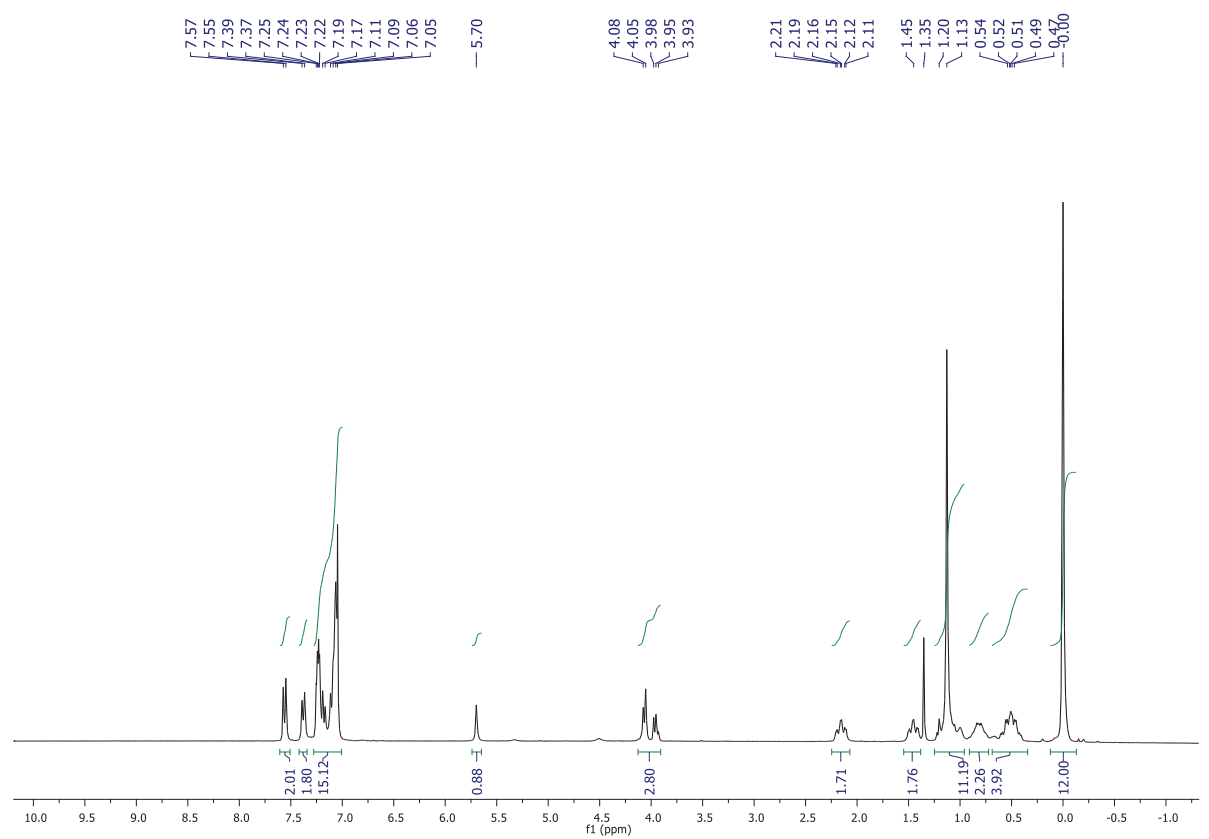
Compound 7a



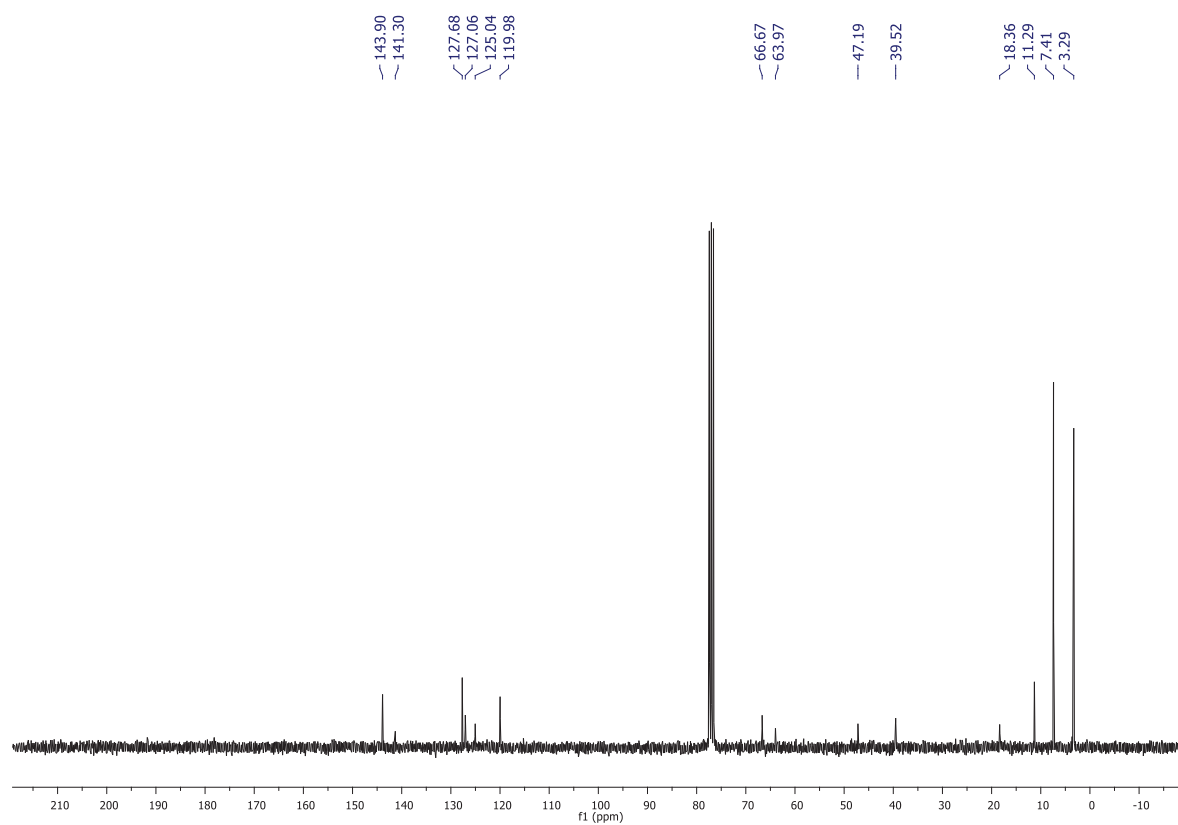
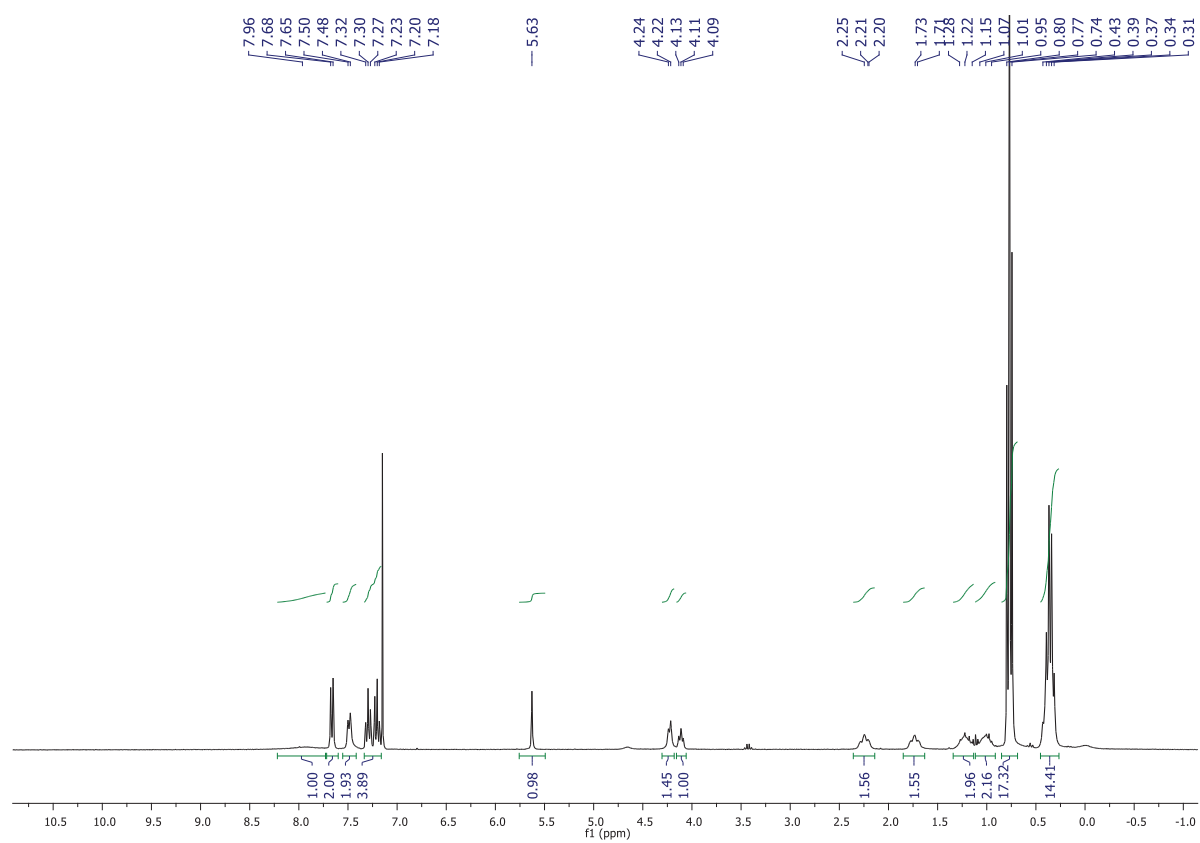
Compound 7b



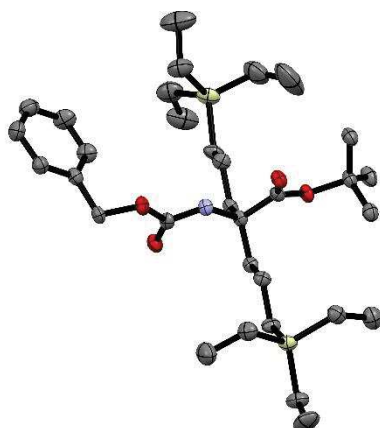
Compound 7c



Compound 8a



6. Crystal Structure of 5a



X-ray data of **5a** were collected at 100K with an Oxford Diffraction Xcalibur 2 diffractometer equipped with a copper microsource ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Diffraction data were processed using CrysAlis RED (Oxford Diffraction, **2003**). The structures were solved by direct methods with SIR2004 (Burla M.C., Caliandro R., Camalli M., Carrozzini B., Cascarano G.L., De Caro L., Giacovazzo C., Polidori G. and Spagna R. *J. Appl. Cryst.* **2005**, 38:381-388) and the crystallographic refinements were conducted using SHELXL-97 (Sheldrick G.M. *Acta Cryst.* **2008**, A64: 112-122). Selected crystallographic data are provided in the table S1.

Table S1: Selected crystallographic data for **5a**

Molecular formula	C ₃₂ H ₅₉ N ₁ O ₄ Si ₂
<i>Mr</i> (g.mol ⁻¹)	577.98
Space group	<i>P</i> 2 ₁
<i>a</i> (Å)	16.472(2)
<i>b</i> (Å)	18.5630(4)
<i>c</i> (Å)	11.996(2)
<i>beta</i> (°)	92.58(1)
Volume	3664.4(8)
<i>D</i> _x (g.cm ⁻³)	1.048
<i>Z</i>	4
<i>Z</i> '	2
F(000)	1272.0
<i>N</i> _{ref} (measured)	43981
<i>R</i> _{int}	0.066
Data completeness	0.98
Theta(max)	77.72
<i>R</i> ₁ (<i>F</i> ² > 2σ(<i>F</i> ²))	0.071 (12026)
<i>wR</i> ₂ (all data)	0.085 (15195)
<i>S</i>	1.033
<i>N</i> _{par}	704

C. Annexe de l'article 3 : Straightfoward strategy to substitute amide bond by 1,2,3-triazoles in peptaibols analogs using AibΨ[Tz]-Xaa dipeptides Spectres LC/MS et RMN.

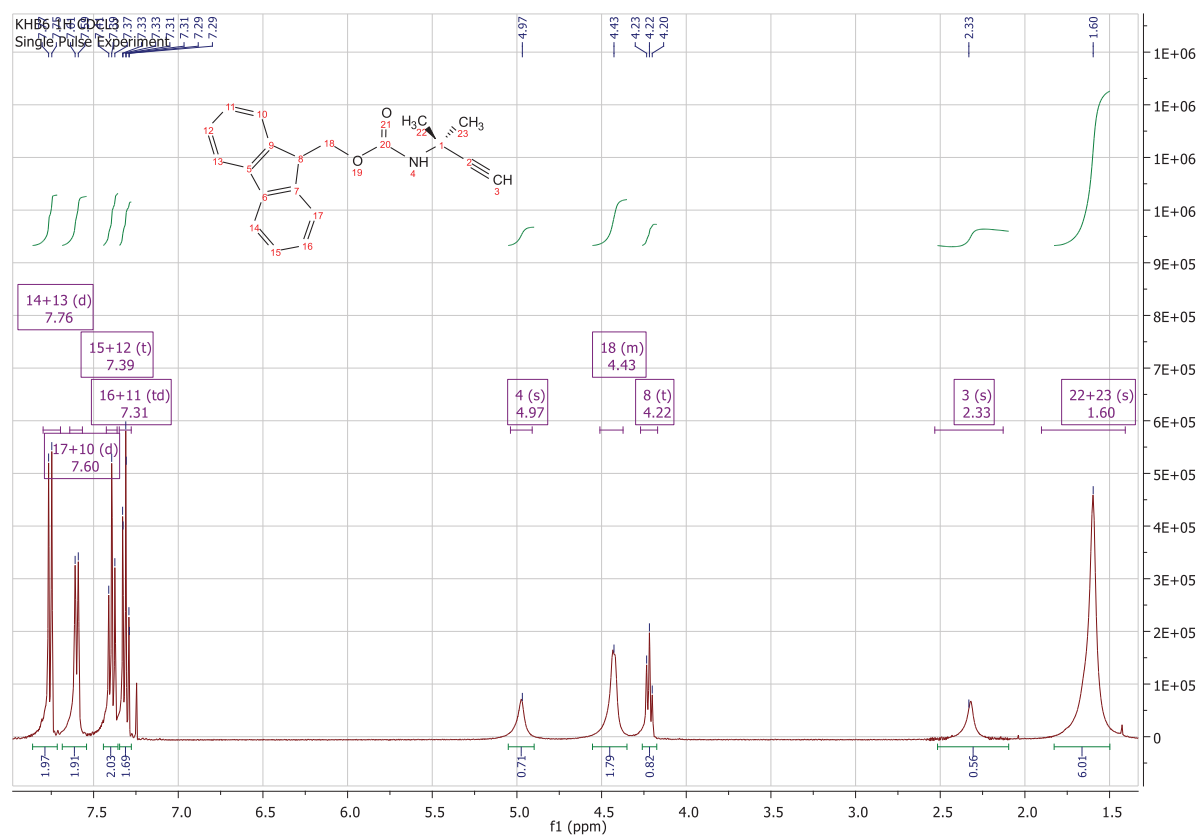
SUPPORTING INFORMATION

Khoubuib Ben Haj Salah,¹ Baptiste Legrand,² Sanjit Das,¹ Jean Martinez,² Nicolas Inguibert¹

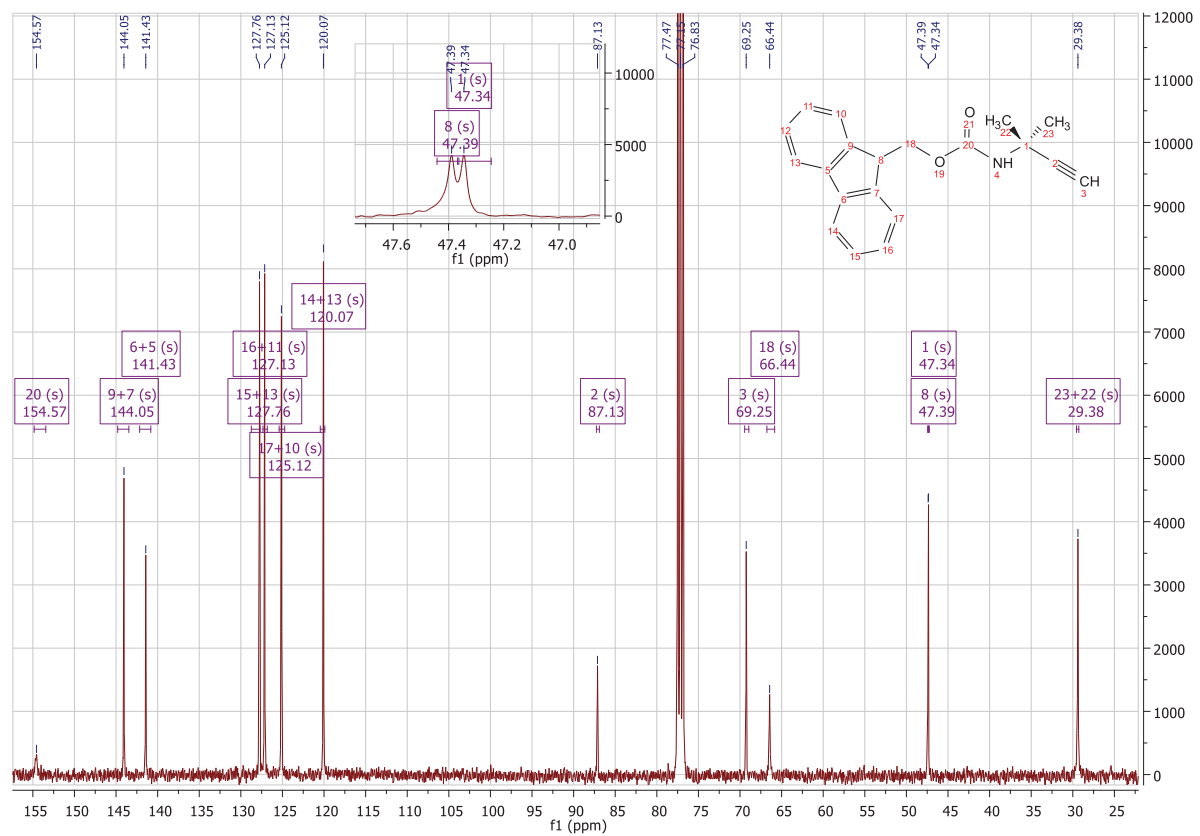
¹Université de Perpignan Via Domitia, Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE) USR CNRS 3278, centre de phytopharmacie, bâtiment T, 58 avenue P. Alduy, 66860 Perpignan, France.

²Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247 CNRS, Université de Montpellier, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5

9H-fluoren-9-ylmethyl (2-methylbut-3-yn-2-yl)-carbamate(2)
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)



¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)



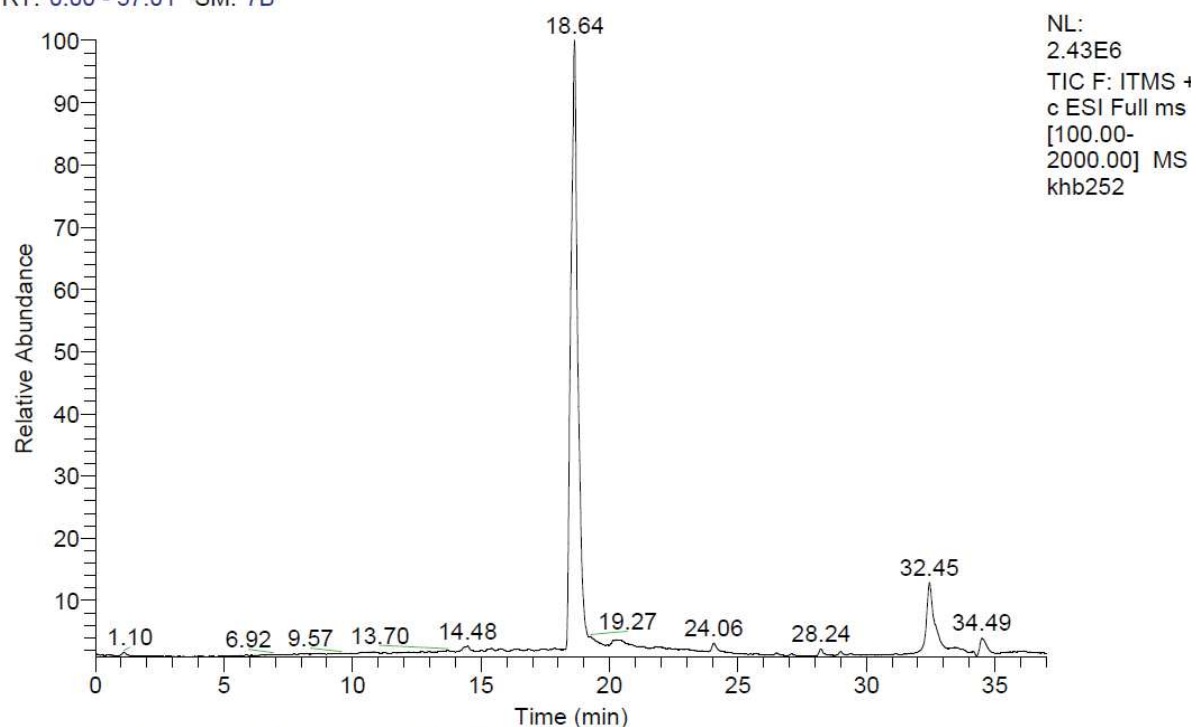
Analytical LC-MS gradient: 0.5 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 30 min and 10% B over 5 min

khb252

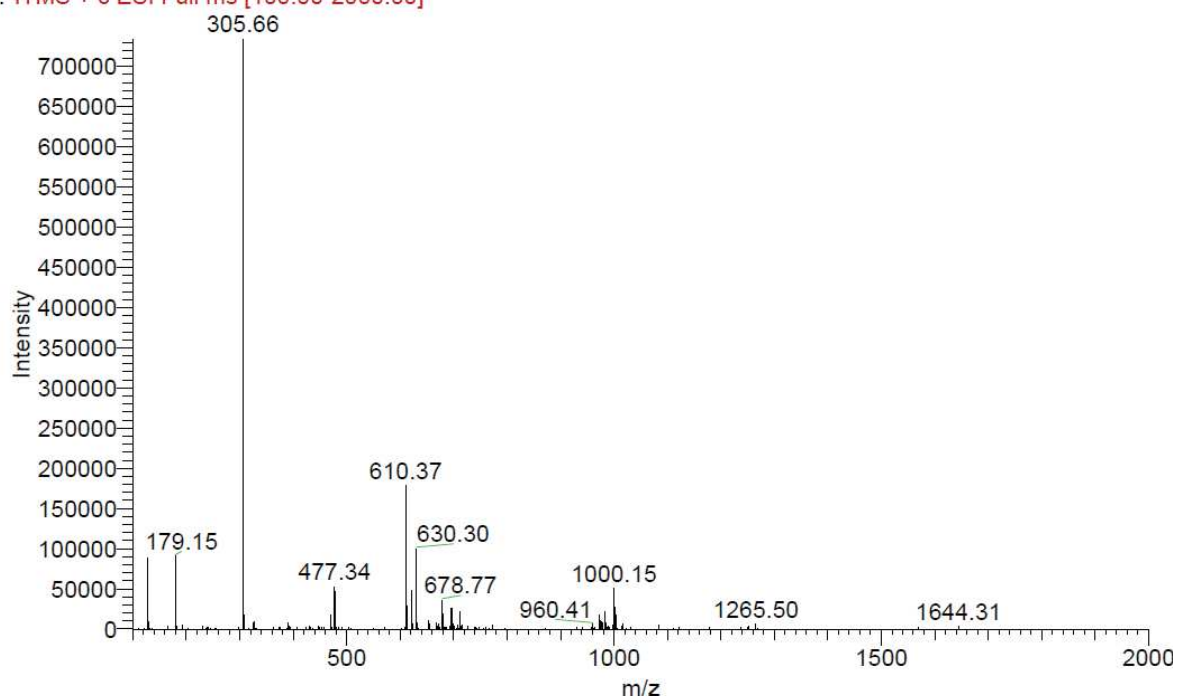
11/6/2014 4:48:25 PM

khb252

RT: 0.00 - 37.01 SM: 7B

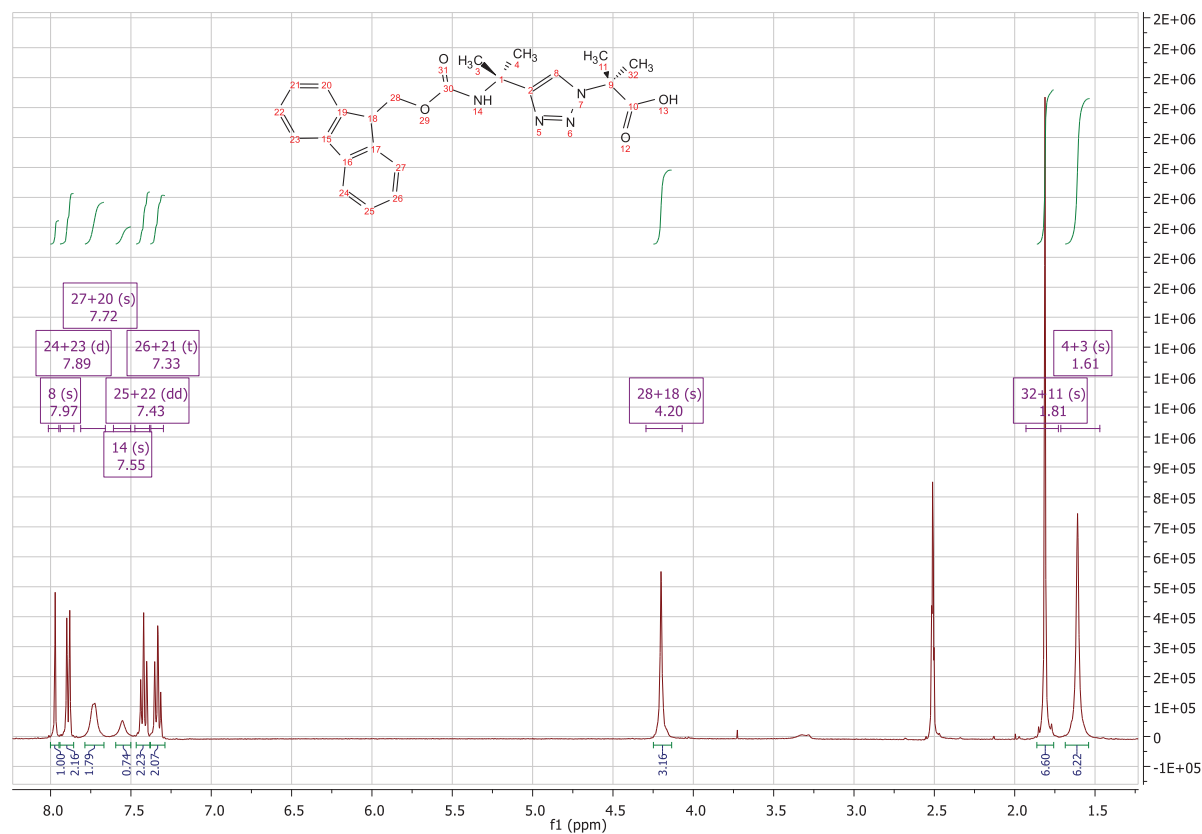


khb252 #2275 RT: 18.62 AV: 1 NL: 7.34E5
F: ITMS + c ESI Full ms [100.00-2000.00]

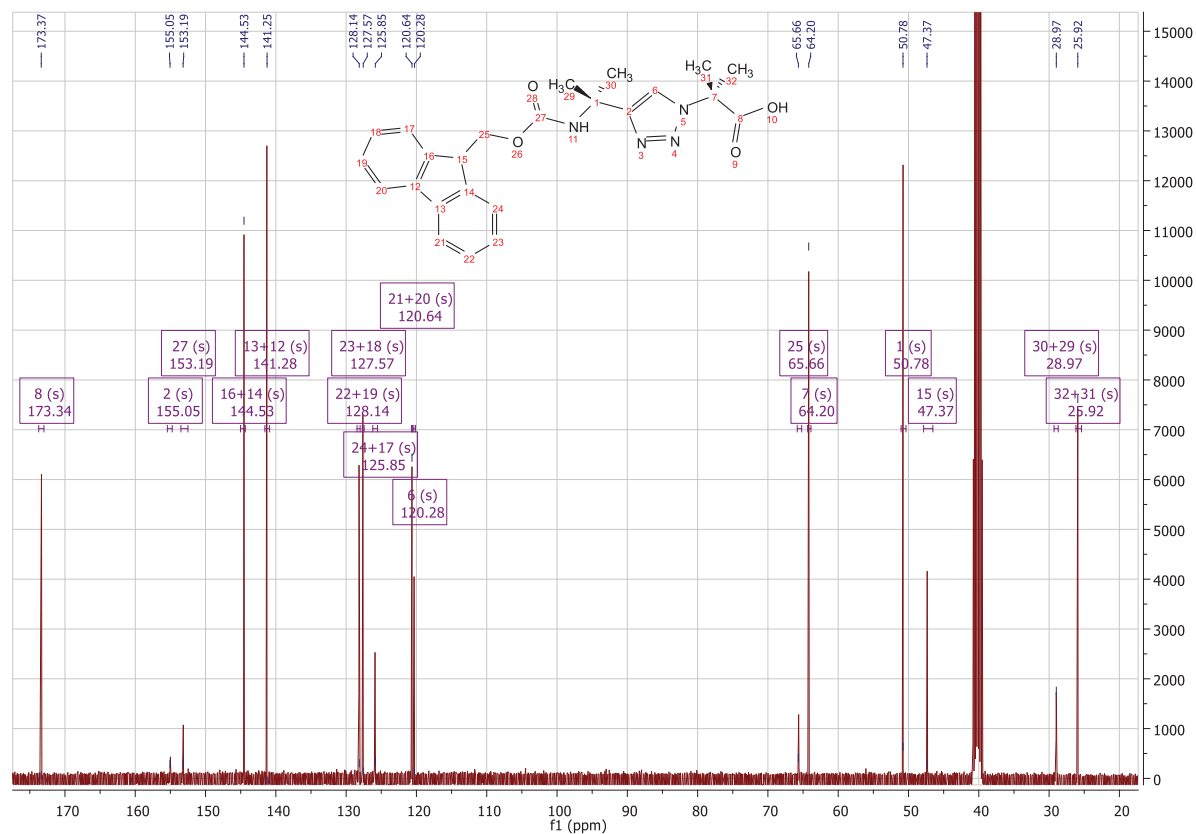


Fmoc-Aibψ[Tz]Aib-OH (**3a**)

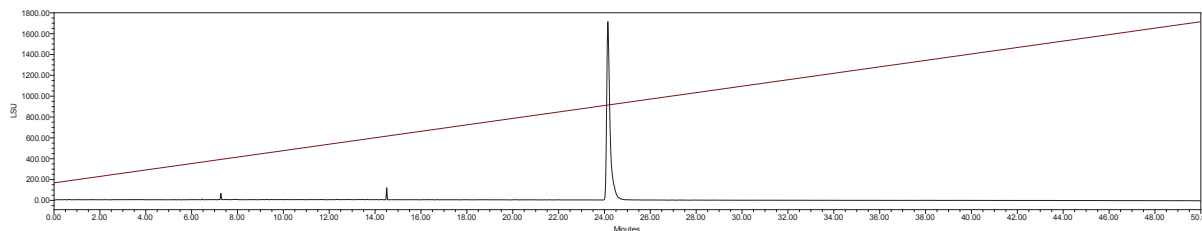
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)



¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)

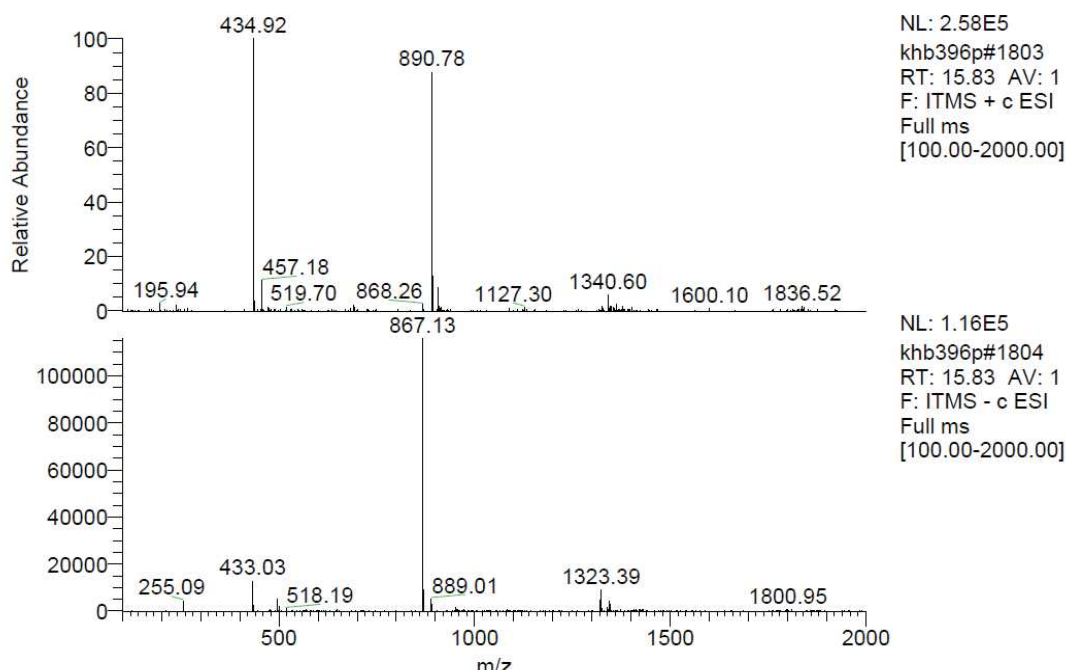
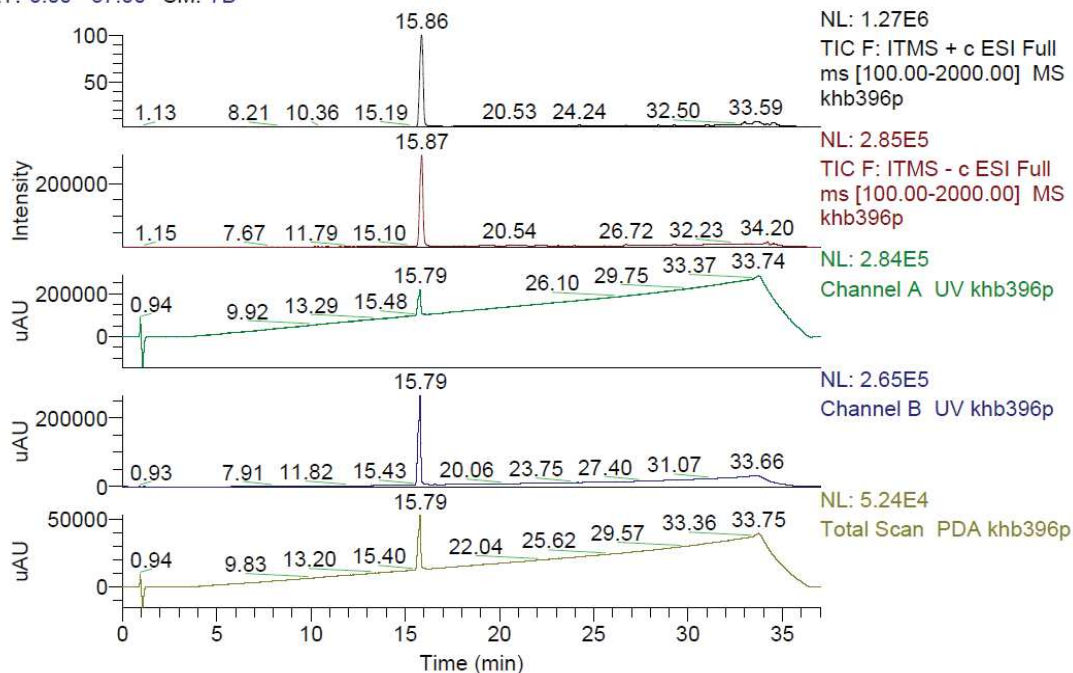


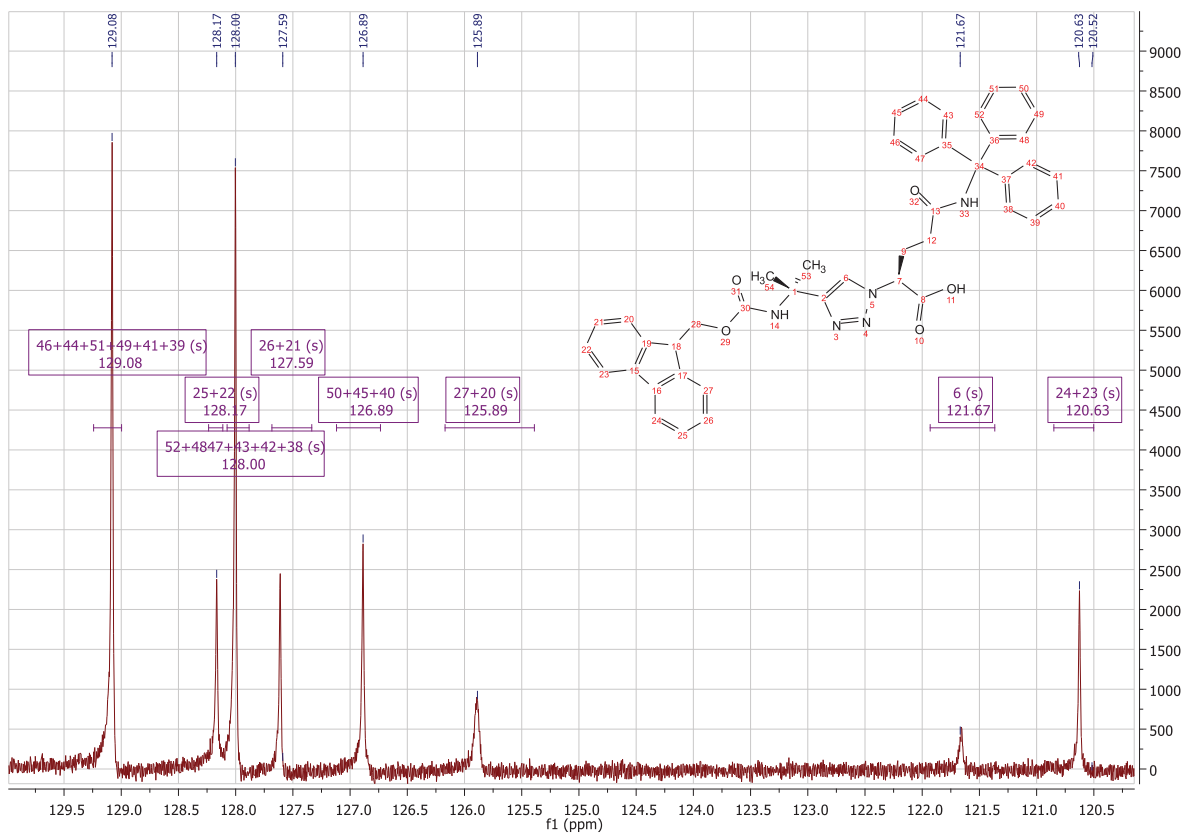
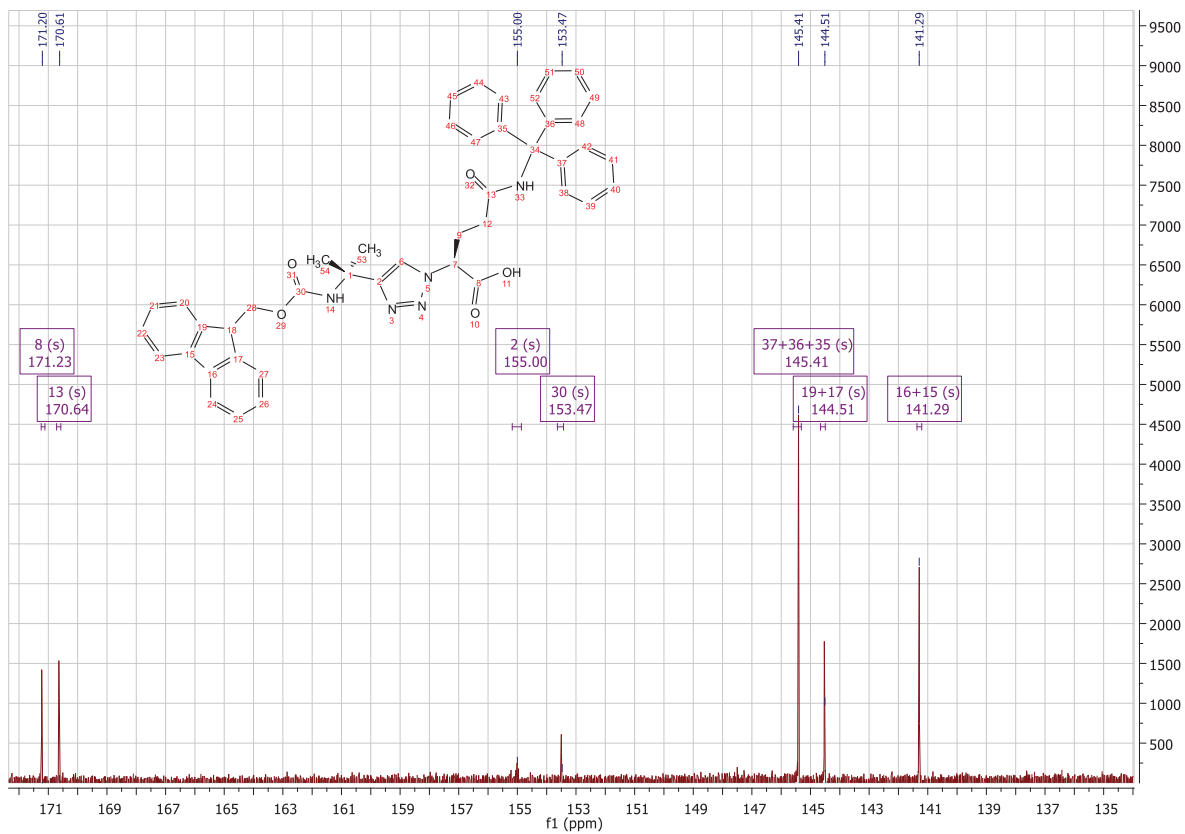
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.



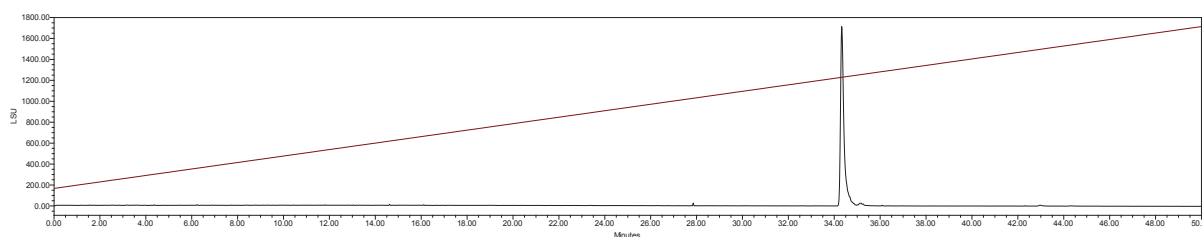
Analytical LC-M gradient: 0.5 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 30 min and 10% B over 7 min

RT: 0.00 - 37.00 SM: 7B



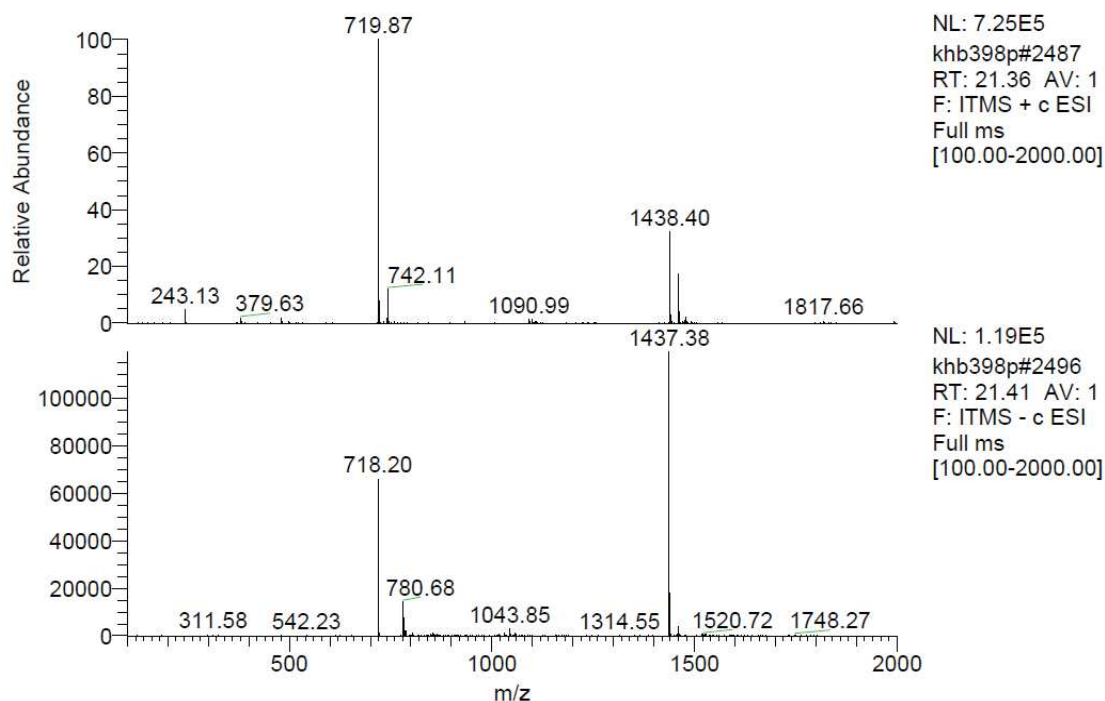
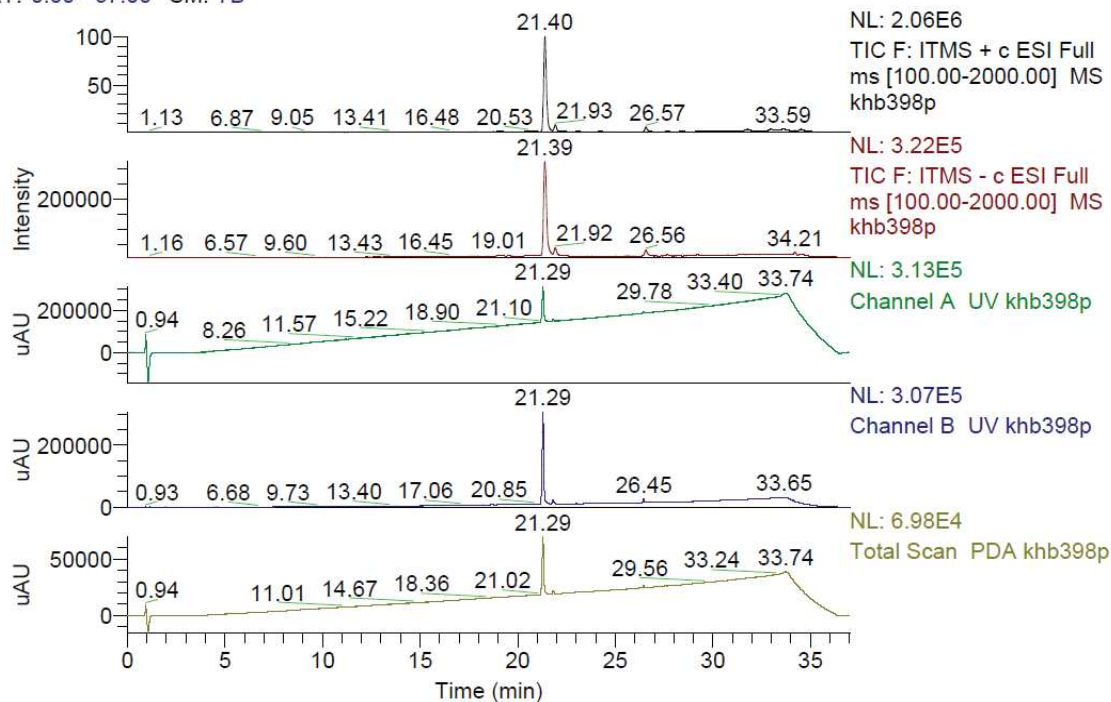


Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.



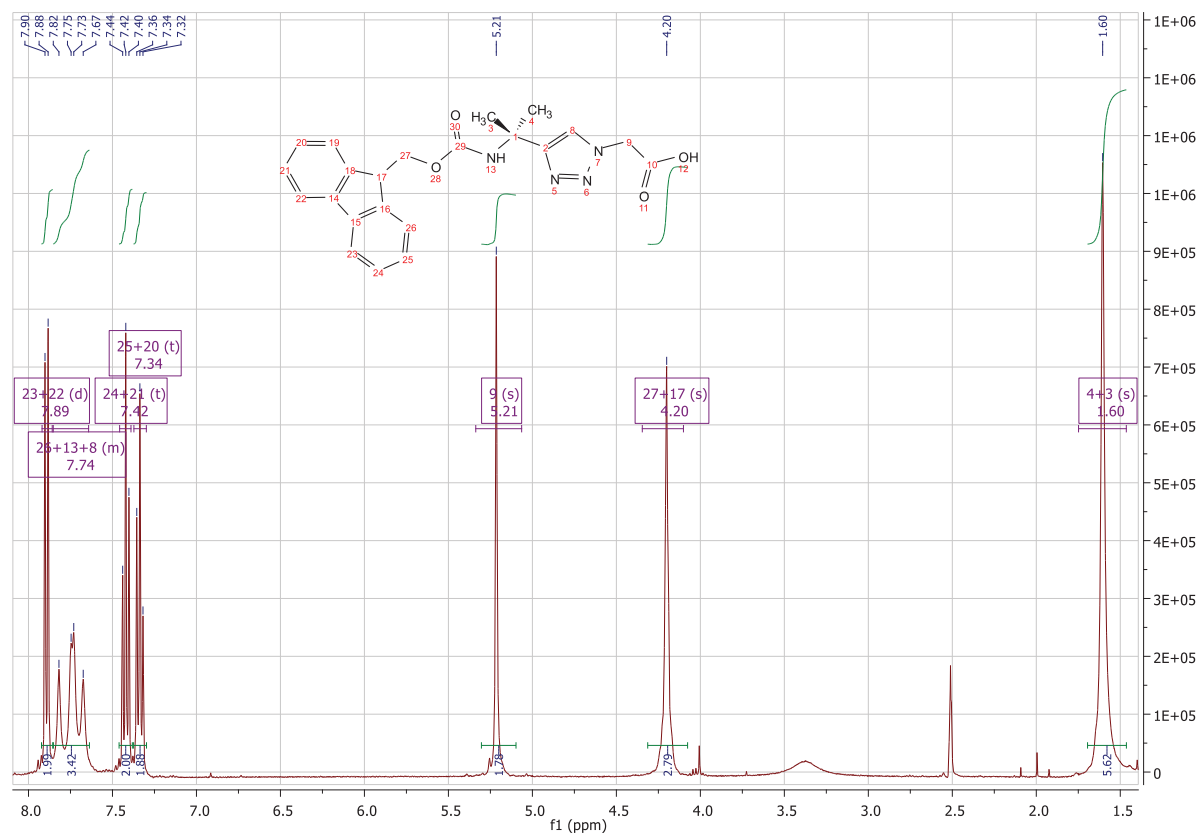
Analytical LC-MS gradient: 0.5 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 30 min and 10% B over 7 min

RI: 0.00 - 37.00 SM: 7/B

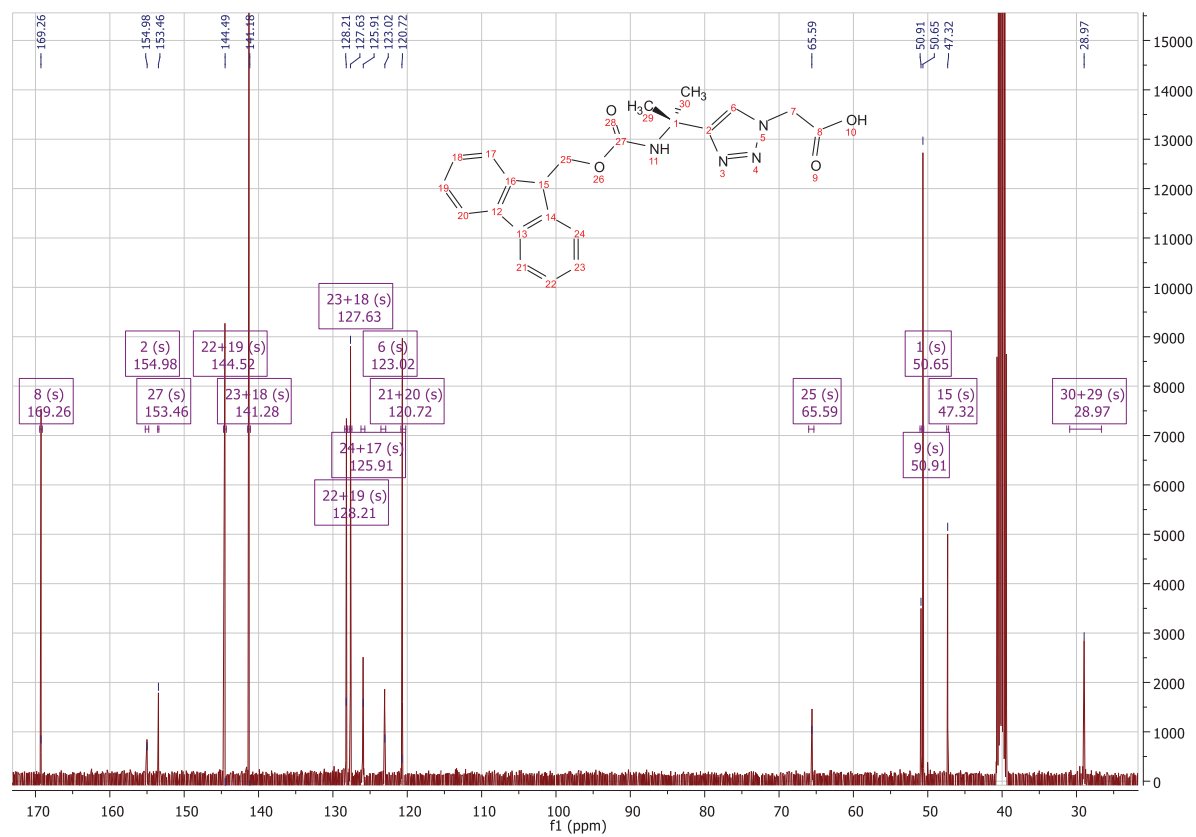


Fmoc-Aibψ [Tz]Gly-OH (3c)

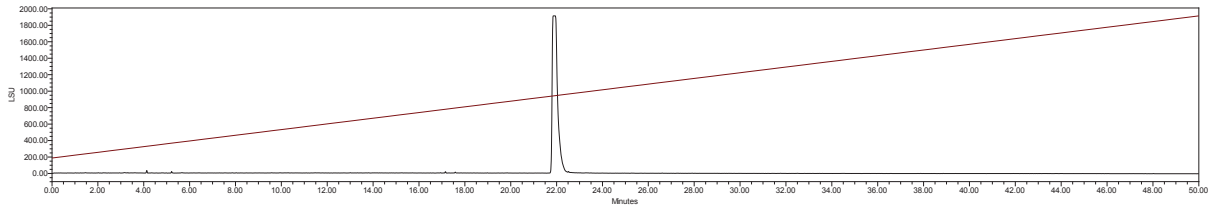
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)



¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)

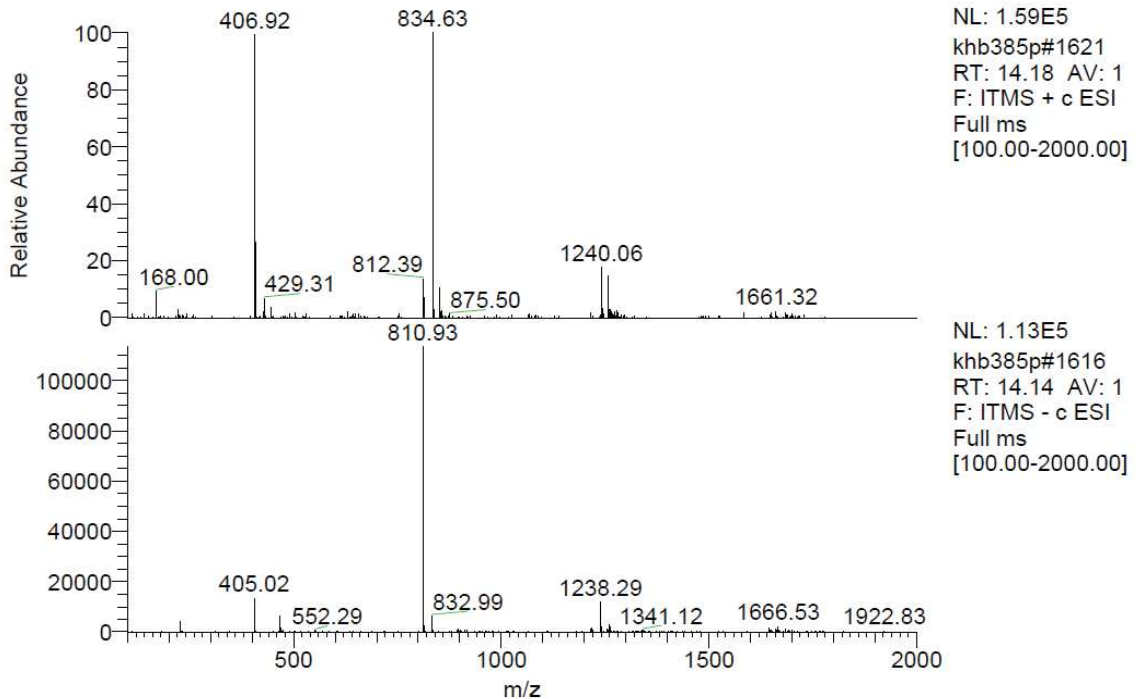
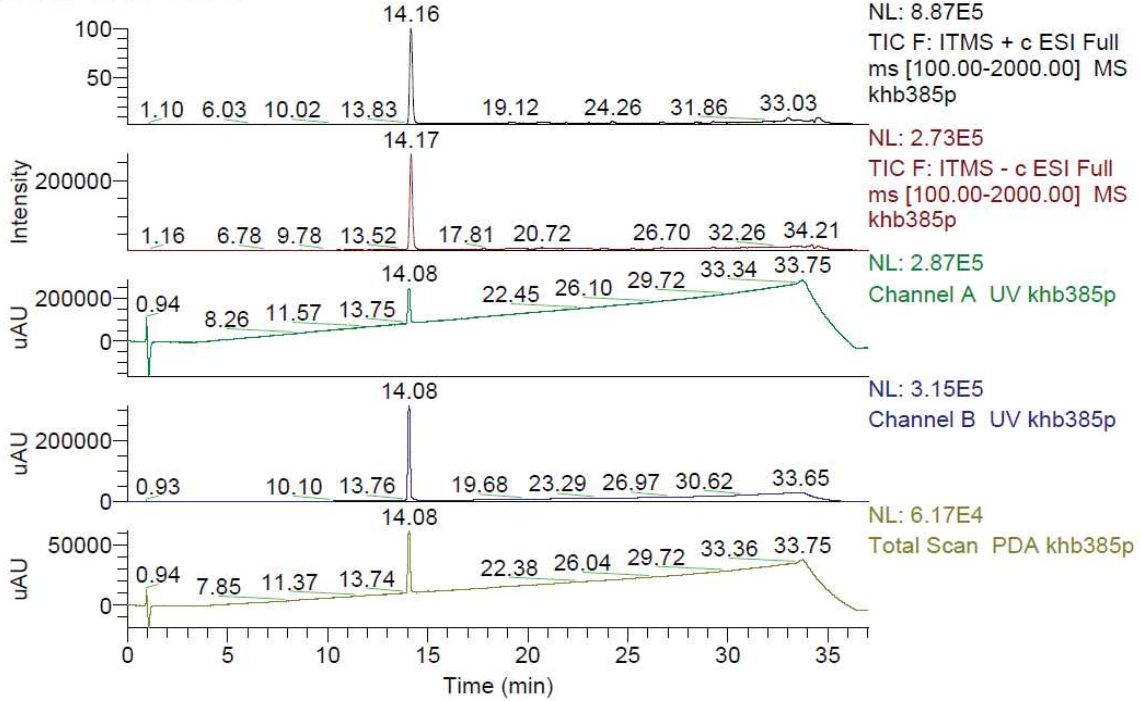


Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.



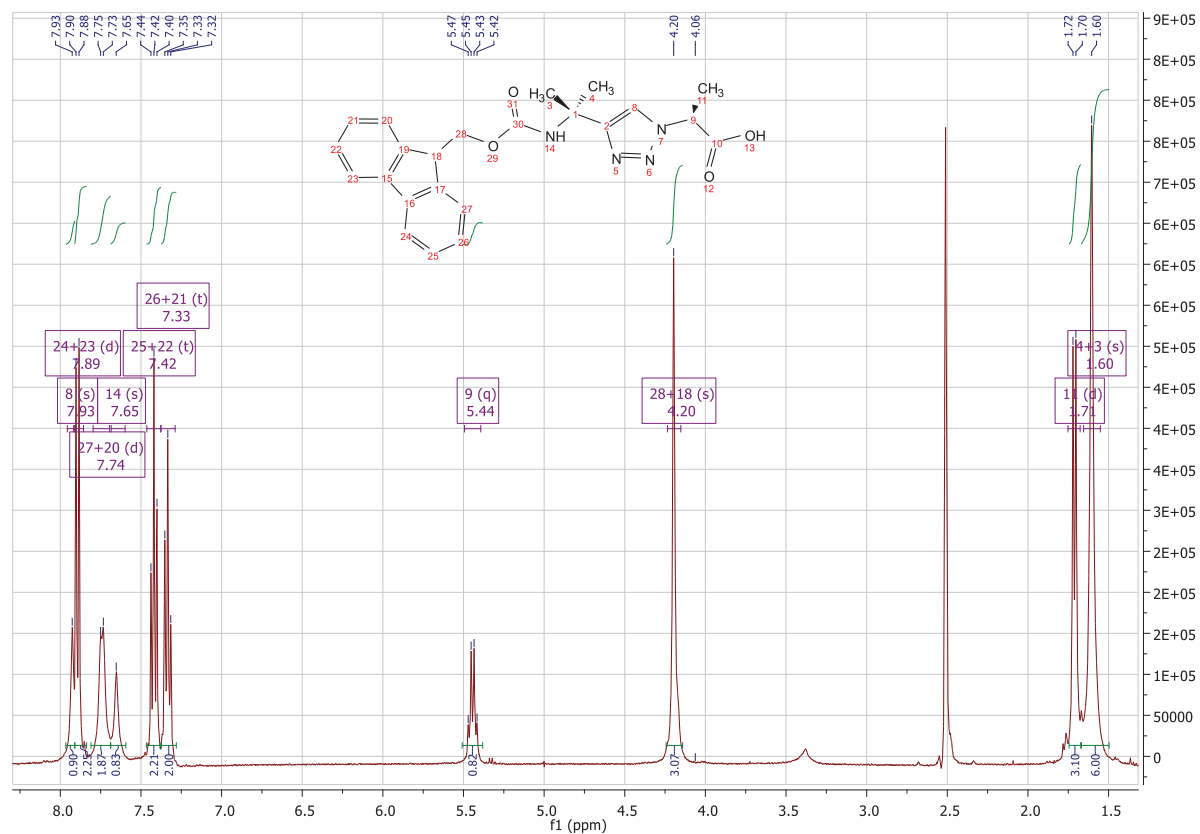
Analytical LC-MS gradient: 0.5 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 30 min and 10% B over 7 min

RT: 0.00 - 37.00 SM: 7B

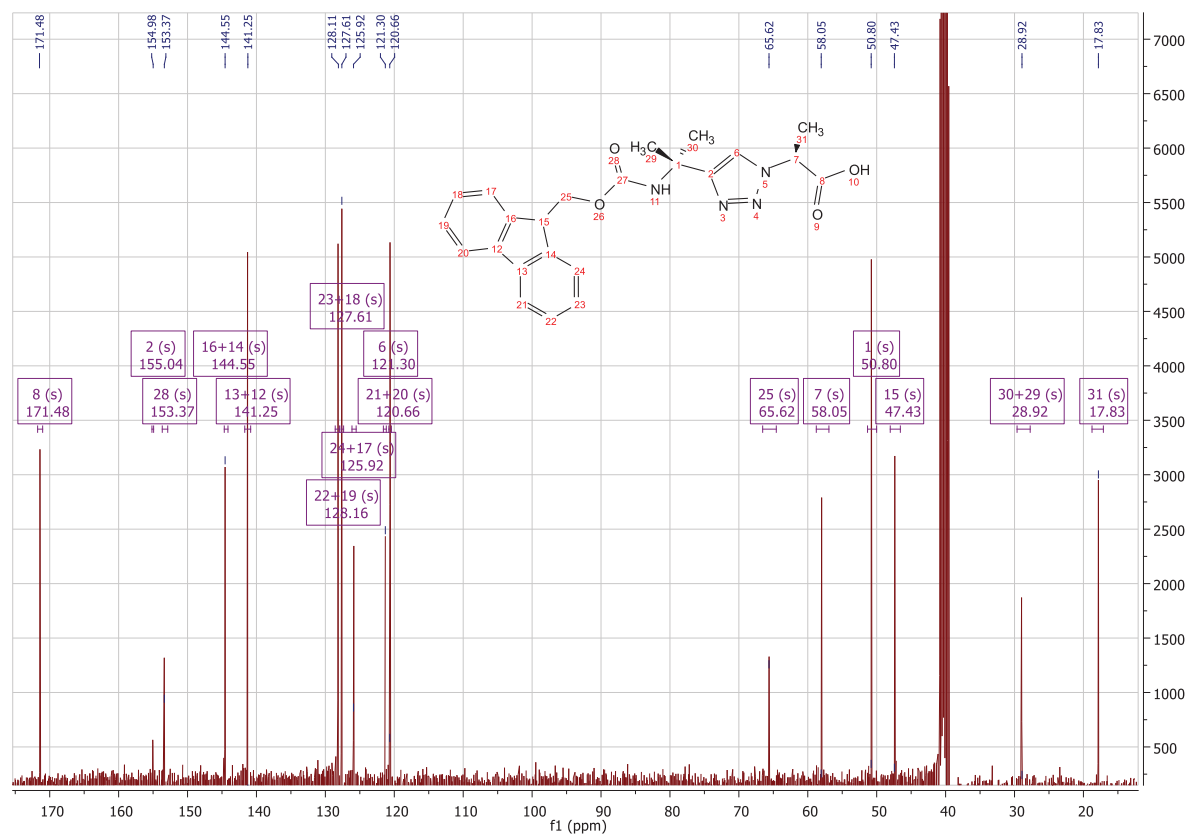


Fmoc-Aibψ [Tz]Ala-OH (**3d**)

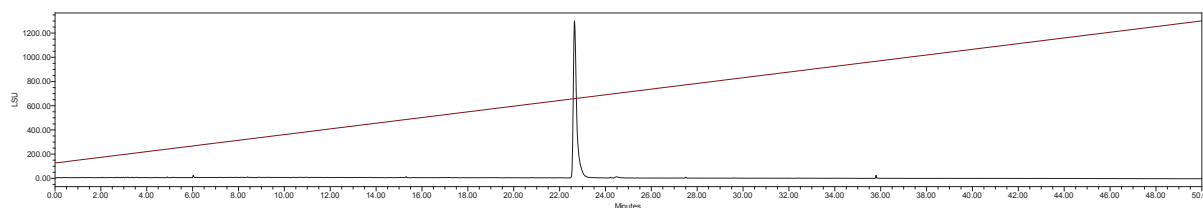
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)



¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)

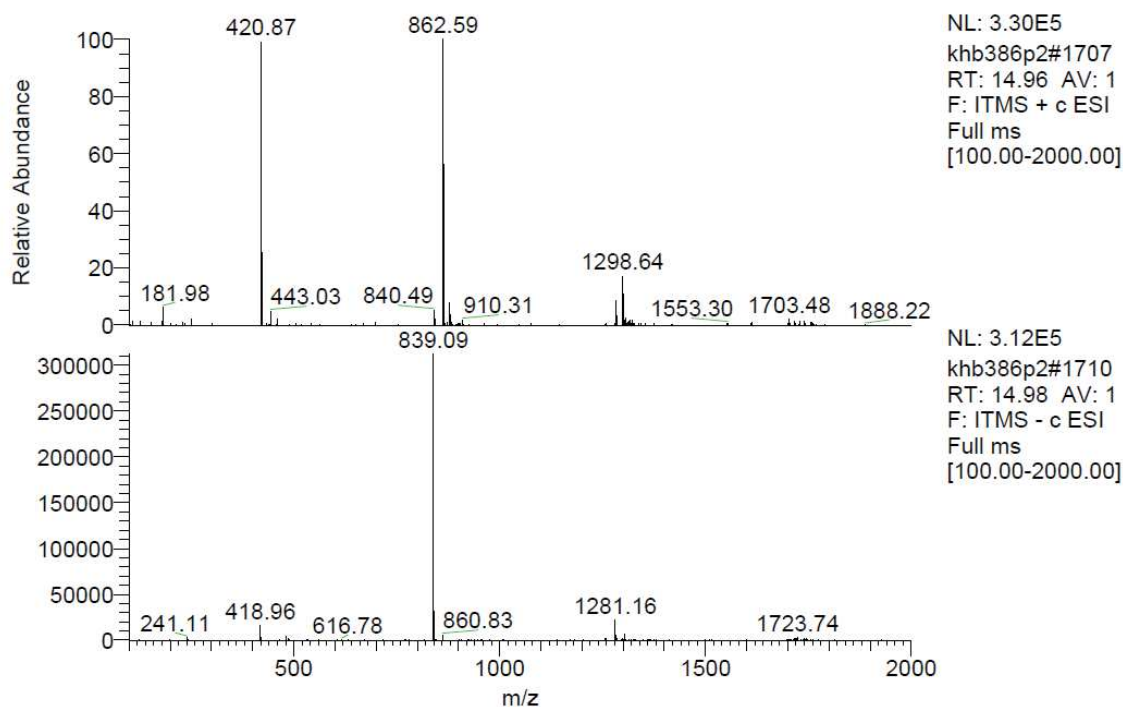
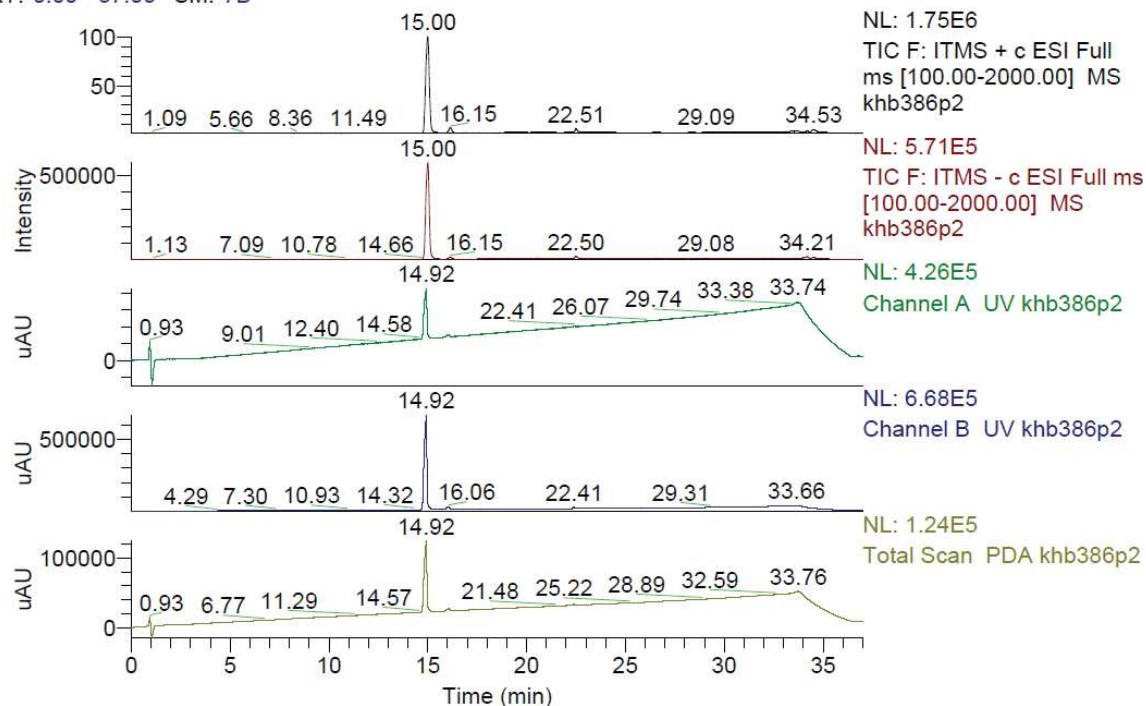


Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.



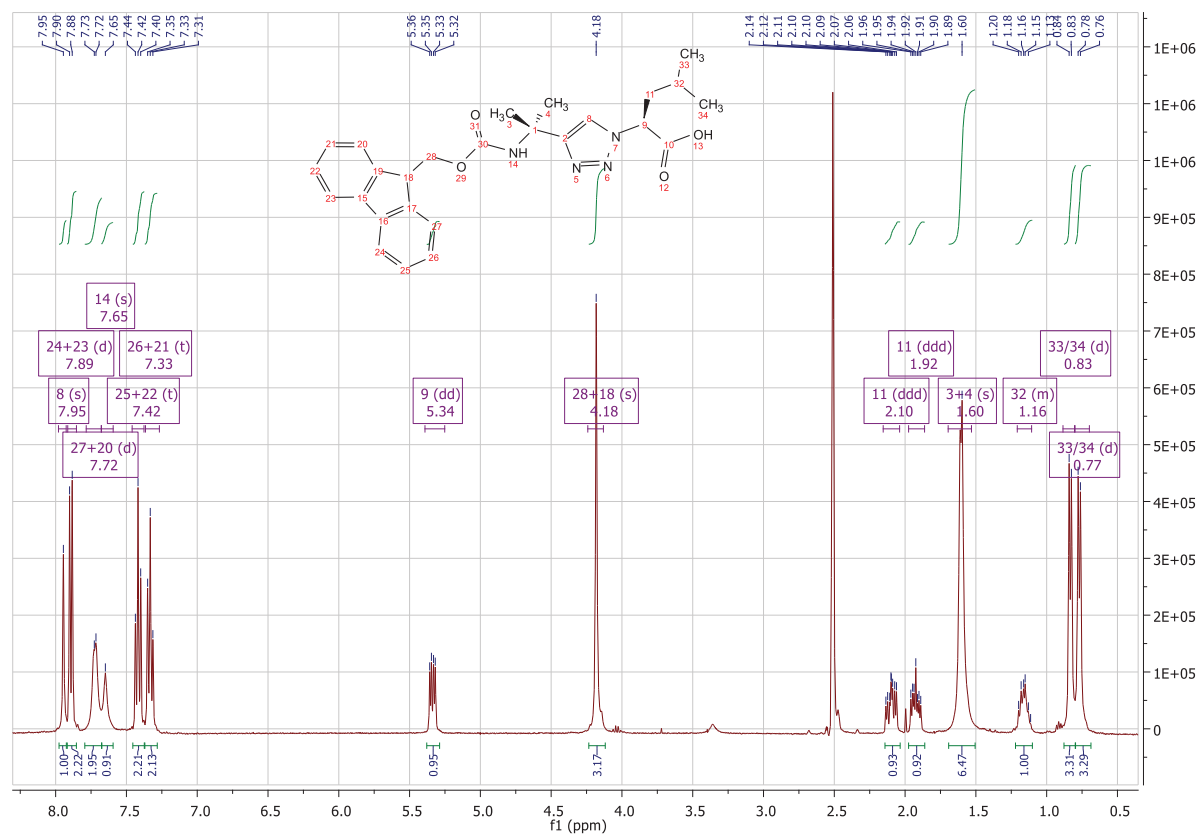
Analytical LC-MS gradient: 0.5 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 30 min and 10% B over 7 min

RI: 0.00 - 37.00 SM: /B

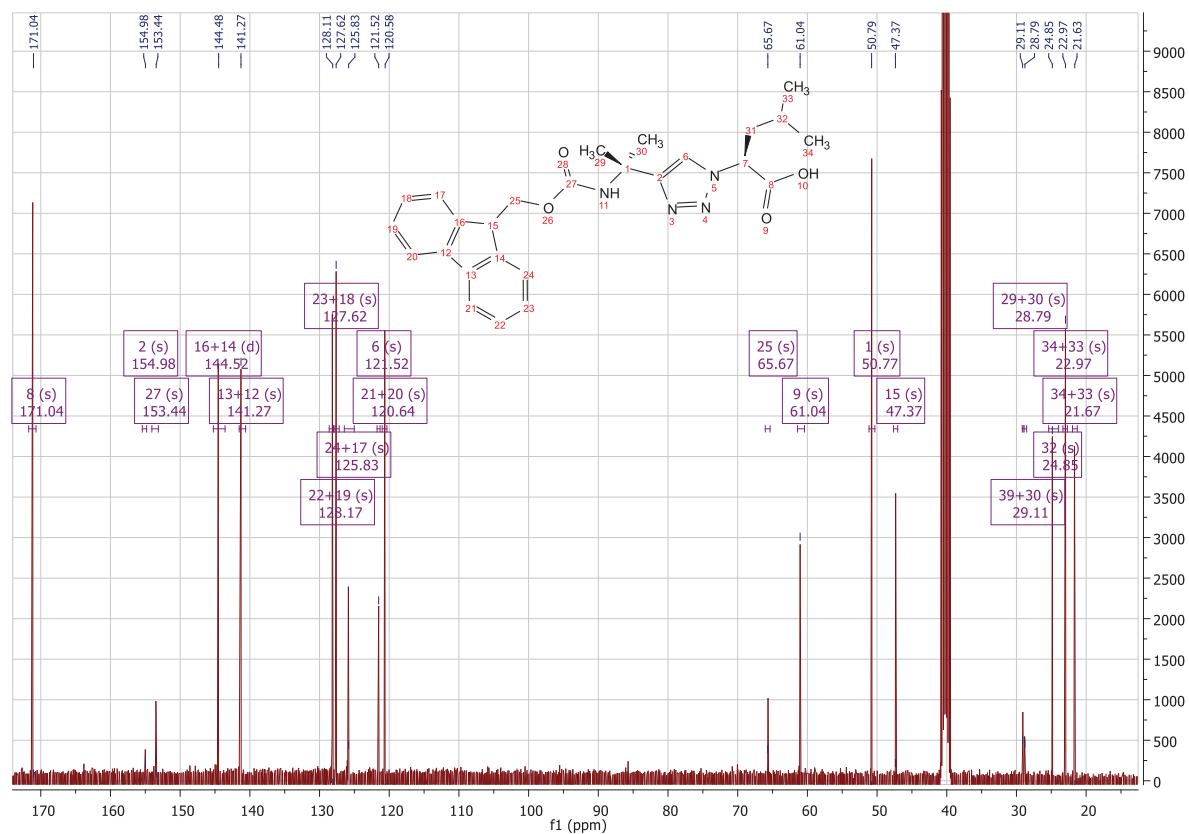


Fmoc-Aibψ [Tz]Leu-OH (**3e**)

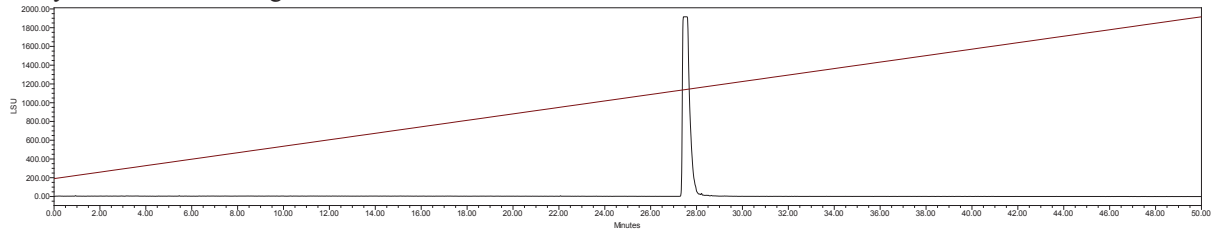
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)



¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)

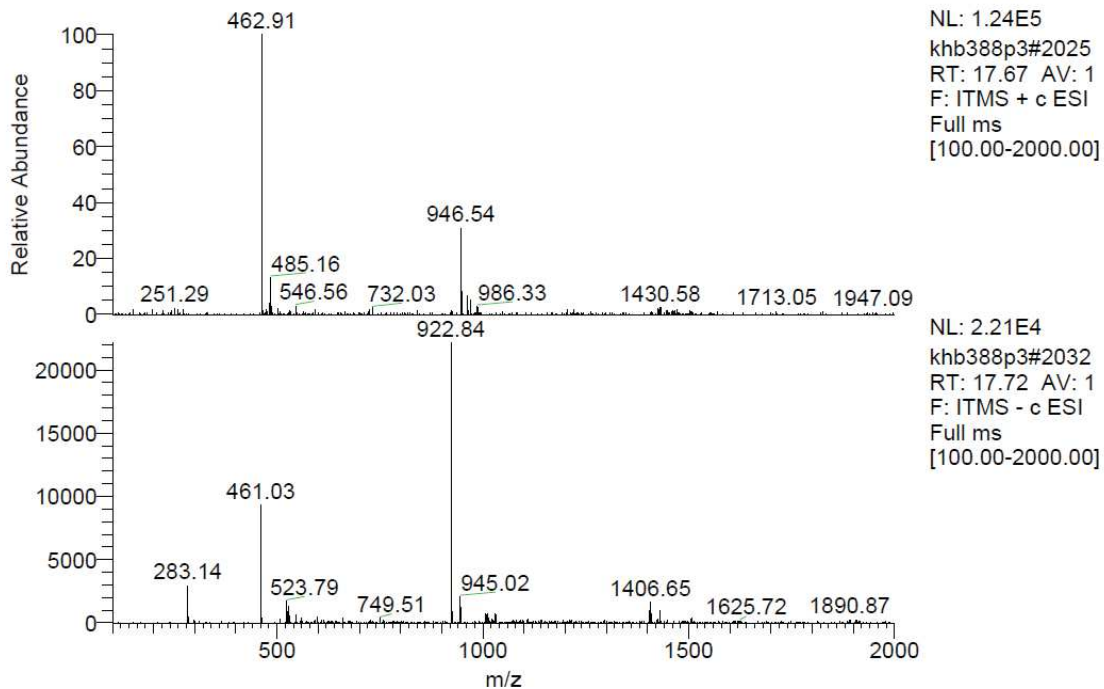
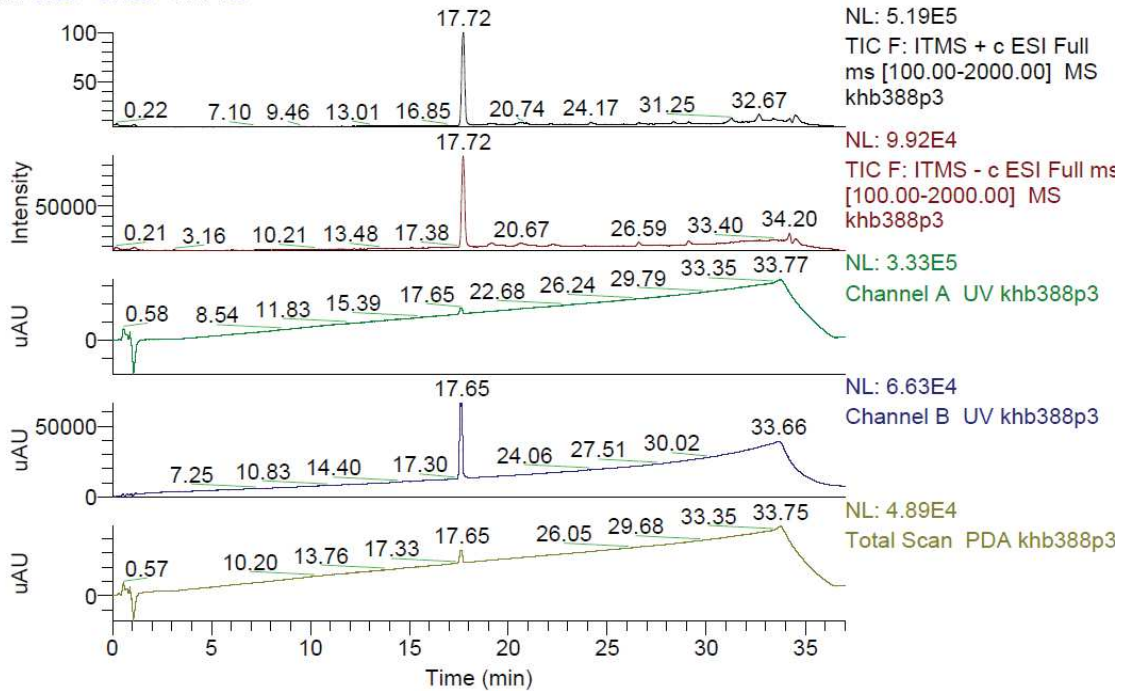


Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.



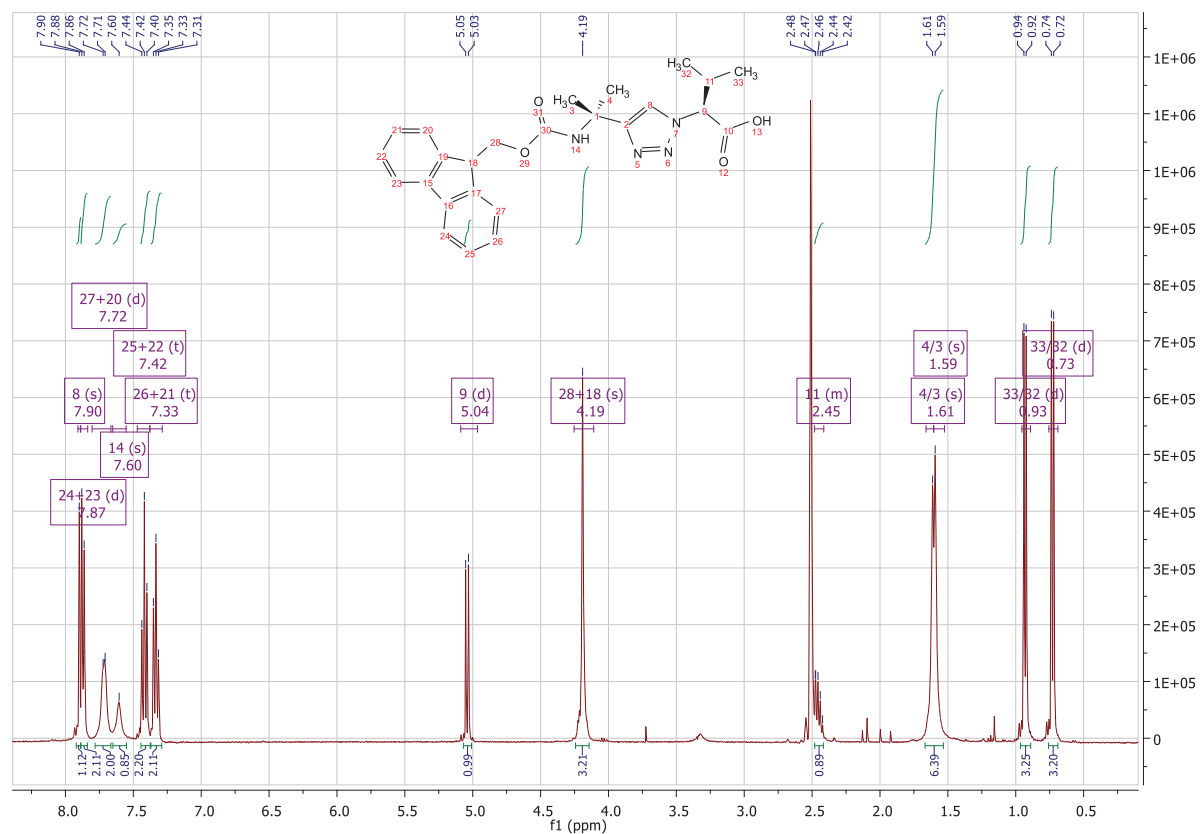
Analytical LC-MS gradient: 0.5 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 30 min and 10% B over 7 min

RT: 0.00 - 37.00 SM: 7B

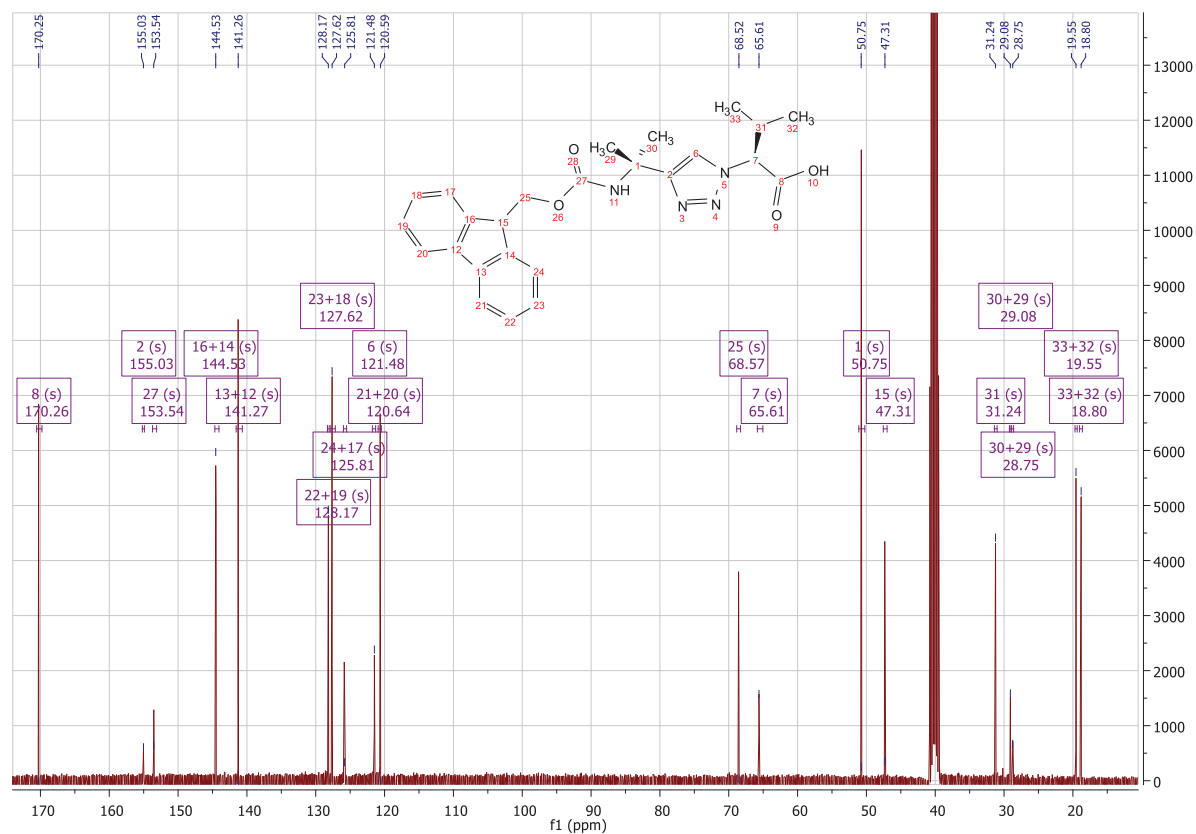


Fmoc-Aibψ[Tz]Val-OH (**3f**)

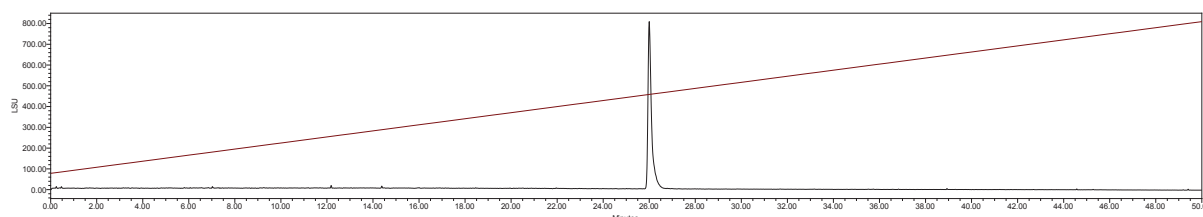
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)



¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)

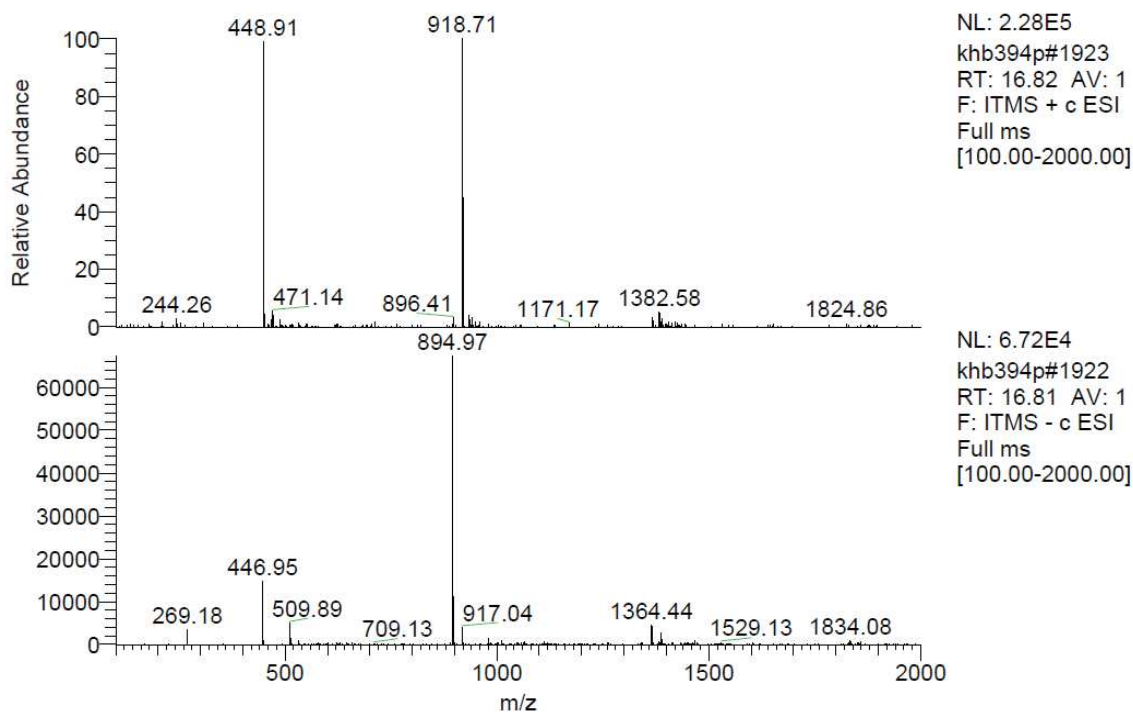
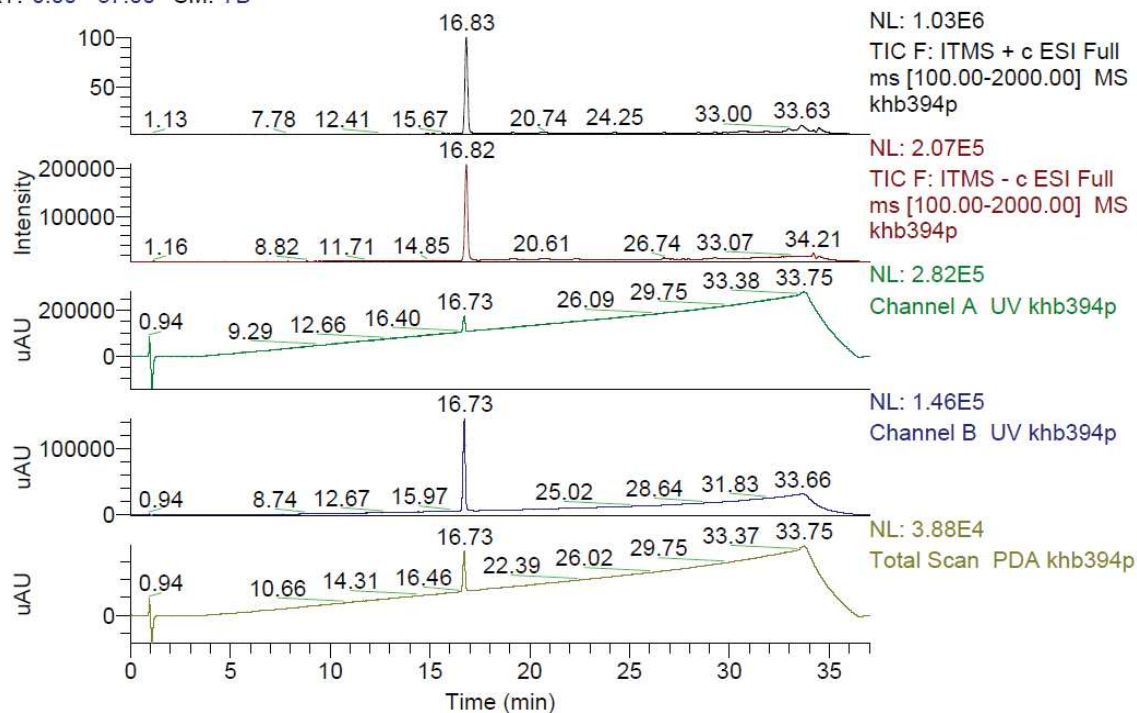


Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

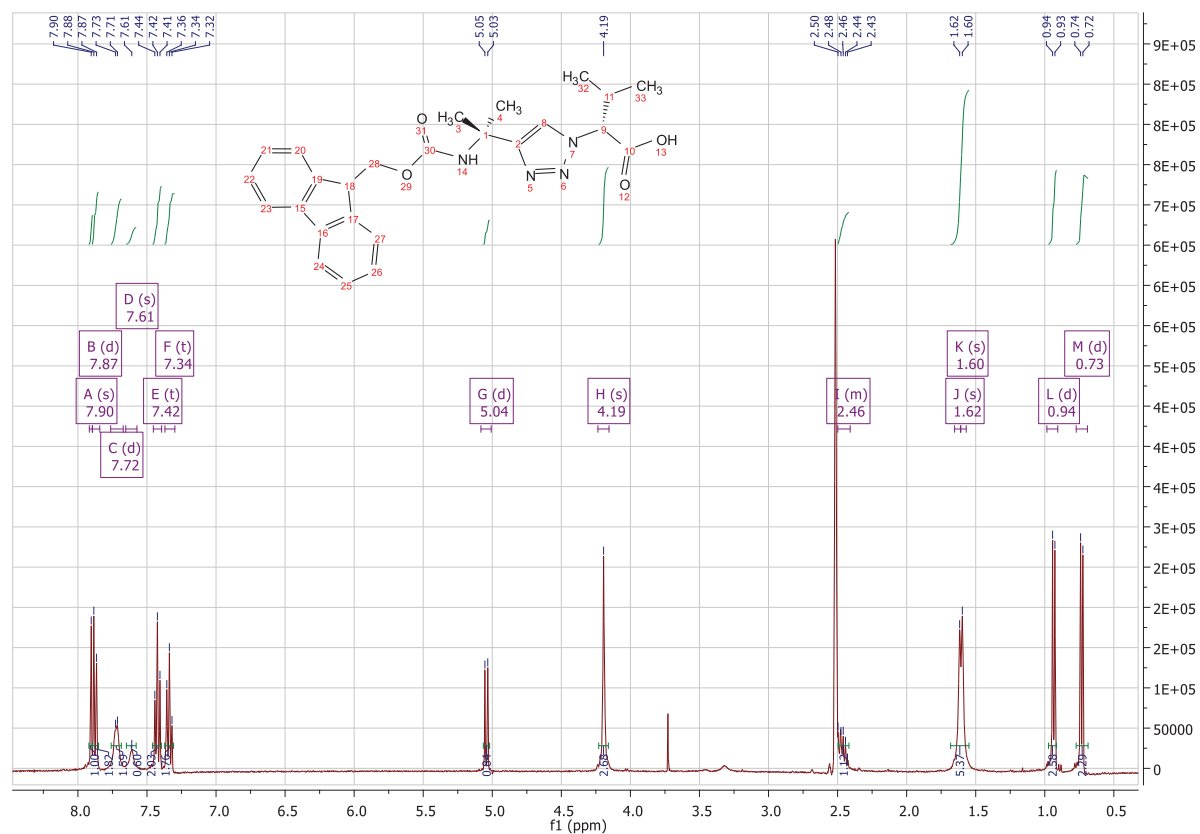


Analytical LC-MS gradient: 0.5 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 30 min and 10% B over 7 min

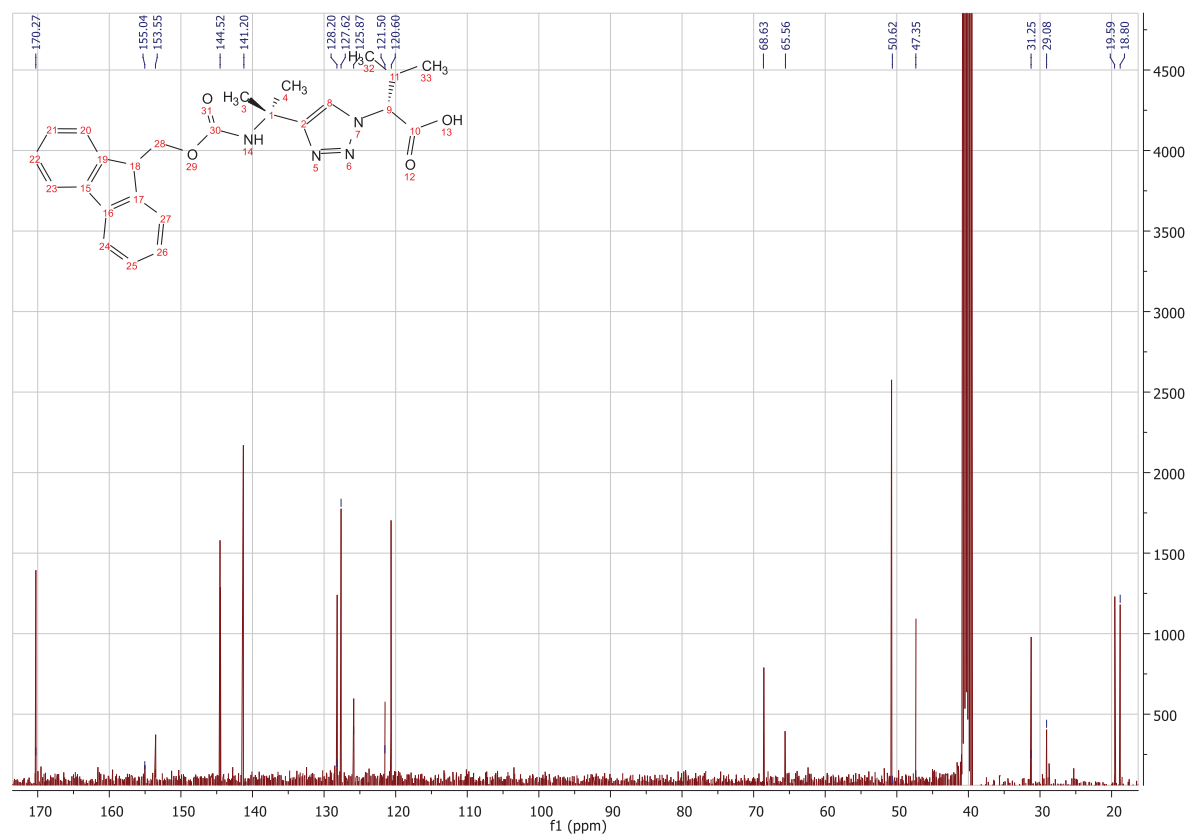
RT: 0.00 - 37.00 SM: 7B



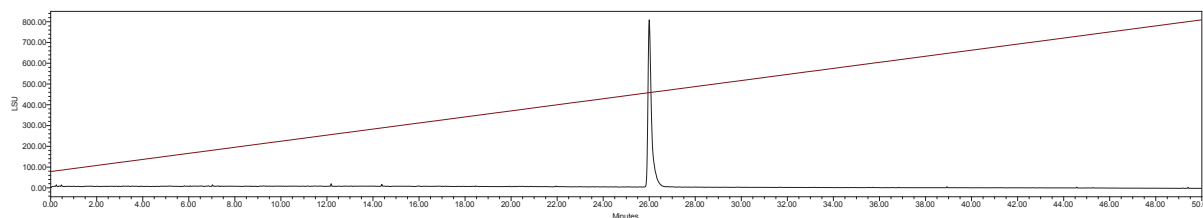
Fmoc-Aibψ [Tz]-D-Val-OH (**3f**)
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)



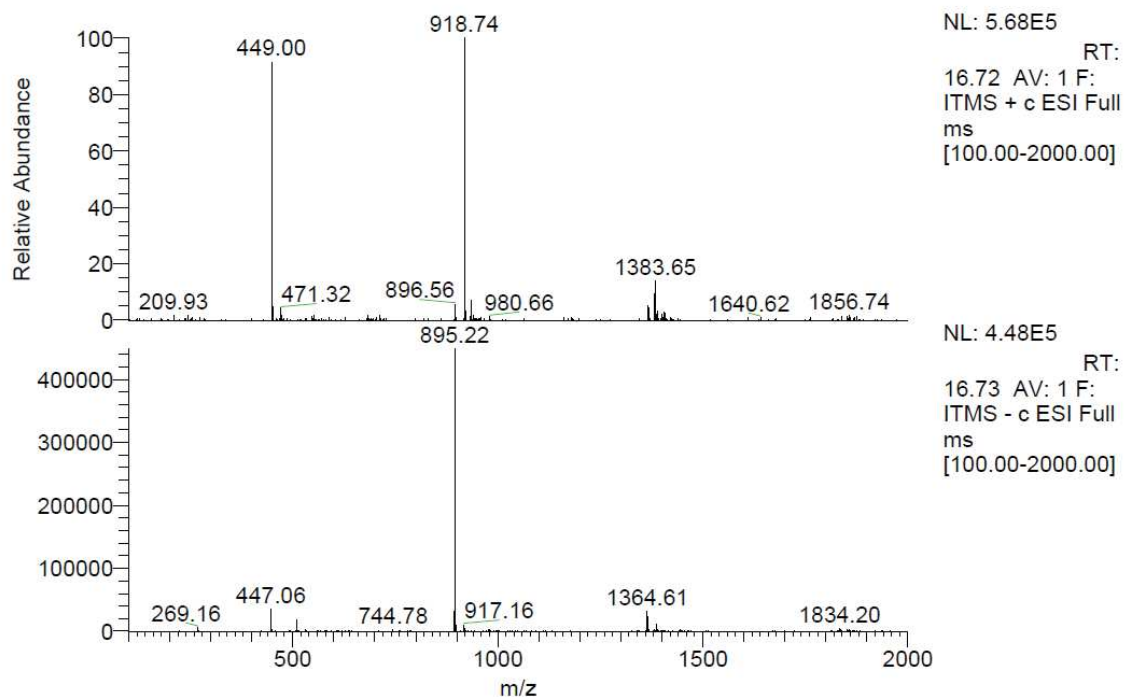
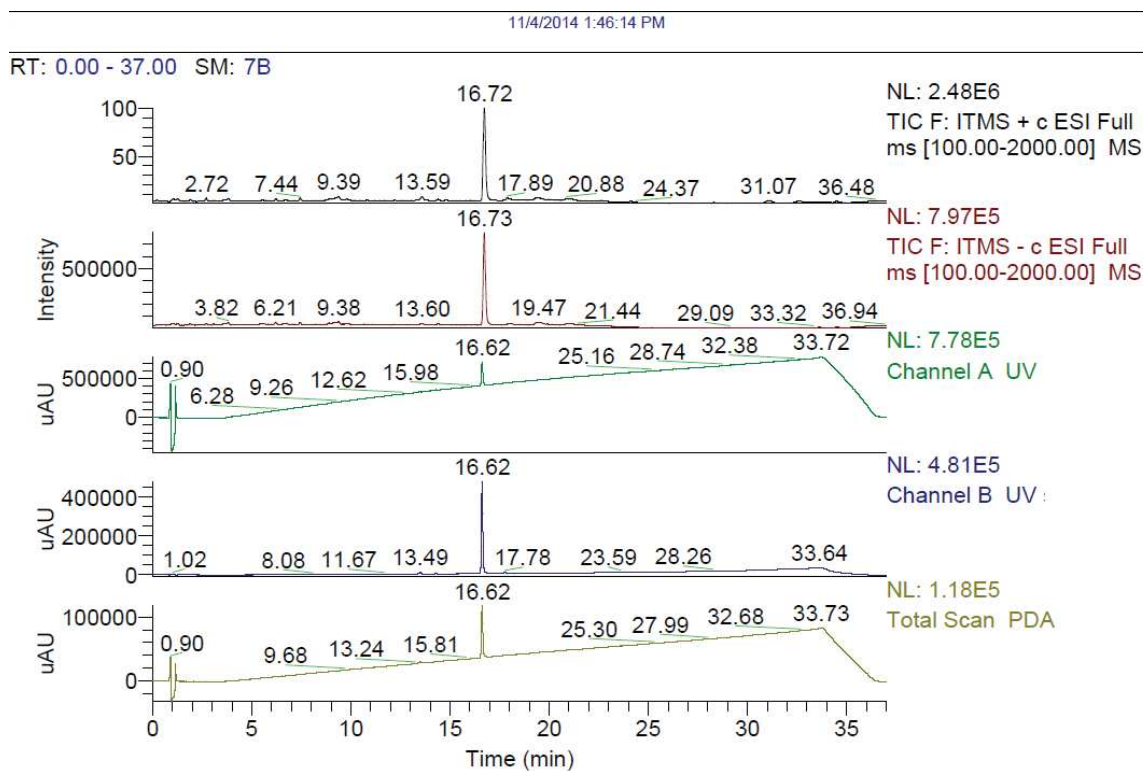
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)



Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

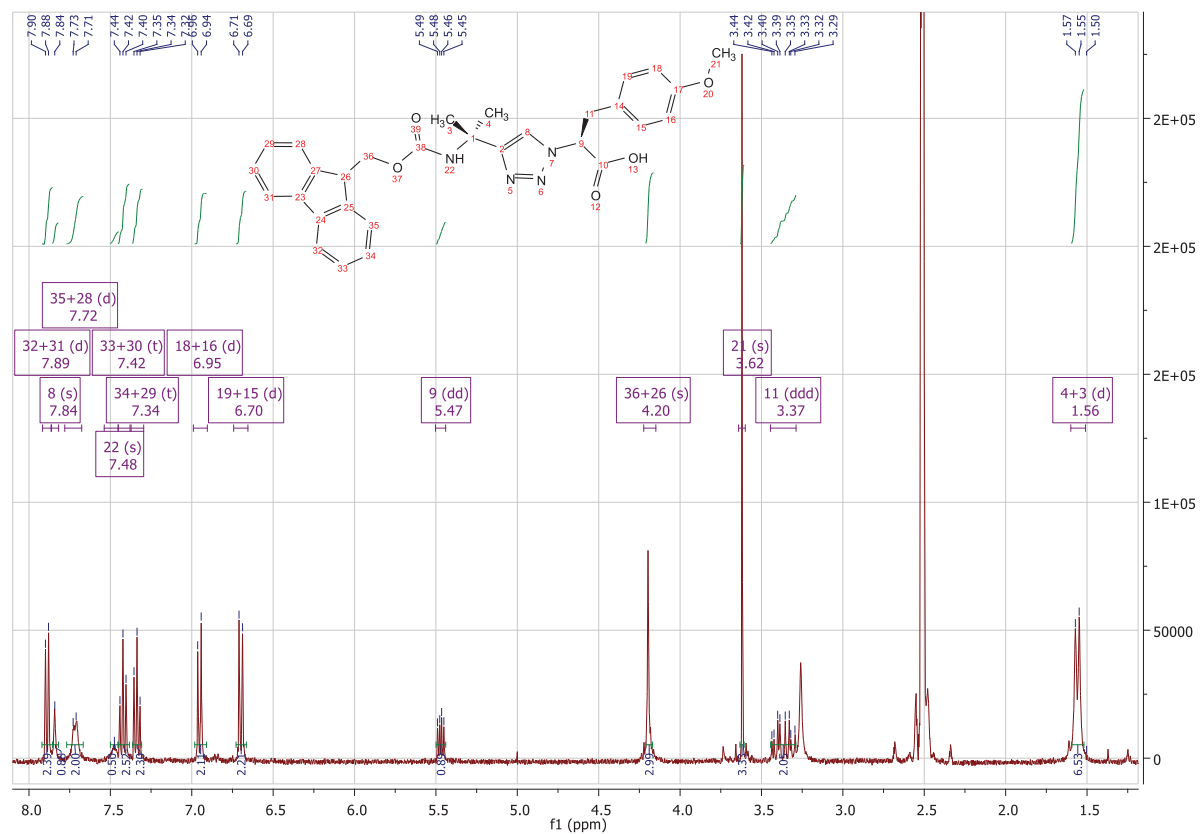


Analytical LC-MS gradient: 0.5 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 30 min and 10% B over 7 min

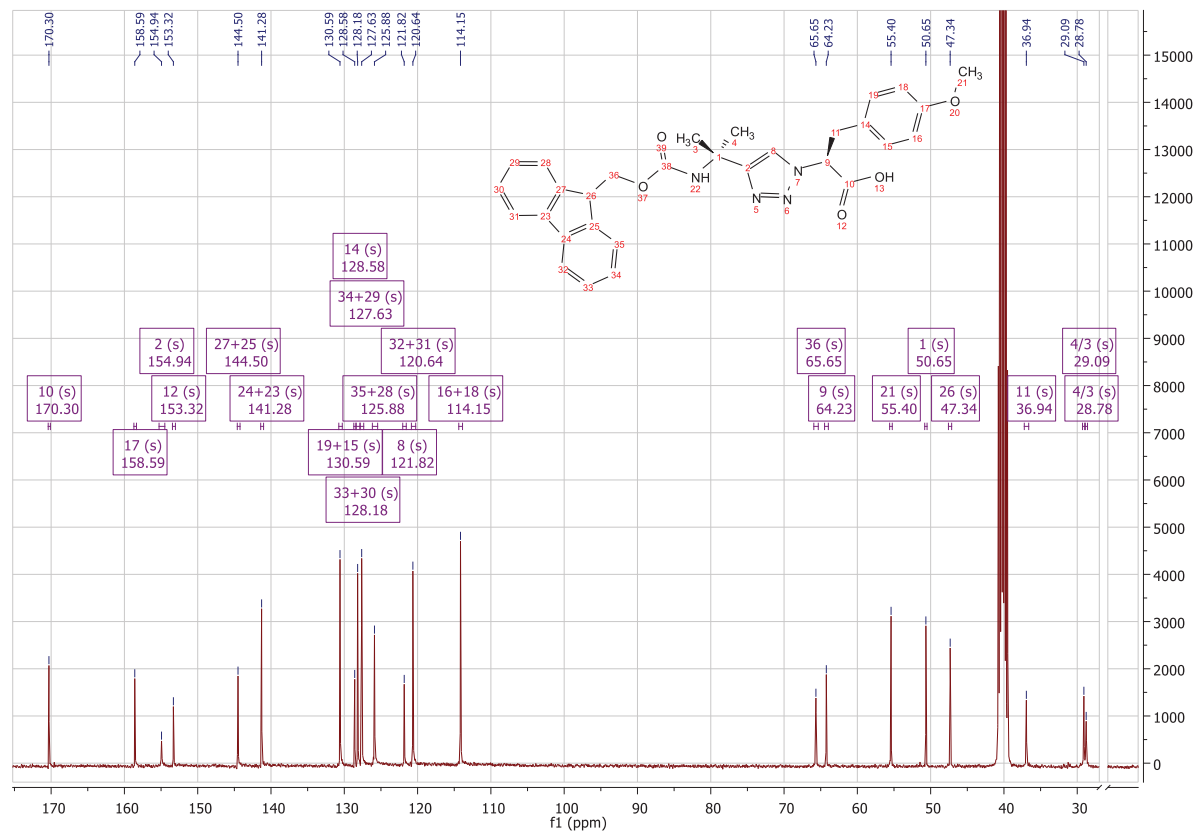


Fmoc-Aibψ [Tz]Tyr(OMe)-OH (**3g**)

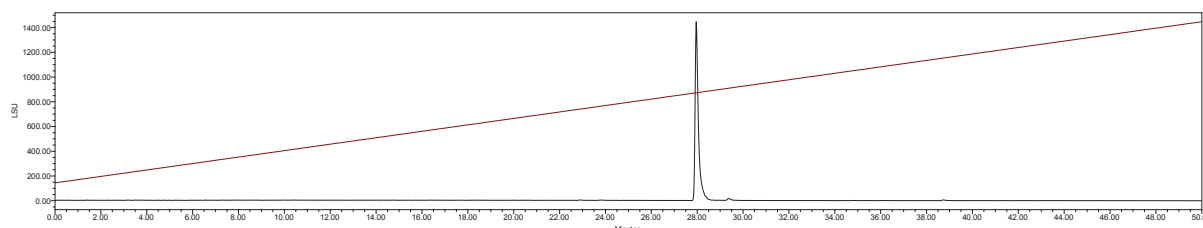
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)



¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)

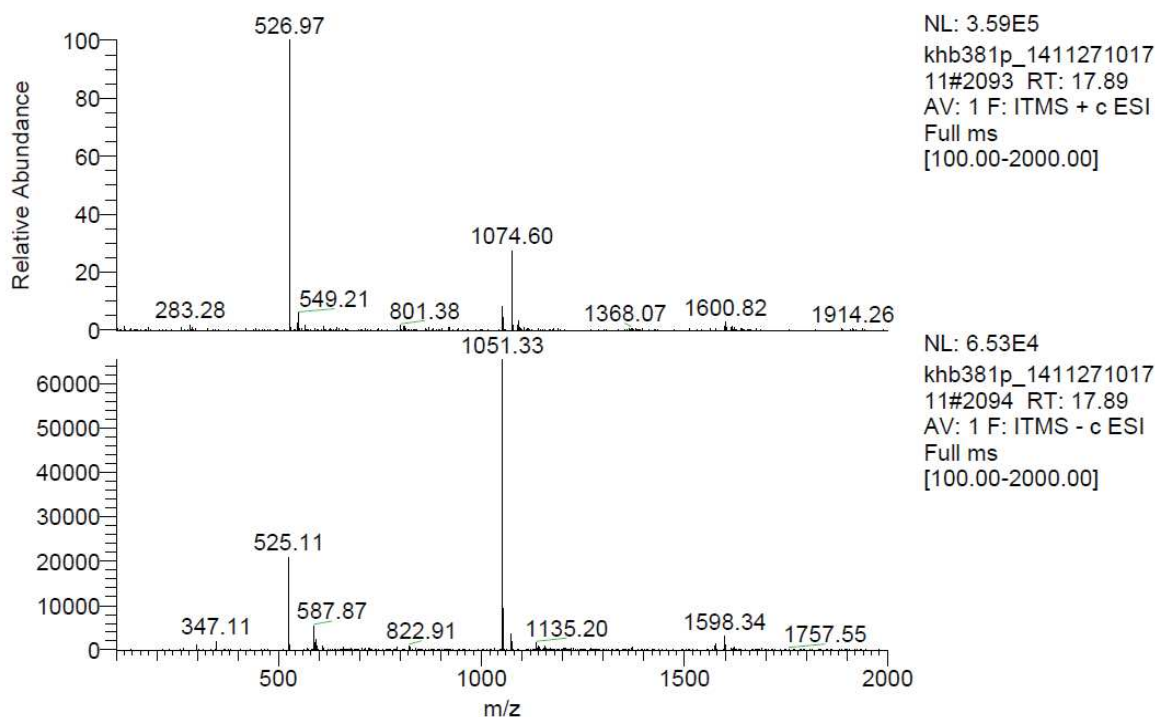
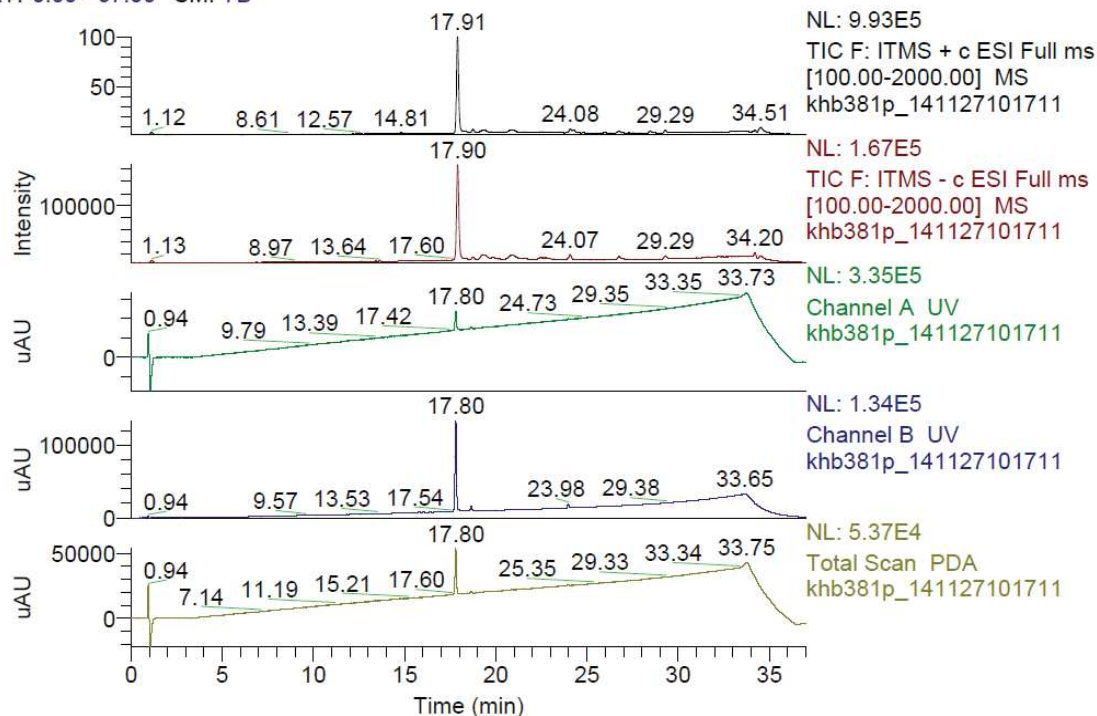


Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.



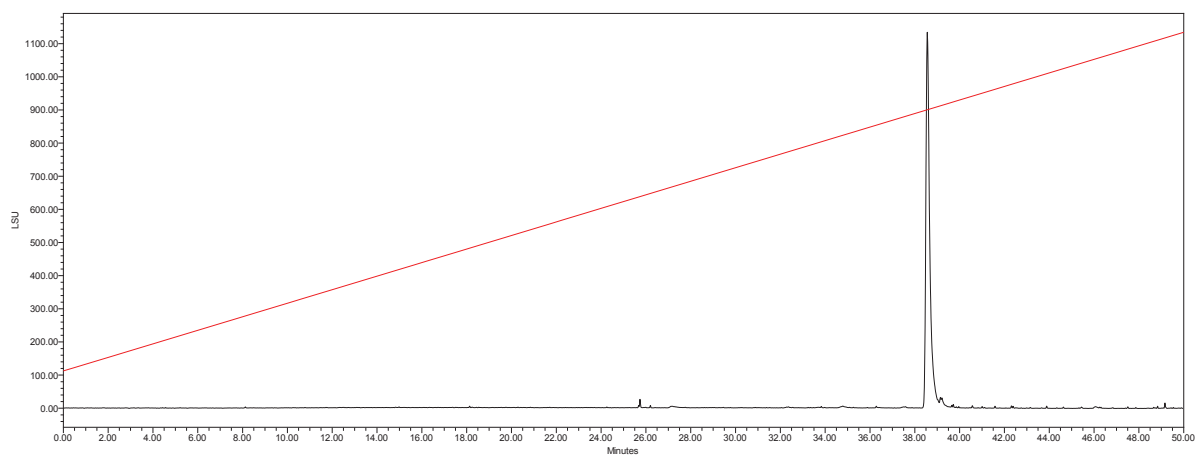
Analytical LC-MS gradient: 0.5 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 30 min and 10% B over 7 min

RI: 0.00 - 37.00 SM: /B

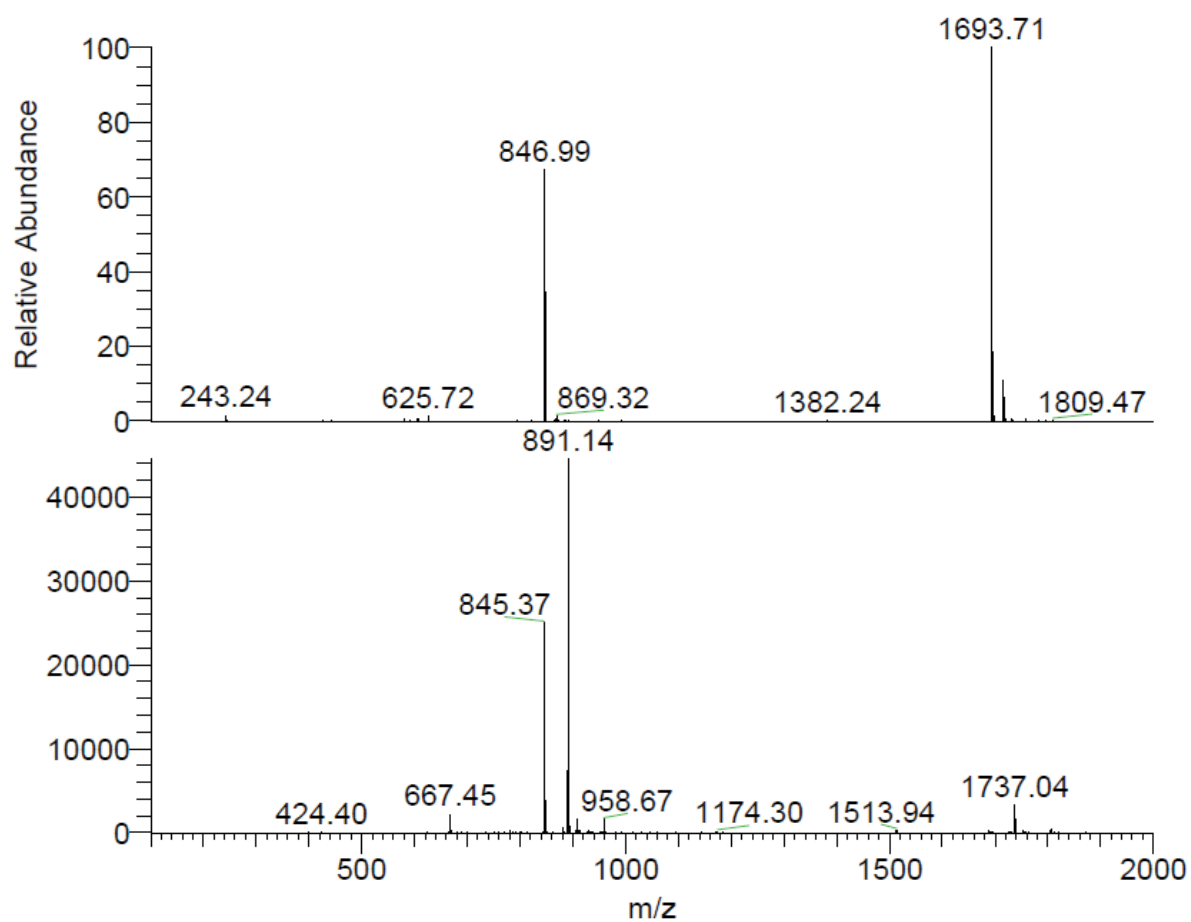


Fmoc-Aibψ [Tz]Gln(Trt)-Ile-OMe (**4b**)

Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

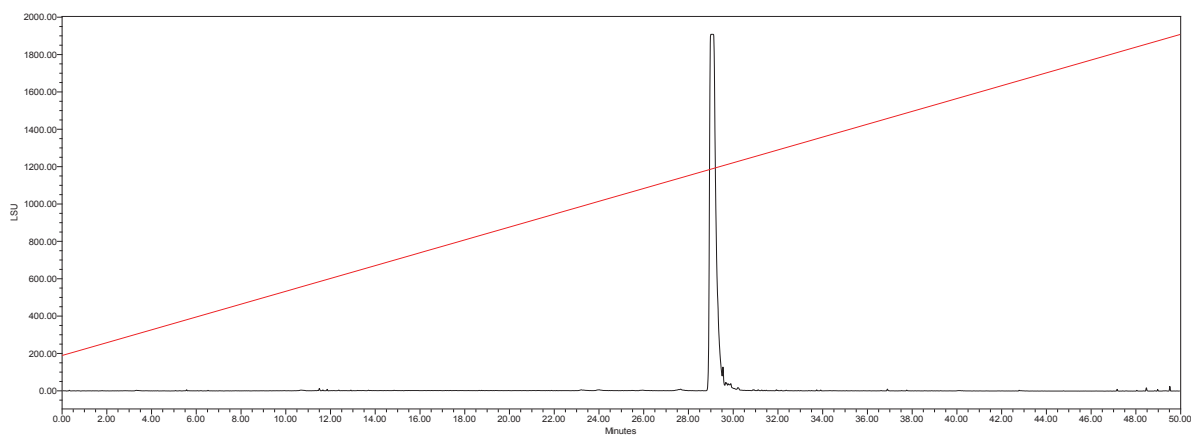


ESI-MS

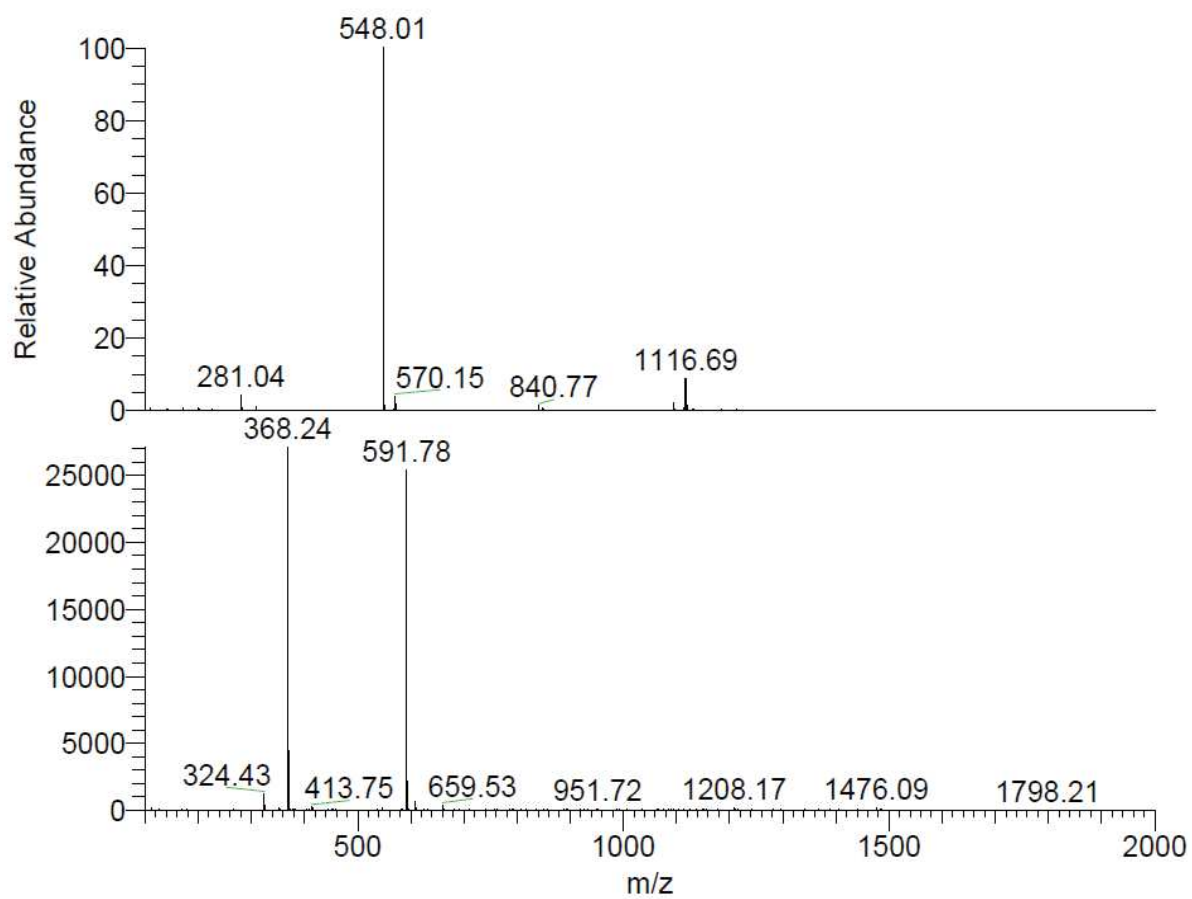


Fmoc-Aib ψ [Tz]Ala-Ile-OMe (**4d**)

Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

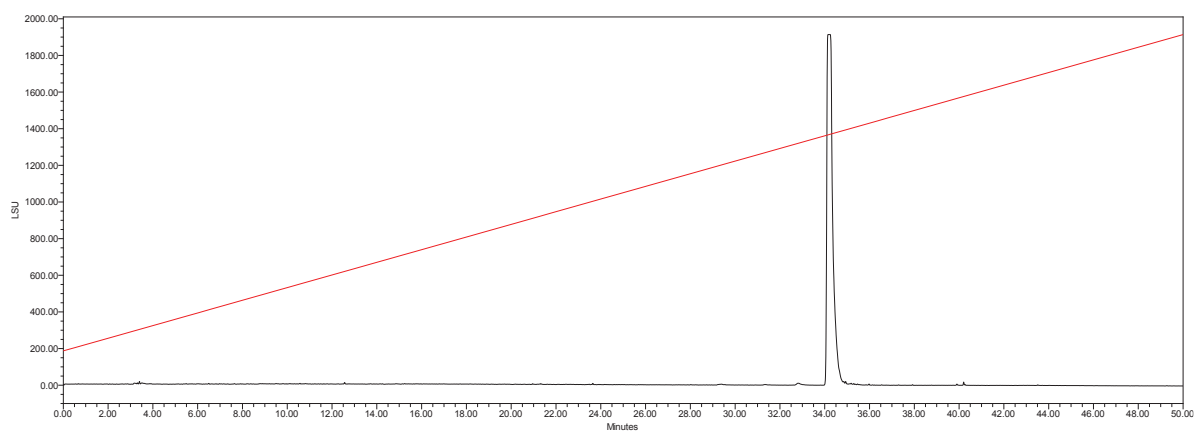


ESI-MS

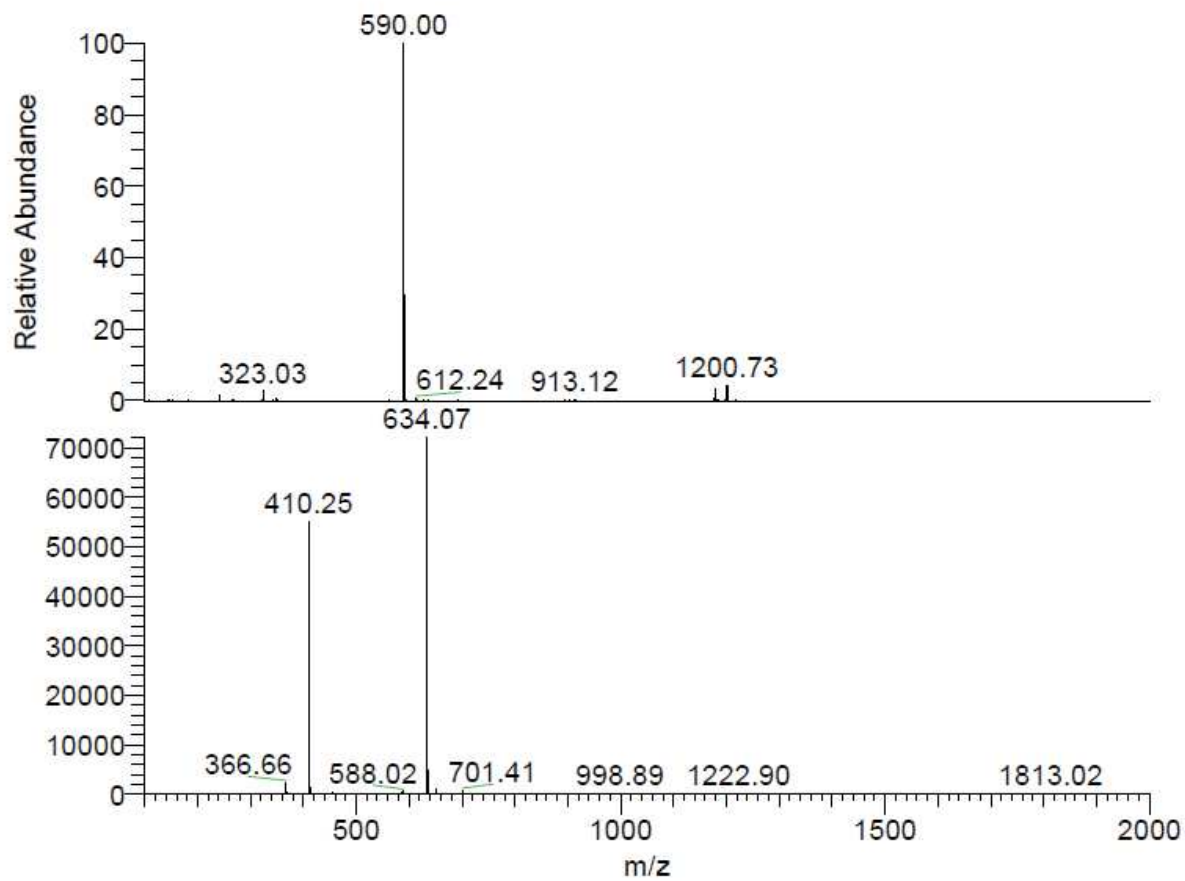


Fmoc-Aib ψ [Tz]Leu-Ile-OMe (**4e**)

Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

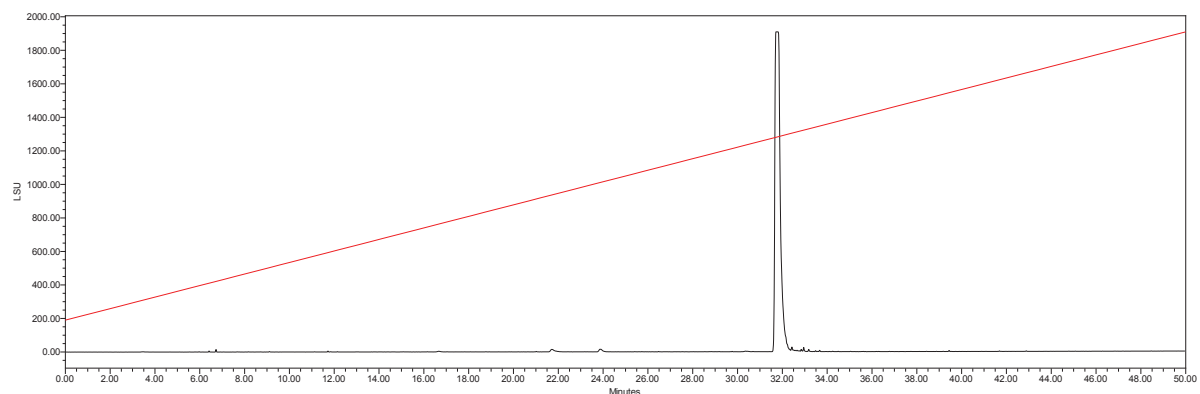


ESI-MS

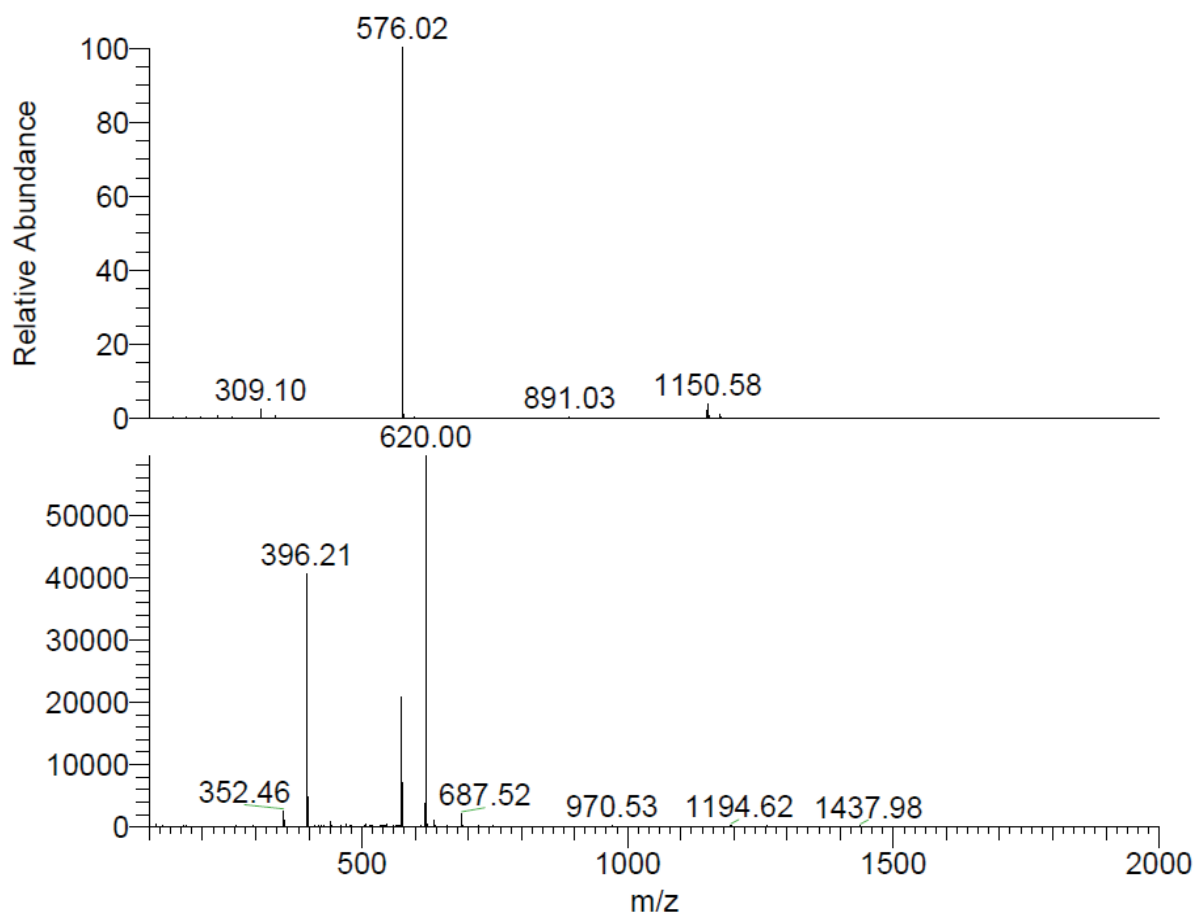


Fmoc-Aibψ [Tz]Val-Ile-OMe (**4f**)

Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

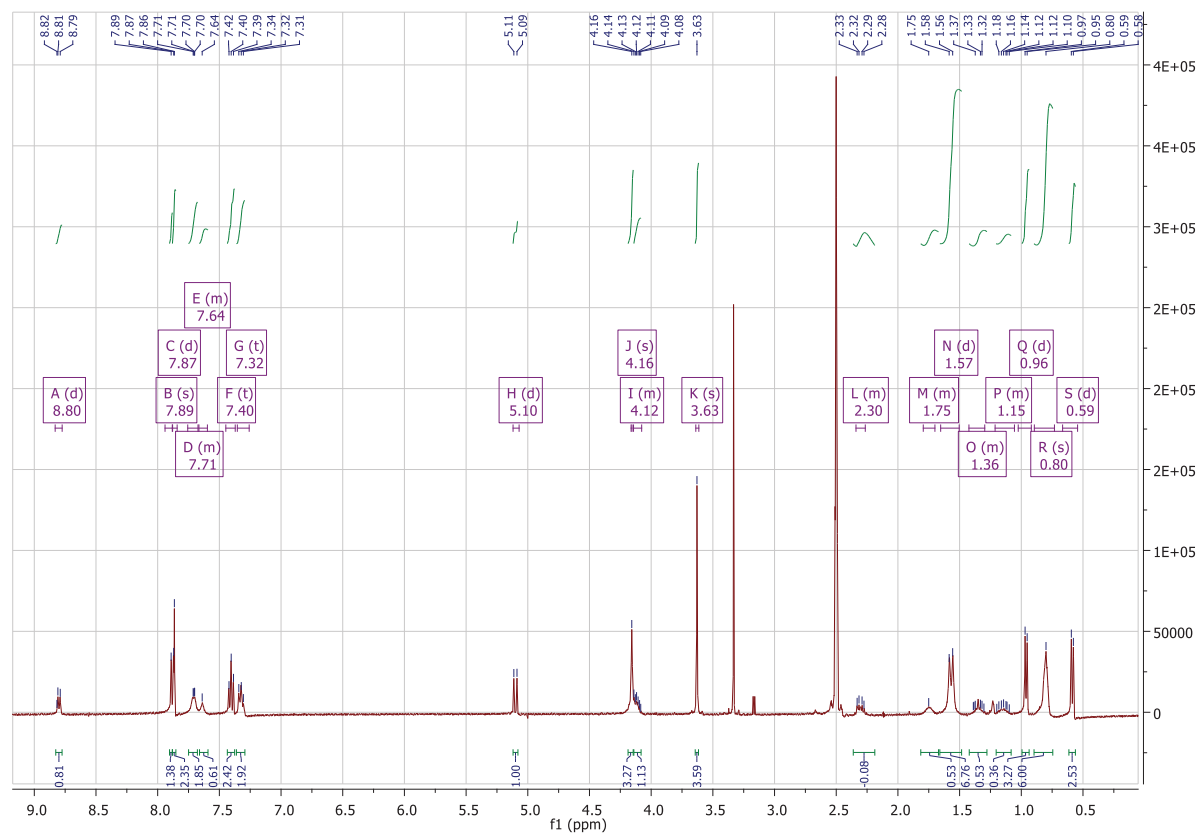


ESI-MS

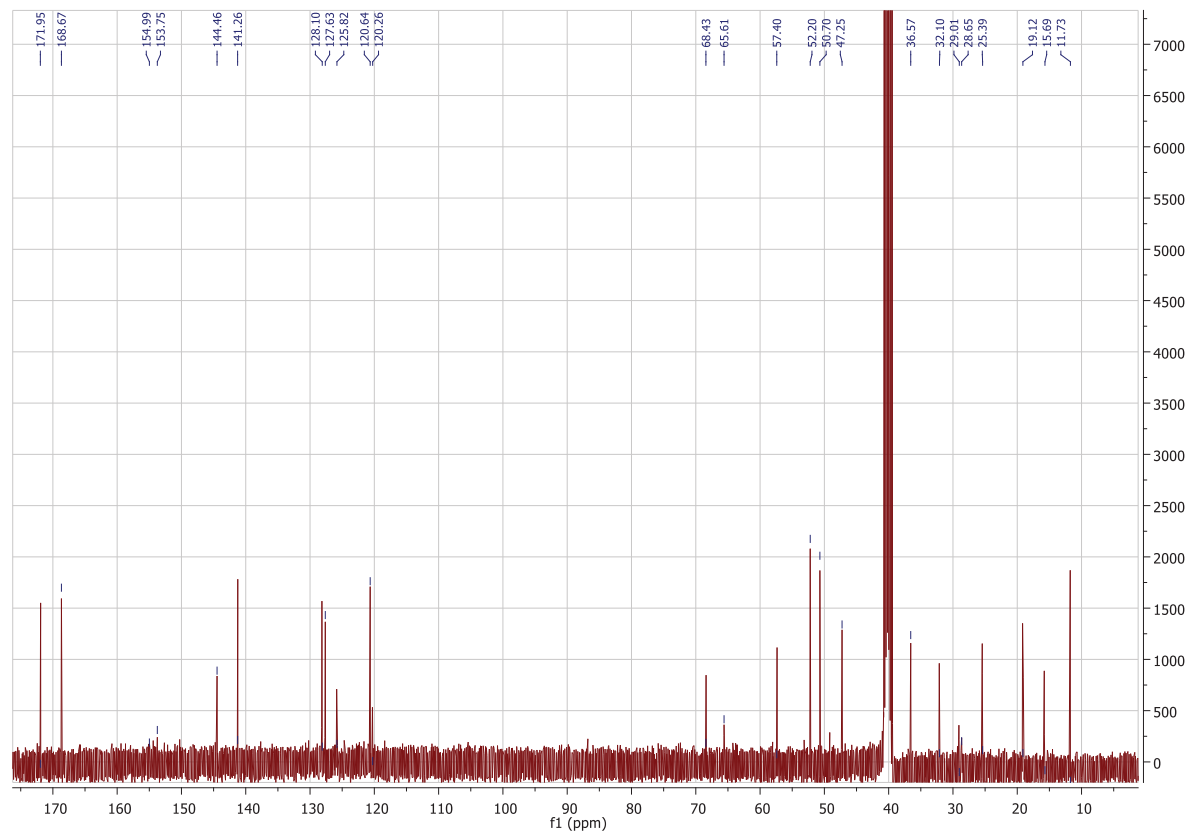


Fmoc-Aib ψ [Tz]Val-Ile-OMe (**4f**)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)

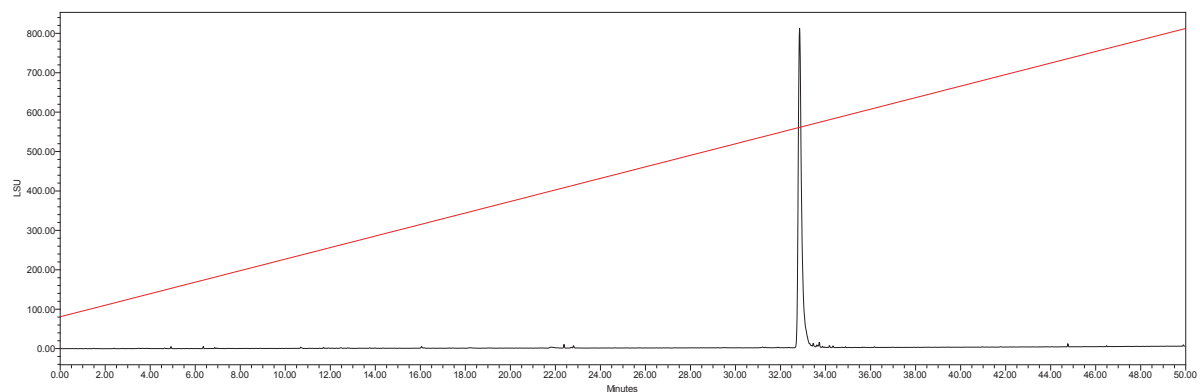


^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6)

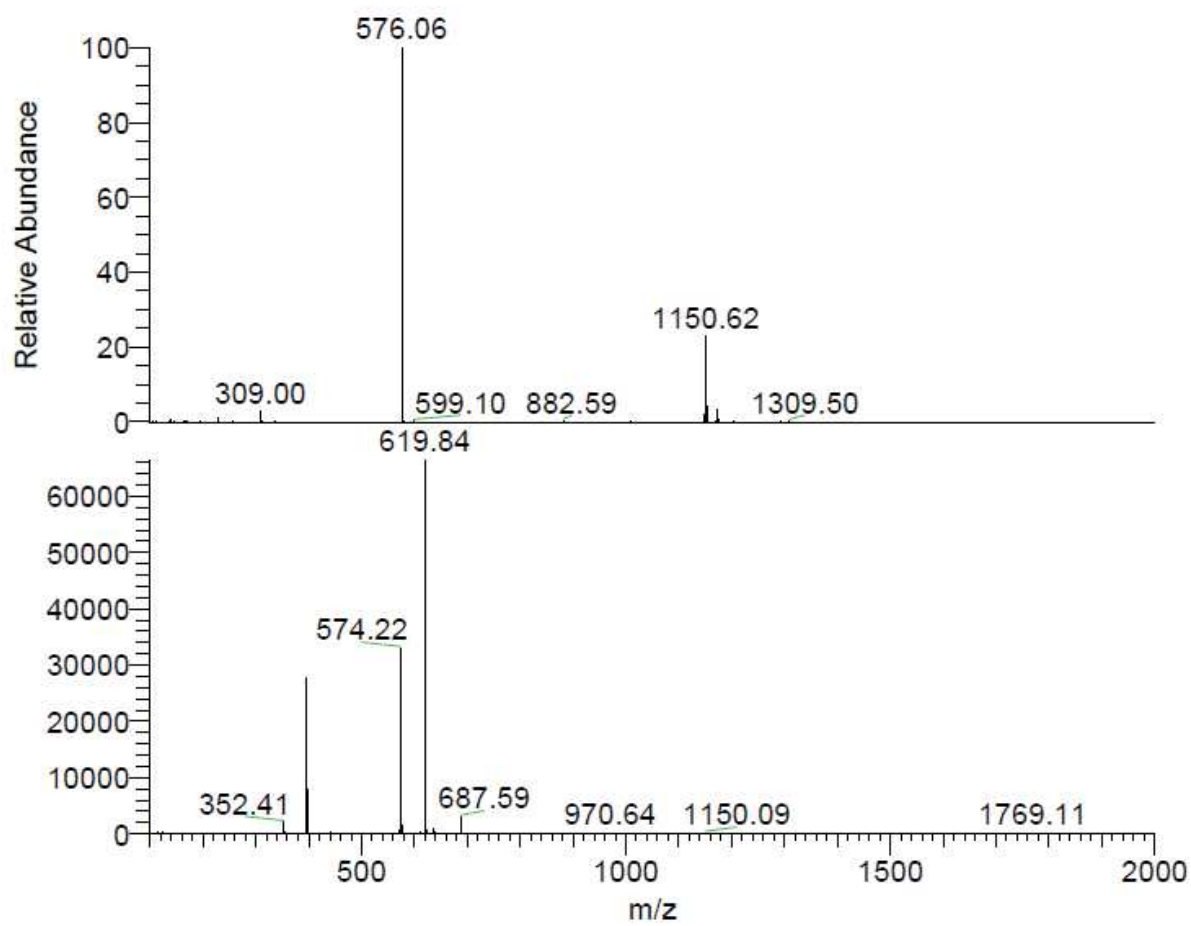


Fmoc-Aibψ [Tz]-D-Val-Ile-OMe (**4f**)

Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

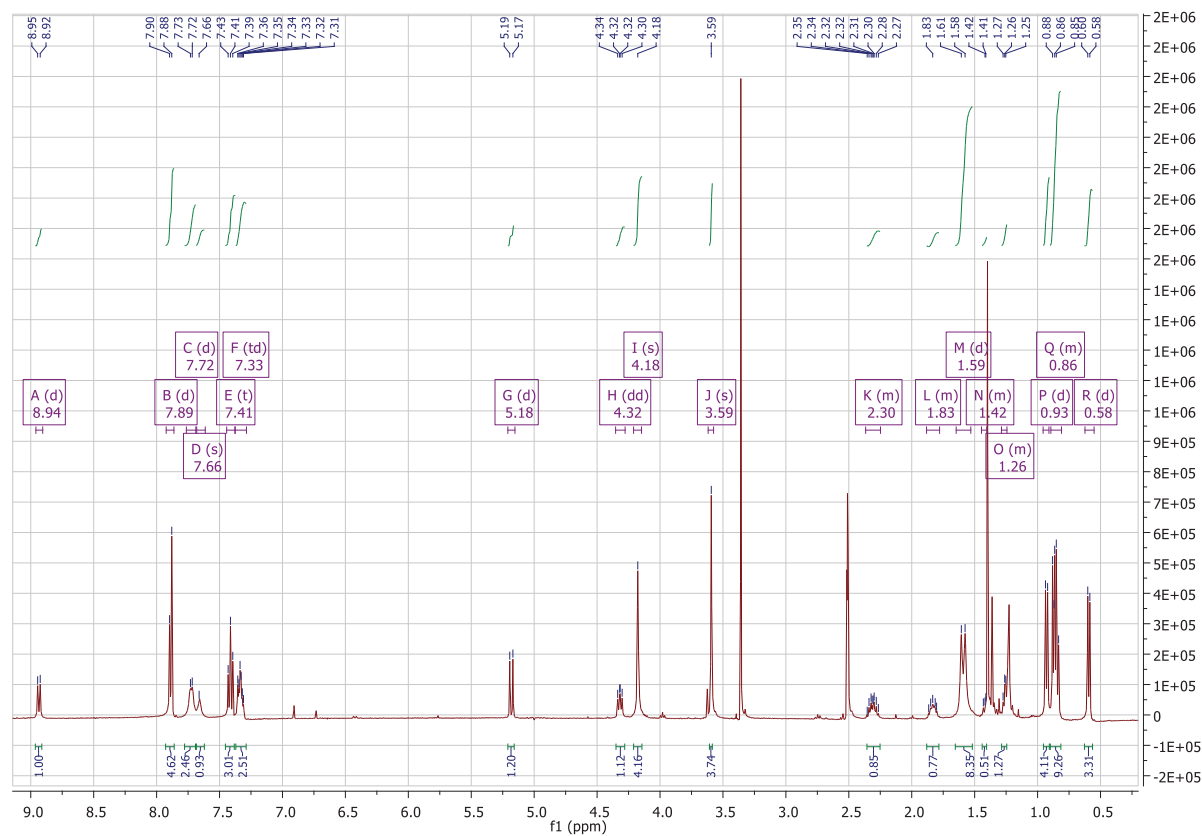


ESI-MS

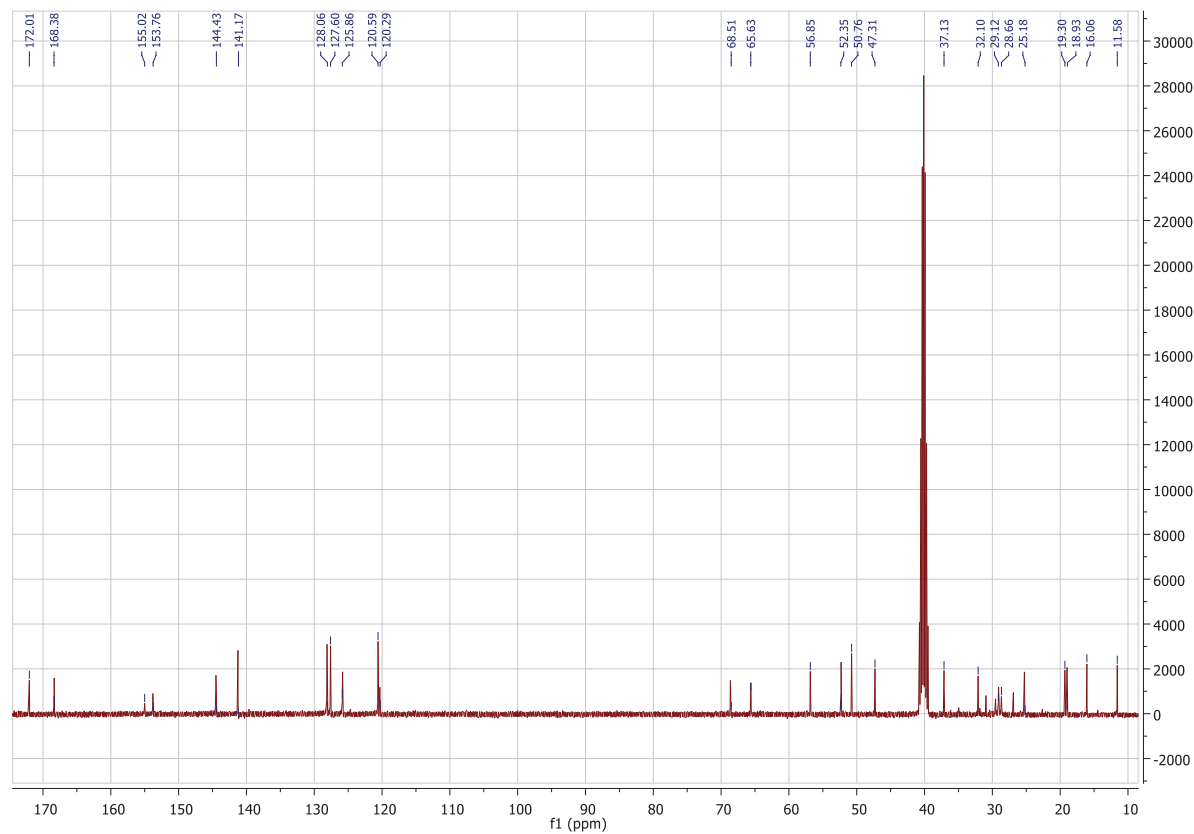


Fmoc-Aib ψ [Tz]-D-Val-Ile-OMe (**4f'**)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)

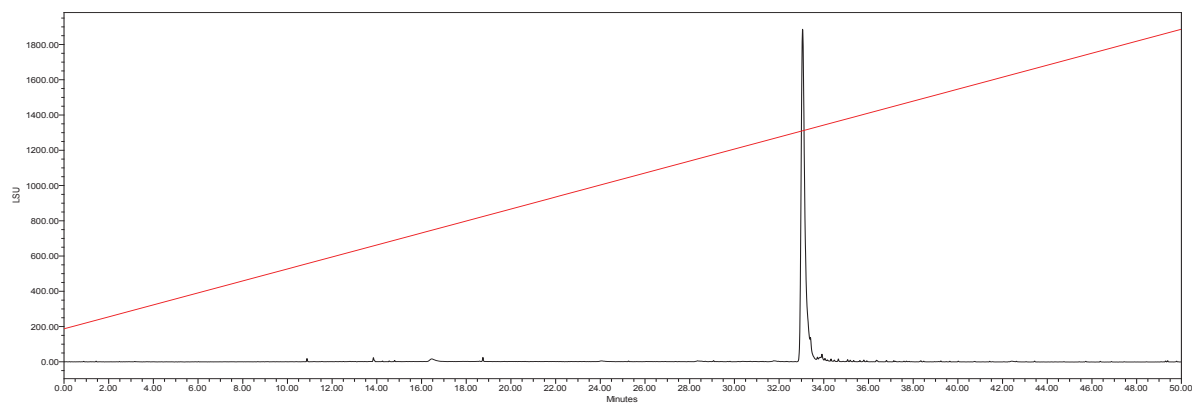


¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)

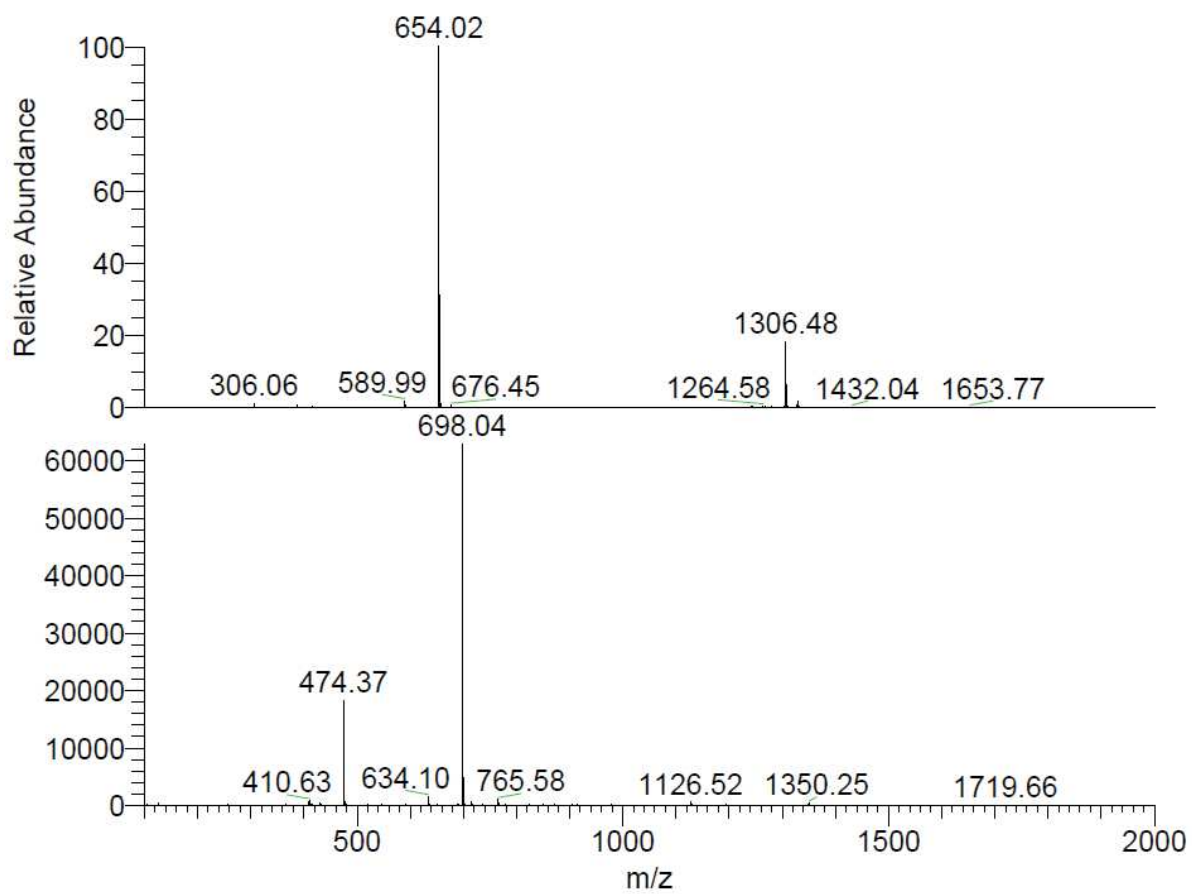


Fmoc-Aibψ [Tz]Tyr(OMe)-Ile-OMe (**4g**)

Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

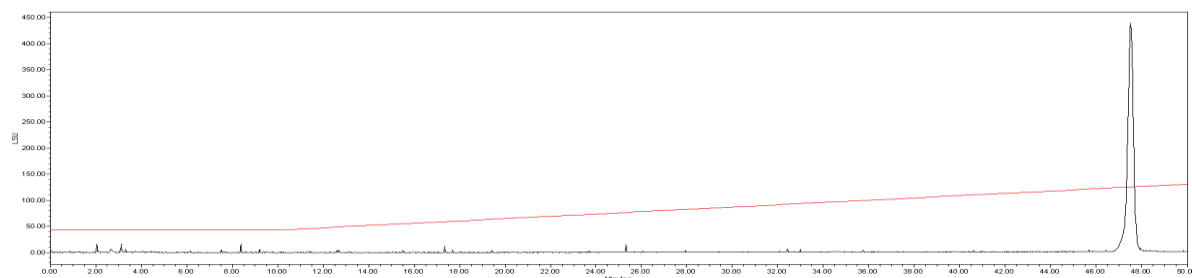


ESI-MS

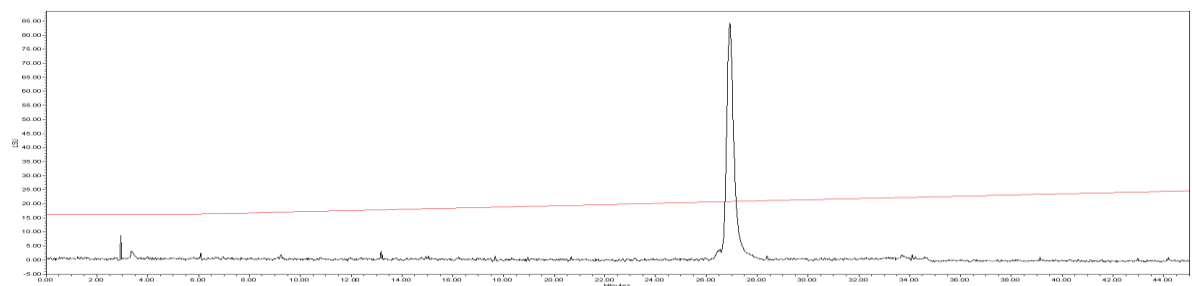


Ac-Phe-Aib ψ [Tz]Aib-Aib ψ [Tz]Val-Aib ψ [Tz]Gly-Gly-OH (**6a**)

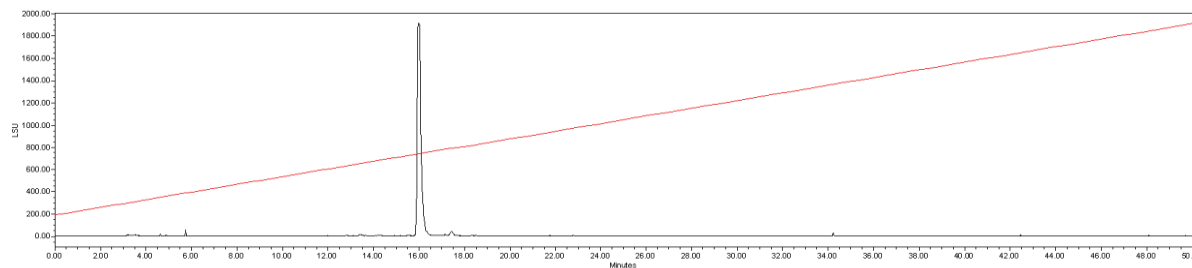
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate 10% B for 10 min and to 30 % B over 40 min.



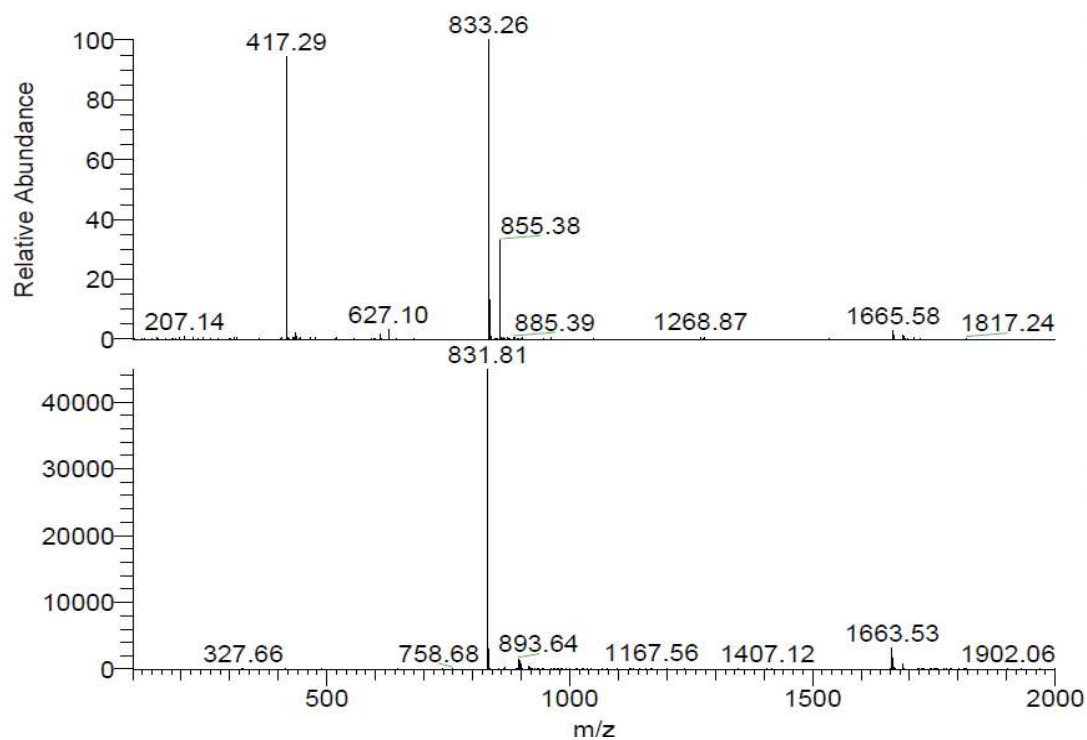
gradient: 0.9 ml/min flow rate 20% B for 5 min and to 30 % B over 40 min.



gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

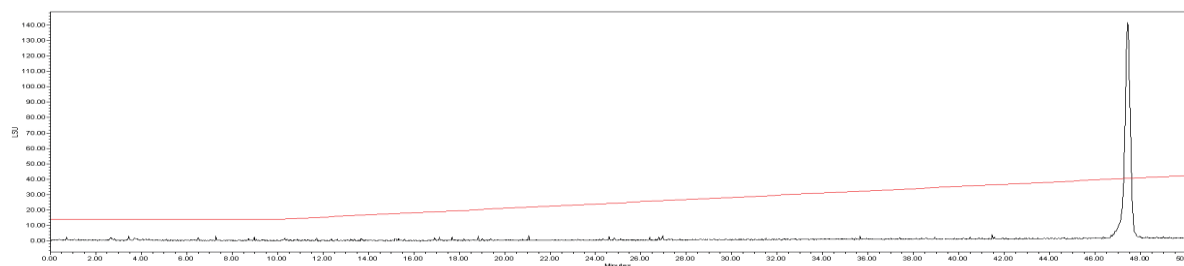


ESI-MS

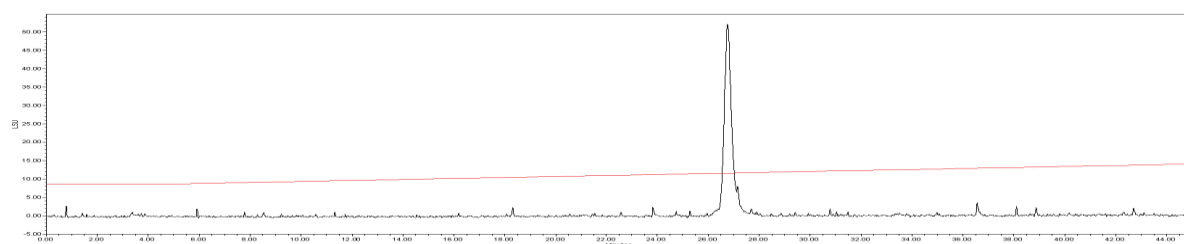


Ac- Phe-Aib ψ [Tz]Aib-Aib ψ [Tz]-D-Val-Aib ψ [Tz]Gly-Gly-OH (**6b**)

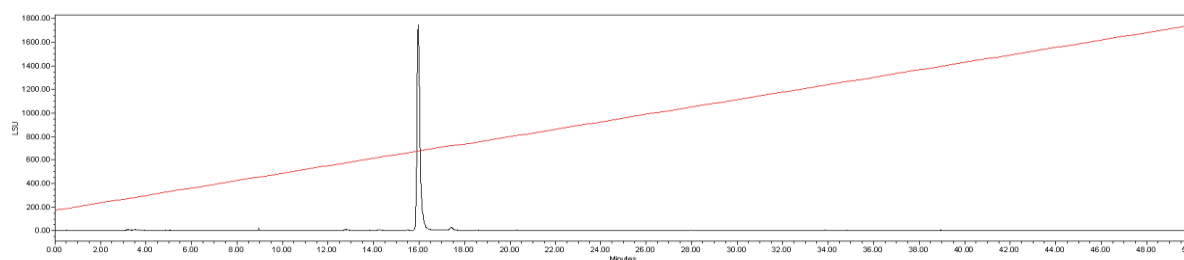
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate 10% B for 10 min and to 30 % B over 40 min.



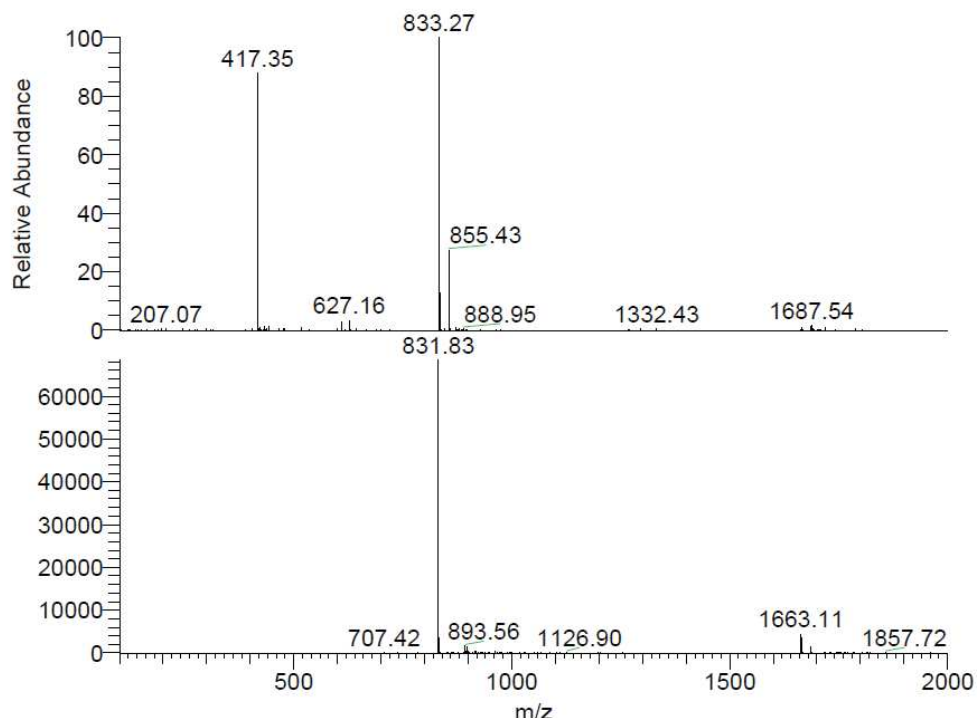
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate 20% B for 5 min and to 30 % B over 40 min.



Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

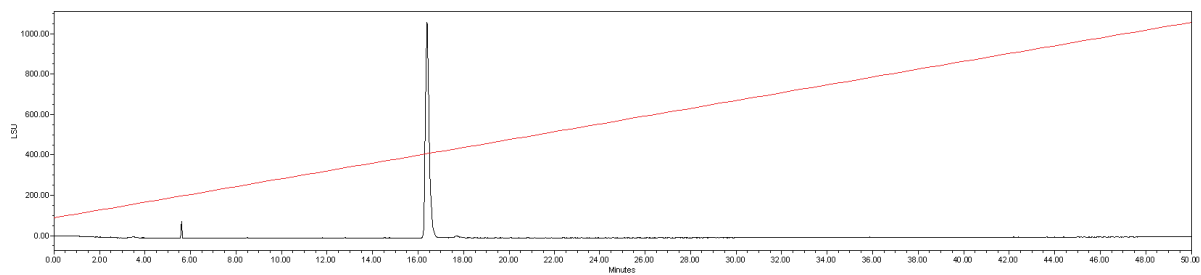


ESI-MS

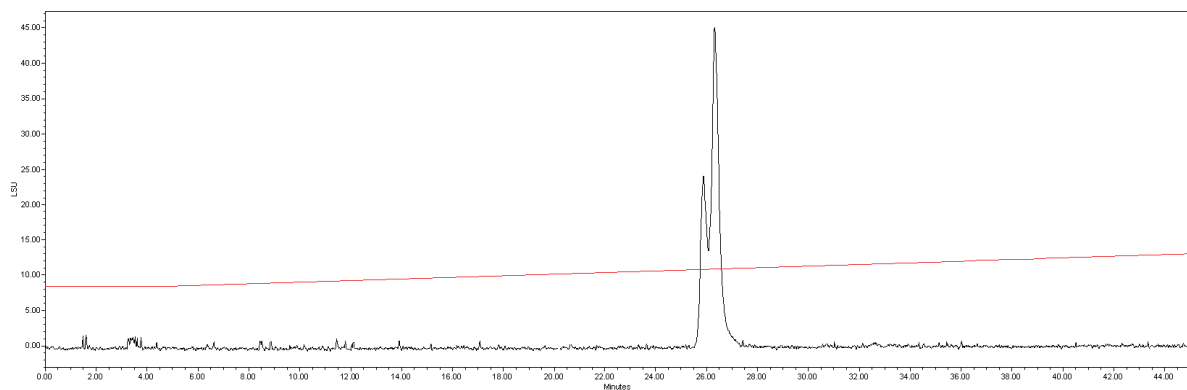


co-injection of (6a) and (6b)

Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

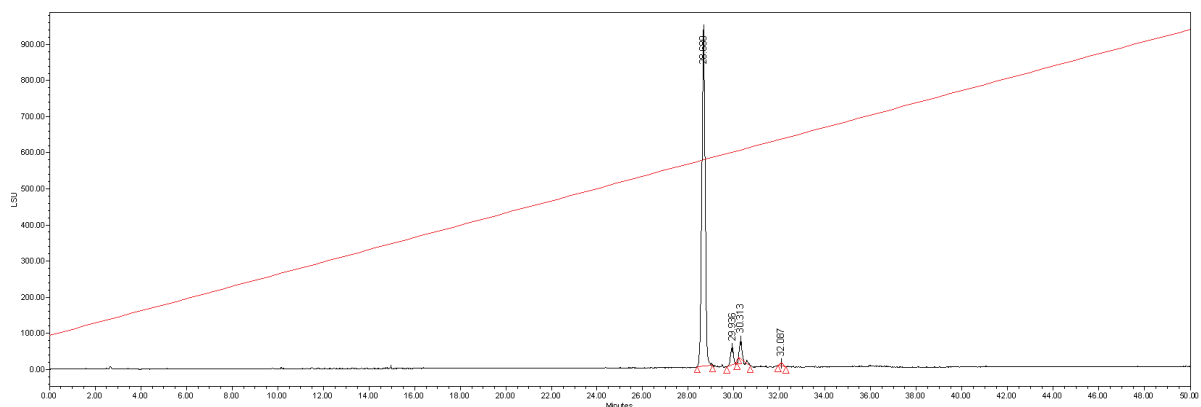


Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate 20% B for 5 min and to 30 % B over 40 min.

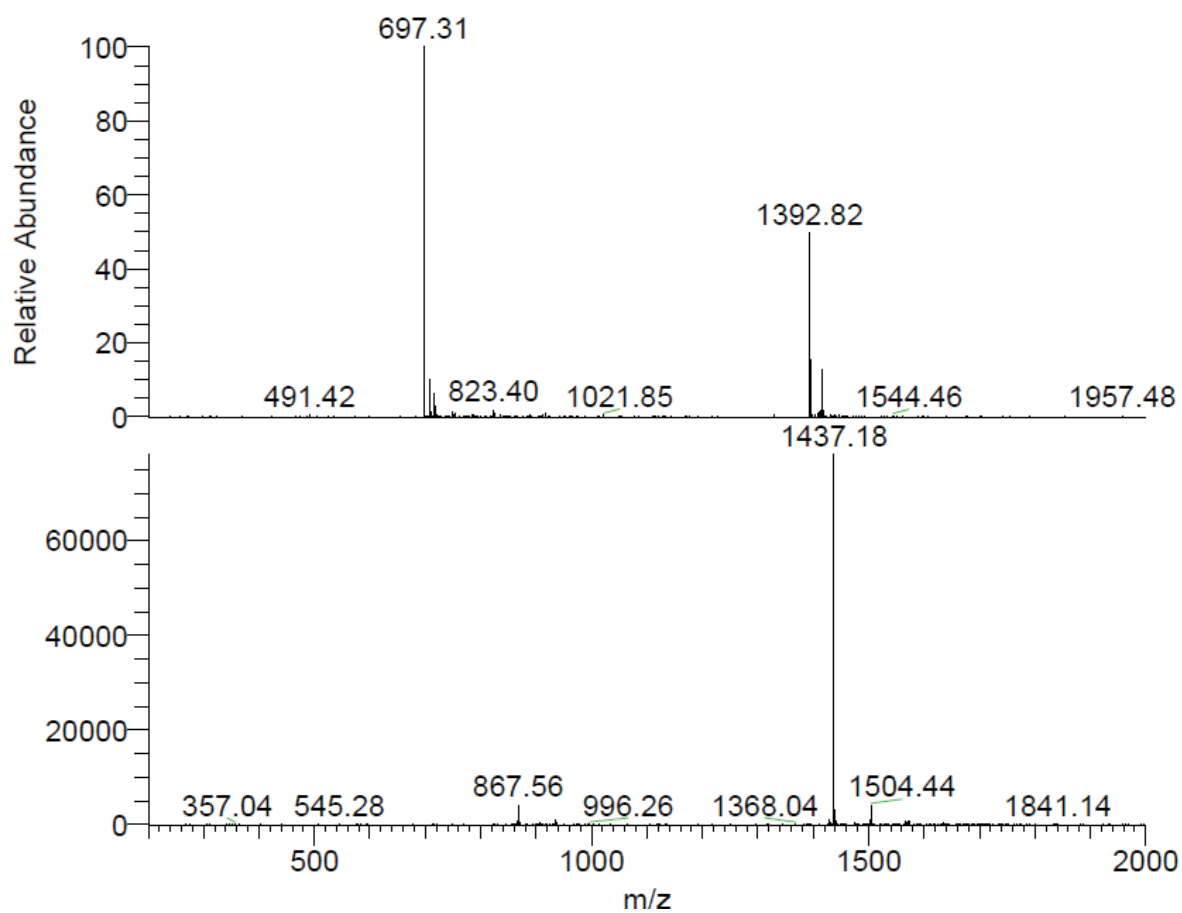


Ac-(Aib) ψ [Tz]Leu)₆-NH₂ (**6c**) Crude

Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min.

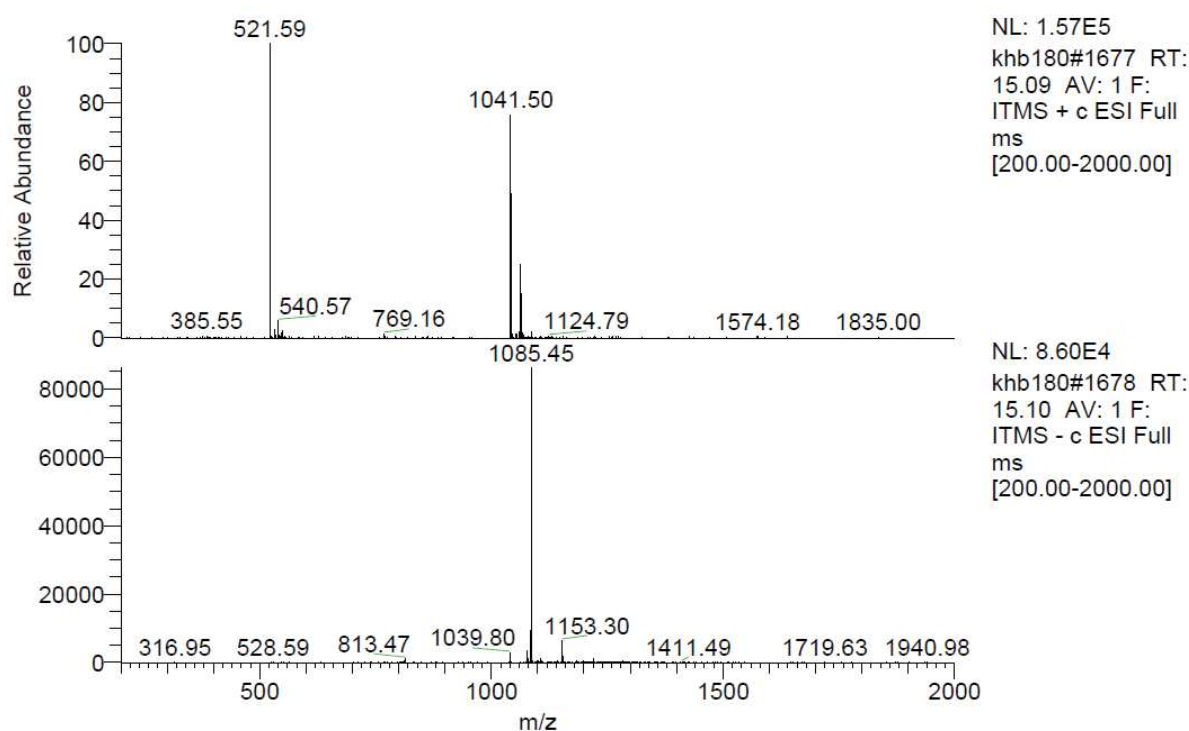
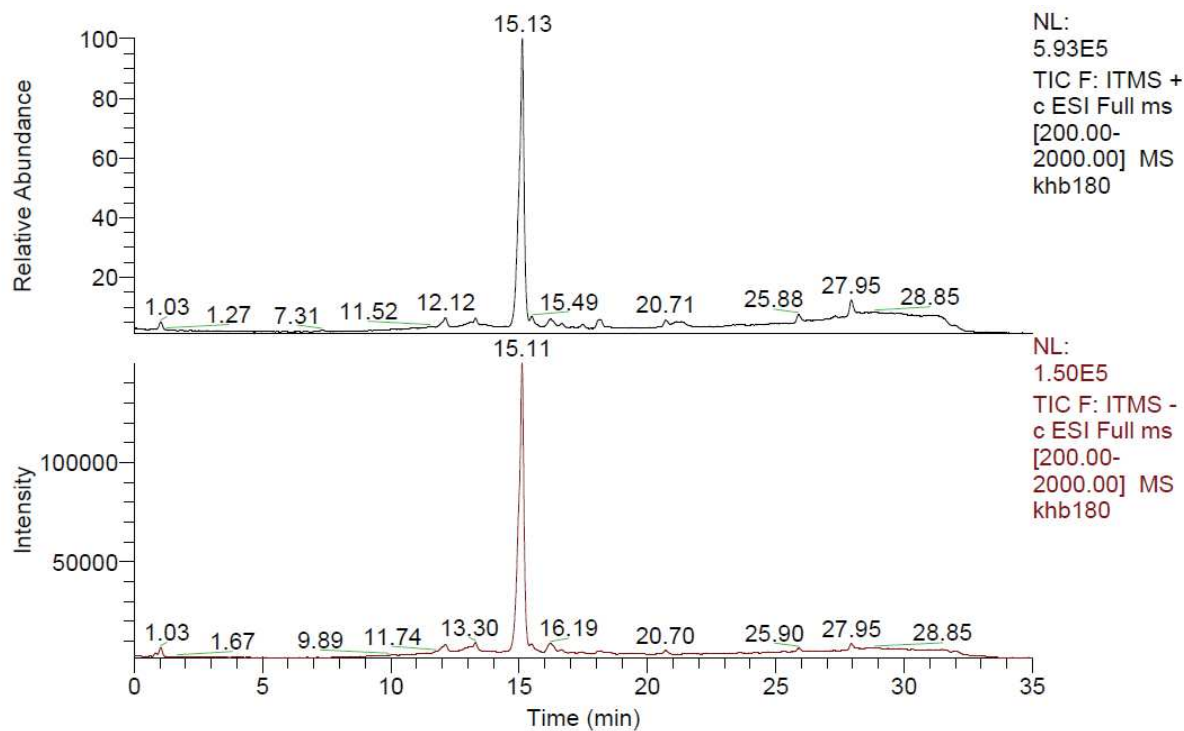


ESI-MS



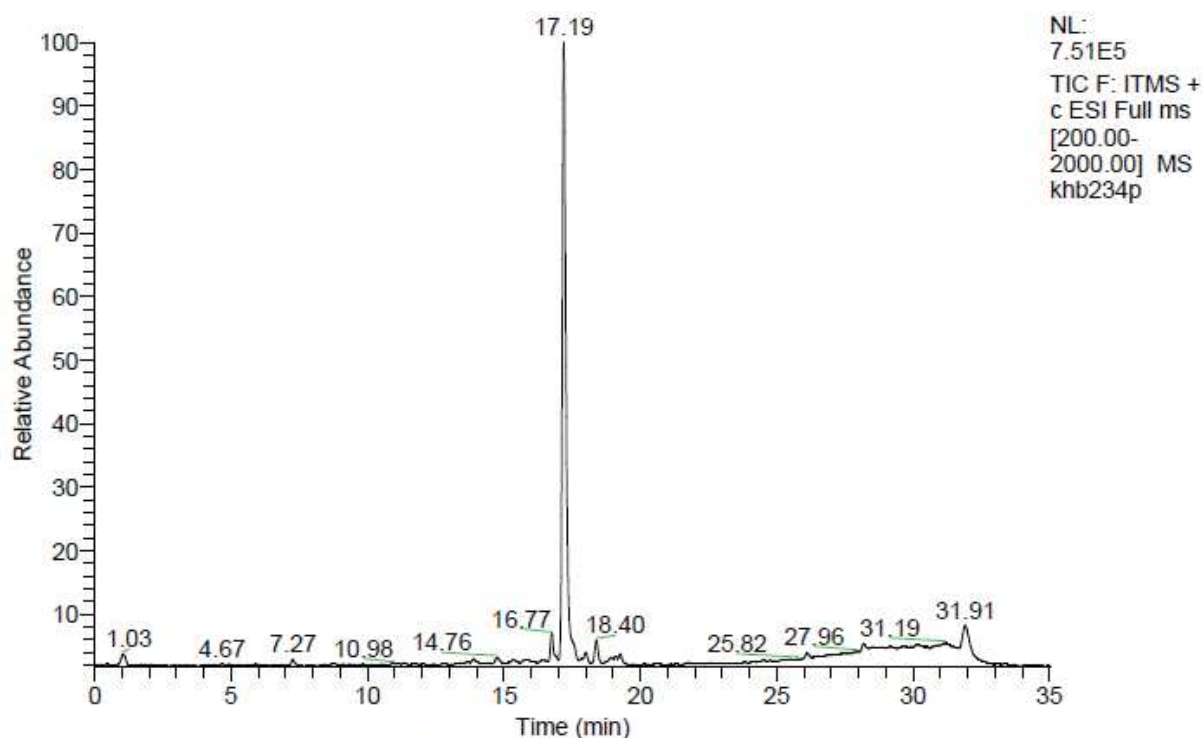
Ac-(Phe-Aib ψ [Tz]Ala)₃-NH₂ (**6d**)

Analytical LC-MSgradient: 0.5 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 30 min and 10% B over 5 min

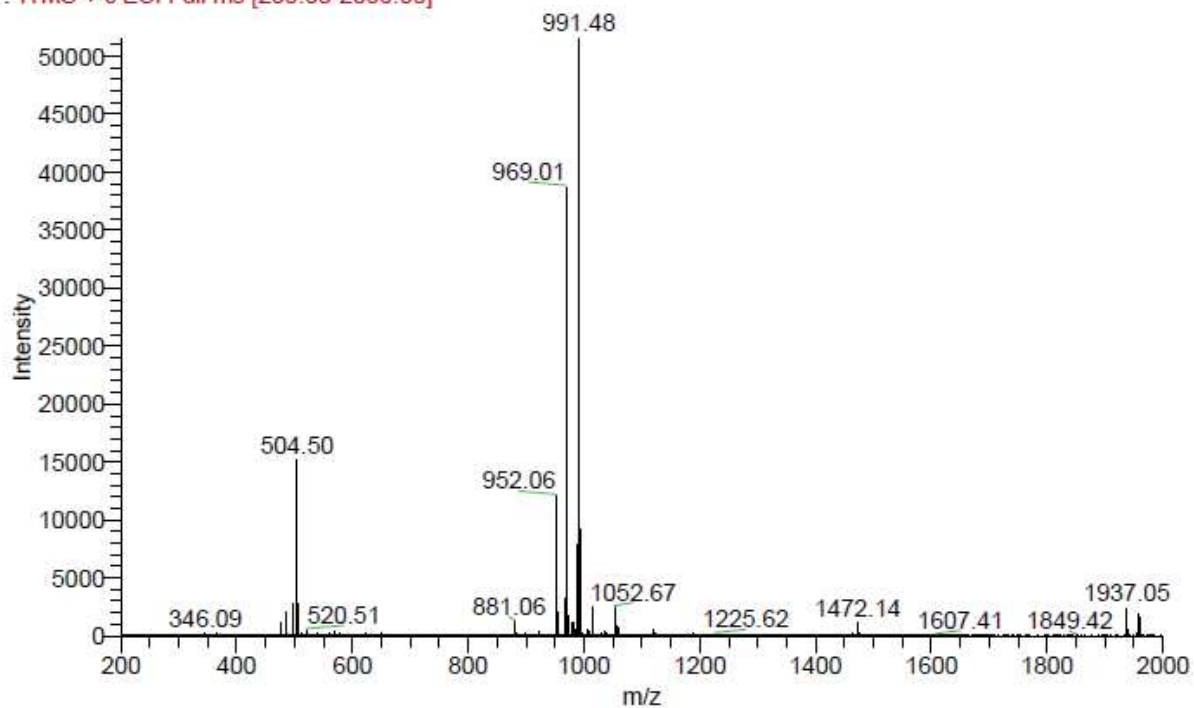


Ac-(Phe-Aib-Ala)₃-NH₂ (7)

Analytical LC-MSgradient: 0.5 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 30 min and 10% B over 5 min

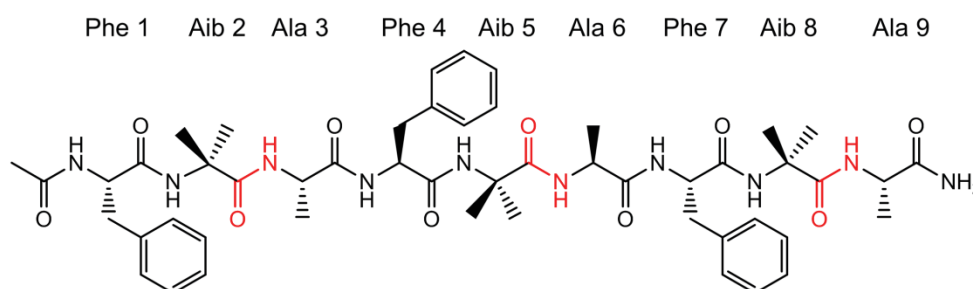


khb234p #1965-2031 RT: 16.93-17.38 AV: 34 NL: 5.15E4
F: ITMS + c ESI Full ms [200.00-2000.00]



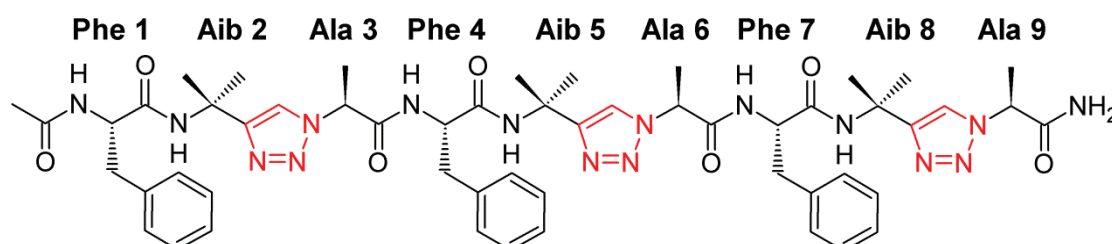
¹H NMR chemical shifts for **7** and **6d** in CD₃OH

¹H NMR chemical shifts for **7** in CD₃OH at 288 K



Residue	<i>HN</i>	<i>Hα</i>	<i>Hβ</i>	Others
Phe 1	8.36	4.43	3.08	CH ₃ 2.02
Aib 2	8.41	-	1.43	
Ala 3	7.70	1.32	-	
Phe 4	8.01	4.39	3.12, 3.25	
Aib 5	7.93	-	1.42	
Ala 6	7.71	1.27	-	
Phe 7	7.97	4.35	3.07, 3.25	
Aib 8	7.77	-	1.42	
Ala 9	7.60	1.44	-	NH ₂ 6.93, 7.32

¹H NMR chemical shifts for **6d** in CD₃OH at 288 K

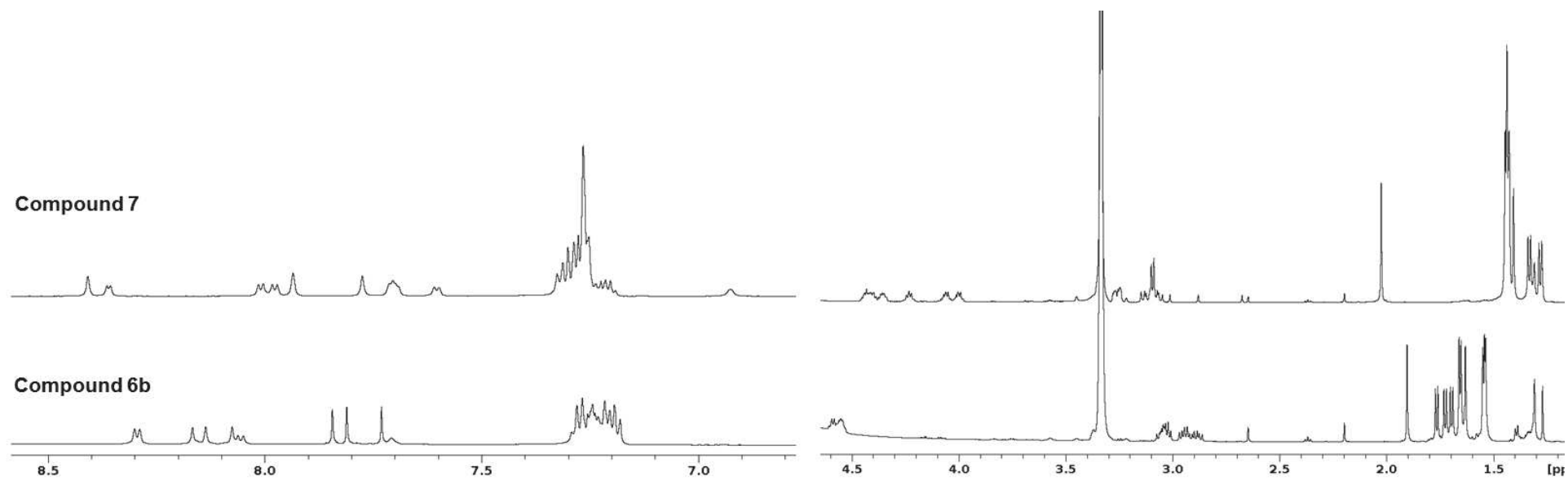


Residue	<i>HN</i>	<i>Hα</i>	<i>Hβ</i>	Others
Phe 1	8.05	4.58	2.88, 3.02	CH ₃ 2.02
Aib 2	8.07	-	1.53, 1.63	H _{ψTz} 7.73
Ala 3	-	1.69	-	
Phe 4	8.29	4.54	2.94, 3.04	
Aib 5	8.13	-	1.54, 1.65	H _{ψTz} 7.80
Ala 6	-	1.72	-	
Phe 7	8.29	4.55	2.95, 3.05	
Aib 8	8.17	-	1.54, 1.66	H _{ψTz} 7.84
Ala 9	-	1.76	-	NH ₂ 7.27, 7.70

Unambiguous inter-residue NOEs correlations observed in the ROESY spectrum of **7** and **6d** in CD₃OH at 293 K. Strong “s” < 2.7 Å; medium “m” < 3.3 Å; weak “w” < 5.0 Å.

Name of the NOE correlation	NOE		Type
	7	6d	
Ac-HN1	m	m	Sequential
HN2-HA1	m	s	Sequential
HN2-HB1	w	-	Sequential
HN2-HN3/H Ψ _{Tz} (2-3)	w	w	Sequential
HN3/H Ψ _{Tz} (3-4)-HN4	w	-	Sequential
HN3-HB2	-	-	Sequential
HN3/H Ψ _{Tz} (3-4)-HA1	w	w	Medium
HN4-HA3	m	s	Sequential
HN4-HB3	w	m	Sequential
HN4-HB2	-	-	Medium
HN5-HN6/H Ψ _{Tz} (5-6)	w	w	Sequential
HN5-HA4	m	s	Sequential
HN5-HB4	w	-	Sequential
HN5-HA3	w	-	Medium
HN6/H Ψ _{Tz} (5-6)-HA4	w	w	Medium
HN6/H Ψ _{Tz} (5-6)-HB5	-	w	Sequential
HN6/H Ψ _{Tz} (5-6)-HN7	w	-	Sequential
HN7-HN8	w	-	Sequential
HN7-HA6	w	s	Sequential
HN7-HB6	w	m	Sequential
HN8-HN9/H Ψ _{Tz} (8-9)	w	w	Sequential
HN8-HA7	w	s	Sequential
HN8-HB7	w	-	Sequential
HN8-HA6	w	-	Medium
HN9/H Ψ _{Tz} (8-9)-HB8	-	w	Sequential
HN9/H Ψ _{Tz} (8-9)-HA7	w	w	Medium

^1H NMR spectra of compound **7** and **6b** in CD_3OH at 293 K.



D. Partie expérimentale de l'article 4. 1,2,3-triazole are not so well-disposed as amide bond mimetic. A case study on peptaibols.

Abbreviations: DIC, N,N'-diisopropylcarbodiimide; Oxyma, Ethyl cyano(hydroxyimino)acetate, Ethyl cyanoglyoxylate-2-oxime; DCM, Dichloromethane; DMF, N,N'-dimethylformamide; cHex, Cyclohexane; DIEA, Diisopropylethylamine; Ac₂O, Acetic anhydride; TFA, Trifluoroacetic acid; TIS, Triisopropylsilane; FA, formic acid; ACN, Acetonitrile; HPLC, High-performance liquid chromatography; LC-MS, liquid chromatography mass spectrometry; ELSD, evaporative light scattering detector; SPPS, solid phase peptide synthesis.

General Experimental:

Experimental procedure for the SPPS of Alamethicin F50/5 and analogs:

Solid-phase peptide synthesis (SPPS) was run on an automated microwave peptide synthesizer (CEM liberty one, Orsay, France) using Fmoc/O-tbutyl chemistry. All Fmoc-protected amino acids, DIC, Oxyma, 2-chlorotriyl chloride resin preloaded with phenylalaninol (loading 0.67 mmol/g or 0.36 mmol/g) were purchased from Iris Biotech (Germany). DCM, DMF, cHex, DIEA, Ac₂O, TFA, TIS, FA, ACN and piperidine for peptide synthesis were obtained from Aldrich (USA). SPPS was performed on a CEM Liberty One microwave-assisted peptide synthesizer at a 0.10 mmol scale with DIC/Oxyma as coupling reagent and 20% piperidine in DMF for Fmoc deprotection. After transfer to the reaction vessel the resin was swelled using the standard protocol involving 1 h immersion in 10 mL of DMF the elongation was carried automatically using a 5-fold excess of protected amino acids and coupling reagent. The mixture was irradiated in a microwave cavity at 70 °C for 20 min, Fmoc deprotection with 20% piperidine in DMF (7 mL for 30s at 33 °C and 7 mL for 3min at 70 °C) and N-terminal acetylation to reach a final temperature of 70°C for 10 min using 10 ml of Ac₂O/DIEA/DMF 1:2:7 (v/v). After completion of the automatic synthesis the peptidyl-resin was washed twice with 10 mL of DCM. Cleavage and deprotection of the peptide was performed by treating the peptidyl-resin with 10 mL of TFA/DCM/H₂O/TIPS 47:47:4:2 (v/v) for 60 min. After resins' filtration, the filtrate was concentrated and co-evaporated with cyclohexane. The peptide was precipitated with ice-cold diethyl ether, recovered by centrifugation and washed with cold diethyl ether. Water was added and the mixture was lyophilized to yield crude peptide. After purification by semi-preparative HPLC,

concentration of the fraction containing the peptide of interest the remaining solution is dried freeze to afford a white powder.

LC-MS: LC-MS analyses were carried out using a Thermo Fisher Scientific LC-MS device, Accela HPLC coupled to a LCQ Fleet equipped with an electrospray ionisation source and a 3D ion-trap analyser. The analysis was performed with a Phenomenex Kinetex C-18 column (100 x 300 mm) using gradient mixture of water with 0.1 % AF (buffer A) and ACN with 0.1 % AF (buffer B). Standard conditions were a flow rate of 0.5 ml/min eluting with 10% B to 100% B 30 min and 10%B for 7 min. Standard conditions were applied to all LC-MS analysis unless otherwise stated.

Analytical HPLC: The HPLC analysis was conducted on a Waters 2695 HPLC system with a Grace Vydac 218MS 5 μ M C-18 column (250 x 4.6 mm) and an ELS-Detector using a gradient mixture of water with 0.1% FA (Buffer A) and ACN with 0.1% FA (Buffer B).

Semi-preparative HPLC purification: Semi-preparative purification of peptides was performed using a Waters 1525 chromatography system fitted with a Waters 2487 tunable absorbance detector with detection at 214 nm and 254 nm. Purification was performed by eluting solvents A (water) with 0.1 % TFA and B (ACN) with 0.1 % TFA on a Grace Vydac 218MS510 C-18 column (250 x 10 mm 5 μ m) at 3 ml/min.

Cytotoxicity assay on KB cells: KB cells (human oral epidermoid carcinoma ATCC CCL 17, American Type Culture Collection, Rockville, MD) were cultivated in BME (Basal Medium Eagle) supplemented with 5% (v/v) fetal calf serum, 1% (v/v) glutamine 200 mM and 1% (v/v) streptomycin (10 mg/ml) / penicillin (10000 U) (all *Sigma-Aldrich*). Cells were cultivated in plastic flasks (*Greiner Bio One*, F-Courtaboeuf) at 37°C in a 5% CO₂ enriched atmosphere. After an incubation period of 48 h, trypsinized cells were suspended as a 200,000 cells/ml suspension in supplemented BME and 50 μ l were put in each well of 96-well microplates (*Nunclon Delta Surface*, *Thermo Scientific Nunc*). After an incubation of 48h, 50 μ l of peptaibol samples were added to the initial 50- μ l cell suspension. Peptaibols samples were tested in well as a final 5% (v/v) methanolic solution in supplemented BME with concentrations ranging from 3 to 400 μ g/ml. A final 5% (v/v) methanolic solution in supplemented BME was used as solvent control. After 76 h of incubation, the cell viability was evaluated by the colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide, *Sigma-Aldrich*) bioassay.^{223,224} All the *in vitro* assays were done in technical and biological triplicates.

Antibacterial assay on *Bacillus subtilis*: Broth assay was performed to compare peptaibols activity at one concentration, 50 µg/ml, which is ten-fold higher than the IC₅₀ determined previously for alamethicin. *Bacillus subtilis* strain (CIP 103406) was grown and maintained on LB broth and Tryptic soy agar at 28°C.²²⁵ An exponential growth phase culture in LB broth (after 6 hours incubation in a fresh medium) was diluted to 1x10⁴ CFU/ml.

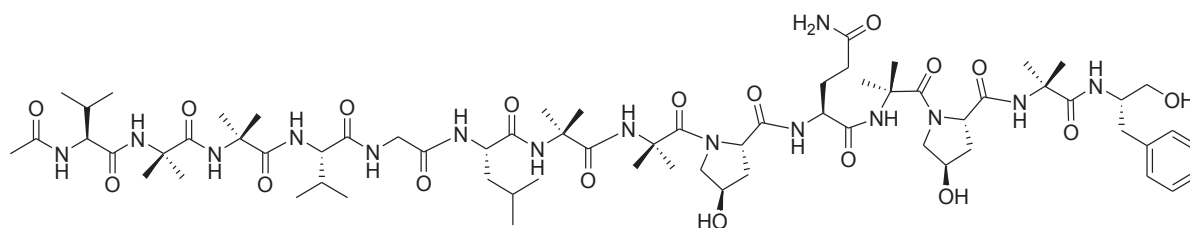
20 µl of peptaibols solution in DMSO (5 mg/ml) were first diluted with 980 µl broth in sterile eppendorf tubes. These diluted solutions (100 µg/ml) were then added in 96-well microplate containing 100 µl *Bacillus subtilis* solution. A positive control was setup with broth and *Bacillus subtilis* solution complemented with 1% DMSO and a negative control with broth alone. All peptaibols were tested in triplicate.

Microplates were mixed and incubated at 28°C overnight. Optical density (OD) was taken at 600 nm with negative control as blank.

Inhibitory percentage was determined using following formula:

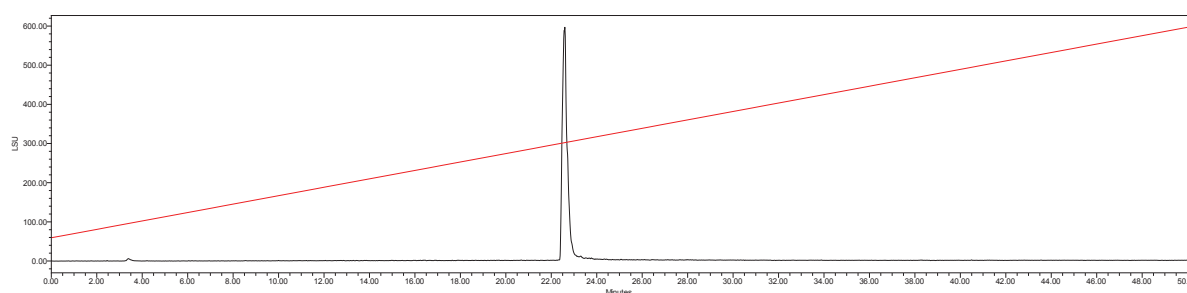
$I = 1 - (OD_p / OD_0)$ Where OD_p is OD obtained with peptaibols solution and OD₀ is OD of positive control.

Bergofungin D: Ac-Val-Aib-Aib-Val-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Phol (**4a**)

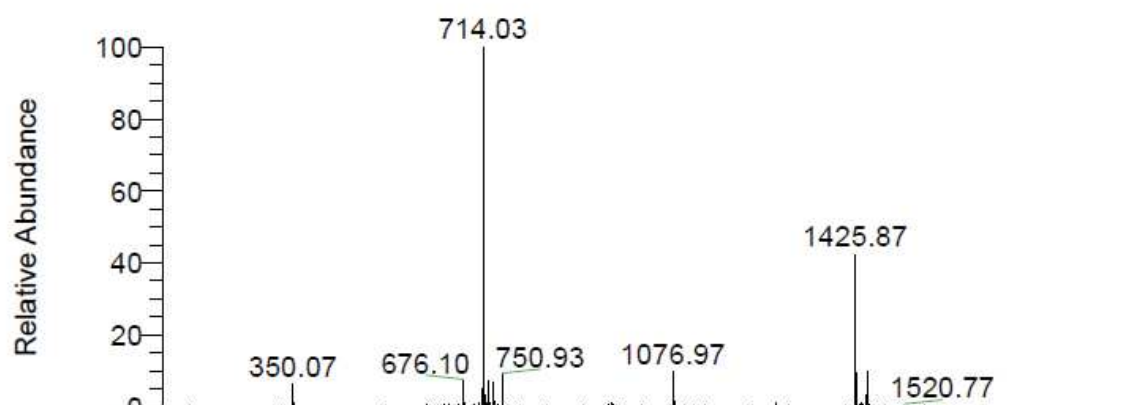


The crude peptide was dissolved in ~4 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 40% to 70% B in A over 30 min with a flow rate of 3 mL/min to yield the Bergofungin D (90 mg, 63% yield, >95% purity). ESI-MS: C₆₈H₁₁₂N₁₅O₁₈ [M+H⁺]; calculated 1426.8, found 1425.8

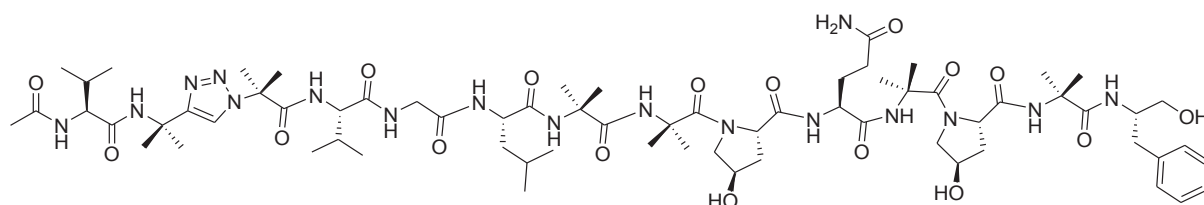
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

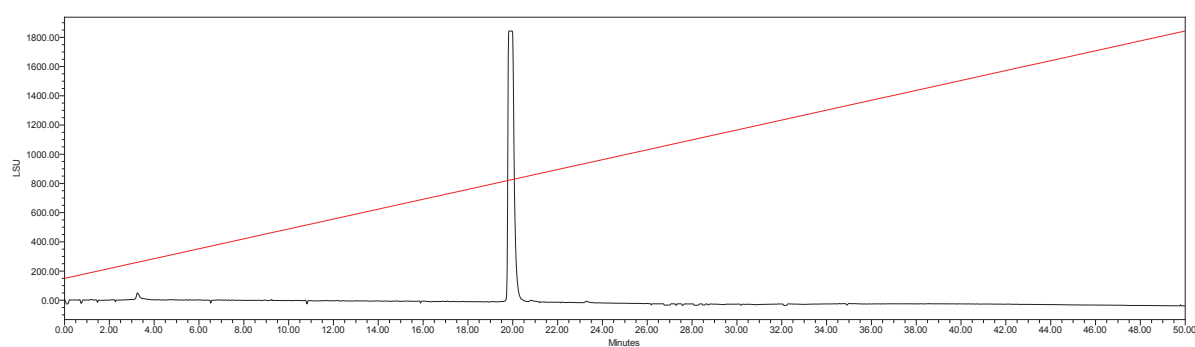


Ac-Val-AibΨ[Tz]Aib-Val-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Phol (**4b**)

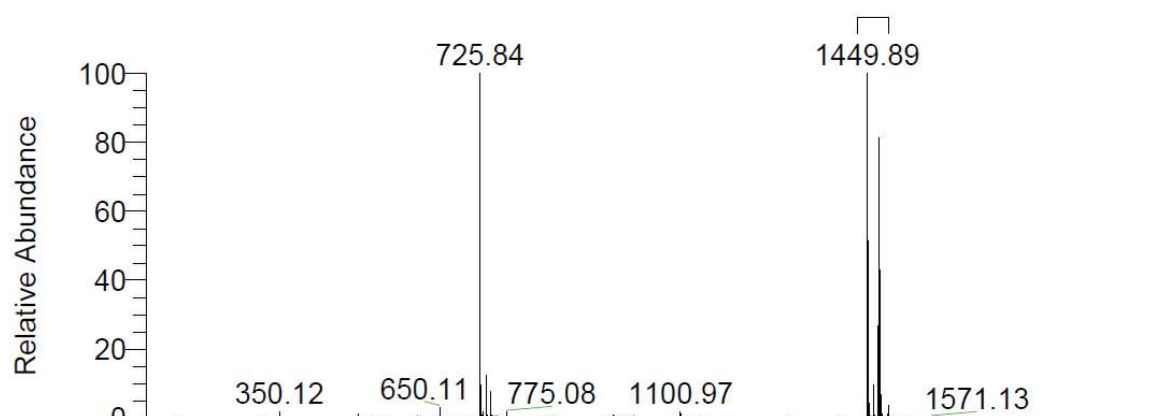


The crude peptide was dissolved in ~4 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 65% B in A over 30 min with a flow rate of 3 mL/min to yield **compound 4b** (90 mg, 56% yield, >95% purity). ESI-MS: C₆₈H₁₁₂N₁₅O₁₈ [M+H⁺]; calculated 1450.8, found 1449.8

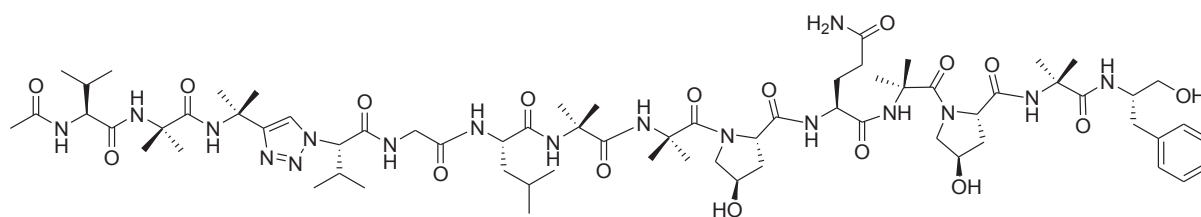
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

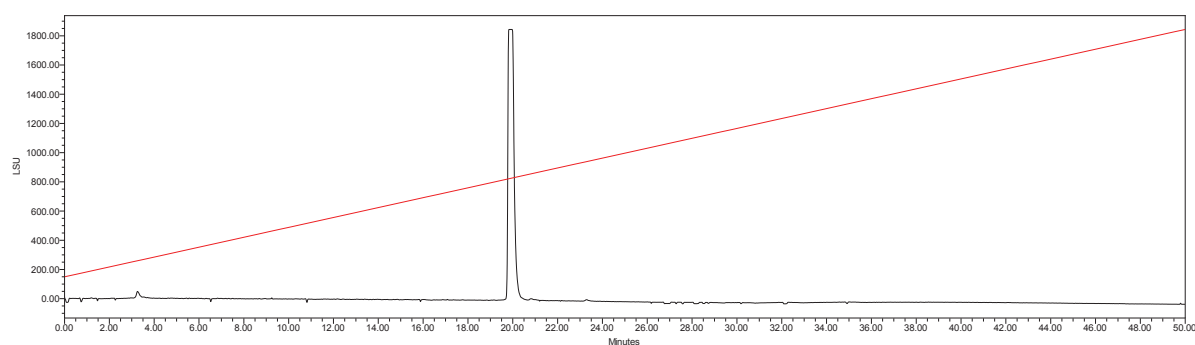


Ac-Val-Aib-AibΨ[Tz]Val-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Phol (**4c**)

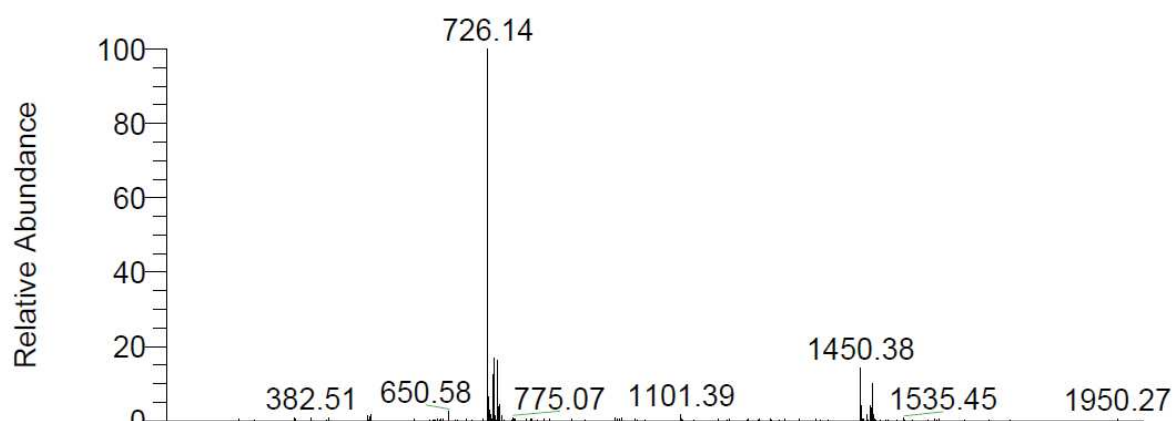


The crude peptide was dissolved in ~4 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 65% B in A over 30 min with a flow rate of 3 mL/min to yield compound **4c** (50 mg, 34% yield, >95% purity). ESI-MS: C₆₈H₁₁₂N₁₅O₁₈ [M+H⁺]; calculated 1450.8, found 1450.3

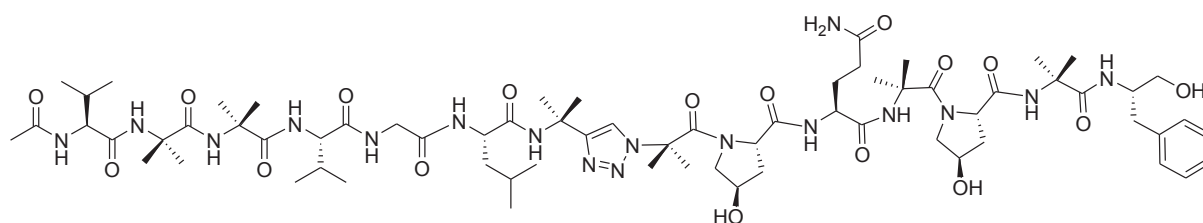
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

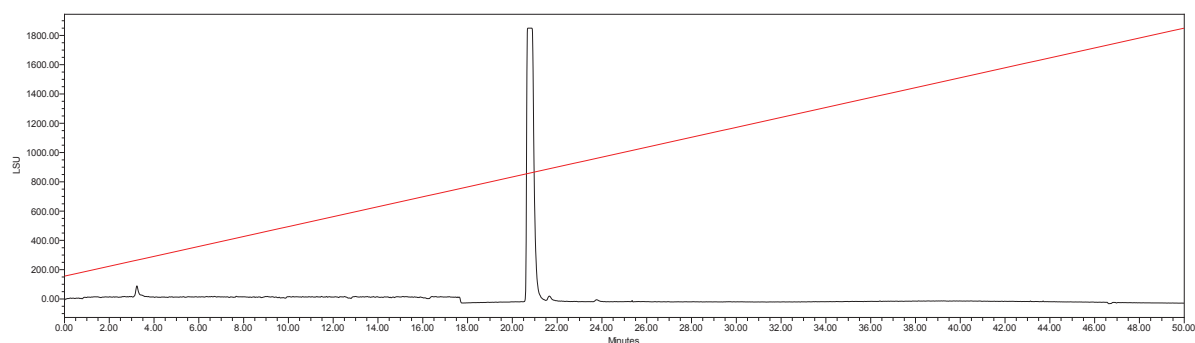


Ac-Val-Aib-Aib-Val-Gly-Leu-AibΨ[Tz]Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Phol (**4d**)

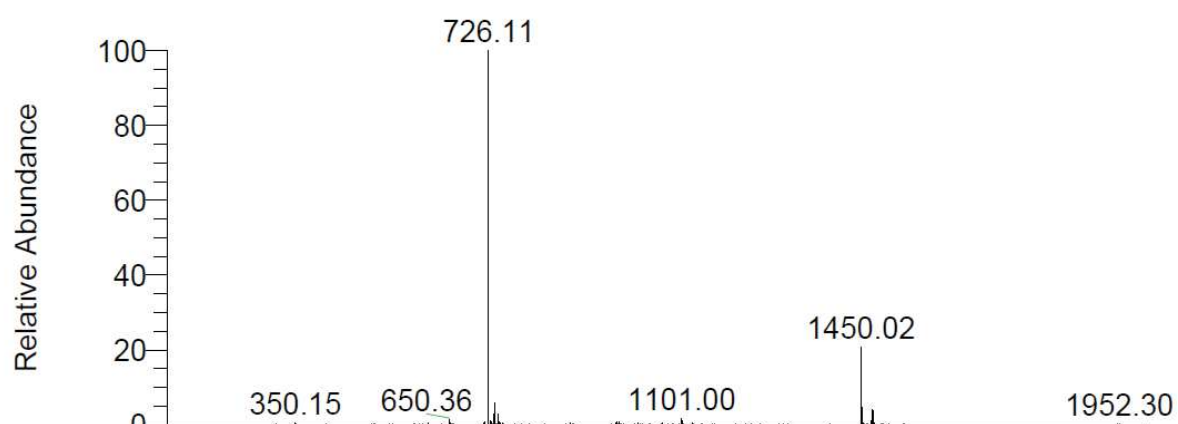


The crude peptide was dissolved in ~4 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 65% B in A over 30 min with a flow rate of 3 mL/min to yield compound **4d** (80 mg, 55% yield, >95% purity). ESI-MS: C₆₈H₁₁₂N₁₅O₁₈ [M+H⁺]; calculated 1450.8, found 1450.0

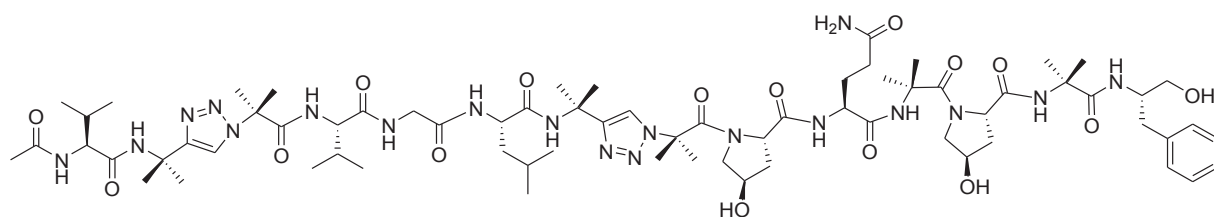
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

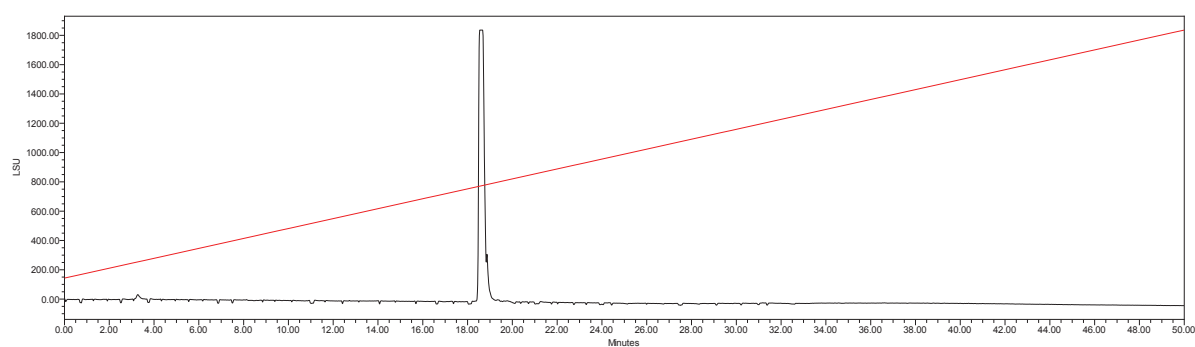


Ac-Val-AibΨ[Tz]Aib-Val-Gly-Leu-AibΨ[Tz]Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Phol (**4e**)

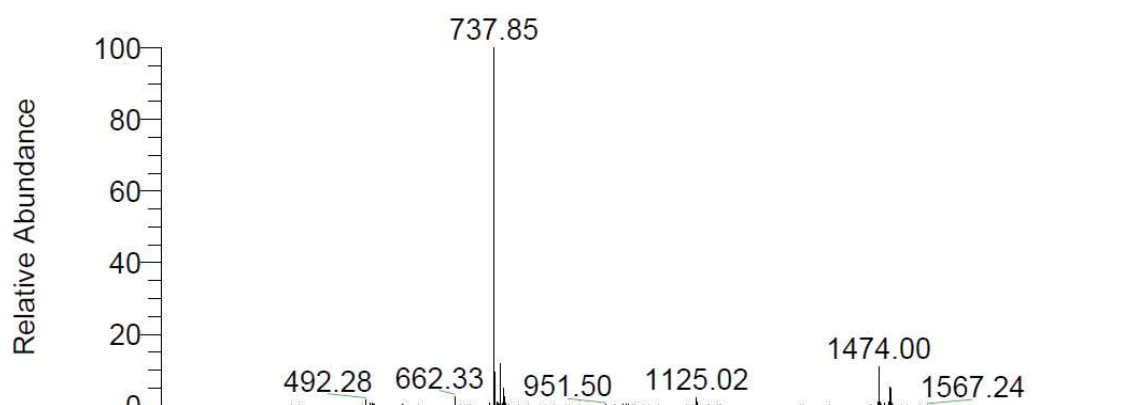


The crude peptide was dissolved in ~4 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 65% B in A over 30 min with a flow rate of 3 mL/min to yield the compound **4e** (80 mg, 54% yield, >95% purity). ESI-MS: C₇₀H₁₁₂N₁₉O₁₆ [M+H⁺]; calculated 1474.8, found 1474.0

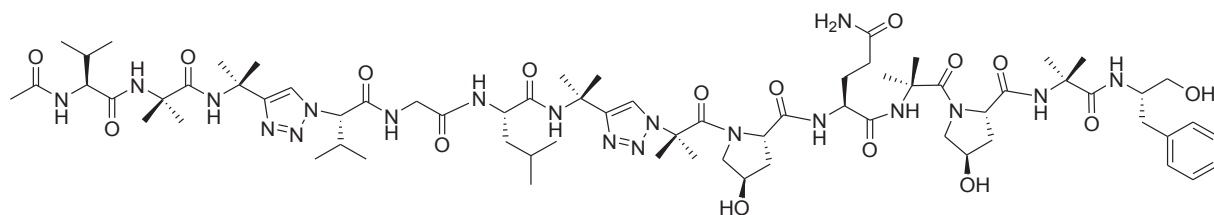
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

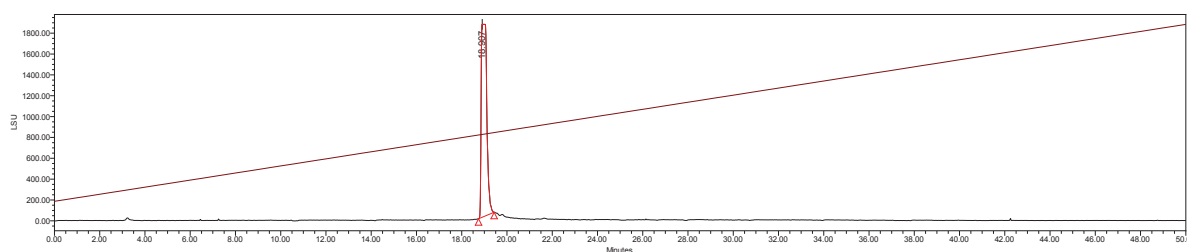


Ac-Val-Aib-AibΨ[Tz]Val-Gly-Leu-AibΨ[Tz]Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Phol (**4f**)

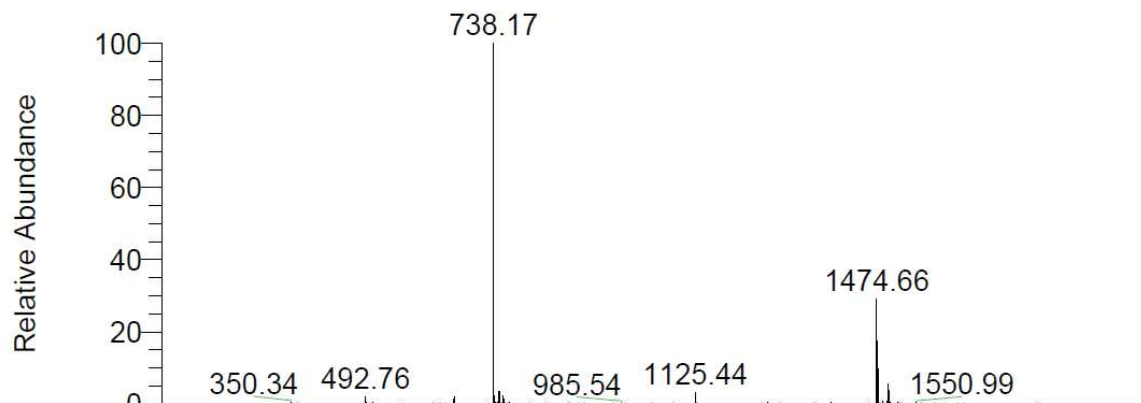


The crude peptide was dissolved in ~4 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 65% B in A over 30 min with a flow rate of 3 mL/min to yield compound **4f** (80 mg, 54% yield, >95% purity). ESI-MS: C₇₀H₁₁₂N₁₉O₁₆ [M+H⁺]; calculated 1474.8, found 1474.6

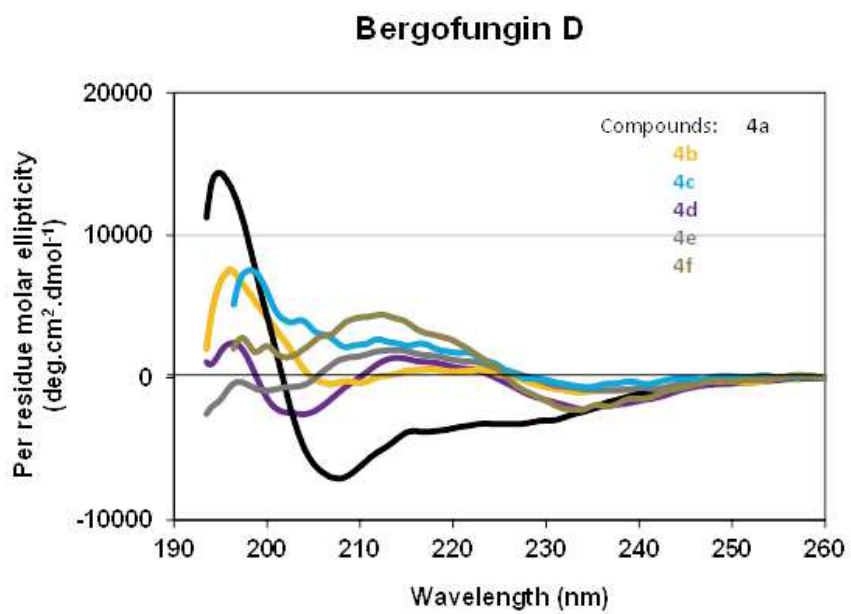
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

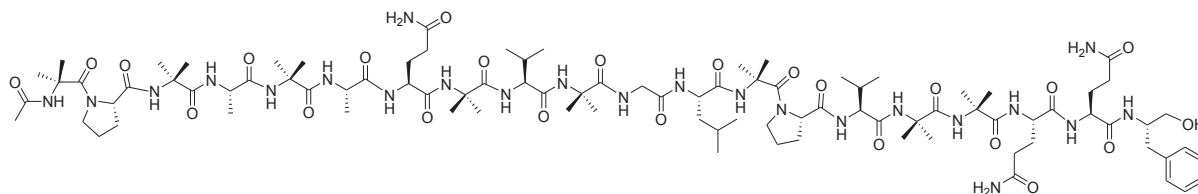


Circular dichroism spectra of BergofunginD and its analogs.



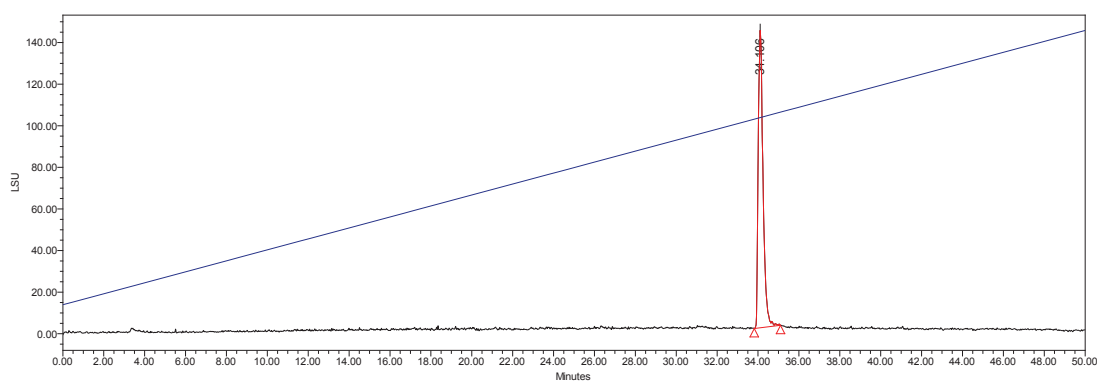
AlamethicinF50/5:

Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phol
(5a)

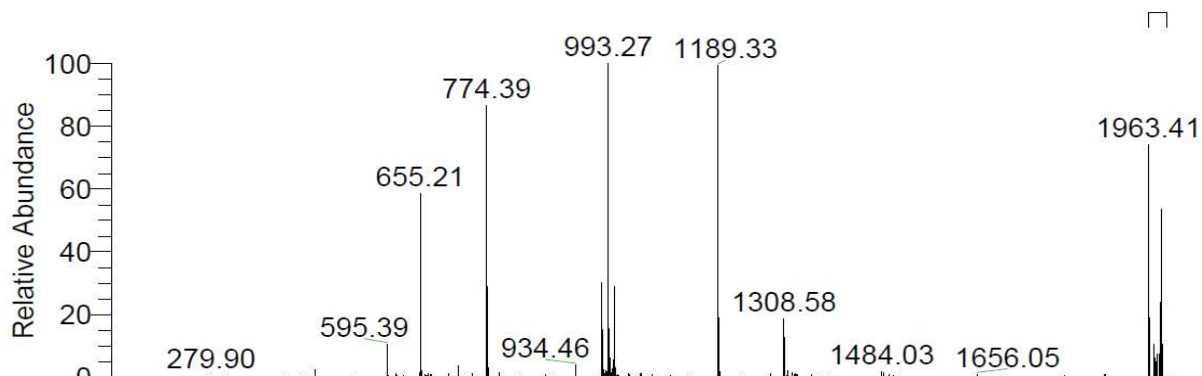


The crude peptide was dissolved in ~5 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 50% to 100% B in A over 35 min with a flow rate of 3 mL/min to yield alamethicin F-50/5 (89 mg, 45% yield, >98% purity). ESI-MS: C₉₂H₁₅₂N₂₃O₂₄ [M+H⁺]; calculated 1963.1, found 1963.4.

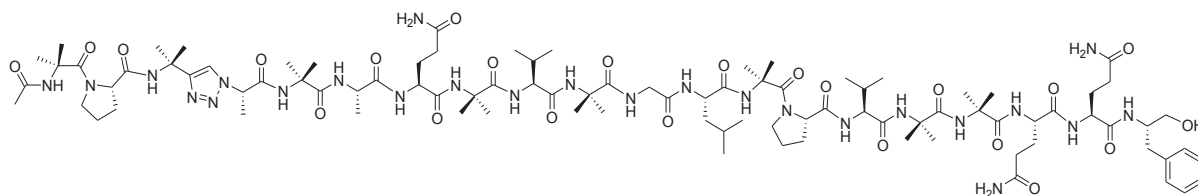
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

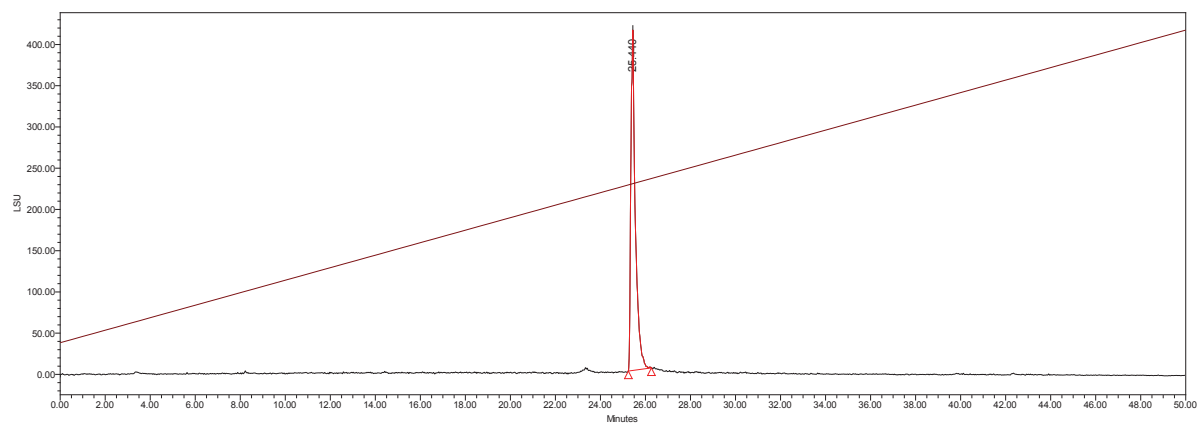


Ac-Aib-Pro-AibΨ[Tz]Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phol (**5b**)

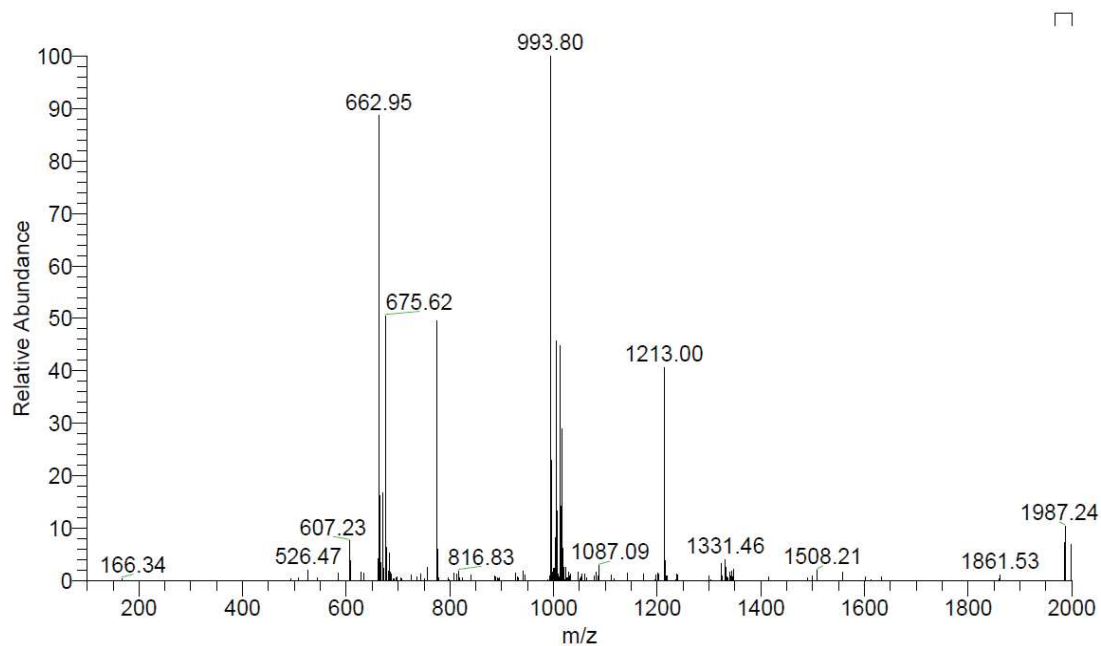


The crude peptide was dissolved in ~5 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 40 min with a flow rate of 3 mL/min to yield compound **5b** (56 mg, 28% yield, >98% purity). ESI-MS: C₉₃H₁₅₂N₂₅O₂₃ [M+H⁺]; calculated 1987.1, found 1987.2.

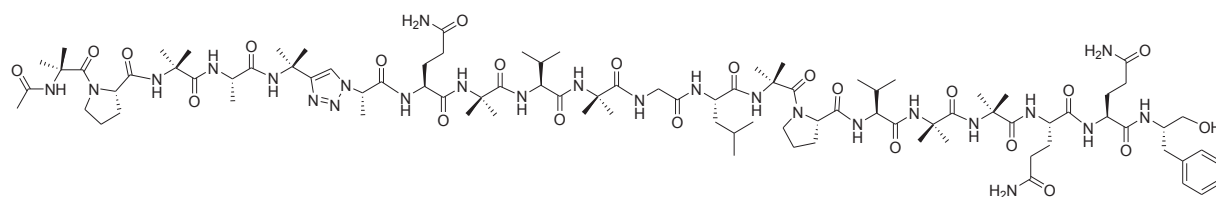
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

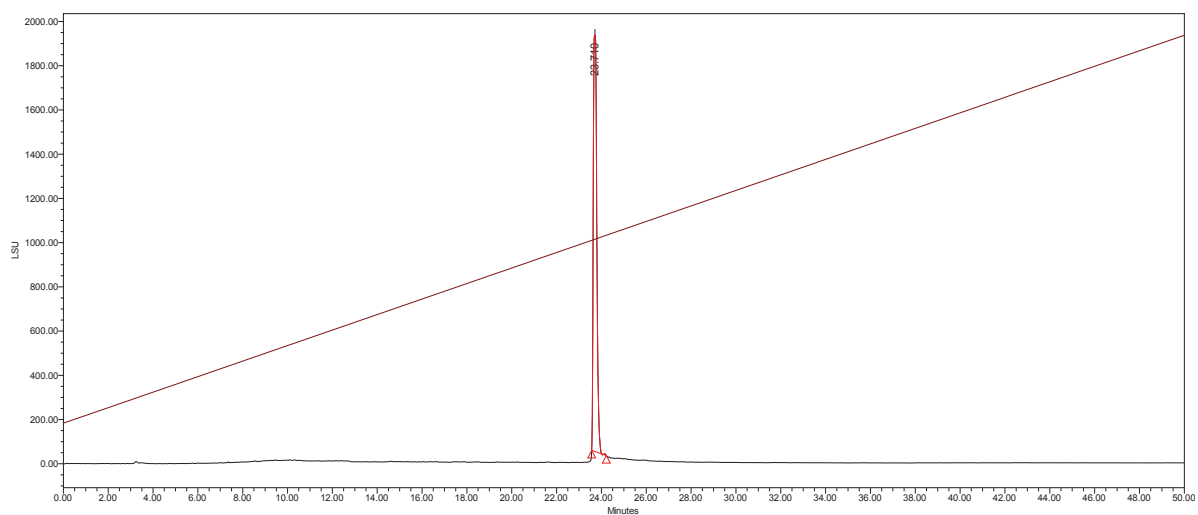


Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-AibΨ[Tz]Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phol (**5c**)

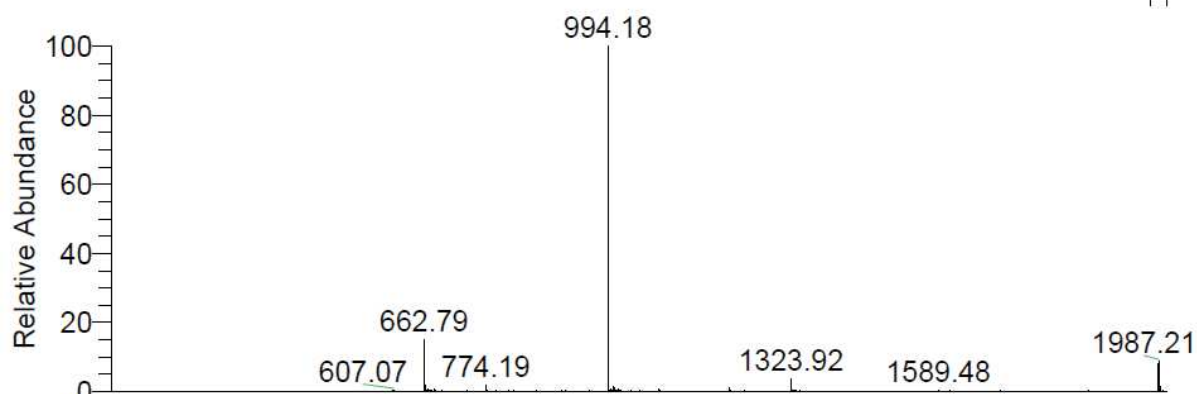


The crude peptide was dissolved in ~5 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 40 min with a flow rate of 3 mL/min to yield compound **5c** (68 mg, 34% yield, >95% purity). ESI-MS: C₉₃H₁₅₂N₂₅O₂₃ [M+H⁺]; calculated 1987.1, found 1987.2.

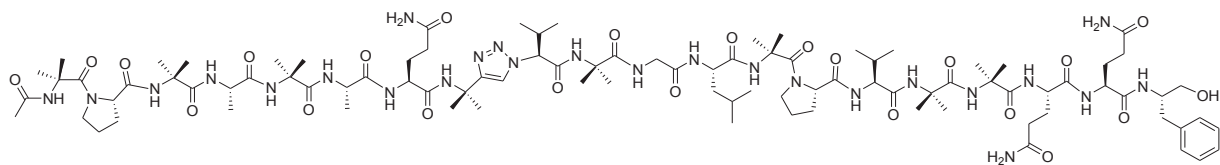
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

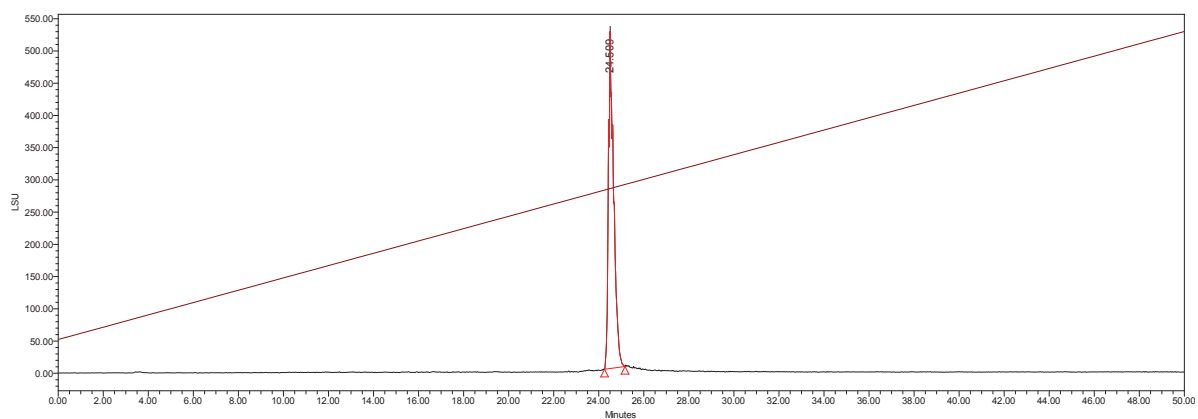


Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib Ψ [Tz]Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phol (**5d**)

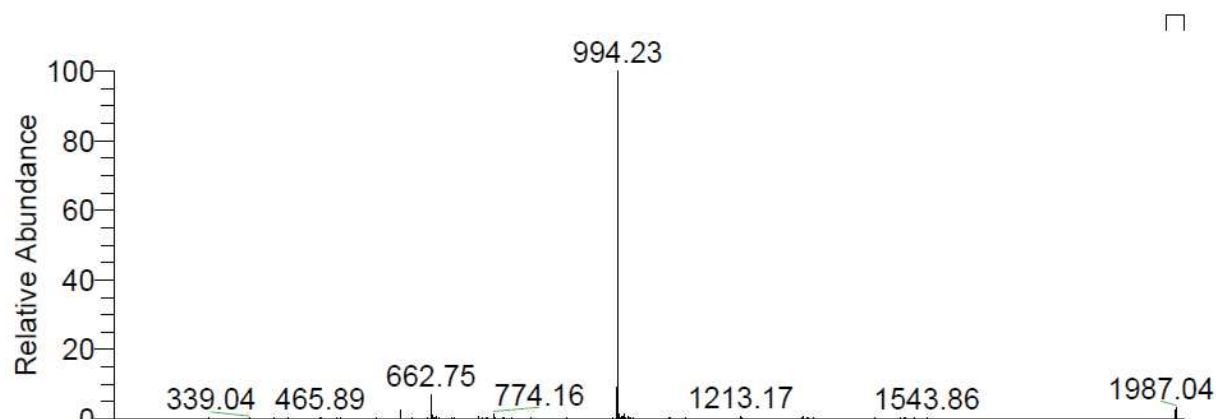


The crude peptide was dissolved in ~5 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 40 min with a flow rate of 3 mL/min to yield compound **5d** (40 mg, 20% yield, >95% purity). ESI-MS: C₉₃H₁₅₂N₂₅O₂₃ [M+H⁺]; calculated 1987.1, found 1987.0.

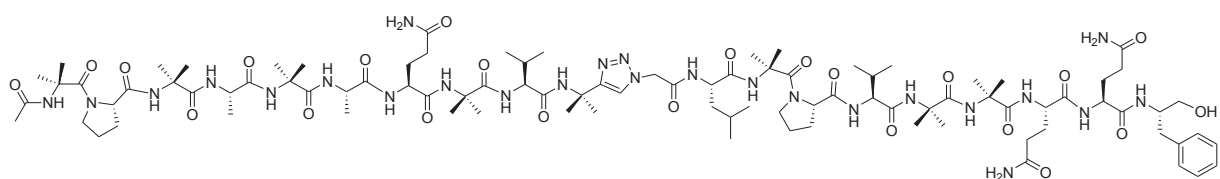
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

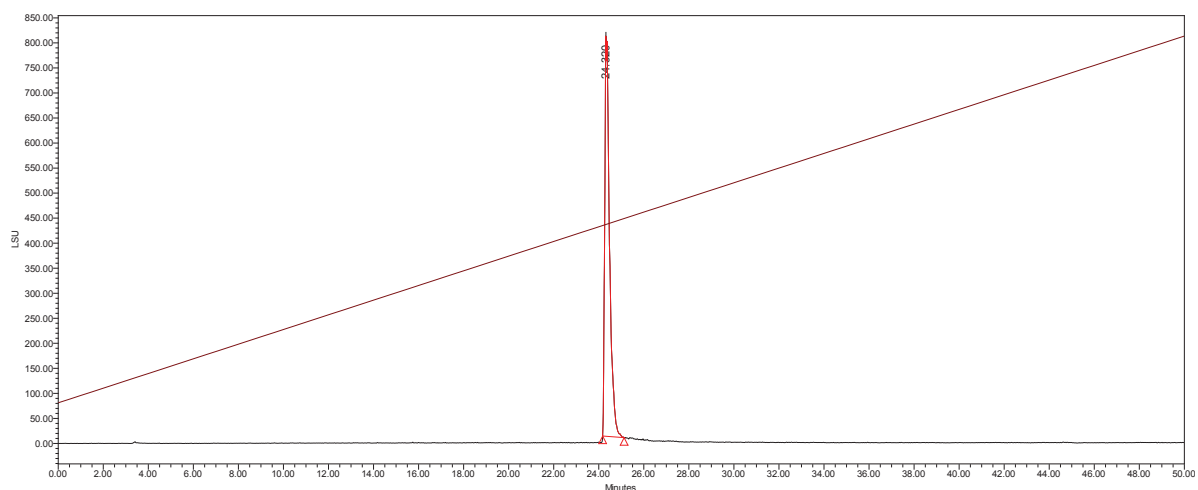


Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-AibΨ[Tz]Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phol (**5e**)

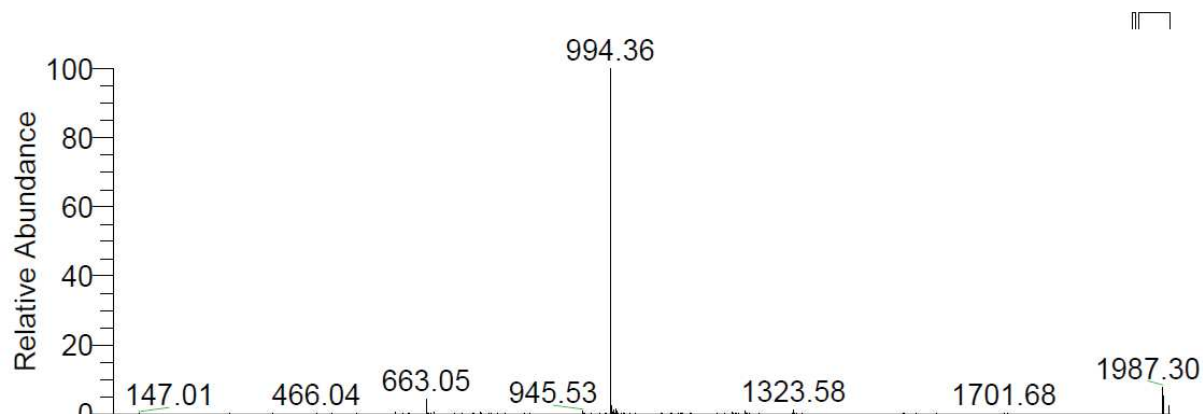


The crude peptide was dissolved in ~5 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 40 min with a flow rate of 3 mL/min to yield compound **5e** (83 mg, 42% yield, >95% purity). ESI-MS: C₉₃H₁₅₂N₂₅O₂₃ [M+H⁺]; calculated 1987.1, found 1987.3.

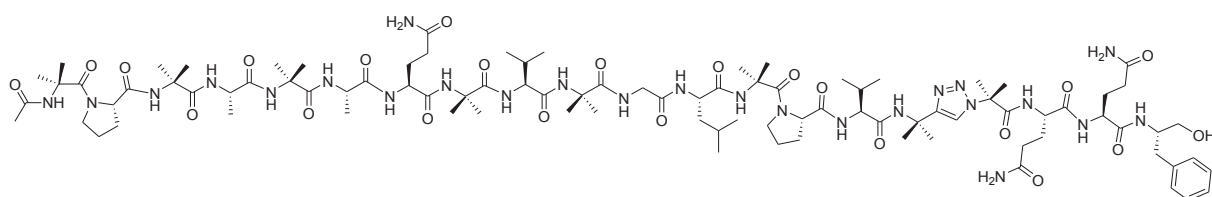
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

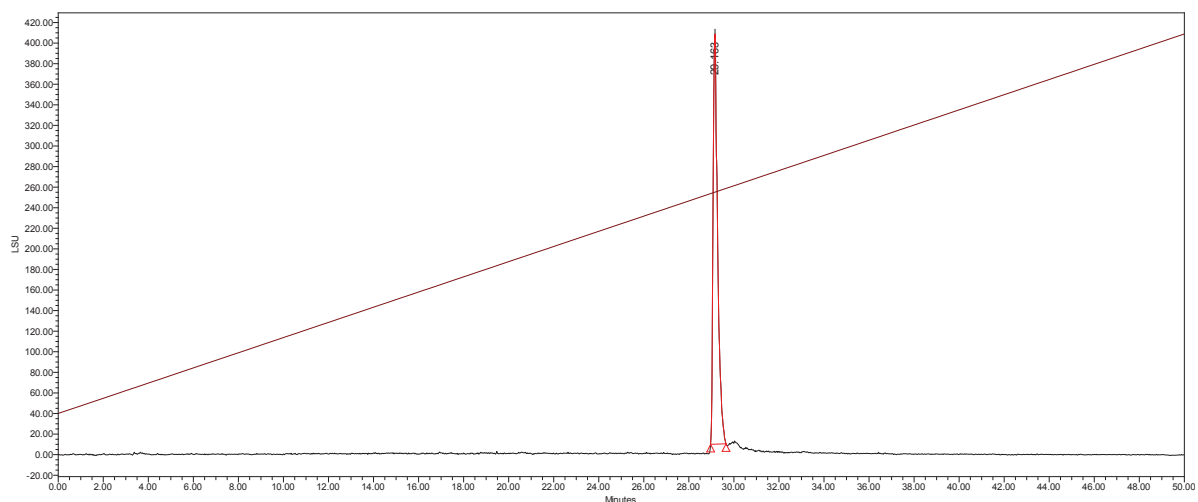


Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-AibΨ[Tz]Aib-Gln-Gln-Phol (**5f**)

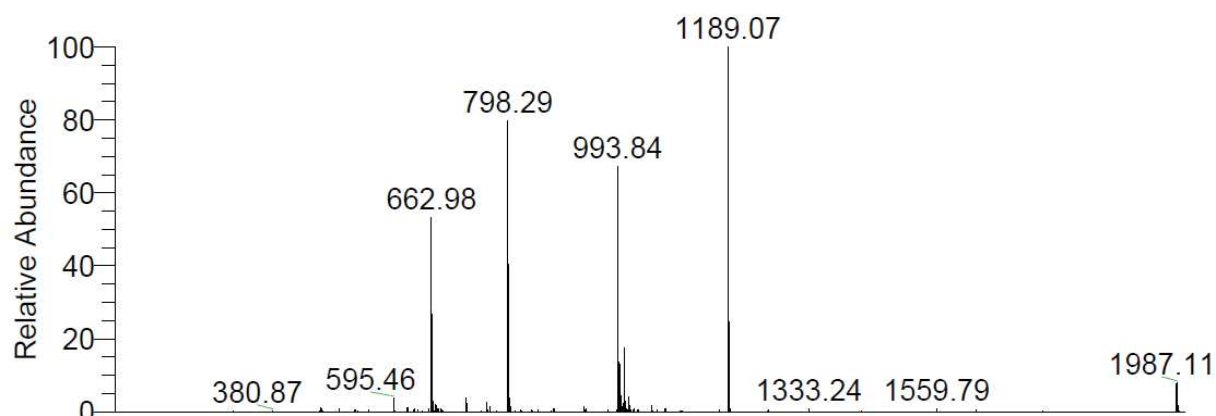


Crude peptide yield (~200 mg, 100% yield). The crude peptide was dissolved in ~5 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 40 min with a flow rate of 3 mL/min to yield compound **5f** (89 mg, 45% yield, >95% purity). ESI-MS: C₉₃H₁₅₂N₂₅O₂₃ [M+H⁺]; calculated 1987.1, found 1987.1.

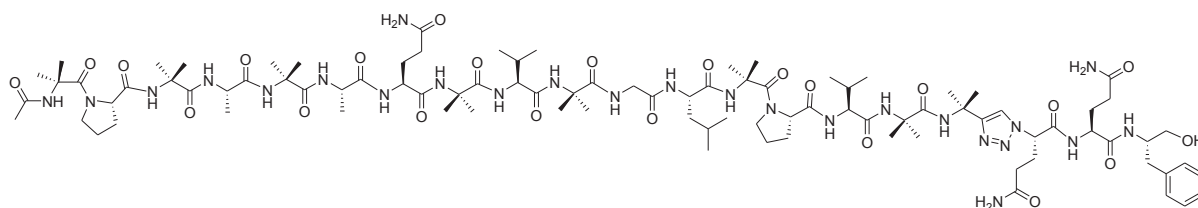
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

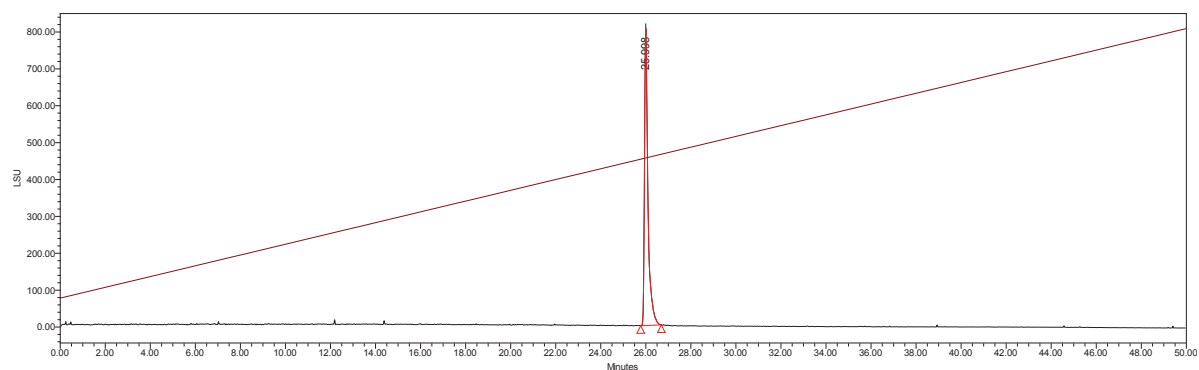


Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-AibΨ[Tz]Gln-Gln-Phol (**5g**)

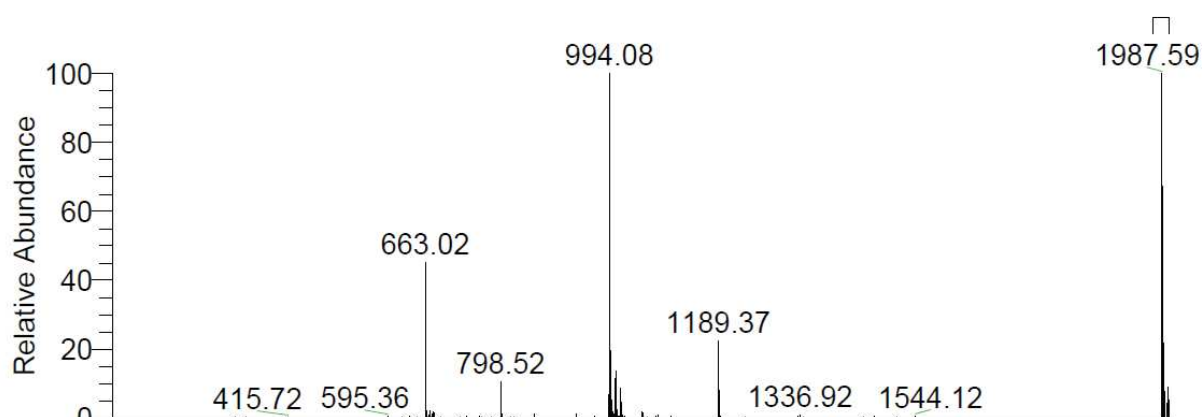


The crude peptide was dissolved in ~5 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 40 min with a flow rate of 3 mL/min to yield compound **5g** (56 mg, 28% yield, >95% purity). ESI-MS: C₉₃H₁₅₂N₂₅O₂₃ [M+H⁺]; calculated 1987.1, found 1987.5.

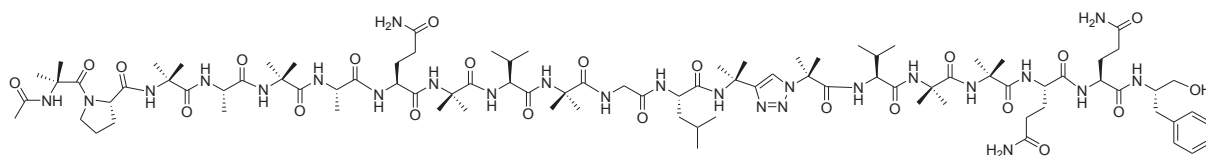
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

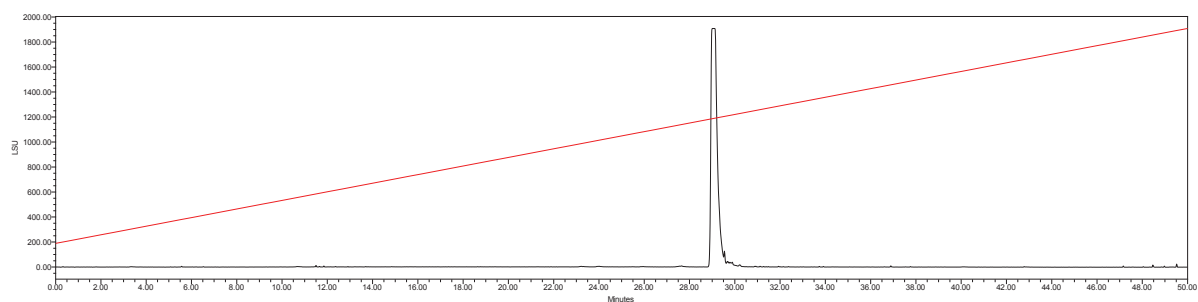


Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-AibΨ[Tz]Aib-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phol (**5h**)

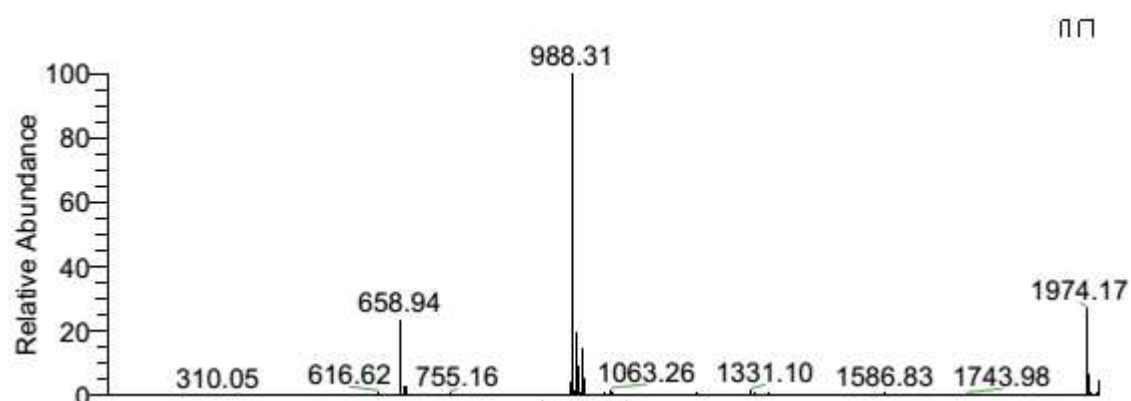


Crude peptide yield (~200 mg, 100% yield). The crude peptide was dissolved in ~5 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 40% to 80% B in A over 40 min with a flow rate of 3 mL/min to yield compound **5h** (95 mg, 48% yield, >95% purity). ESI-MS: C₉₃H₁₅₂N₂₅O₂₃ [M+H+]; calculated 1974.1, found 1974.1.

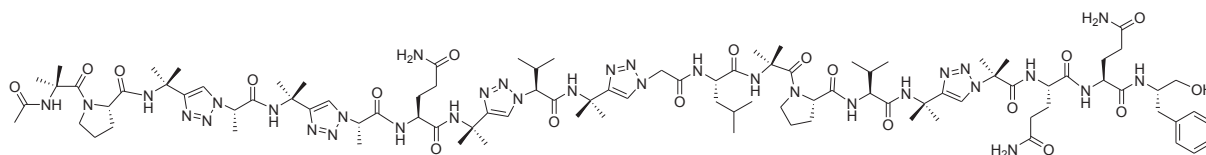
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

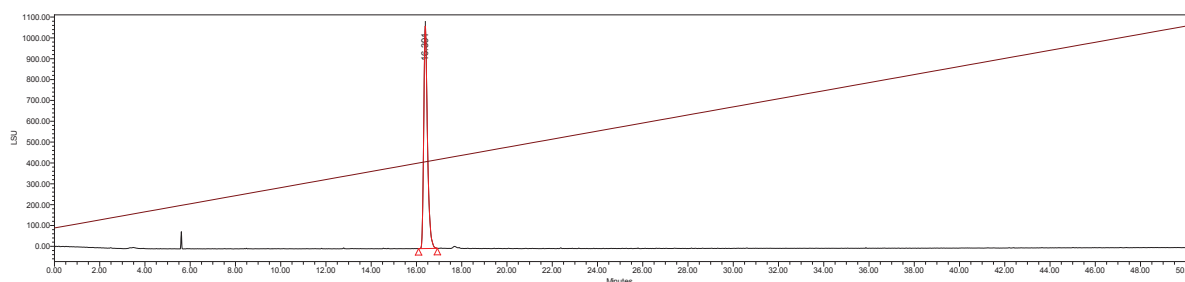


Ac-Aib-Pro-AibΨ[Tz]Ala-AibΨ[Tz]Ala-Gln-AibΨ[Tz]Val-AibΨ[Tz]Gly-Leu-Aib-Pro-Val-AibΨ[Tz]Aib-Gln-Gln-Phol (**5i**)

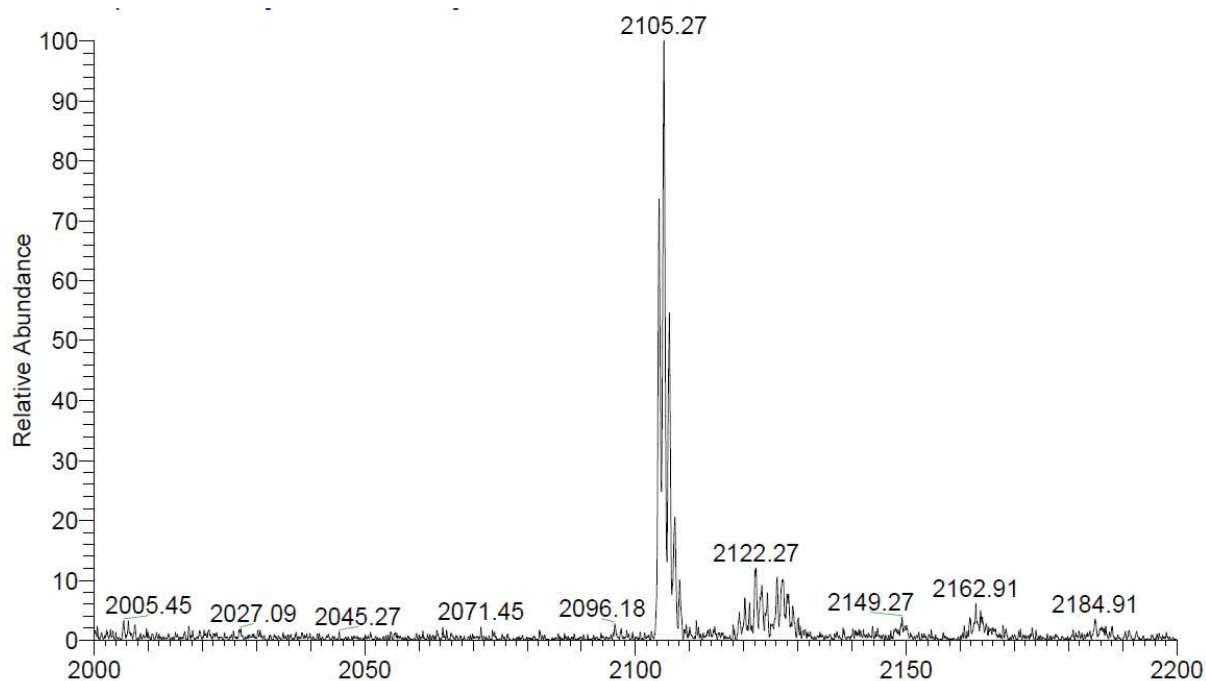


Crude peptide yield (~230 mg, 100% yield). The crude peptide was dissolved in ~5 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 40 min with a flow rate of 3 mL/min to yield compound **5i** (77 mg, 37% yield, >95% purity). ESI-MS: C₉₇H₁₅₁N₃₃NaO₁₉ [M+Na⁺]; calculated 2105.1, found 2105.2.

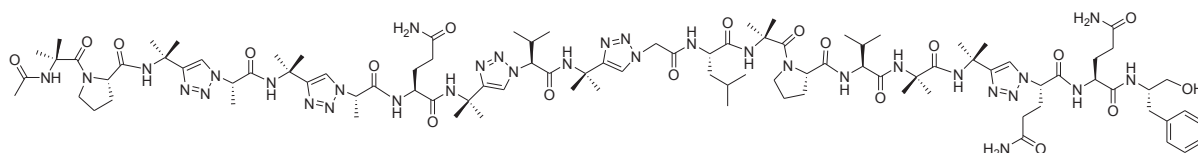
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:

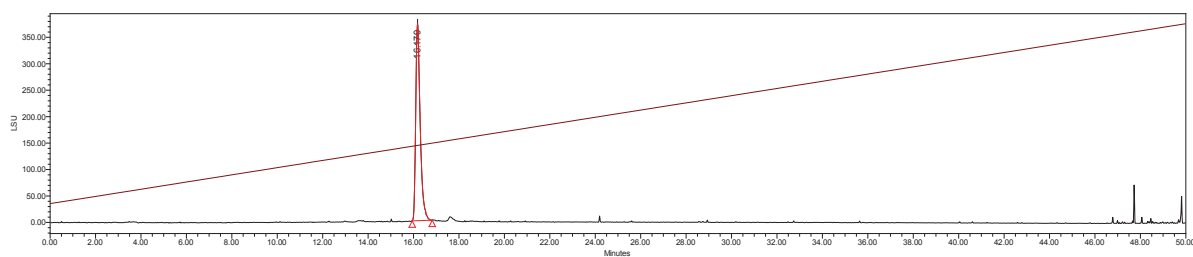


Ac-Aib-Pro-AibΨ[Tz]Ala-AibΨ[Tz]Ala-Gln-AibΨ[Tz]Val-AibΨ[Tz]Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-AibΨ[Tz]Gln-Gln-Phol (**5j**)

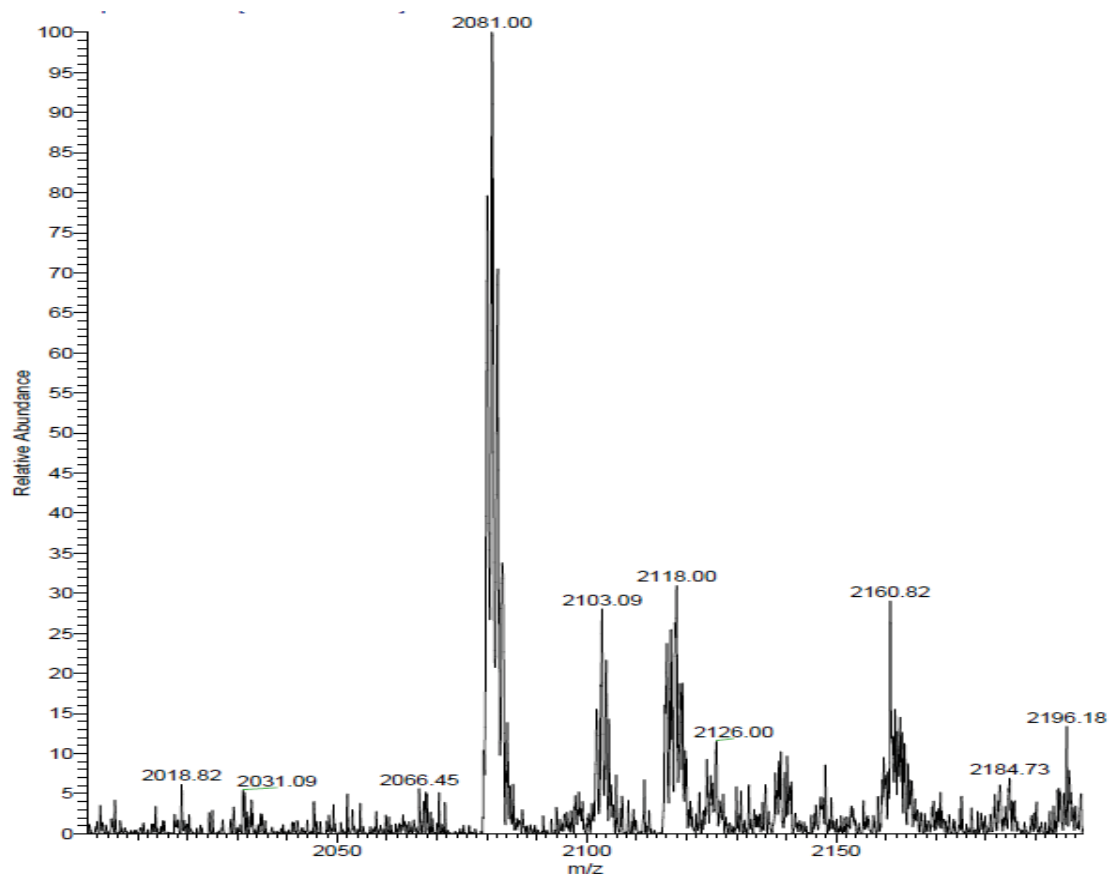


The crude peptide was dissolved in ~5 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 40 min with a flow rate of 3 mL/min to yield compound **5j** (80 mg, 38% yield, >95% purity). ESI-MS: C₉₇H₁₅₁N₃₃NaO₁₉ [M+H⁺]; calculated 2083.2, found 2081.0.

Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS:



E. Partie expérimentale de la partie: Amélioration de l'activité biologique de l'alamethicine.

Abbreviations: DIC, N,N'-diisopropylcarbodiimide; Oxyma, Ethyl cyano(hydroxyimino)acetate, Ethyl cyanoglyoxylate-2-oxime; DCM, Dichloromethane; DMF, N,N'-dimethylformamide; cHex, Cyclohexane; DIEA, Diisopropylethylamine; Ac₂O, Acetic anhydride; TFA, Trifluoroacetic acid; TIS, Triisopropylsilane; FA, formic acid; ACN, Acetonitrile; HPLC, High-performance liquid chromatography; LC-MS, liquid chromatography mass spectrometry; ELSD, evaporative light scattering detector; SPPS, solid phase peptide synthesis.

General Experimental:

LC-MS: LC-MS analyses were carried out using a Thermo Fisher Scientific LC-MS device, Accela HPLC coupled to a LCQ Fleet equipped with an electrospray ionisation source and a 3D ion-trap analyser. The analysis was performed with a Phenomenex Kinetex C-18 column (100 x 300 mm) using gradient mixture of water with 0.1 % AF (buffer A) and ACN with 0.1 % AF (buffer B). Standard conditions were a flow rate of 0.5 ml/min eluting with 10% B to 100% B 30min and 10%B for 7 min. Standard conditions were applied to all LC-MS analysis unless otherwise stated.

Analytical HPLC: The HPLC analysis was conducted on a Waters 2695 HPLC system with a Grace Vydac 218MS 5 μ M C-18 column (250 x 4.6 mm) and an ELS-Detector. The used eluents are buffer A, 0.1% FA in water and buffer B, 0.1% FA in MeOH.

Semi-preparative HPLC purification: Semi-preparative purification of peptides was performed using a Waters 1525 chromatography system fitted with a Waters 2487 tunable absorbance detector with detection at 214 nm and 254 nm. Purification was performed by eluting solvents A (water) with 0.1 % TFA and B (ACN) with 0.1 % TFA on a Grace Vydac 218MS510 C-18 column (250 x 10 mm 5 μ m) at 3 ml/min.

Procedure for the preparation of 2-azido-2-methylpropanoic acid (1): Imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride (36mmol) was added to the α -aminoisobutyric acid (Aib) (30mmol), K₂CO₃ (90mmol) and CuSO₄·5H₂O (0.3mmol) in MeOH (300 ml) and the mixture was stirred at room temperature for 12h. The mixture was concentrated, diluted with Diethylether (100 ml) and extracted with saturated NaHCO₃ (3x 50 ml), the remaining aqueous layer phase was acidified to pH = 1 with a 1 M HCl solution and extracted three times with ethyl acetate (3 x 50 ml). The organic extract were washed with brine (2 x 30 ml) and dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to yield the product as a yellowish oil. The desired α -azido acid was used without any additional purification and the analytical data of azido acid was found to be identical to literature data (2.5g, 65%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.53 (s, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 178.8, 62.9, 24.3.

Procedure for the preparation of compounds (2-4).

2-azido-2-methylpropanoic acid (1) (1.0 mmol) and alkynes (1.0 mmol) were dissolved in degassed acetonitrile (10 mL). To this solution, 2,6-lutidine (2 mmol) and diisopropylethylamine (2 mmol) were added under Ar. Copper(I) iodide (0.1 mmol) was then added to the solution. The reaction was stirred under Ar for 6 h. The mixture was diluted with

→

EtOAc (150 mL). The solution was washed with 9:1 saturated $\text{NH}_4\text{Cl}:\text{NH}_4\text{OH}$ then washed with 1M HCl (3x50mL), brine (2x50mL) and dried over MgSO_4 , and filtered. After solvent evaporation the crude product was purified by column chromatography (50 : 100% cHex /EtOAc)

Ph Ψ [Tz]Aib-OH (**2**): A white solid 1.88g (70%) was obtained starting from 1.5g (11.6 mmol) 2-azido-2-methylpropanoic acid (**1**) and 1.18g (11.6 mmol) of phenylacetylene. R_f 0.5 (cHex /EtOAc/AcOH 4.9:4.9:0.2 (v/v)). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.79 (s, 1H), 7.91 – 7.85 (m, 1H), 7.45 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.88 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.52, 146.31, 131.32, 129.38, 128.35, 125.50, 121.20, 64.55, 25.76. ESI-MS ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2$) $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = \text{found } 232.0, \text{ calculated } 232.1.$

2,4-difluoro-Ph Ψ [Tz]Aib-OH (**3**): A white solid 2.5g (80%) was obtained starting from 1.5g (11.6 mmol) 2-azido-2-methylpropanoic acid (**1**) and 1.6g (11.6 mmol) of 1-Ethynyl-2,4-difluorobenzene. R_f 0.5 (cHex /EtOAc/AcOH 4.9:4.9:0.2 (v/v)). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.52 (s, 1H), 8.13 (td, $J = 8.8, 6.8$ Hz, 1H), 7.46 – 7.39 (m, 1H), 7.23 (td, $J = 8.5, 2.7$ Hz, 1H), 1.91 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 173.38, 139.46, 129.40, 122.92, 115.88, 115.78, 112.94, 112.72, 105.16, 64.90, 25.76. ESI-MS ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$) $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = \text{found } 268.0, \text{ calculated } 268.1.$

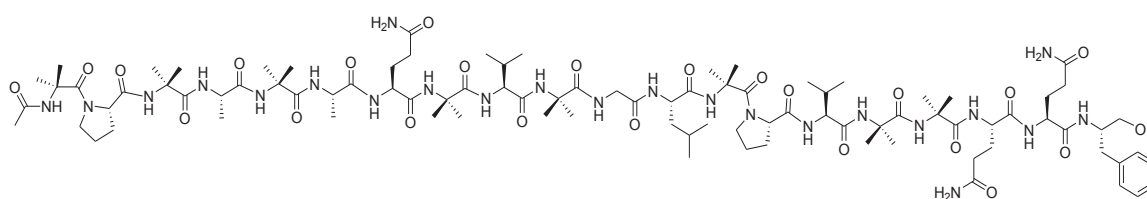
p-CF₃-Ph Ψ [Tz]Aib-OH (**4**): A white solid 2.5g (92%) was obtained starting from 1.5g (11.6 mmol) 2-azido-2-methylpropanoic acid (**1**) and 2.0g (11.6 mmol) of 4-Ethynyl- α, α, α -trifluorotoluene. R_f 0.5 (cHex /EtOAc/AcOH 4.9:4.9:0.2 (v/v)). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.99 (s, 1H), 8.11 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 1.90 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.62, 144.93, 135.29, 128.57, 126.53, 126.19, 123.53, 122.69, 65.02, 25.72. ESI-MS ($\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$) $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = \text{found } 300.0, \text{ calculated } 300.1.$

Experimental procedure for the SPPS of Alamethicin F50/5 and analogs:

Solid-phase peptide synthesis (SPPS) was run on an automated microwave peptide synthesizer (CEM liberty one, Orsay, France) using Fmoc/O-tbutyl chemistry. All Fmoc-protected amino acids, DIC, Oxyma, 2-chlorotriyl chloride resin preloaded with phenylalaninol (loading 0.67 mmol/g or 0.36mmol/g) were purchased from Iris Biotech (Germany). DCM, DMF, cHex, DIEA, Ac_2O , TFA, TIS, FA, ACN and piperidine for peptide synthesis were obtained from Aldrich (USA). SPPS was performed on a CEM Liberty One microwave-assisted peptide synthesizer at a 0.10 mmol scale with DIC/Oxyma as coupling

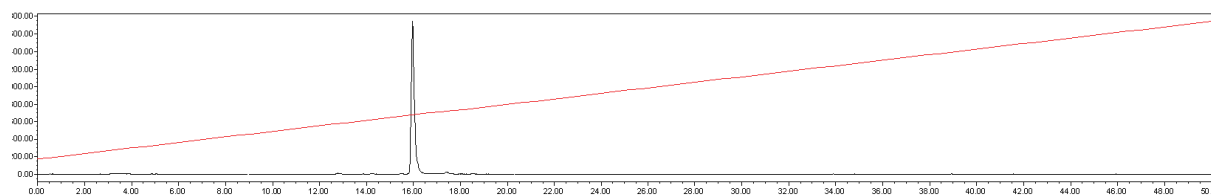
reagent and 20% piperidine in DMF. After transfer to the reaction vessel the resin was swelled using the standard protocol involving 1 h immersion in 10 mL of DMF the elongation was carried automatically using a 5-fold excess of protected amino acids and coupling reagent. The mixture was irradiated in a microwave cavity at 70 °C for 20 min, Fmocdeprotection was performed with 20% piperidine in DMF (7 mL for 30s at 33 °C and 7 mL for 3min at 70 °C) and N-terminal acetylation to reach a final temperature of 70°C for 10 min using 10 ml of Ac₂O/DIEA/DMF 1:2:7 (v/v). After completion of the automatic synthesis the peptidyl-resin was washed twice with 10 mL of DCM. Cleavage and deprotection of the peptide was performed by treating the peptidyl-resin with 10 mL of TFA/DCM/H₂O/TIPS 47:47:4:2 (v/v) for 60 min. After resins' filtration, the filtrate was concentrated and co-evaporated with cyclohexane. The peptide was precipitated with ice-cold diethyl ether, recovered by centrifugation and washed with cold diethyl ether. Water was added and the mixture was lyophilized to yield crude peptide

Alamethicin: AcAibProAibAlaAibAlaGlnAibValAibGlyLeuAibProValAibAibGlnGlnPhol

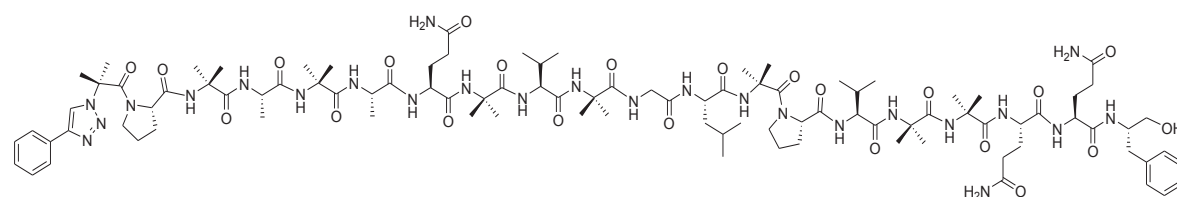


The crude peptide was purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 50% to 100% B in A over 35 min with a flow rate of 3 mL/min to yield alamethicin F-50/5 (89 mg, 45% yield, >98% purity). ESI-MS: C₉₂H₁₅₂N₂₃O₂₄ [M+H⁺]; calculated 1963.1, found 1963.4.

Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



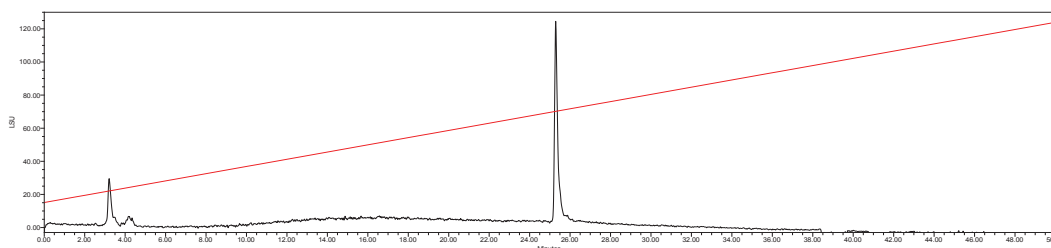
PhΨ[Tz]AibProAibAlaAibAlaGlnAibValAibGlyLeuAibProValAibAibGlnGlnPhol (5)



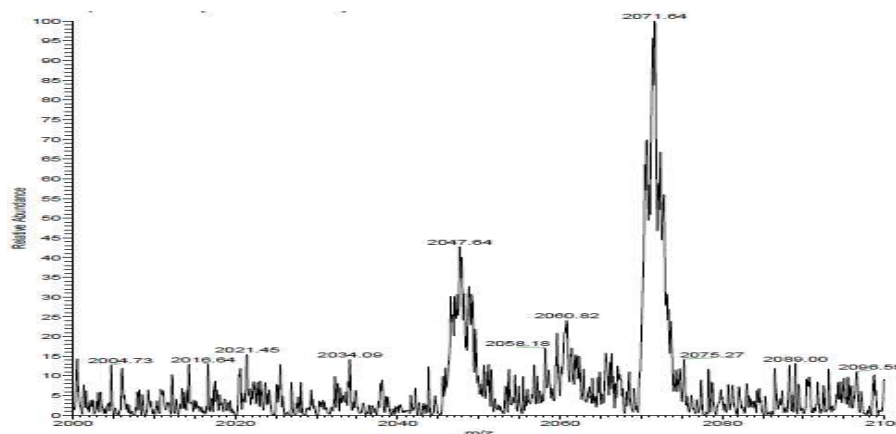
The crude peptide was purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 20%

to 70% B in A over 40 min with a flow rate of 3 mL/min to yield the alamethicin F-50/5 analog (89 mg, 43% yield, >98% purity). ESI-MS: C₉₈H₁₅₃N₂₅NaO₂₃ [M+Na⁺]; calculated 2071.1, found 2071.6.

Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min

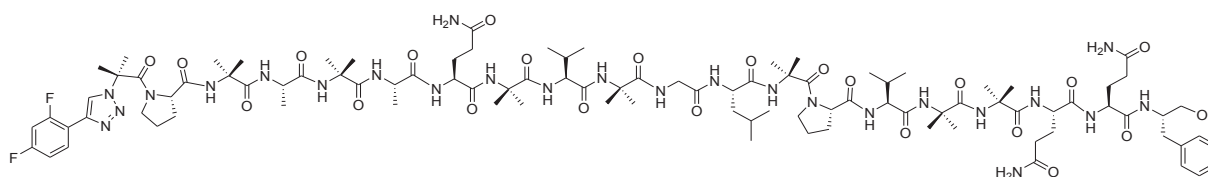


ESI-MS



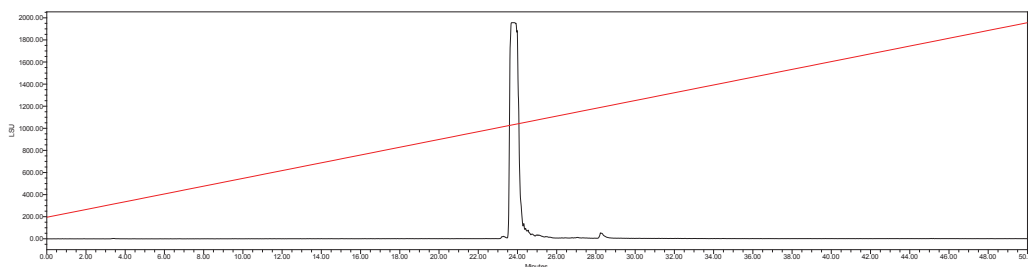
2,4-F,F-PhΨ[Tz]AibProAibAlaAibAlaGlnAibValAibGlyLeuAibProValAibAibGlnGlnPhol

(6)

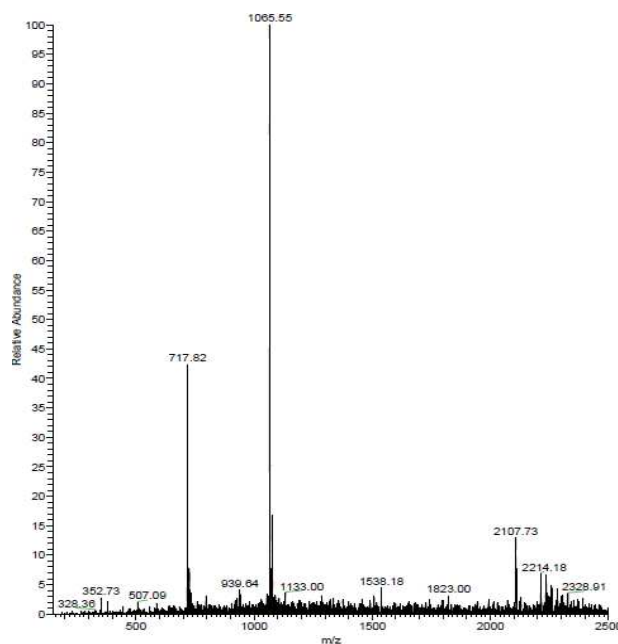


The crude peptide was purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 20% to 70% B in A over 40 min with a flow rate of 3 mL/min to yield the alamethicin F-50/5 analog (85 mg, 42% yield, >98% purity). ESI-MS: C₉₈H₁₅₁F₂N₂₅NaO₂₃ [M+Na⁺]; calculated 2107.1, found 2107.7.

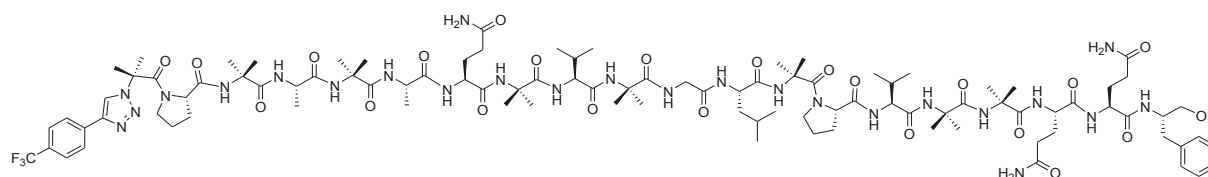
Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS

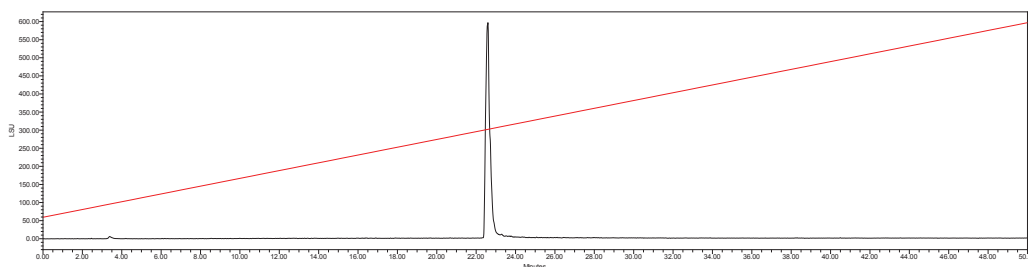


p-CF₃-PhΨ[Tz]AibProAibAlaAibAlaGlnAibValAibGlyLeuAibProValAibAibGlnGlnPhol (7)

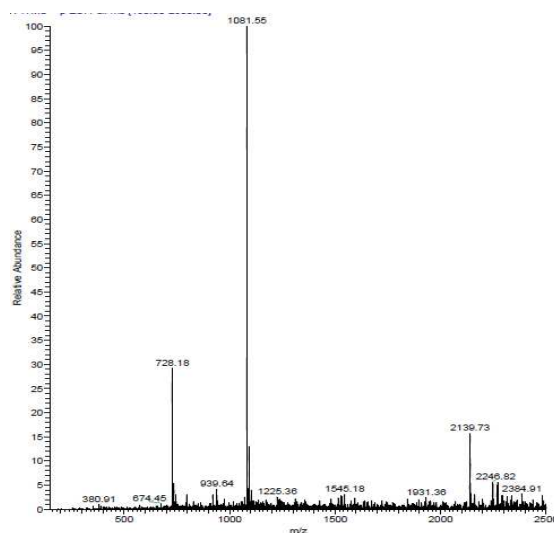


The crude peptide was purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 40 min with a flow rate of 3 mL/min to yield the alamethicin F-50/5 analog (86 mg, 40% yield, >98% purity). ESI-MS: C₉₉H₁₅₂F₃N₂₅NaO₂₃ [M+Na⁺]; calculated 2139.1, found 2139.7.

Analytical HPLC-ELSD gradient: 0.9 ml/min flow rate from 10% B to 100% B over 50 min



ESI-MS



NMR and molecular modeling studies

NMR experiments. The NMR samples contained 5 mM of **alamethicin F50/5, 6-7** dissolved in CD₃OH. All spectra were recorded on a Bruker AVANCE III 600 MHz spectrometer equipped with a 5 mm quadruple-resonance probe (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ³¹P). Homonuclear 2-D spectra DQF-COSY, TOCSY (DIPSII) and ROESY were typically recorded in the phase-sensitive mode using the States-TPPI method as data matrices of 256-512 real (*t*₁) × 2048 (*t*₂) complex data points; 8-64 scans per *t*₁ increment with 1.0-1.5 s recovery delay and spectral width of 6009 Hz in both dimensions were used. The mixing times were 60 ms for TOCSY and 350 ms for the ROESY experiments. In addition, 2D heteronuclear spectra ¹⁵N, ¹³C-HSQC and ¹³C-HMBC were acquired to assign the ¹⁵N and ¹³C chemical shifts (8-56 scans, 256-512 real (*t*₁) × 2048 (*t*₂) complex data points). Spectra were processed with Topspin (Bruker Biospin) and visualized with Topspin or NMRView on a Linux station. The matrices

were zero-filled to 1024 (t_1) x 2048 (t_2) points after apodization by shifted sine-square multiplication and linear prediction in the F1 domain. Chemical shifts were referenced to the tetramethylsilane (TMS).

Structure calculations. ^1H , ^{15}N and ^{13}C chemical shifts were assigned according to classical procedures. NOE cross-peaks were integrated and assigned within the NMRView software. The volumes of NOE peaks between methylene pair protons were used as reference of 1.8 Å. The lower bound for all restraints was fixed at 1.8 Å and upper bounds at 2.7, 3.3 and 5.0 Å, for strong, medium and weak correlations, respectively. Pseudo-atoms corrections of the upper bounds were applied for unresolved aromatic, methylene and methyl protons signals as described previously. Structure calculations were performed with AMBER 10 in two stages: cooking, simulated annealing in vacuum. The cooking stage was performed at 1000 K to generate 100 initial random structures. SA calculations were carried during 20 ps (20000 steps, 1 fs long) as described elsewhere. First, the temperature was risen quickly and was maintained at 1000 K for the first 5000 steps, then the system was cooled gradually from 1000 K to 100 K from step 5001 to 18000 and finally the temperature was brought to 0 K during the 2000 remaining steps. For the 3000 first steps, the force constant of the distance restraints was increased gradually from 2.0 kcal.mol⁻¹.Å to 20 kcal.mol⁻¹.Å. For the rest of the simulation (step 3001 to 20000), the force constant is kept at 20 kcal.mol⁻¹.Å. The 20 lowest energy structures with no violations > 0.3 Å were considered as representative of the compound structure. The representation and quantitative analysis were carried out using MOLMOL and PyMOL (Delano Scientific).

Tables Sx-x: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts the alamethicin, 6 and 7 compounds

Table Sx: ^1H chemical shifts for the alamethicin in CD₃OH at 298K

Residues	<i>HN</i>	<i>Hα</i>	<i>Hβ</i>	<i>Hγ</i>	<i>Others</i>
Ac	-	-	-	-	CH ₃ 2.05
Aib 1	8.59	-	1.46, 1.54		
Pro 2	-	4.25	1.78, 2.34	1.96, 2.08	H δ 3.49, 3.94
Aib 3	7.62	-	1.53		
Ala 4	7.56	4.09	1.49		
Aib 5	7.92	1.55			
Ala 6	7.89	4.02	1.53		
Gln 7	7.99	3.92	2.14, 2.28	2.34, 2.53	NH ₂ 6.74, 7.41
Aib 8	8.06	1.51, 1.58			
Val 9	7.48	3.59	2.23	1.00, 1.12	

Aib 10	8.20	1.55			
Gly 11	8.32	3.67, 3.94			
Leu 12	8.08	4.46	1.58, 1.94	1.92	H δ 0.92
Aib 13	8.38	1.54, 1.61			
Pro 14	-	4.38	1.81, 2.32	1.99, 2.07	H δ 3.73, 3.87
Val 15	7.63	3.73	2.33	0.98, 1.06	
Aib 16	7.59	-	1.54		
Aib 17	7.80	-	1.54		
Gln 18	7.78	4.02	2.25	2.42, 2.61	NH $_2$ 6.75, 7.41
Gln 19	7.86	4.16	2.02	2.19, 2.33	NH $_2$ 6.59, 7.31
Pho 20	7.30	4.15	2.73, 2.93		CH $_2$ 3.61, OH 7.42

Table Sx: ^{13}C chemical shifts for the alamethicin in CD_3OH at 298K

Residues	<i>N</i>	<i>Cα</i>	<i>Cβ</i>	<i>Cγ</i>	<i>Others</i>
Ac					CH $_3$ 21.0; CO 171.1
Aib 1	137.1	56.0	22.5, 25.2		CO 174.2
Pro 2	-	64.4	28.4	25.7	C δ 48.6; CO 174.2
Aib 3	124.4	56.0	21.8, 25.8		CO 177.2
Ala 4	117.2	52.7	15.7		CO 175.9
Aib 5	127.6	55.9	21.6, 25.6		CO 176.6
Ala 6	115.3	52.5	15.7		CO 176.7
Gln 7	115.3?	56.8	25.9	31.2	NH $_2$ 106.1; CO(l) 176.0; CO 174.5
Aib 8	127.6	56.2	21.7, 25.9		CO 176.9
Val 9	113.7	64.4	29.2	18.2, 19.5	CO 174.0
Aib 10	129.7	56.2	21.7, 25.5		CO 177.7
Gly 11	100.1	43.7			CO 171.7
Leu 12	117.7	52.7	40.2	24.3	C δ 19.9, 22.0
Aib 13	132.9	56.7	21.8, 25.2		CO 174.5

Pro 14	-	63.3	28.7	25.7	Cδ 49.2; CO 175.1
Val 15	115.3	62.9	29.1	18.0, 18.8	CO 174.1
Aib 16	129.1	56.1	21.8, 25.9		CO 176.4
Aib 17	124.1	56.2	21,8, 26.0		CO 177.5
Gln 18	113.2	55.6	26.7	31.9	NH ₂ 106.1; CO 174.4
Gln 19	115.2	54.4	26.7	31.6	NH ₂ 105.8 ; CO 172.7
Pho 20	119.2	53.1	36.7		CH ₂ 63.4

Table Sx: ¹H chemical shifts for the **6** compound in CD₃OH at 298K

Residues	<i>HN</i>	<i>Hα</i>	<i>Hβ</i>	<i>Hγ</i>	<i>Others</i>
SD12	-	-	-	-	CH _{trazole} 8.85
Aib 1	-	-	1.98, 2.08		
Pro 2	-	4.45	1.88, 2.27	1.88	Hδ 2.62, 3.26
Aib 3	7.98	-	1.58		
Ala 4	7.61	4.12	1.49		
Aib 5	7.76	-	1.54		
Ala 6	7.76	4.05	1.52		
Gln 7	7.98	3.95	2.25, 2.14	2.34, 2.49	NH ₂ 6.75, 7.43
Aib 8	7.96	-	1.58		
Val 9	7.43	3.62	2.25	1.01, 1.13	
Aib 10	8.15	-	1.56		
Gly 11	8.31	3.66, 3.94			
Leu 12	8.08	4.46	1.59, 1.94	1.60	Hδ 0.93
Aib 13	8.35	-	1.54, 1.61		

Pro 14	-	4.38	1.81, 2.32	1.98, 2.07	H δ 3.73, 3.88
Val 15	7.64	3.74	2.33	0.98, 1.07	
Aib 16	7.60	-	1.51		
Aib 17	7.80	-	1.54		
Gln 18	7.78	4.02	2.25	2.43, 2.65	NH $_2$ 6.75, 7.43
Gln 19	7.88	4.18	2.02	2.19, 2.32	NH $_2$ 6.60, 7.32
Pho 20	7.31	4.15	2.73, 2.93		CH $_2$ 3.61, OH ?

Table Sx: ^{13}C chemical shifts for the SD12 in CD $_3$ OH at 298K

Residues	N	Cα	Cβ	Cγ	Others
SD12	-	-	-	-	C _{trazole} 121.3
Aib 1	-		22.9, 27.6		CO 173.4
Pro 2	-	64.0	27.8	25.3	C δ 47.2; CO 173.4
Aib 3	127.4	52.4	22.1, 25.9		CO 176.3
Ala 4	116.5	52.5	15.7		CO 175.5
Aib 5	127.5	56.0	21.7, 25.7		CO 176.5
Ala 6	115.2	52.4	15.7		CO 173.4
Gln 7	116.6	56.6	25.9	31.3	NH $_2$ 106.0; CO(l) 176.0; CO 174.3
Aib 8	127.4	56.1	21.7, 25.9		CO 176.8
Val 9	113.6	64.2	29.3	18.2; 19.4	CO 173.9
Aib 10	129.7	56.2	21.7, 25.5		CO 177.7
Gly 11	100.0	43.7			CO 171.4
Leu 12	117.9	52.6	40.3	24.3	C δ 19.9, 22.2; CO 173.7
Aib 13	132.8	56.7	21.8, 25.2		CO 174.5

Pro 14	-	63.3	28.7	25.7	Cδ 49.2; CO 175.2
Val 15	115.2	62.9	29.2	18.0; 18.8	CO 174.1
Aib 16	129.1	56.1	21.8, 25.9		CO 176.3
Aib 17	124.3	56.3	21,8, 26.0		CO 177.4
Gln 18	113.3	55.6	26.7	31.9	NH ₂ 106.0; CO 174.2
Gln 19	115.3	54.3	26.8	31.6	NH ₂ 106.0; CO 172.7
Pho 20	119.4	53.2	36.8		CH ₂ 63.5

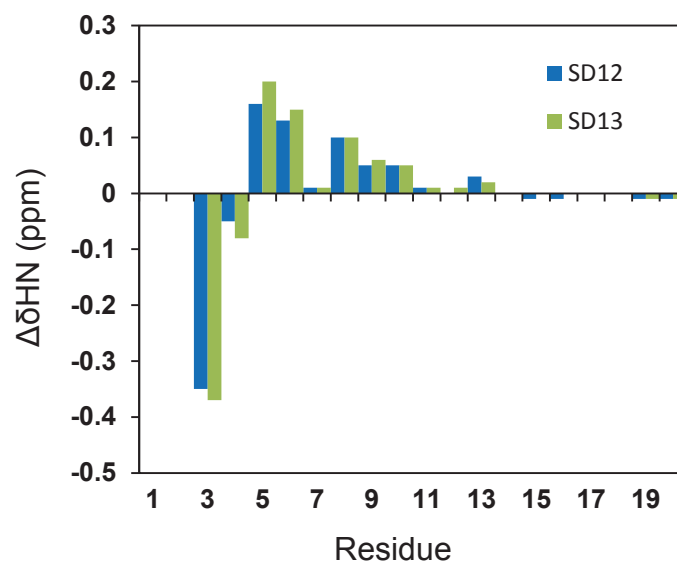
Table Sx: ¹H chemical shifts for the 7 compound in CD₃OH at 298K

Residues	<i>HN</i>	<i>Hα</i>	<i>Hβ</i>	<i>Hγ</i>	<i>Others</i>
SD13	-	-	-	-	CH _{frazole} 8.51
Aib 1	-	-	1.91, 2.08		
Pro 2	-	4.44	2.27	1.88	H δ 2.58, 3.26
Aib 3	7.99	-	1.60		
Ala 4	7.64	1.48			
Aib 5	7.72	-	1.53		
Ala 6	7.74	4.06	1.53		
Gln 7	7.98	2.14, 2.26	2.35, 2.49		NH ₂ 6.75, 7.43
Aib 8	7.96	-	1.58		
Val 9	7.42	3.61	2.24	1.01, 1.13	
Aib 10	8.15	-	1.55		
Gly 11	8.31	3.66, 3.94			
Leu 12	8.07	4.45	1.59, 1.94	1.59	H δ 0.94
Aib 13	8.36	1.54, 1.62			
Pro 14	-	4.39	1.81, 2.32	1.99, 2.06	H δ 3.73, 3.87
Val 15	7.63	3.73	2.34	0.98, 1.07	
Aib 16	7.59	-	1.54		
Aib 17	7.80	-	1.54		
Gln 18	7.78	4.02	2.25	2.43, 2.62	NH ₂ 6.75, 7.43
Gln 19	7.87	4.17	2.02	2.20, 2.33	NH ₂ 6.60, 7.32
Pho 20	7.31	4.15	2.73, 2.94		CH ₂ 3.61, OH ?

Table Sx: ^{13}C chemical shifts for the 7 in CD_3OH at 298K

Residues	<i>N</i>	<i>Cα</i>	<i>Cβ</i>	<i>Cγ</i>	<i>Others</i>
SD13	-	-	-	-	
Aib 1	-	-	22.8; 27.6		CO
Pro 2	-	63.9	27.7	25.4	C δ 47.2; CO 173.2
Aib 3	129.9	57.7	22.1, 25.9		CO 176.2
Ala 4	116.4	52.6	15.7		CO 176.5
Aib 5	127.4	56.0	21.7, 25.7		CO 176.5
Ala 6	115.2	52.4	15.7		CO 173.4
Gln 7	116.5	56.7	25.9	31.3	NH ₂ 106.0; CO(l) 176.0; CO 174.3
Aib 8	127.2	56.1	21.7, 25.9		CO 176.8
Val 9	113.5	64.2	29.2	18.3; 19.4	CO 173.9
Aib 10	129.8	56.2	21.7, 25.5		CO 177.7
Gly 11	99.8	43.7			CO 171.4
Leu 12	117.8	52.6	40.2	24.3	C δ 19.9, 22.0 CO 173.7
Aib 13	132.9	56.7	21.8, 25.2		CO 174.5
Pro 14	-	63.3	28.7	25.7	C δ 49.2; CO 175.2
Val 15	115.2	63.0	29.2	18.1; 18.9	CO 174.1
Aib 16	129.2	56.1	21.8, 25.9		CO 176.3
Aib 17	124.3	56.3	21.8, 26.0		CO 177.4
Gln 18	113.2	55.6	26.7	31.9	NH ₂ 106.0; CO 174.2
Gln 19	115.2	54.3	26.7	31.6	NH ₂ 106.0; CO 172.7
Pho 20	119.2	53.1	36.7		CH ₂ 63.5

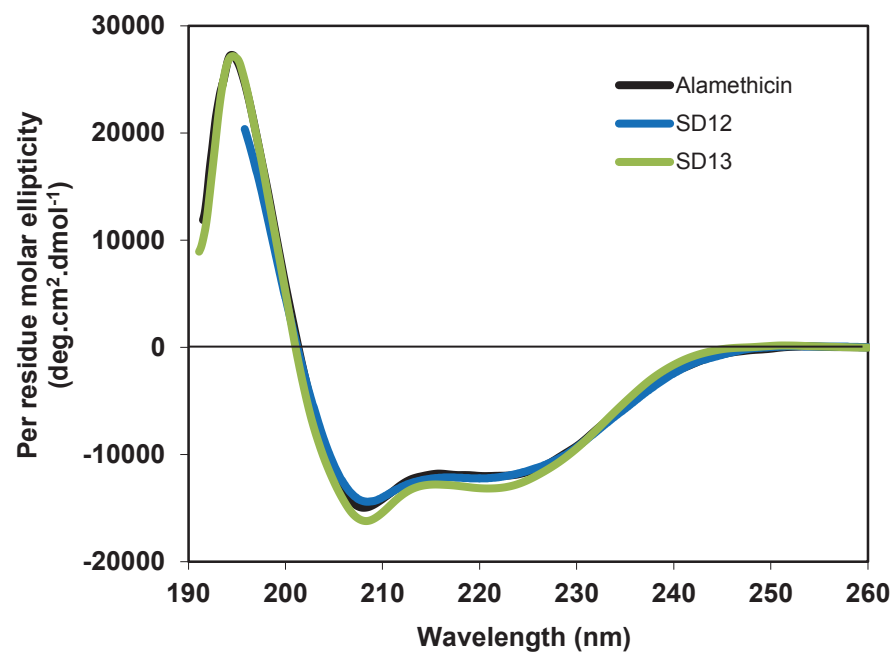
Chemical shifts mapping of the amide protons resonances along the alamethicin sequences upon addition of the N-terminal fluorinated moieties, for SD12 (**6**) and SD13 (**7**)



Coupling constants $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ of **alamethicin**, **6** and **7** in Hz (o: overlaps).

Residues	<i>Alamethicin</i>	6	7
Ala 4	5.6	5.0	5.3
Ala 6	4.4	4.2	3.8
Gln 7	4.9	5.3	o
Val 9	5.4	o	5.4
Leu 12	7.7	7.8	7.7
Val 15	7.9	8.0	7.6
Gln 18	5.5	5.7	5.4
Gln 19	7.2	7.3	7.2
Pho 20	9.1	9.0	9.0

CD spectra of the alamethicin and fluorinated analogues **SD12 (6)** and **SD13 (7)**.



F. Partie expérimentale de la partie : Synthèse d'analogues simplifiés de la tamandarine B

Abbreviations: DIC, N,N'-diisopropylcarbodiimide; Oxyma, Ethyl cyano(hydroxyimino)acetate, Ethyl cyanoglyoxylate-2-oxime; DCM, Dichloromethane; DMF, N,N'-dimethylformamide; cHex, Cyclohexane; Pd[P(Ph₃)]₄, Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0); TFA, Trifluoroacetic acid; TIS, Triisopropylsilane; FA, formic acid; ACN, Acetonitrile; HPLC, High-performance liquid chromatography; LC-MS, liquid chromatography mass spectrometry; SPPS, solid phase peptide synthesis.

General Experimental:

Experimental procedure for the SPPS of macrocycles:

Solid-phase peptide synthesis (SPPS) was run on an automated microwave peptide synthesizer (CEM liberty one, Orsay, France) using Fmoc/O-tbutyl chemistry. All Fmoc-protected amino acids, DIC, Oxyma, Rink amide MBHA LL resin at a 0.36 mmol/g substitution level were purchased from Iris Biotech (Germany). DCM, DMF, cHex, DIEA, Ac₂O, TFA, TIS, FA, ACN, Pd[P(Ph₃)]₄ and piperidine for peptide synthesis were obtained from Aldrich (USA). SPPS was performed on a CEM Liberty One microwave-assisted peptide synthesizer at a 0.10 mmol scale with DIC/Oxyma as coupling reagent and 20% piperidine in DMF. After transfer to the reaction vessel the resin was swelled using the standard protocol involving 1 h immersion in 10 mL of DMF the elongation was carried automatically using a 5-fold excess of protected amino acids and coupling reagent. The mixture was irradiated in a microwave cavity at 70 °C for 10 min. The Fmoc déprotection was performed with 20% piperidine in DMF (7 mL for 30s at 33 °C and 7 mL for 3min at 70 °C). After full sequence assembly, the linear protected peptide linked to the resin was transferred into a batch reactor and the allyl protecting group was cleaved using Pd[P(Ph₃)]₄ (m= 0.35 g, 0.3 mmol, 3 eq) with a solution of CHCl₃/AcOH,NMM : 3.7/0.2/0.1 for 4 h under a nitrogen atmosphere at room temperature. Macrocyclization of linear precursor was performed with 5-fold DIC/Oxyma, 70°C 3*10 min, and a return for 120 s at room temperature between each cycle. A Kaiser test was realized in order to check reaction completion. After completion of the cyclisation the peptidyl-resin was washed twice with 10 mL of DCM. The peptide was removed from the Rink amide MBHA resin with simultaneous side chains deprotection by treatment with a mixture of TFA/TIS/H₂O (9.5:2.5:2.5) for 3 h. After resins' filtration, the filtrate was concentrated and co-evaporated with cyclohexane. The peptide was precipitated with ice-cold

diethyl ether, recovered by centrifugation and washed with cold diethyl ether. Water was added and the mixture was lyophilized to yield crude peptide

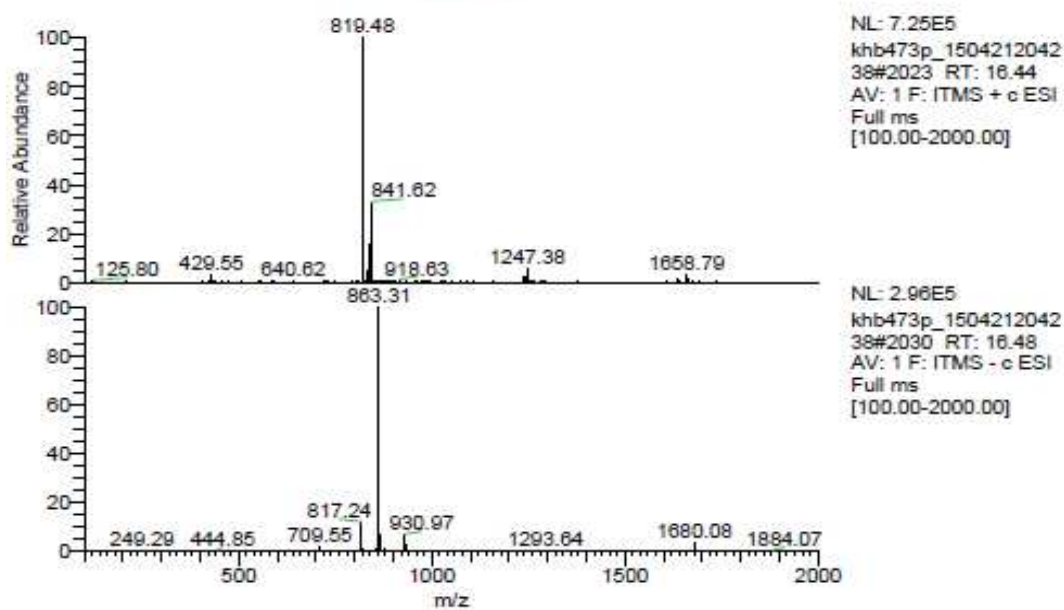
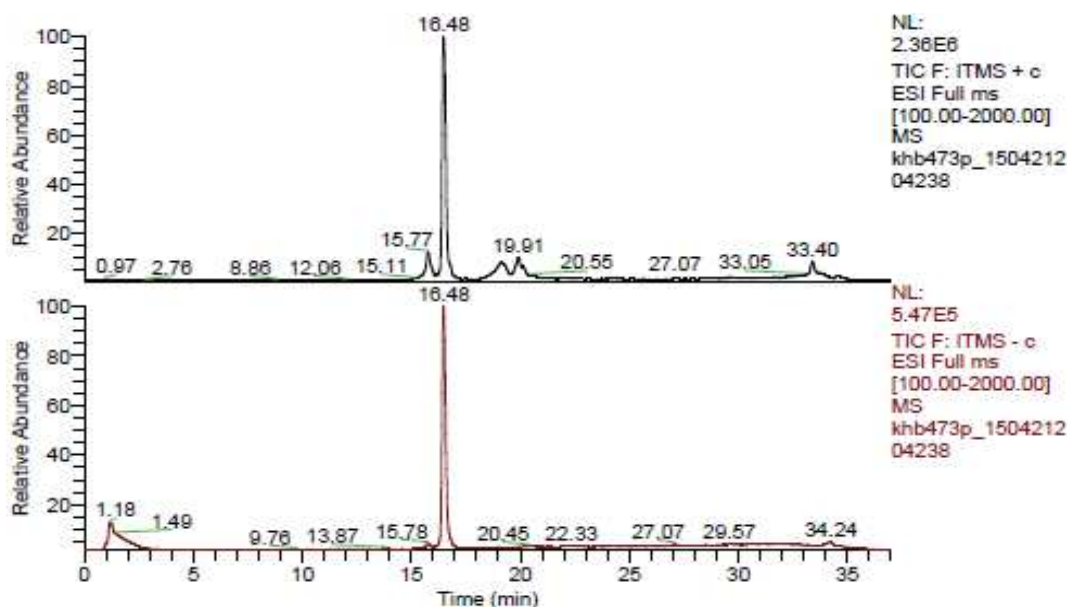
LC-MS: LC-MS analyses were carried out using a Thermo Fisher Scientific LC-MS device, Accela HPLC coupled to a LCQ Fleet equipped with an electrospray ionisation source and a 3D ion-trap analyser. The analysis was performed with a Phenomenex Kinetex C-18 column (100 x 300 mm) using gradient mixture of water with 0.1 % AF (buffer A) and ACN with 0.1 % AF (buffer B). Standard conditions were a flow rate of 0.5 ml/min eluting with 10% B to 100% B 30min and 10%B for 7 min. Standard conditions were applied to all LC-MS analysis unless otherwise stated.

Semi-preparative HPLC purification: Semi-preparative purification of peptides was performed using a Waters 1525 chromatography system fitted with a Waters 2487 tunable absorbance detector with detection at 214 nm and 254 nm. Purification was performed by eluting solvents A (water) with 0.1 % TFA and B (ACN) with 0.1 % TFA on a Grace Vydac 218MS510 C-18 column (250 x 10 mm 5um) at 3 ml/min.

Cyclic peptide (1)

The crude peptide was purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 35 min with a flow rate of 3 mL/min to yield the product (40 mg, 48% yield, >95% purity). ESI-MS: $C_{42}H_{59}N_8O_9[M+H]^+$; calculated 819.4, found 819.4.

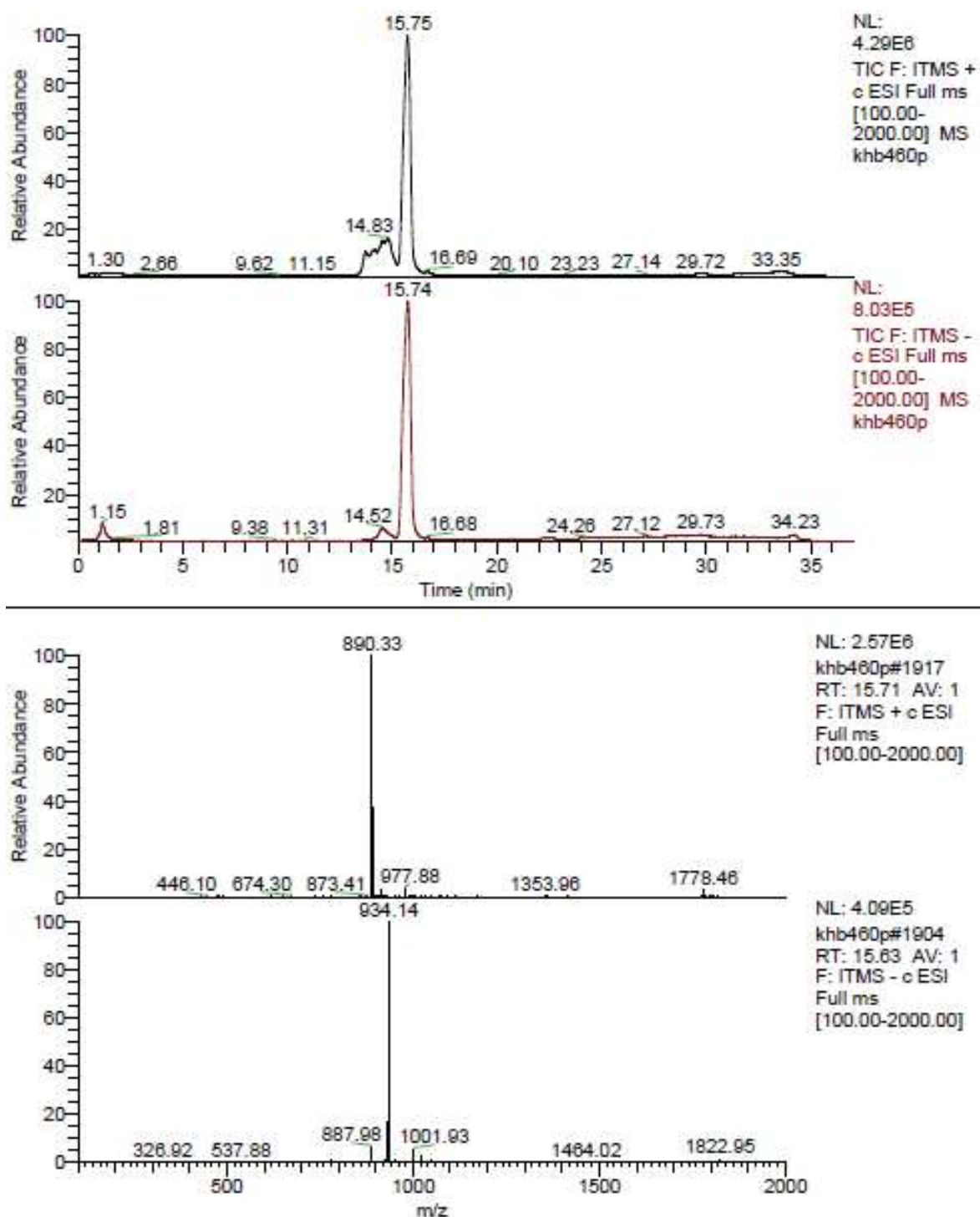
LC-MS



Cyclic peptide (2)

The crude peptide purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 35 min with a flow rate of 3 mL/min to yield the product (32 mg, 35% yield, >95% purity). ESI-MS: $C_{45}H_{64}N_9O_{10}[M+H]^+$; calculated 890.5, found 890.3.

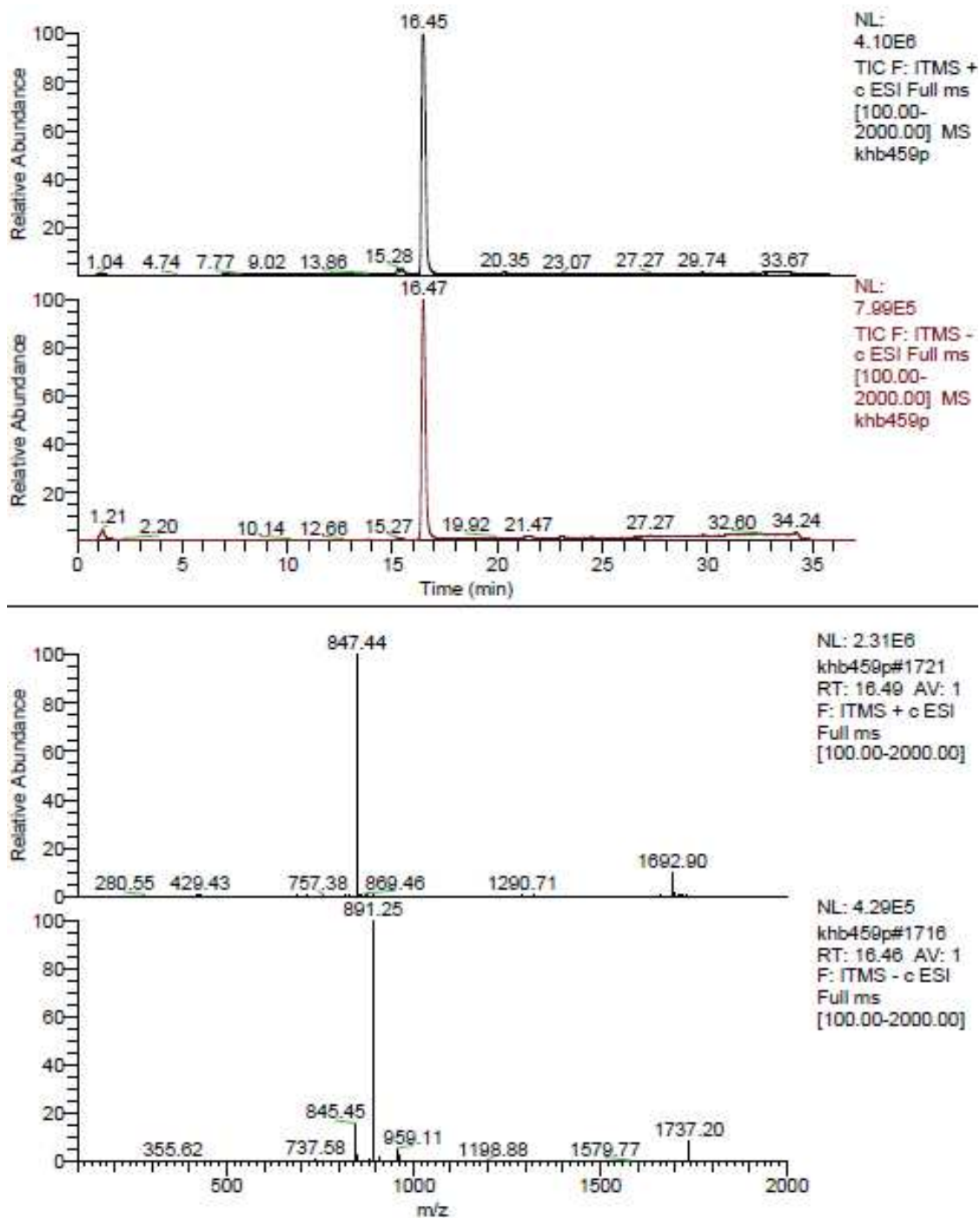
LC-MS



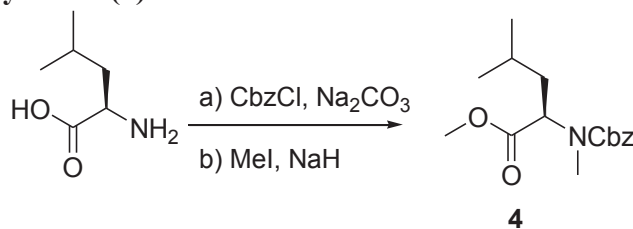
Cyclic peptide (3)

The crude peptide was purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 35 min with a flow rate of 3 mL/min to yield the product (47 mg, 55% yield, >95% purity). ESI-MS: $C_{42}H_{59}N_{10}O_9[M+H]^+$; calculated 847.4, found 847.4.

LC-MS

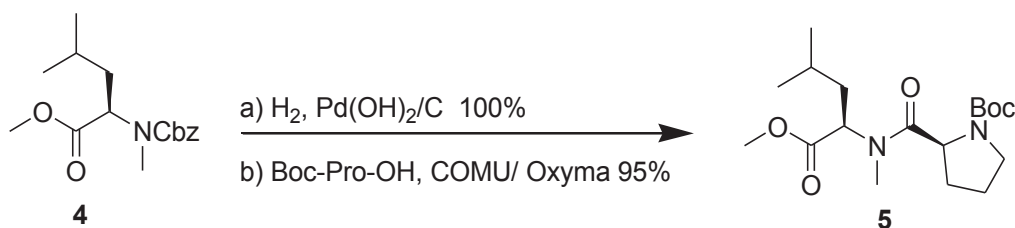


Cbz-D-Leucine methyl ester (4).



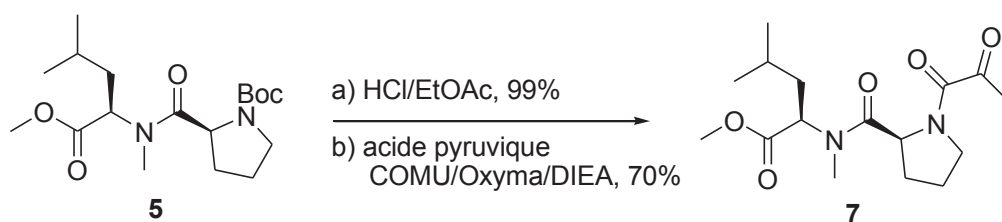
D-Leucine (5g, 38.1 mmol) was suspended in 1 M Na₂CO₃ (76 mL) and dioxane (23 mL) and cooled to 0 °C. To this solution was added Cbz-Cl (6.5, 38.1 mmol) in dioxane (30 mL). The reaction was allowed to warm to room temperature and stir overnight. The reaction mixture was diluted with water (100 mL) and extracted with hexanes (3 x 100 mL). The remaining aqueous layer was acidified with solid citric acid and extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). The organic extracts were washed with water (50 mL), brine (50 mL) and dried over MgSO₄. Filtration and concentration under reduced pressure led to the product as clear oil (10.1 g, 99%) that was used directly in the next step. The Cbz protected product (10.1 g, 38 mmol) was dissolved in anhydrous 50ml of DMF, 50ml of THF and cooled to 0 °C. To this solution was added iodomethane (54 g, 380 mmol) and the reaction was allowed to stir for 20 min. Sodium hydride 60 % dispersion in mineral oil (7.6g, 190 mmol) was added to the reaction mixture. The reaction mixture was heated at reflux 48h. Water (300 mL) was added to the reaction and was then extracted with Et₂O (3 x 150 mL). The combined organic extracts were washed with water (2x50), sodium thiosulfate (2x50) brine (2x 50), dried over MgSO₄, filtered and the solvent removed under vacuum. Purification by column chromatography (10% EtOAc/Cyclohexane) give Cbz-D-Leucine methyl ester as an oil (10.7, 95%). R_f 0.5 (10% EtOAc/Cyclohexane). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.36 (s, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.78 – 4.55 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 2.79 (s, 3H), 1.82 – 1.69 (m, 2H), 1.64 – 1.51 (m, 1H), 1.50 – 1.40 (m, 1H), 0.94 – 0.78 (m, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.43, 172.27, 156.71, 156.09, 137.43, 137.20, 128.96, 128.92, 128.45, 128.38, 128.12, 127.89, 67.14, 67.05, 57.07, 56.95, 52.63, 52.59, 37.75, 37.29, 31.55, 31.20, 30.87, 26.91, 24.95, 24.85, 23.56, 21.51. ESI-MS (C₁₆H₂₄NO₅) [M+H]⁺m/z =found 293.9, calculated 294.2.

***N*-Boc-Proline-*N*-Me-*D*-leucine methyl ester (5).**



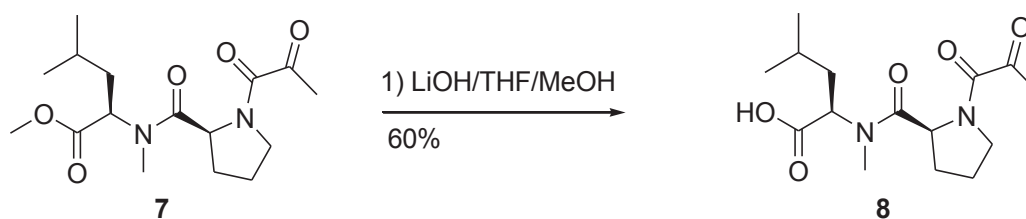
Protected precursor 1 (5 g, 17mmol) was dissolved in anhydrous methanol (100 mL). To this was added 10% Pd(OH)₂/C (0.5g, 10% wt.). The flask was evacuated, purged with hydrogen, and allowed to stir overnight. The reaction mixture was diluted with dichloromethane (50 mL) and the solution was filtered through a pad of Celite, and concentrated to yield the product (2.7g, quantitative) as a white solid, which was used without further purification. This deprotected product (2.7g, 17 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (100 mL) and cooled to 0 °C. To this was added COMU (11.2g, 25.5 mmol), Oxyma (3.6g, 25.5 mmol) and Boc-Pro-OH (5.5, 25.5 mmol). The reaction was allowed to warm to room temperature and stir overnight. To the reaction mixture was added water (100 mL). This solution was then extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The combined organic phases were washed with 10% KHSO₄ (100mL), 10% NaHCO₃ (100 mL), and brine (100 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated to yield the crude product, which was purified by column chromatography (30% EtOAc/Cyclohexane) to yield the product (5.7g, 95%) as a white solid. *R*_f 0.4 (40% EtOAc/ Cyclohexane). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.98 – 4.86 (m, 1H), 4.62 (dd, *J* = 8.5, 3.6 Hz, 1H), 3.60 (s, 3H), 2.94 (s, 3H), 2.30 – 2.02 (m, 1H), 1.84 – 1.69 (m, 3H), 1.68 – 1.51 (m, 2H), 1.32 (s, 9H), 0.86 (s, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.60, 172.13, 153.64, 78.93, 57.51, 55.61, 52.45, 47.01, 37.89, 32.21, 30.32, 28.86, 28.43, 24.84, 23.80, 23.18, 21.48. ESI-MS (C₁₈H₃₃N₂O₅) [M+H]⁺*m/z* =found 356.9, calculated 357.2.

Pyruvyl-prolyl-*N*-methyl-*D*-leucine methyl ester (7).



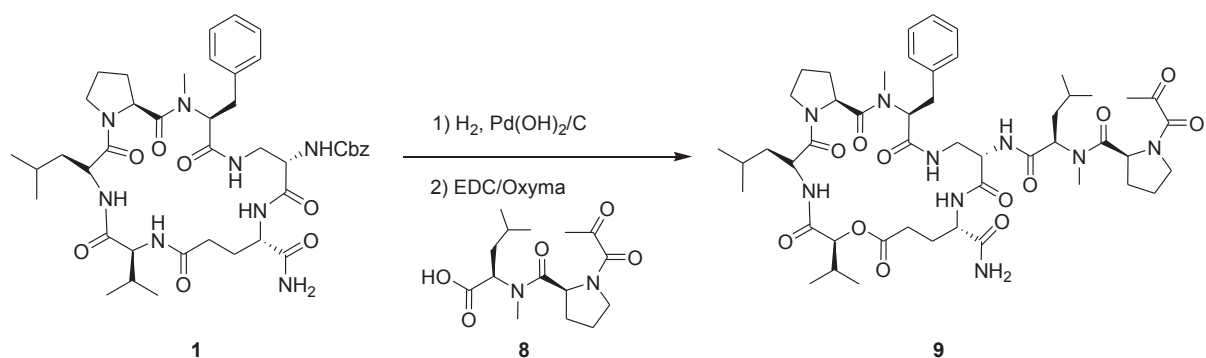
N-Boc-Proline-*N*-Me-*D*-leucine methylester (2g, 5.6mmol) was dissolved in a solution of HCl in EtOH/EtOAc [obtained by the drop-wise addition of AcCl (4.4 mL, 60mmol) to ice-cooled dry ethanol (15 mL, 156 mmol)] and allowed to stir at room temperature for 2 h. The solvent was removed and the resulting salt was redissolved in anhydrous DCM (50mL) and cooled to -10 °C, to this solution was added Pyruvic-acid (0.061g, 0.69 mmol), COMU (3.6g, 8.4mmol), Oxyma (1.1g, 8.4mmol) and DIEA (1.95ml, 11.2mmol). The mixture was allowed to warm to room temperature and stir overnight. The reaction was diluted with CH₂Cl₂ (50 mL) and washed with 10% HCl (50mL), saturated NaHCO₃ (50mL), and brine (50mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (25% EtOAc/Cyclohexane) to yield the product (1.2g, 70%) as a white solid. *R*_f0.35 (30% EtOAc/Cyclohexane). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.86-1.05 (m, 6H), 1.41-1.54 (m, 1H), 1.70-1.74 (m, 2H) 1.87-1.89 (m, 3H), 2.05-2.19 (m, 1H), 2.33 (s, 3H) 2.97 (s, 2H), 3.59-3.63 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 4.96(t, *J*=7.97 Hz, 1H), 5.11-5.13 (m, 1H); ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 21.3, 22.5, 23.2, 25.1, 26.2, 28.3, 31.3, 37.1, 47.5, 52.1, 55.9, 58.5, 163.7, 171.5, 172.8, 198.7. ESI-MS (C₁₆H₂₇N₂O₅) [M+H]⁺m/z =found 326.9, calculated 327.2.

Pyruvyl-prolyl-*N*-methyl-*D*-leucine (8).

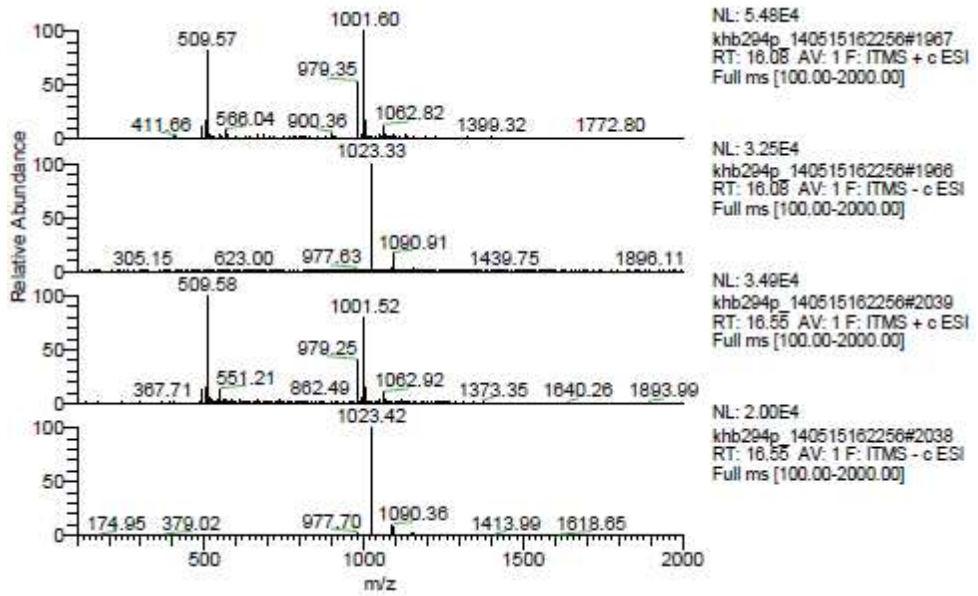
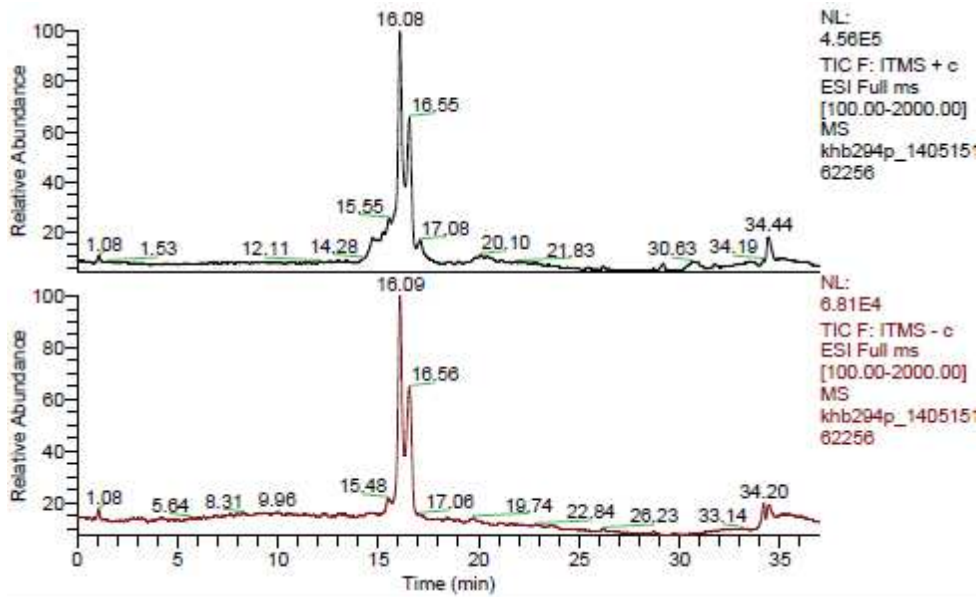


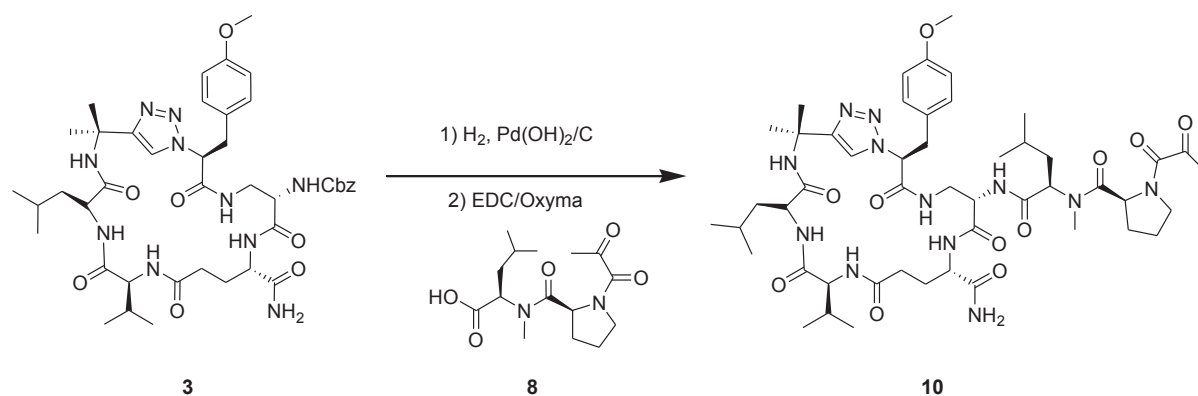
The white solid (**3**) (0.6g, 1.8mmol), was dissolved in distilled THF/HPLC MeOH (1/1) (50ml) at 0°C, added 0.2M LiOH solution (50ml), and the reaction mixture was stirred at 0°C for 1h and then rt 2h. The mixture was concentrated in vacuo, and the aqueous solution was cooled to 0°C, the acidified to pH 3 with 1N KHSO₄, and extracted with EtOAc (3× 50). The organic layers were combined and dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to afford white solid (0.34g, 60%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.86-1.03 (m, 6H), 1.35-1.50 (m, 1H), 1.70-1.77 (m, 2H) 1.85-1.93 (m, 2H), 2.07-2.18 (m, 2H), 2.33 (s, 3H) 3.02 (s, 3H), 3.58-3.86 (m, 2H), 4.78-4.81 (m, 1H), 5.08-5.12 (m, 1H); ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 21.3, 22.6, 23.2, 24.6, 26.4, 28.2, 31.2, 37.1, 45.7, 56.8, 58.7, 163.3, 173.1, 174.6, 199.1. ESI-MS (C₁₅H₂₅N₂O₅). [M+H]⁺m/z =found 312.9, calculated 313.2.

Synthesis of tamandarin B analogs **9** and **10**

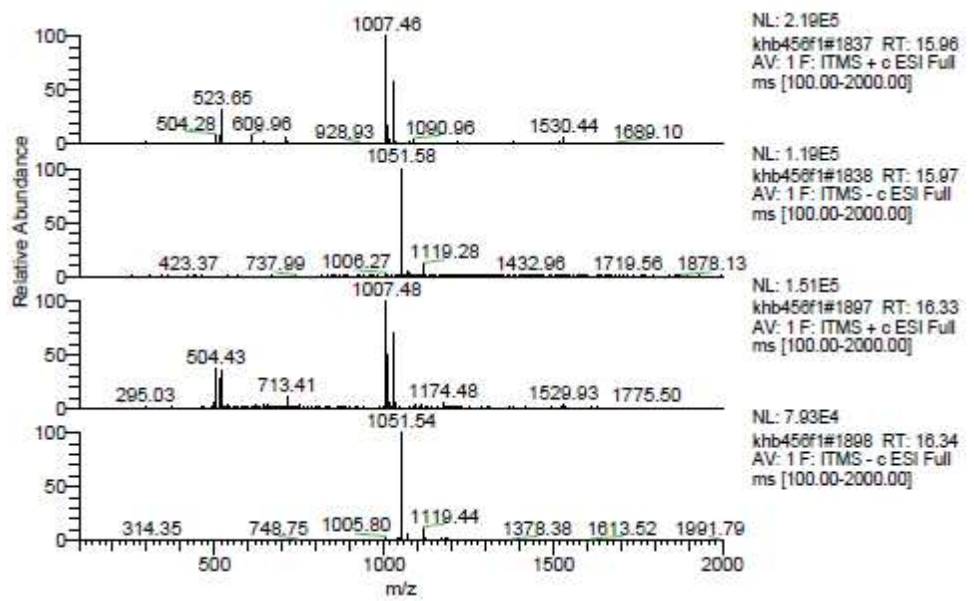
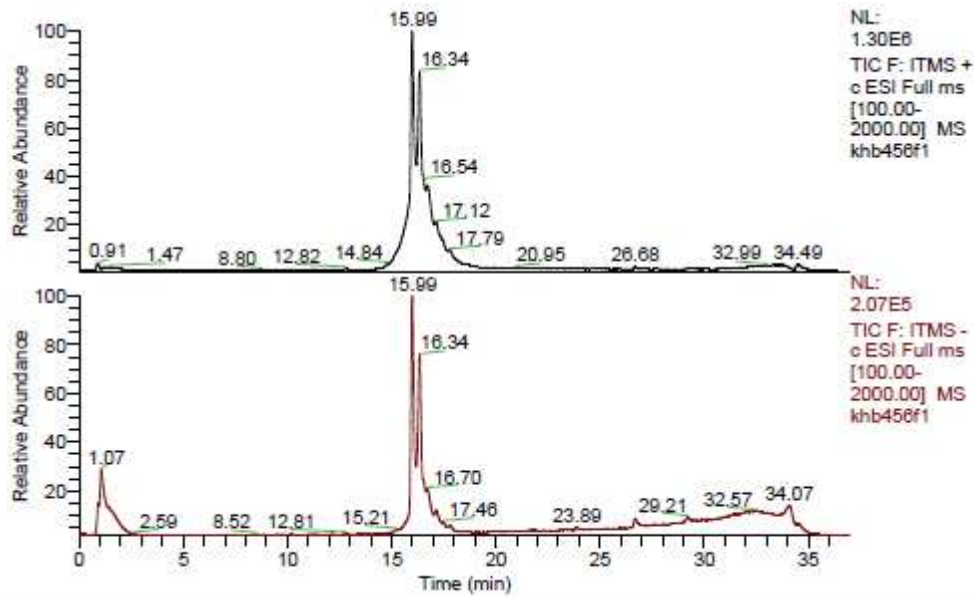


Protected cyclic precursor **1** (48mg, 0.058mmol) was dissolved in anhydrous methanol (4mL). To this was added 10% Pd(OH)₂/C (5mg, 10% wt.). The flask was evacuated, purged with hydrogen, and allowed to stir overnight. The reaction mixture was diluted with dichloromethane (15 mL) and the solution was filtered through a pad of Celite, and concentrated to yield the product (40mg, quantitative) as a white solid, which was used without further purification. This deprotected product (40mg, 0.058mmol) was dissolved in anhydrous DCM (5mL) and cooled to 0 °C. To this was added EDC (16mg, 0.08mmol) and Oxyma (12mg, 0.08mmol). The reaction was allowed to warm to room temperature and stir overnight. After 24 h additional EDC (16mg, 0.08mmol) and Oxyma (12mg, 0.08mmol) were added and the reaction was stirred for an additional 24 h. The peptide was concentrated and precipitated with ice-cold diethyl ether, recovered by centrifugation and washed with cold diethyl ether. Water was added and the mixture was lyophilized to yield crude peptide. The crude peptide was dissolved in ~3 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 35 min with a flow rate of 3 mL/min to yield the product (9 mg, 15% yield, >95% purity). ESI-MS: C₄₉H₇₃N₉NaO₁₂ [M+Na⁺]; calculated 1002.5, found 1001.6.





Protected cyclic precursor **3** (55mg, 0.064mmol) was dissolved in anhydrous methanol (4mL). To this was added 10% Pd(OH)₂/C (7mg, 10% wt.). The flask was evacuated, purged with hydrogen, and allowed to stir overnight. The reaction mixture was diluted with dichloromethane (15 mL) and the solution was filtered through a pad of Celite, and concentrated to yield the product (46mg, quantitative) as a white solid, which was used without further purification. This deprotected product (46mg, 0.064mmol) was dissolved in anhydrous DCM (5mL) and cooled to 0 °C. To this was added EDC (18mg, 0.1mmol) and Oxyma (14mg, 0.1mmol). The reaction was allowed to warm to room temperature and stir overnight. After 24 h additional EDC (18mg, 0.1mmol) and Oxyma (14mg, 0.1mmol) were added and the reaction was stirred for an additional 24 h. The peptide was concentrated and precipitated with ice-cold diethyl ether, recovered by centrifugation and washed with cold diethyl ether. Water was added and the mixture was lyophilized to yield crude peptide. The crude peptide was dissolved in ~3 ml of ACN/H₂O and purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 30% to 70% B in A over 35 min with a flow rate of 3 mL/min to yield the product (13 mg, 20% yield, >95% purity). ESI-MS: C₄₉H₇₅N₁₂O₁₁ [M+H⁺]; calculated 1007.6, found 1007.4.



Références bibliographiques.

- (1) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (14), 2149–2154.
- (2) Kastin, A.; Kastin, A. J. *Handbook of Biologically Active Peptides*; Academic Press, 2011.
- (3) Weber, A. L.; Miller, S. L. Reasons for the Occurrence of the Twenty Coded Protein Amino Acids. *J. Mol. Evol.* **1981**, 17 (5), 273–284.
- (4) Todd, E. C. D. Domoic Acid and Amnesic Shellfish Poisoning - A Review. *J. Food Prot.* **1993**, 56 (1), 69–83.
- (5) Sone, H.; Kigoshi, H.; Yamada, K. Isolation and Stereostructure of Dolastatin I, a Cytotoxic Cyclic Hexapeptide from the Japanese Sea Hare *Dolabella Auricularia*. *Tetrahedron* **1997**, 53 (24), 8149–8154.
- (6) Ojika, M.; Nemoto, T.; Nakamura, M.; Yamada, K. Dolastatin E, a New Cyclic Hexapeptide Isolated from the Sea Hare *Dolabella Auricularia*. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (28), 5057–5058.
- (7) Nakamura, M.; Shibata, T.; Nakane, K.; Nemoto, T.; Ojika, M.; Yamada, K. Stereochemistry and Total Synthesis of Dolastatin E. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (28), 5059–5062.
- (8) Rother, M.; Krzycki, J. A. Selenocysteine, Pyrrolysine, and the Unique Energy Metabolism of Methanogenic. *Archaea* **2010**, 2010, e453642.
- (9) Johansson, L.; Gafvelin, G.; Arnér, E. S. J. Selenocysteine in Proteins—properties and Biotechnological Use. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2005**, 1726 (1), 1–13.
- (10) McIntosh, J. A.; Donia, M. S.; Schmidt, E. W. Ribosomal Peptide Natural Products: Bridging the Ribosomal and Nonribosomal Worlds. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26 (4), 537–559.
- (11) Lazarus, C. M.; Williams, K.; Bailey, A. M. Reconstructing Fungal Natural Product Biosynthetic Pathways. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 31 (10), 1339–1347.
- (12) Kehr, J.-C.; Gatte Picchi, D.; Dittmann, E. Natural Product Biosyntheses in Cyanobacteria: A Treasure Trove of Unique Enzymes. *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, 7, 1622–1635.
- (13) Buczek, O.; Yoshikami, D.; Bulaj, G.; Jimenez, E. C.; Olivera, B. M. Post-Translational Amino Acid Isomerization A FUNCTIONALLY IMPORTANT D-AMINO ACID IN AN EXCITATORY PEPTIDE. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (6), 4247–4253.
- (14) Jaworski, A.; Brückner, H. Sequences of Polypeptide Antibiotics Stilboflavins, Natural Peptaibol Libraries of the Mold *Stilbella Flavipes*. *J. Pept. Sci.* **2001**, 7 (8), 433–447.
- (15) Chatterjee, J.; Rechenmacher, F.; Kessler, H. N-Methylation of Peptides and Proteins: An Important Element for Modulating Biological Functions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52 (1), 254–269.
- (16) Lelais, G.; Seebach, D. β -Amino Acids—syntheses, Occurrence in Natural Products, and Components of β -peptides^{1,2}. *Pept. Sci.* **2004**, 76 (3), 206–243.
- (17) Schwarzer, D.; Finking, R.; Marahiel, M. A. Nonribosomal Peptides: From Genes to Products. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20 (3), 275–287.
- (18) Felnagle, E. A.; Jackson, E. E.; Chan, Y. A.; Podevels, A. M.; Berti, A. D.; McMahon, M. D.; Thomas, M. G. Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Production of Medically Relevant Natural Products. *Mol. Pharm.* **2008**, 5 (2), 191–211.
- (19) Strieker, M.; Tanović, A.; Marahiel, M. A. Nonribosomal Peptide Synthetases: Structures and Dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, 20 (2), 234–240.
- (20) Marahiel, M. A.; Stachelhaus, T.; Mootz, H. D. Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem. Rev.* **1997**, 97 (7), 2651–2674.

- (21) Fisch, K. M. Biosynthesis of Natural Products by Microbial Iterative Hybrid PKS–NRPS. *RSC Adv.* **2013**, 3 (40), 18228–18247.
- (22) Boyaud, F.; Mahiout, Z.; Lenoir, C.; Tang, S.; Wdzieczak-Bakala, J.; Witczak, A.; Bonnard, I.; Banaigs, B.; Ye, T.; Inguibert, N. First Total Synthesis and Stereochemical Revision of Laxaphycin B and Its Extension to Lyngbyacyclamide A. *Org. Lett.* **2013**, 15 (15), 3898–3901.
- (23) Banaigs, B.; Bonnard, I.; Witczak, A.; Inguibert, N. Marine Peptide Secondary Metabolites. In *Outstanding Marine Molecules*; Barre, S. L., Kornprobst, J.-M., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014; pp 285–318.
- (24) Bonnard, I.; Rolland, M.; Francisco, C.; Banaigs, B. Total Structure and Biological Properties of Laxaphycins A and B, Cyclic Lipopeptides from the Marine cyanobacterium *Lyngbya Majuscula*. *Let. Pept. Sci.* **1997**, 4 (4-6), 289–292.
- (25) Bonnard, I.; Rolland, M.; Salmon, J.-M.; Debiton, E.; Barthomeuf, C.; Banaigs, B. Total Structure and Inhibition of Tumor Cell Proliferation of Laxaphycins. *J. Med. Chem.* **2007**, 50 (6), 1266–1279.
- (26) Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *J. Mol. Biol.* **1963**, 7 (1), 95–99.
- (27) Richardson, J. S. The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure. In *Advances in Protein Chemistry*; C.B. Anfinsen, J. T. E. and F. M. R., Ed.; Academic Press, 1981; Vol. 34, pp 167–339.
- (28) Frishman, D.; Argos, P. Knowledge-Based Protein Secondary Structure Assignment. *Proteins* **1995**, 23 (4), 566–579.
- (29) Pauling, L.; Corey, R. B.; Branson, H. R. The Structure of Proteins; Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1951**, 37 (4), 205–211.
- (30) Pauling, L.; Corey, R. B. Compound Helical Configurations of Polypeptide Chains: Structure of Proteins of the Alpha-Keratin Type. *Nature* **1953**, 171 (4341), 59–61.
- (31) Pauling, L.; Corey, R. B. Atomic Coordinates and Structure Factors for Two Helical Configurations of Polypeptide Chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1951**, 37 (5), 235–240.
- (32) Rohl, C. A.; Doig, A. J. Models for the 3(10)-Helix/coil, Pi-Helix/coil, and Alpha-helix/3(10)-Helix/coil Transitions in Isolated Peptides. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **1996**, 5 (8), 1687–1696.
- (33) Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers* **1983**, 22 (12), 2577–2637.
- (34) Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M. A Revised Set of Potentials for Beta-Turn Formation in Proteins. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **1994**, 3 (12), 2207–2216.
- (35) Duddy, W. J.; Nissink, J. W. M.; Allen, F. H.; Milner-White, E. J. Mimicry by Asx- and ST-Turns of the Four Main Types of β -Turn in Proteins. *Protein Sci.* **2004**, 13 (11), 3051–3055.
- (36) James Milner-White, E.; Poet, R. Loops, Bulges, Turns and Hairpins in Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **1987**, 12, 189–192.
- (37) Hummel, G.; Reineke, U.; Reimer, U. Translating Peptides into Small Molecules. *Mol. Biosyst.* **2006**, 2 (10), 499–508.
- (38) Loffet, A. Peptides as Drugs: Is There a Market? *J. Pept. Sci.* **2002**, 8 (1), 1–7.
- (39) Maggio, E. T. Intravail™: Highly Effective Intranasal Delivery of Peptide and Protein Drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2006**, 3 (4), 529–539.
- (40) Quattrin, T.; Bélanger, A.; Bohannon, N. J. V.; Schwartz, S. L. Efficacy and Safety of Inhaled Insulin (Exubera) Compared With Subcutaneous Insulin Therapy in Patients

- With Type 1 Diabetes Results of a 6-Month, Randomized, Comparative Trial. *Diabetes Care* **2004**, *27* (11), 2622–2627.
- (41) Gentilucci, L.; De Marco, R.; Cerisoli, L. Chemical Modifications Designed to Improve Peptide Stability: Incorporation of Non-Natural Amino Acids, Pseudo-Peptide Bonds, and Cyclization. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16* (28), 3185–3203.
- (42) Olsen, C. A. β -Peptoid “Foldamers”—Why the Additional Methylene Unit? *Pept. Sci.* **2011**, *96* (5), 561–566.
- (43) von Nussbaum, F.; Spiteller, P. β -Amino Acids in Nature. In *Highlights in Bioorganic Chemistry*; Schmuck, essor C., Wennemers, essor H., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004; pp 63–89.
- (44) Berlicki, Ł.; Pilsł, L.; Wéber, E.; Mándity, I. M.; Cabrele, C.; Martinek, T. A.; Fülöp, F.; Reiser, O. Unique α,β - and $\alpha,\alpha,\beta,\beta$ -Peptide Foldamers Based on Cis- β -Aminocyclopentanecarboxylic Acid. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (9), 2208–2212.
- (45) Raguse, T. L.; Lai, J. R.; LePlae, P. R.; Gellman, S. H. Toward β -Peptide Tertiary Structure: Self-Association of an Amphiphilic 14-Helix in Aqueous Solution. *Org. Lett.* **2001**, *3* (24), 3963–3966.
- (46) Martínez-Rodríguez, S.; Martínez-Gómez, A. I.; Rodríguez-Vico, F.; Clemente-Jiménez, J. M.; Las Heras-Vázquez, F. J. Natural Occurrence and Industrial Applications of D-Amino Acids: An Overview. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7* (6), 1531–1548.
- (47) Sagan, S.; Karoyan, P.; Lequin, O.; Chassaing, G.; Lavielle, S. N- and C- α -Methylation in Biologically Active Peptides: Synthesis, Structural and Functional Aspects. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11* (21), 2799–2822.
- (48) Clark, R. J.; Fischer, H.; Dempster, L.; Daly, N. L.; Rosengren, K. J.; Nevin, S. T.; Meunier, F. A.; Adams, D. J.; Craik, D. J. Engineering Stable Peptide Toxins by Means of Backbone Cyclization: Stabilization of the α -Conotoxin MII. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (39), 13767–13772.
- (49) Jlalía, I.; Lensen, N.; Chaume, G.; Dzhambazova, E.; Astasidi, L.; Hadjiolova, R.; Bocheva, A.; Brigaud, T. Synthesis of an MIF-1 Analogue Containing Enantiopure (S)- α -Trifluoromethyl-Proline and Biological Evaluation on Nociception. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 122–129.
- (50) Choudhary, A.; Raines, R. T. An Evaluation of Peptide-Bond Isosteres. *ChemBioChem* **2011**, *12* (12), 1801–1807.
- (51) Michael, A. Ueber Die Einwirkung von Diazobenzolimid Auf Acetylendicarbonsäuremethylester. *J. Für Prakt. Chem.* **1893**, *48* (1), 94–95.
- (52) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (10), 565–598.
- (53) Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (11), 633–645.
- (54) 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* (9), 3057–3064.
- (55) 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* (14), 2596–2599.
- (56) 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* (11), 2004–2021.

- (57) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 15998–15999.
- (58) Sauer, G.; Nasu, D.; Tietze, D.; Gutmann, T.; Englert, S.; Avrutina, O.; Kolmar, H.; Buntkowsky, G. Effective Phip Labeling of Bioactive Peptides Boosts the Intensity of the NMR Signal. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, n/a – n/a.
- (59) Tischler, M.; Nasu, D.; Empting, M.; Schmelz, S.; Heinz, D. W.; Rottmann, P.; Kolmar, H.; Buntkowsky, G.; Tietze, D.; Avrutina, O. Braces for the Peptide Backbone: Insights into Structure–Activity Relationships of Protease Inhibitor Mimics with Locked Amide Conformations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (15), 3708–3712.
- (60) Horne, W. S.; Olsen, C. A.; Beierle, J. M.; Montero, A.; Ghadiri, M. R. Probing the Bioactive Conformation of an Archetypal Natural Product HDAC Inhibitor with Conformationally Homogeneous Triazole-Modified Cyclic Tetrapeptides. *Angew. Chem.* **2009**, *121* (26), 4812–4818.
- (61) Tam, A.; Arnold, U.; Soellner, M. B.; Raines, R. T. Protein Prosthesis: 1,5-Disubstituted[1,2,3]triazoles as Cis-Peptide Bond Surrogates. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (42), 12670–12671.
- (62) Johansson, J. R.; Hermansson, E.; Nordén, B.; Kann, N.; Beke-Somfai, T. δ -Peptides from RuAAC-Derived 1,5-Disubstituted Triazole Units. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014* (13), 2703–2713.
- (63) Goncalves, V.; Gautier, B.; Regazzetti, A.; Coric, P.; Bouaziz, S.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N. On-Resin Cyclization of Peptide Ligands of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 by copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Azide–alkyne Cycloaddition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (20), 5590–5594.
- (64) 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* (49), 17134–17135.
- (65) Chan-Seng, D.; Lutz, J.-F. Primary Structure Control of Oligomers Based on Natural and Synthetic Building Blocks. *ACS Macro Lett.* **2014**, 291–294.
- (66) Corcilius, L.; Santhakumar, G.; Stone, R. S.; Capicciotti, C. J.; Joseph, S.; Matthews, J. M.; Ben, R. N.; Payne, R. J. Synthesis of Peptides and Glycopeptides with Polyproline II Helical Topology as Potential Antifreeze Molecules. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (12), 3569–3581.
- (67) Zhang, Z.; Fan, E. Solid Phase Synthesis of Peptidotriazoles with Multiple Cycles of Triazole Formation. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (5), 665–669.
- (68) Horne, W. S.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. A Heterocyclic Peptide Nanotube. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (31), 9372–9376.
- (69) Habrant, D.; Rauhala, V.; Koskinen, A. M. P. Conversion of Carbonyl Compounds to Alkynes: General Overview and Recent Developments. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (6), 2007–2017.
- (70) Corey, E. J.; Fuchs, P. L. A Synthetic Method for Formyl→ethynyl Conversion (RCHO→RC≡CH or RCCR'). *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13* (36), 3769–3772.
- (71) 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* (29), 5597–5599.
- (72) Callant, P.; D'haenens, L.; Eycken, E. V. D.; Vandewalle, M. Photoinduced Wolff Rearrangement of α -Diazo- β -Ketophosphonates: A Novel Entry into Substituted Phosphonoacetates. *Synth. Commun.* **1984**, *14* (2), 163–167.

- (73) Ohira, S. Methanolysis of Dimethyl (1-Diazo-2-Oxopropyl) Phosphonate: Generation of Dimethyl (Diazomethyl) Phosphonate and Reaction with Carbonyl Compounds. *Synth. Commun.* **1989**, *19* (3-4), 561–564.
- (74) Gilbert, J. C.; Weerasooriya, U. Generation of Aldehydic Enol Ethers and Enamines by Olefination of Ketones. *J. Org. Chem.* **1983**, *48* (4), 448–453.
- (75) Müller, S.; Liepold, B.; Roth, G. J.; Bestmann, H. J. An Improved One-Pot Procedure for the Synthesis of Alkynes from Aldehydes. *Synlett* **1996**, *1996* (06), 521–522.
- (76) Scriven, E. F. V.; Turnbull, K. Azides: Their Preparation and Synthetic Uses. *Chem. Rev.* **1988**, *88* (2), 297–368.
- (77) Smith, P. A. S. The Curtius Reaction. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- (78) Curtius, T. Ueber Stickstoffwasserstoffsäure (Azoimid) N₃H. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1890**, *23* (2), 3023–3033.
- (79) Gololobov, Y. G.; Kasukhin, L. F. Recent Advances in the Staudinger Reaction. *Tetrahedron* **1992**, *48* (8), 1353–1406.
- (80) Staudinger, H.; Meyer, J. Über Neue Organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylderivate Und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2* (1), 635–646.
- (81) Schmidt, K. F. Über Den Imin-Rest. *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1924**, *57* (4), 704–706.
- (82) Aube, J.; Milligan, G. L. Intramolecular Schmidt Reaction of Alkyl Azides. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (23), 8965–8966.
- (83) Boyer, J. H.; Hamer, J. The Acid-Catalyzed Reaction of Alkyl Azides upon Carbonyl Compounds I. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (4), 951–954.
- (84) Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (33), 5188–5240.
- (85) Alper, P. B.; Hung, S.-C.; Wong, C.-H. Metal Catalyzed Diazo Transfer for the Synthesis of Azides from Amines. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (34), 6029–6032.
- (86) Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V. An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-Sulfonyl Azide Hydrochloride. *Org. Lett.* **2007**, *9* (19), 3797–3800.
- (87) Bock, V. D.; Speijer, D.; Hiemstra, H.; Maarseveen, J. H. van. 1,2,3-Triazoles as Peptide Bond Isosteres: Synthesis and Biological Evaluation of Cyclotetrapeptide Mimics. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (6), 971–975.
- (88) Valverde, I. E.; Bauman, A.; Kluba, C. A.; Vomstein, S.; Walter, M. A.; Mindt, T. L. 1,2,3-Triazoles as Amide Bond Mimics: Triazole Scan Yields Protease-Resistant Peptidomimetics for Tumor Targeting. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (34), 8957–8960.
- (89) Nahrwold, M.; Bogner, T.; Eissler, S.; Verma, S.; Sewald, N. “Clicktophycin-52”: A Bioactive Cryptophycin-52 Triazole Analogue. *Org. Lett.* **2010**, *12* (5), 1064–1067.
- (90) van Maarseveen, J. H.; Horne, W. S.; Ghadiri, M. R. Efficient Route to C₂ Symmetric Heterocyclic Backbone Modified Cyclic Peptides. *Org. Lett.* **2005**, *7* (20), 4503–4506.
- (91) Ingale, S.; Dawson, P. E. On Resin Side-Chain Cyclization of Complex Peptides Using CuAAC. *Org. Lett.* **2011**, *13* (11), 2822–2825.
- (92) Turner, R. A.; Oliver, A. G.; Lokey, R. S. Click Chemistry as a Macrocyclization Tool in the Solid-Phase Synthesis of Small Cyclic Peptides. *Org. Lett.* **2007**, *9* (24), 5011–5014.
- (93) White, C. J.; Yudin, A. K. Contemporary Strategies for Peptide Macrocyclization. *Nat. Chem.* **2011**, *3* (7), 509–524.

- (94) Aucagne, V.; Valverde, I. E.; Marceau, P.; Galibert, M.; Dendane, N.; Delmas, A. F. Towards the Simplification of Protein Synthesis: Iterative Solid-Supported Ligations with Concomitant Purifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (45), 11320–11324.
- (95) Valverde, I. E.; Lecaille, F.; Lalmanach, G.; Aucagne, V.; Delmas, A. F. Synthesis of a Biologically Active Triazole-Containing Analogue of Cystatin A Through Successive Peptidomimetic Alkyne–Azide Ligations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (3), 718–722.
- (96) Xiao, J.; Tolbert, T. J. Synthesis of N-Terminally Linked Protein Dimers and Trimers by a Combined Native Chemical Ligation-CuAAC Click Chemistry Strategy. *Org. Lett.* **2009**, *11* (18), 4144–4147.
- (97) Le Quement, S. T.; Ishoey, M.; Petersen, M. T.; Thastrup, J.; Hagel, G.; Nielsen, T. E. Solid-Phase Synthesis of Smac Peptidomimetics Incorporating Triazoloproline and Biarylalanines. *ACS Comb. Sci.* **2011**, *13* (6), 667–675.
- (98) Li, H.; Aneja, R.; Chaiken, I. Click Chemistry in Peptide-Based Drug Design. *Molecules* **2013**, *18* (8), 9797–9817.
- (99) Angell, Y. L.; Burgess, K. Peptidomimetics via Copper-Catalyzed Azide–alkyne Cycloadditions. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (10), 1674–1689.
- (100) Ko, E.; Liu, J.; Perez, L. M.; Lu, G.; Schaefer, A.; Burgess, K. Universal Peptidomimetics. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (3), 462–477.
- (101) Li, X. Click to Join Peptides/Proteins Together. *Chem. – Asian J.* **2011**, *6* (10), 2606–2616.
- (102) 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.* **2007**, *119* (48), 9472–9475.
- (103) Wiley, R. A.; Rich, D. H. Peptidomimetics Derived from Natural Products. *Med. Res. Rev.* **1993**, *13* (3), 327–384.
- (104) Gante, J. Peptidomimetics—Tailored Enzyme Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33* (17), 1699–1720.
- (105) Ko, E.; Liu, J.; Burgess, K. Minimalist and Universal Peptidomimetics. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (8), 4411–4421.
- (106) Avan, I.; Hall, C. D.; Katritzky, A. R. Peptidomimetics via Modifications of Amino Acids and Peptide Bonds. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (10), 3575–3594.
- (107) Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V. J. Peptidomimetics, a Synthetic Tool of Drug Discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12* (3), 292–296.
- (108) 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* (2), 278–308.
- (109) Hou, J.; Liu, X.; Shen, J.; Zhao, G.; Wang, P. G. The Impact of Click Chemistry in Medicinal Chemistry. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7* (6), 489–501.
- (110) Valverde, I. E.; Mindt, T. L. 1,2,3-Triazoles as Amide-Bond Surrogates in Peptidomimetics. *Chim. Int. J. Chem.* **2013**, *67* (4), 262–266.
- (111) 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* (5), 919–922.
- (112) 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* (47), 15366–15367.

- (113) Boddaert, T.; Solà, J.; Helliwell, M.; Clayden, J. Chemical Communication: Conductors and Insulators of Screw-Sense Preference between Helical Oligo(aminoisobutyric Acid) Domains. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (28), 3397–3399.
- (114) Solà, J.; Helliwell, M.; Clayden, J. Interruption of a 310-Helix by a Single Gly Residue in a Poly-Aib Motif: A Crystallographic Study. *Biopolymers* **2011**, *95* (1), 62–69.
- (115) Degenkolb, T.; von Döhren, H.; Fog Nielsen, K.; Samuels, G. J.; Brückner, H. Recent Advances and Future Prospects in Peptaibiotics, Hydrophobin, and Mycotoxin Research, and Their Importance for Chemotaxonomy of Trichoderma and Hypocrea. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5* (5), 671–680.
- (116) Carroux, A.; Van Bohemen, A.-I.; Roullier, C.; Robiou du Pont, T.; Vansteelandt, M.; Bondon, A.; Zalouk-Vergnoux, A.; Pouchus, Y. F.; Ruiz, N. Unprecedented 17-Residue Peptaibiotics Produced by Marine-Derived Trichoderma Atroviride. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10* (5), 772–786.
- (117) Brückner, H.; Toniolo, C. Towards a Myriad of Peptaibiotics. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10* (5), 731–733.
- (118) Toniolo, C.; Bonora, G. M.; Bavoso, A.; Benedetti, E.; di Blasio, B.; Pavone, V.; Pedone, C. Preferred Conformations of Peptides Containing α,α -Disubstituted α -Amino Acids. *Biopolymers* **1983**, *22* (1), 205–215.
- (119) Finneman, J. I.; Pozzo, M. J. Novel Approach for Optimization of a “difficult” Peptide Synthesis by Utilizing Quantitative Reaction Monitoring Assays. *J. Pept. Sci.* **2012**, *18* (8), 511–518.
- (120) Stoppacher, N.; Neumann, N. K. N.; Burgstaller, L.; Zeilinger, S.; Degenkolb, T.; Brückner, H.; Schuhmacher, R. The Comprehensive Peptaibiotics Database. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10* (5), 734–743.
- (121) Leitgeb, B.; Szekeres, A.; Manczinger, L.; Vágvölgyi, C.; Kredics, L. The History of Alamethicin: A Review of the Most Extensively Studied Peptaibol. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4* (6), 1027–1051.
- (122) Kredics, L.; Szekeres, A.; Czifra, D.; Vágvölgyi, C.; Leitgeb, B. Recent Results in Alamethicin Research. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10* (5), 744–771.
- (123) Zhang, L.; Hermans, J. 310 Helix Versus α -Helix: A Molecular Dynamics Study of Conformational Preferences of Aib and Alanine. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (26), 11915–11921.
- (124) Karle, I. L.; Balaram, P. Structural Characteristics of α -Helical Peptide Molecules Containing Aib Residues. *Biochemistry (Mosc.)* **1990**, *29* (29), 6747–6756.
- (125) Burgess, A. W.; Leach, S. J. An Obligatory α -Helical Amino Acid Residue. *Biopolymers* **1973**, *12* (11), 2599–2605.
- (126) Maffucci, I.; Pellegrino, S.; Clayden, J.; Contini, A. Mechanism of Stabilization of Helix Secondary Structure by Constrained C α -Tetrasubstituted α -Amino Acids. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (4), 1350–1361.
- (127) De Filippis, V.; De Antoni, F.; Frigo, M.; Polverino de Laureto, P.; Fontana, A. Enhanced Protein Thermostability by Ala \rightarrow Aib Replacement. *Biochemistry (Mosc.)* **1998**, *37* (6), 1686–1696.
- (128) Karle, I. L. Controls Exerted by the Aib Residue: Helix Formation and Helix Reversal. *Pept. Sci.* **2001**, *60* (5), 351–365.
- (129) Demizu, Y.; Yabuki, Y.; Doi, M.; Sato, Y.; Tanaka, M.; Kurihara, M. Conformations of Helical Aib Peptides Containing a Pair of L-Amino Acid and D-Amino Acid. *J. Pept. Sci.* **2012**, *18* (7), 466–475.

- (130) Szekeres, A.; Leitgeb, B.; Kredics, L.; Antal, Z.; Hatvani, L.; Manczinger, L.; Vágvölgyi, C. Peptaibols and Related Peptaibiotics of *Trichoderma*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **2005**, *52* (2), 137–168.
- (131) Saviano, M.; Benedetti, E.; Vitale, R. M.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Toniolo, C. X-Ray Diffraction Analysis and Conformational Energy Computations of β -Turn and 310-Helical Peptides Based on α -Amino Acids with an Olefinic Side Chain. Implications for Ring-Closing Metathesis. *Macromolecules* **2002**, *35* (10), 4204–4209.
- (132) Aravinda, S.; Shamala, N.; Balaram, P. Aib Residues in Peptaibiotics and Synthetic Sequences: Analysis of Nonhelical Conformations. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5* (7), 1238–1262.
- (133) Fox, R. O., Jr; Richards, F. M. A Voltage-Gated Ion Channel Model Inferred from the Crystal Structure of Alamethicin at 1.5-Å Resolution. *Nature* **1982**, *300* (5890), 325–330.
- (134) Esposito, G.; Carver, J. A.; Boyd, J.; Campbell, I. D. High-Resolution Proton NMR Study of the Solution Structure of Alamethicin. *Biochemistry (Mosc.)* **1987**, *26* (4), 1043–1050.
- (135) Yee, A.; Szymczyzna, B.; O’Neil, J. D. Backbone Dynamics of Detergent-Solubilized Alamethicin from Amide Hydrogen Exchange Measurements. *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, *38* (20), 6489–6498.
- (136) Duclouhier, H.; Wróblewski, H. Voltage-Dependent Pore Formation and Antimicrobial Activity by Alamethicin and Analogues. *J Membr Biol* **2001**, *184* (1), 1–12.
- (137) Duclouhier, H.; Wróblewski, H. Voltage-Dependent Pore Formation and Antimicrobial Activity by Alamethicin and Analogues. *J. Membr. Biol.* **2001**, *184* (1), 1–12.
- (138) Botton, B.; Breton, A.; Fevre, M.; Guy, P.; Larpent, J. P.; Veau, P. *Moisissures Utiles et Nuisibles. Importance Industrielle*; 1985.
- (139) Gupta, V. G.; Schmoll, M.; Herrera-Estrella, A.; Upadhyay, R. S.; Druzhinina, I.; Tuohy, M. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*; Newnes, 2014.
- (140) K.R, S. *Frontiers in Fungal Ecology, Diversity and Metabolites*; I. K. International Pvt Ltd, 2008.
- (141) Oren, Z.; Shai, Y. Mode of Action of Linear Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides. *Pept. Sci.* **1998**, *47* (6), 451–463.
- (142) Mukherjee, P. K.; Wiest, A.; Ruiz, N.; Keightley, A.; Moran-Diez, M. E.; McCluskey, K.; Pouchus, Y. F.; Kenerley, C. M. Two Classes of New Peptaibols Are Synthesized by a Single Non-Ribosomal Peptide Synthetase of *Trichoderma Virens*. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (6), 4544–4554.
- (143) Wei, X.; Yang, F.; Straney, D. C. Multiple Non-Ribosomal Peptide Synthetase Genes Determine Peptaibol Synthesis in *Trichoderma Virens*. *Can. J. Microbiol.* **2005**, *51* (5), 423–429.
- (144) Ayers, S.; Ehrmann, B. M.; Adcock, A. F.; Kroll, D. J.; Carcache de Blanco, E. J.; Shen, Q.; Swanson, S. M.; Falkinham, J. O.; Wani, M. C.; Mitchell, S. M.; et al. Peptaibols from Two Unidentified Fungi of the Order Hypocreales with Cytotoxic, Antibiotic, and Anthelmintic Activities. *J. Pept. Sci.* **2012**, *18* (8), 500–510.
- (145) Reiber, K.; Neuhoﬀ, T.; Ozegowski, J. H.; Döhren, H. von; Schwecke, T. A Nonribosomal Peptide Synthetase Involved in the Biosynthesis of Ampullosporins in *Sepedonium Ampullosporum*. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9* (11-12), 701–713.
- (146) Kropacheva, T. N.; Salnikov, E. S.; Nguyen, H.-H.; Reissmann, S.; Yakimenko, Z. A.; Tagaev, A. A.; Ovchinnikova, T. V.; Raap, J. Membrane Association and Activity of

- 15/16-Membered Peptide Antibiotics: Zervamicin IIB, Ampullosporin A and Antiamoebin I. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2005**, *1715* (1), 6–18.
- (147) Chugh, J. K.; Wallace, B. A. Peptaibols: Models for Ion Channels. *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29* (Pt 4), 565–570.
- (148) Sansom, M. S. P. Alamethicin and Related Peptaibols — Model Ion Channels. *Eur. Biophys. J.* **1993**, *22* (2), 105–124.
- (149) Vedovato, N.; Baldini, C.; Toniolo, C.; Rispoli, G. Pore-Forming Properties of Alamethicin F50/5 Inserted in a Biological Membrane. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4* (6), 1338–1346.
- (150) Aquila, M.; Benedusi, M.; Koch, K.-W.; Dell’Orco, D.; Rispoli, G. Divalent Cations Modulate Membrane Binding and Pore Formation of a Potent Antibiotic Peptide Analog of Alamethicin. *Cell Calcium* **2013**, *53* (3), 180–186.
- (151) Dittmer, J.; Thøgersen, L.; Underhaug, J.; Bertelsen, K.; Vosegaard, T.; Pedersen, J. M.; Schiøtt, B.; Tajkhorshid, E.; Skrydstrup, T.; Nielsen, N. C. Incorporation of Antimicrobial Peptides into Membranes: A Combined Liquid-State NMR and Molecular Dynamics Study of Alamethicin in DMPC/DHPC Bicelles. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (19), 6928–6937.
- (152) Whitmore, L.; Chugh, J. K.; Snook, C. F.; Wallace, B. A. The Peptaibol Database: A Sequence and Structure Resource. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9* (11-12), 663–665.
- (153) Sato, H.; Feix, J. B. Peptide–membrane Interactions and Mechanisms of Membrane Destruction by Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2006**, *1758* (9), 1245–1256.
- (154) Chen, F.-Y.; Lee, M.-T.; Huang, H. W. Sigmoidal Concentration Dependence of Antimicrobial Peptide Activities: A Case Study on Alamethicin. *Biophys. J.* **2002**, *82* (2), 908–914.
- (155) Epanand, R. M.; Shai, Y.; Segrest, J. P.; Anantharamiah, G. M. Mechanisms for the Modulation of Membrane Bilayer Properties by Amphipathic Helical Peptides. *Biopolymers* **1995**, *37* (5), 319–338.
- (156) Brogden, K. A. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (3), 238–250.
- (157) Yang, L.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Ding, L.; Huang, H. W. Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophys. J.* **2001**, *81* (3), 1475–1485.
- (158) Matsuzaki, K.; Murase, O.; Fujii, N.; Miyajima, K. Translocation of a Channel-Forming Antimicrobial Peptide, Magainin 2, across Lipid Bilayers by Forming a Pore. *Biochemistry (Mosc.)* **1995**, *34* (19), 6521–6526.
- (159) Steiner, H.; Andreu, D.; Merrifield, R. B. Binding and Action of Cecropin and Cecropin Analogues: Antibacterial Peptides from Insects. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *939* (2), 260–266.
- (160) Hung, K.; Harris, P. W. R.; Brimble, M. A. Synthesis of the Peptaibol Framework of the Anticancer Agent Culicinin D: Stereochemical Assignment of the AHMOD Moiety. *Org. Lett.* **2012**, *14* (22), 5784–5787.
- (161) Mařha, V.; Jegorov, A.; Kiess, M.; Brückner, H. Morphological Alterations Accompanying the Effect of Peptaibiotics, α -Aminoisobutyric Acid-Rich Secondary Metabolites of Filamentous Fungi, on *Culex pipiens* Larvae. *Tissue Cell* **1992**, *24* (4), 559–564.
- (162) Yun, B.-S.; Yoo, I.-D.; Kim, Y. H.; Kim, Y.-S.; Lee, S.-J.; Kim, K.-S.; Yeo, W.-H. Peptavirins A and B, Two New Antiviral Peptaibols against TMV Infection. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (9), 1429–1431.

- (163) De Zotti, M.; Biondi, B.; Peggion, C.; Park, Y.; Hahm, K.-S.; Formaggio, F.; Toniolo, C. Synthesis, Preferred Conformation, Protease Stability, and Membrane Activity of Heptaibin, a Medium-Length Peptaibiotic. *J. Pept. Sci.* **2011**, *17* (8), 585–594.
- (164) Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Haber, H.; Seydel, J. K.; Krause, E.; Bienert, M.; Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Albericio, F. Stepwise Automated Solid Phase Synthesis of Naturally Occurring Peptaibols Using Fmoc Amino Acid Fluorides. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (2), 405–410.
- (165) Theis, C.; Degenkolb, T.; Brückner, H. Studies on the Selective Trifluoroacetylytic Scission of Native Peptaibols and Model Peptides Using HPLC and ESI-CID-MS. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5* (11), 2337–2355.
- (166) Fischer, P. M. Diketopiperazines in Peptide and Combinatorial Chemistry. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9* (1), 9–35.
- (167) Nelissen, J.; Nuyts, K.; De Zotti, M.; Lavigne, R.; Lamberigts, C.; De Borggraeve, W. M. Total Synthesis of Septocylindrin B and C-Terminus Modified Analogues. *PLoS ONE* **2012**, *7* (12).
- (168) Peggion, C.; Coin, I.; Toniolo, C. Total Synthesis in Solution of Alamethicin F50/5 by an Easily Tunable Segment Condensation Approach. *Pept. Sci.* **2004**, *76* (6), 485–493.
- (169) Bertelsen, K.; Pedersen, J. M.; Rasmussen, B. S.; Skrydstrup, T.; Nielsen, N. C.; Vosegaard, T. Membrane-Bound Conformation of Peptaibols with Methyl-Deuterated α -Amino Isobutyric Acids by 2H Magic Angle Spinning Solid-State NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (47), 14717–14723.
- (170) Carpino, L. A.; El-Faham, A. Tetramethylfluoroformamidinium Hexafluorophosphate: A Rapid-Acting Peptide Coupling Reagent for Solution and Solid Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (19), 5401–5402.
- (171) Hjörtinggaard, C. U.; Pedersen, J. M.; Vosegaard, T.; Nielsen, N. C.; Skrydstrup, T. An Automatic Solid-Phase Synthesis of Peptaibols. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (3), 1329–1332.
- (172) Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion[1]. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15* (37), 9394–9403.
- (173) Subirós-Funosas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. Use of Oxyma as pH Modulatory Agent to Be Used in the Prevention of Base-Driven Side Reactions and Its Effect on 2-Chlorotriyl Chloride Resin. *Pept. Sci.* **2012**, *98* (2), 89–97.
- (174) Berg, A.; Ritzau, M.; Ihn, W.; Schlegel, B.; Fleck, W. F.; Heinze, S.; Grafe, U. Isolation and Structure of Bergofungin, a New Antifungal Peptaibol from *Emericellopsis Donezkii* HKI 0059. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1996**, *49* (8), 817–820.
- (175) Bunkóczi, G.; Schiell, M.; Vértesy, L.; Sheldrick, G. M. Crystal Structures of Cephaibols. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9* (11-12), 745–752.
- (176) Karle, I. L.; Perozzo, M. A.; Mishra, V. K.; Balaram, P. Crystal Structure of the Channel-Forming Polypeptide Antiamoebin in a Membrane-Mimetic Environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95* (10), 5501–5504.
- (177) Benedetti, E.; Bavoso, A.; Di Blasio, B.; Pavone, V.; Pedone, C.; Toniolo, C.; Bonora, G. M. Peptaibol Antibiotics: A Study on the Helical Structure of the 2-9 Sequence of Emerimicins III and IV. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1982**, *79* (24), 7951–7954.
- (178) De Zotti, M.; Biondi, B.; Peggion, C.; Park, Y.; Hahm, K.-S.; Formaggio, F.; Toniolo, C. Synthesis, Preferred Conformation, Protease Stability, and Membrane Activity of Heptaibin, a Medium-Length Peptaibiotic. *J. Pept. Sci.* **2011**, *17* (8), 585–594.

- (179) Gessmann, R.; Axford, D.; Evans, G.; Brückner, H.; Petratos, K. The Crystal Structure of Samarosporin I at Atomic Resolution. *J. Pept. Sci.* **2012**, *18* (11), 678–684.
- (180) Sasaki, K.; Minato, H.; Katagiri, K.; Hayakawa, S.; Matsushima, T. TILBELLIN, A NEW ANTIBIOTIC FROM STILBELLA SP. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1971**, *24* (1), 67–68.
- (181) Tonlolo, C.; Benedetti, E. The Polypeptide 310-Helix. *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 350–353.
- (182) Peter Tieleman, D.; Berendsen, H. J. C.; Sansom, M. S. P. An Alamethicin Channel in a Lipid Bilayer: Molecular Dynamics Simulations. *Biophys. J.* **1999**, *76* (4), 1757–1769.
- (183) Tieleman, D. P.; Hess, B.; Sansom, M. S. P. Analysis and Evaluation of Channel Models: Simulations of Alamethicin. *Biophys. J.* **2002**, *83* (5), 2393–2407.
- (184) Chan-Seng, D.; Lutz, J.-F. Primary Structure Control of Oligomers Based on Natural and Synthetic Building Blocks. *ACS Macro Lett.* **2014**, *3* (3), 291–294.
- (185) Fox, R. O.; Richards, F. M. A Voltage-Gated Ion Channel Model Inferred from the Crystal Structure of Alamethicin at 1.5-Å Resolution. *Nature* **1982**, *300* (5890), 325–330.
- (186) Yin, N. Enhancing the Oral Bioavailability of Peptide Drugs by Using Chemical Modification and Other Approaches. *Med. Chem.* **2014**.
- (187) Goldberg, M.; Gomez-Orellana, I. Challenges for the Oral Delivery of Macromolecules. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2* (4), 289–295.
- (188) Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. The Future of Peptide-Based Drugs. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81* (1), 136–147.
- (189) Kipnes, M.; Dandona, P.; Tripathy, D.; Still, J. G.; Kosutic, G. Control of Postprandial Plasma Glucose by an Oral Insulin Product (HIM2) in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2003**, *26* (2), 421–426.
- (190) Yang, P.; Wu, F.-G.; Chen, Z. Dependence of Alamethicin Membrane Orientation on the Solution Concentration. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (7), 3358–3365.
- (191) Maisch, D.; Wadhvani, P.; Afonin, S.; Böttcher, C.; Koksche, B.; Ulrich, A. S. Chemical Labeling Strategy with (R)- and (S)-Trifluoromethylalanine for Solid State ¹⁹F NMR Analysis of Peptaibols in Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (43), 15596–15597.
- (192) Peggion, C.; Biondi, B.; Battistella, C.; De Zotti, M.; Oancea, S.; Formaggio, F.; Toniolo, C. Spectroscopically Labeled Peptaibiotics. Synthesis and Properties of Selected Trichogin GA IV Analogs Bearing a Side-Chain-Monofluorinated Aromatic Amino Acid for ¹⁹F-NMR Analysis. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10* (5), 904–919.
- (193) De Zotti, M.; Ballano, G.; Jost, M.; Salnikov, E. S.; Bechinger, B.; Oancea, S.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Formaggio, F. Solution Synthesis, Conformational Analysis, and Antimicrobial Activity of Three Alamethicin F50/5 Analogs Bearing a Trifluoroacetyl Label. *Chem. Biodivers.* **2014**, *11* (8), 1163–1191.
- (194) Zanda, M. Trifluoromethyl Group: An Effective Xenobiotic Function for Peptide Backbone Modification. *New J. Chem.* **2004**, *28* (12), 1401–1411.
- (195) Rinehart, K. L.; Gloer, J. B.; Hughes, R. G.; Renis, H. E.; McGovren, J. P.; Swynenberg, E. B.; Stringfellow, D. A.; Kuentzel, S. L.; Li, L. H. Didemnins: Antiviral and Antitumor Depsipeptides from a Caribbean Tunicate. *Science* **1981**, *212* (4497), 933–935.
- (196) Rinehart, K. L.; Gloer, J. B.; Cook, J. C.; Mizesak, S. A.; Scahill, T. A. Structures of the Didemnins, Antiviral and Cytotoxic Depsipeptides from a Caribbean Tunicate. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (7), 1857–1859.

- (197) Lee, J.; Currano, J. N.; Carroll, P. J.; Joullié, M. M. Didemnins, Tamandarins and Related Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (3), 404–424.
- (198) Vervoort, H.; Fenical, W.; Epifanio, R. de A. Tamandarins A and B: New Cytotoxic Depsipeptides from a Brazilian Ascidian of the Family Didemnidae. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (3), 782–792.
- (199) Tsukimoto, M.; Nagaoka, M.; Shishido, Y.; Fujimoto, J.; Nishisaka, F.; Matsumoto, S.; Harunari, E.; Imada, C.; Matsuzaki, T. Bacterial Production of the Tunicate-Derived Antitumor Cyclic Depsipeptide Didemnin B. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (11), 2329–2331.
- (200) Xu, Y.; Kersten, R. D.; Nam, S.-J.; Lu, L.; Al-Suwailem, A. M.; Zheng, H.; Fenical, W.; Dorrestein, P. C.; Moore, B. S.; Qian, P.-Y. Bacterial Biosynthesis and Maturation of the Didemnin Anti-Cancer Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (20), 8625–8632.
- (201) Vervoort, H.; Fenical, W.; Epifanio, R. de A. Tamandarins A and B: New Cytotoxic Depsipeptides from a Brazilian Ascidian of the Family Didemnidae. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (3), 782–792.
- (202) Jiang, T. L.; Liu, R. H.; Salmon, S. E. Antitumor Activity of Didemnin B in the Human Tumor Stem Cell Assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1983**, *11* (1), 1–4.
- (203) Depenbrock, H.; Peter, R.; Faircloth, G. T.; Manzanares, I.; Jimeno, J.; Hanauske, A. R. In Vitro Activity of Aplidine, a New Marine-Derived Anti-Cancer Compound, on Freshly Explanted Clonogenic Human Tumour Cells and Haematopoietic Precursor Cells. *Br. J. Cancer* **1998**, *78* (6), 739–744.
- (204) Vera, M. D.; Joullié, M. M. Natural Products as Probes of Cell Biology: 20 Years of Didemnin Research. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22* (2), 102–145.
- (205) Muñoz-Alonso, M. J.; González-Santiago, L.; Zarich, N.; Martínez, T.; Alvarez, E.; Rojas, J. M.; Muñoz, A. Plitidepsin Has a Dual Effect Inhibiting Cell Cycle and Inducing Apoptosis via Rac1/c-Jun NH2-Terminal Kinase Activation in Human Melanoma Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *324* (3), 1093–1101.
- (206) Caers, J.; Menu, E.; De Raeve, H.; Lepage, D.; Van Valckenborgh, E.; Van Camp, B.; Alvarez, E.; Vanderkerken, K. Antitumour and Antiangiogenic Effects of Aplidin® in the 5TMM Syngeneic Models of Multiple Myeloma. *Br. J. Cancer* **2008**, *98* (12), 1966–1974.
- (207) Livett, B. G.; Gayler, K. R.; Khalil, Z. Drugs from the Sea: Conopeptides as Potential Therapeutics. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11* (13), 1715–1723.
- (208) Urdiales, J. L.; Morata, P.; Núñez De Castro, I.; Sánchez-Jiménez, F. Antiproliferative Effect of Dehydrodidemnin B (DDB), a Depsipeptide Isolated from Mediterranean Tunicates. *Cancer Lett.* **1996**, *102* (1-2), 31–37.
- (209) Liang, B.; Richard, D. J.; Portonovo, P. S.; Joullié, M. M. Total Syntheses and Biological Investigations of Tamandarins A and B and Tamandarin A Analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (19), 4469–4474.
- (210) Cárdenas, F.; Thormann, M.; Feliz, M.; Caba, J.-M.; Lloyd-Williams, P.; Giralt, E. Conformational Analysis of Dehydrodidemnin B (Aplidine) by NMR Spectroscopy and Molecular Mechanics/Dynamics Calculations. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (13), 4580–4584.
- (211) Hossain, M. B.; Van Der Helm, D.; Antel, J.; Sheldrick, G. M.; Sanduja, S. K.; Weinheimer, A. J. Crystal and Molecular Structure of Didemnin B, an Antiviral and Cytotoxic Depsipeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85* (12), 4118–4122.
- (212) Vera, M. D.; Joullié, M. M. Natural Products as Probes of Cell Biology: 20 Years of Didemnin Research. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22* (2), 102–145.

- (213) Ding, X.; Vera, M. D.; Liang, B.; Zhao, Y.; Leonard, M. S.; Joullié, M. M. Structure–activity Relationships of Side-Chain Modified Didemnins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (2), 231–234.
- (214) Liang, B.; Portonovo, P.; Vera, M. D.; Xiao, D.; Joullié, M. M. The First Total Synthesis of (–)-Tamandarin A. *Org. Lett.* **1999**, *1* (8), 1319–1322.
- (215) Joullié, M. M.; Portonovo, P.; Liang, B.; Richard, D. J. Total Synthesis of (–)-Tamandarin B. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (49), 9373–9376.
- (216) Liang, B.; Vera, M. D.; Joullié, M. M. Total Synthesis of [(2S)-Hiv2]Didemnin M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (15), 4762–4765.
- (217) Schmidt, U.; Griesser, H.; Haas, G.; Kroner, M.; Riedl, B.; Schumacher, A.; Sutoris, F.; Haupt, A.; Emling, F. Synthesis and Cytostatic Activities of Didemnin Derivatives*. *J. Pept. Res.* **1999**, *54* (2), 146–161.
- (218) Sakai, R.; Rinehart, K. L.; Kishore, V.; Kundu, B.; Faircloth, G.; Gloer, J. B.; Carney, J. R.; Namikoshi, M.; Sun, F.; Hughes, et al. Structure–Activity Relationships of the Didemnins_{1,2}. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (14), 2819–2834.
- (219) Mayer, S. C.; Pfizenmayer, A. J.; Joullié, M. M. Synthetic Routes to a Constrained Ring Analog of Didemnin B. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (5), 1655–1664.
- (220) Adrio, J.; Cuevas, C.; Manzanares, I.; Joullié, M. M. Synthesis and Biological Evaluation of Tamandarin B Analogues. *Org. Lett.* **2006**, *8* (3), 511–514.
- (221) Lassen, K. M.; Lee, J.; Joullie, M. M. Synthetic Studies of Tamandarin B Side Chain Analogues. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (9), 3027–3036.
- (222) El-Faham, A.; Funosas, R. S.; Prohens, R.; Albericio, F. COMU: A Safer and More Effective Replacement for Benzotriazole-Based Uronium Coupling Reagents. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15* (37), 9404–9416.
- (223) Denizot, F.; Lang, R. Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival. Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reliability. *J. Immunol. Methods* **1986**, *89* (2), 271–277.
- (224) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1-2), 55–63.
- (225) Thippeswamy, H. S.; Sood, S. K.; Venkateswarlu, R.; Raj, I. Membranes of Five-Fold Alamethicin-resistant *Staphylococcus Aureus*, *Enterococcus Faecalis* and *Bacillus Cereus* Show Decreased Interactions with Alamethicin due to Changes in Membrane Fluidity and Surface Charge. *Ann. Microbiol.* **2009**, *59* (3), 593–601.

Curriculum Vitæ

BEN HAJ SALAH Khoubaib

Ph.D. Msc., Molecular engineering

Experience

Oct. 2015 – Present	Postdoctoral Researcher. Design, synthesis and pharmacological characterization of functional selective ghrelin receptor ligands: Toward a new generation of anti-obesity and/or anti addictive compounds. Post-doctoral project in IBMM Lab-Montpellier, under supervision of DR Jean-Alain Fehrentz
Oct. 2012 – Sept. 2015	<i>Ph.D Molecular engineering at The University of Montpellier.</i> “Design, synthesis and Self-assembling of peptaibols with applications as antibacterial agents”. “How does the 1,2,3-triazole amide bond mimetic influences the secondary structure of peptides and biological activity? Case study on Peptaibols”. “Total Synthesis and Biological Evaluation of Tamandarin B anti-cancer Marine Cyclodepsipeptide and Analogs”. <i>Ph.D</i> project in CRIOBE Lab-Perpignan France, under supervision of Prof. Nicolas Inguibert and Bernard Banaigs
Jan. 2012 – July 2012	Internship. “Synthesis of α -trifluoromethyl α -amino acids and applications in Asymmetric Organocatalysis” Internship realized at LCB (Ex SOSCO) Neuville-sur-Oise (France) under the supervision of Prof. Thierry Brigaud and Julien Pytkowicz
Apr. 2011 – July 2011	Internship. “Synthesis of trifluoromethylated analogs of the neuroprotective tripeptide Gly-Pro-Glu (GPE)” Internship realized at LCB (Ex SOSCO) Neuville-sur-Oise (France) under the supervision of Prof. Thierry Brigaud and Grégory Chaume

Education

2012 – 2015	Doctor of Philosophy (PhD), Molecular Engineering University of Montpellier (France)
2010 – 2012	Master's degree in Fine Chemicals, Cergy-Pontoise University (France)
2009 – 2010	Bachelor's degree in Chemistry, Cergy-Pontoise University (France)
2004 – 2007	Technician's Diploma in Fine Chemicals, University of Monastir (Tunisia)

Skills and Techniques

Multistep organic synthetic chemistry: Total synthesis of bioactive peptides and depsipeptides, Solution and Solid-Phase of Peptides Synthesis, Click chemistry, Organocatalysis, Asymmetric synthesis, Heterocyclic chemistry, Small scale reactions (below 100 mg), follow-up of biological activities.

Main analytical techniques: NMR, RP-HPLC, HPLC-ELSD, Preparative HPLC, LC-MS, optical rotation, IR.

Skills in drug design: course in Drug Design (Cergy-Pontoise University, France).

Supervision of students: BSc to MSc.

I.T. systems: Familiar with most office software suites (Microsoft Office, Open Office, etc.), chemical software (ChemDraw, Chem Schaech). Experience in using web-based databases (Scifinder, Reaxys...), Experience in using Varian RMN JEOL software and MestreNova.

Languages: Arabic (native), French (bilingual proficiency), English (good reading and oral comprehension).

Scientific output

Publications:

(1) **Ben Haj Salah, K.**; Inguibert, N. Efficient Microwave-Assisted One Shot Synthesis of Peptaibols Using Inexpensive Coupling Reagents. *Org. Lett.* **2014**, *16* (6), 1783–1785.

(2) **Ben Haj Salah, K.**; Legrand, B.; Das, S.; Martinez, J.; Inguibert, N. Straightforward Strategy to Substitute Amide Bonds by 1,2,3-Triazoles in Peptaibols Analogs Using Aib ψ [Tz]-Xaa Dipeptides. *Pept. Sci.* **2015**, *104* (5), 611–621.

(3) Fanelli, R.; **Ben Haj Salah, K.**; Inguibert, N.; Didierjean, C.; Martinez, J.; Cavelier, F. Access to α,α -Disubstituted Disilylated Amino Acids and Their Use in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Org. Lett.* **2015**, *17* (18), 4498–4501.

(4) Van Bohemen, A.-I.; Zalouk-Vergnoux, A.; Poirier, L.; Phuong, N. N.; Inguibert, N.; **Ben Haj Salah, K.**; Ruiz, N.; Pouchus, Y. F. Development and Validation of LC–MS Methods for Peptaibol Quantification in Fungal Extracts according to Their Lengths. *J. Chromatogr. B* **2016**, *1009–1010*, 25–33.

Oral Communications:

- (5) Influence of The Replacement of Amide bond by Its 1,2,3-triazole surrogates on Alamethecin F50/5 And Bergofungin D conformation. Peptides in Paris Symposium. PIPS 2014. 5-8 October **2014**.
- (6) How does the 1,2,3-triazole amide bond mimetic influences the secondary structure of peptides? Case study on peptaibols. 19th GFPP Congress of the (GFPP). Portbail, France. 17-22 May **2015**.

Posters:

- (7) De Novo Design of antimicrobial peptide, and Small Molecules containing a combination of Triazole amino acid and Aib. 21st young research Fellow meeting March 24-25, **2014** CRDP Montpellier France.
- (8) Synthesis and Applications of New Trifluoromethylprolinamide Based Organocatalysts. 4th International Symposium on Organofluorine Compounds in Biomedical, Organic Materials and Agriculture Sciences (“Bordeaux Fluorine Days”) from 6-10 July **2014**, Bordeaux France.
- (9) Synthesis and Applications of New Trifluoromethylprolinamide Based Organocatalysts. 33rd European Peptide Symposium in Sofia, Bulgaria between 31st of August and 5th of September **2014**.
- (10) Influence of The Replacement of Amide bond by Its 1,2,3-triazole surrogates on Alamethecin F50/5 And Bergofungin D conformation. 33rd European Peptide Symposium in Sofia, Bulgaria between 31st of August and 5th of September 2014.
- (11) 1,4-disubstituted-1,2,3-triazole as a surrogate of amide bond, myths or reality? Impact of such replacement on the conformation of Peptaibols. The Second International Congress of Natural Products and biocontrol 24-26 of September 2014, Perpignan France.

RESUME : La réaction de cycloaddition entre un azoture et un alcyne catalysée par le cuivre (I) (CuAAC) pour former un 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué est très utilisée dans de nombreux domaines de la chimie. Cette réaction a très vite été utilisée en synthèse peptidique notamment du fait du caractère isostère du noyau triazole et de la liaison amide. Toute fois l'impact de l'insertion d'un triazole sur la structure secondaire de peptides n'a été que faiblement exploré. Ainsi, pour étudier l'effet d'un tel remplacement nous avons choisi deux peptides modèles structurés le premier modèle est un peptide linéaire de la famille des peptaibols et le second est un peptide cyclique la tamandarine B.

Dans un premier temps, nous avons optimisé une voie de synthèse de peptaibols que nous avons appliqué à l'alaméthicine F50/5 et à un analogue de la bergofungine D. Pour cela, nous avons utilisé une synthèse peptidique en phase solide sous irradiation micro-ondes en profitant d'un cocktail de réactifs efficaces contenant du diisopropylcarbodiimide comme agent de couplage et de l'oxyma. Cette méthode de synthèse a été étendue à l'obtention d'analogues silylés de l'alaméthicine en substituant dans différentes positions l'acide aminobutyrique par un résidu hydrophobe et encombré : la bis-triethylsilyl-dipropylglycine (TES-Dpg).

Dans la deuxième partie nous avons développé la synthèse de dipeptides à motif triazole. Puis nous avons défini les conditions réactionnelles nécessaires pour leur utilisation en SPPS et synthétisé des peptides contenant plusieurs motifs triazoles. Ces dipeptides ont ensuite été utilisés pour réaliser un scan triazole sur les deux peptaibols modèles. Les études structurales par dichroïsme circulaire, RMN et les tests biologiques de différents analogues nous permettent de conclure que le triazole affecte la structure secondaire des peptaibols et par conséquent induit une perte d'activité. Ainsi il apparaît que le concept de triazole comme isostère de la liaison peptidique doit être employé avec prudence.

Dans l'optique de comprendre l'impact de triazole sur l'activité et la structure secondaire de peptides cycliques, nous avons généré des analogues simplifiés de la tamandarine B un depsipeptide cyclique d'origine marine. Nous rapportons les résultats préliminaires de cette étude.

Mots clés : Triazole ; Peptidomimétique; Peptaibols; Tamandarine B; Structure secondaire

ABSTRACT: The cycloaddition reaction between an azide and an alkyne catalyzed by copper (I) (CuAAC) to form a 1,2,3-triazole 1,4-disubstituted is widely used in many areas of chemistry. This reaction was rapidly used in peptide synthesis because of the isosteric nature between the triazole ring and the amide bond. However, impact of the insertion of a triazole on the secondary structure of peptides was only scarcely explored. Thus, to study the effect of such a replacement we chose two models of structured peptides. The first models are linear peptides of the peptaibols family and the second is the cyclic peptide tamandarin B.

First, we have optimized a peptaibols synthesis that was applied to alamethicin F50 / 5 and to an analog of bergofungin D. For this we used a solid phase peptide synthesis under microwave irradiation taking advantage of the efficient cocktail consisting of diisopropylcarbodiimide as a coupling agent and Oxyma. This synthesis has been extended to silylated analogues of alamethicin by substituting in different positions the aminobutyric acid by the hydrophobic and crowded residue: bis-triethylsilyl-dipropylglycine (Dpg-TES).

In the second part we have developed the synthesis of dipeptides containing a triazole motif. Then we defined the reaction conditions necessary for their use in SPPS and synthesized peptides containing several triazoles rings. These dipeptides were then used to perform a triazole scan on the two peptaibols models. The structural studies by circular dichroism, NMR and biological tests of various analogs allow us to conclude that the triazole affect the secondary structure of peptaibols and consequently induces a loss of activity. Thus it appears that the concept of triazole as isosteric of the peptide bond should be used with caution.

In order to understand the triazole impact on the activity and the secondary structure of cyclic peptides, we generated simplified cyclic analogues of tamandarin B a depsipeptide of marine origin. We report the preliminary results of this study.

Key words: Triazole; Peptidomimetic; Peptaibols; Tamandarine B; Secondary structure