



HAL
open science

Reconnaissance de surfaces de protéines par les foldamères d'oligoamides aromatiques

Maëlle Vallade

► **To cite this version:**

Maëlle Vallade. Reconnaissance de surfaces de protéines par les foldamères d'oligoamides aromatiques. Chimie organique. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0145 . tel-01452513

HAL Id: tel-01452513

<https://theses.hal.science/tel-01452513>

Submitted on 2 Feb 2017

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 PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ CHIMIE ORGANIQUE

Par Maëlle VALLADE

**RECONNAISSANCE DE SURFACES DE PROTEINES PAR
LES FOLDAMERES D'OLIGOAMIDES AROMATIQUES**

Sous la direction de : Ivan HUC

Soutenue le 29 septembre 2016

Membres du jury :

M. David AITKEN, Professeur, Université Paris Sud,
M^{me} Muriel AMBLARD, Directeur de Recherches CNRS, Université de Montpellier,
M. Claude TAILLEFUMIER, Professeur, Université de Clermond-Ferrand,
M. Ivan HUC, Directeur de Recherche CNRS, Université de Bordeaux,
M^{me} Lucile FISCHER, Chargée de Recherche CNRS, Université de Bordeaux,

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

A ma famille,

REMERCIEMENTS

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail : Muriel Amblard et Claude Taillefumier ainsi que David Aitken pour avoir accepté de présider.

J'adresse un remerciement particulier à Ivan Huc pour m'avoir permis de rejoindre son groupe. Je le remercie pour ses discussions et très précieux conseils durant ces trois années. Au-delà du riche aspect scientifique et de l'apprentissage c'est également une découverte de cultures et d'autres façons d'aborder les sciences que j'ai eu la possibilité de découvrir dans ce groupe international.

Je tiens à remercier Lucile qui m'a aidé à retranscrire cette belle thèse et sans qui le rendu de ce manuscrit aurait été moindre.

Je remercie évidemment tous les membres du laboratoire que j'ai eu la chance de rencontrer et qui en plus de leur agréable compagnie, n'ont jamais été avare en précieux conseils. Je tiens à les remercier sincèrement car sans leur aide, les projets n'auraient pas avancé de la sorte. Je cite plus particulièrement Soumen, Simon, Mike, Christos, Cinzia, Michal, Xiaobo, Valentina. Je remercie Yann pour ses conseils avisés et sans qui cette thèse aurait probablement pris une autre tournure.

J'ai eu la chance de travailler sur un sujet pluridisciplinaire, rendant chaque étape différente et toujours plus attrayante. Je remercie tous mes collaborateurs, Cameron Mackereth, Kattel Bathany Jean-Marie Schmitter. Béatrice Langlois d'Estaintot et Thierry Granier, pour leur disponibilité, pour m'avoir enseigné les bases de la cristallographie et de la résolution de structure. Je remercie ceux qui ont contribué à ces travaux d'un peu plus loin : Estelle Morvan, toujours là pour m'aider avec la RMN, ainsi qu'Axelle Grélard. Loïc et Frédéric Rosu, pour les expériences de masse ; Brice Kauffman, pour avoir pris le temps de répondre à mes questions.

Un merci un peu plus spécial pour mes compagnons de route qui sont devenus des amis. Simon, Rémi, pour votre soutien, votre présence et pour m'avoir, souvent, ouvert les yeux. Antoine (le petit, désolée, mais tu es grand d'esprit alors ça compense), ta compagnie a toujours rendu agréable l'ambiance au laboratoire. Même si nous sommes tous les deux bien loin de la bonne humeur inébranlable d'Antoine (le grand cette fois). Les filles, avec j'aurai bien partagé l'aventure un peu plus longtemps. Camille et Julie, qui sait, je serai peut-être encore en train de chercher l'eau distillée sans toi ! Nilson, Christos, Mike, la fine équipe. Merci pour ces bons moments à vos côtés et ce qu'on a pu partager. Merci Rich pour ta bonne humeur, ta présence

et ton soutien. Pedro, Albano, Joan, Arthur et Eric ont eux aussi contribué à la bonne ambiance durant cette thèse.

Un merci bien particulier à d'autres compagnons de route qui ont rendu l'aventure pimentée. Mes colocs : Lucie, Robin, J-C, Ingrid, Nico et Léo. Mes amis de plus longue date, dont Rachel, sur qui j'ai toujours compté. Thomas, Jérémy, Nico, Caro. Toute la team de Vertige : Hélène, Nico, Oliv, Stéphan, Mélo, Julien, Lucas, Yann-Ma et Florent aussi. C'est une autre aventure que j'ai vécu à vos côtés, merci pour ces évasions.

Finalement, je remercie chaleureusement ma famille, mes parents, Aloïs et je leur dédie ces travaux. Merci pour votre soutien sans faille, quelques soient mes choix.

TABLE DES MATIERES

ABRÉVIATIONS, UNITÉS	1
AVANT-PROPOS	5
CHAPITRE 1 : Architectures moléculaires repliées pour la reconnaissance de surfaces de protéines	9
Introduction	11
PARTIE 1 : Le repliement dans la nature	11
1 A travers deux exemples : l'ADN et les protéines	11
2 Structure secondaire d'une protéine : modes de repliements courants	12
2.1 Hélice α	13
2.2 Feuillet β	13
2.3 Technique d'analyse pour la caractérisation de la structure secondaire des protéines : diagramme de Ramachandran	14
PARTIE 2 : Des architectures repliées artificielles pour mimer la nature .	15
1 Les foldamères, définition.....	15
2 Des foldamères biotiques	16
2.1 Présentation	16
2.2 Des exemples de repliements inspirés de la nature avec des foldamères biotiques ..	16
3 Des foldamères abiotiques aromatiques : d'autres modes de repliement.....	18
3.1 Encombrement stérique	18
3.2 Interactions intermoléculaires.....	19
3.3 Interactions intramoléculaires : exemples avec la formation de mimes de feuillets β	20
3.4 Conformation hélicoïdale avec le motif quinoline	21

3.4.1	Des préférences conformationnelles au sein de la liaison aryl-amide	21
3.4.2	Le motif hélicoïdal	22
3.4.3	Stabilité hélicoïdale	23
3.5	Vers des structures tertiaires et quaternaires	23
PARTIE 3 : La forme hélicoïdale pour la reconnaissance de surfaces de protéines		26
1 Des assemblages de protéines : siège des interactions protéine-protéine (IPP)		26
1.1	Les interactions protéine-protéine (IPP) : définition	26
1.2	Les résidus importants impliqués dans les IPP : les <i>hot spots</i>	26
2 Utilisation de biomolécules : les mini-protéines		27
3 Foldamères peptidomimes : des foldamères aliphatiques, mimes d'hélices α.....		28
3.1	Peptidomimes β -peptidiques.....	28
3.2	Peptides hybrides	29
3.3	Peptides contraints.....	30
3.4	Les peptoïdes	32
4 Des foldamères d'oligoamides aromatiques pour la reconnaissance de surfaces de protéines		34
4.1	Systèmes linéaires mimes d'hélices α	34
4.2	Systèmes à base de quinolines pour de la reconnaissance moléculaire.....	35
4.2.1	Reconnaissance <i>endo</i> de molécules d'intérêt biologique.....	35
4.2.2	Vers de la reconnaissance de surfaces de protéine.....	38
Conclusion.....		39
Références bibliographiques		41
CHAPITRE 2 : Synthèse des oligoquinolines.....		45

Introduction	47
1 Synthèse des monomères quinoline	48
1.1 Monomères fonctionnalisés en position 4	48
1.1.1 Schéma de synthèse général	49
1.1.2 Une chaîne latérale polaire - Q ^{OH}	50
1.1.3 Une autre chaîne polaire - Q ^{Tyr}	51
1.1.4 Une chaîne hydrophobe - Q ^{Hex}	52
1.2 Développement d'un nouveau monomère quinoline fonctionnalisé en position 5 ...	53
2 Synthèse des ligands	55
2.1 Ligand pour HCA : inhibiteur sulfonamide.....	56
2.2 <i>Linker</i> pour l'interleukine 4 (IL-4) et la cyclophiline A (CypA) : disulfure activé...	56
3 Synthèse sur support solide (SPS).....	59
3.1 Choix et intérêt	59
3.2 Synthèse.....	59
3.2.1 Elaboration d'une séquence oligoquinoline Q _n	59
3.2.2 Attachement d'un ligand – clivage de la résine	61
4 Conclusion	63
Références bibliographiques	65
CHAPITRE 3 : HCA comme preuve de concept pour la reconnaissance de surfaces de protéines par les foldamères.....	67
Introduction	69
1 Stratégie.....	72
2 Résultats préliminaires	73
2.1 Conception du ligand.....	74
2.2 Première série de foldamères synthétisés par SPS	75
2.3 Etudes par dichroïsme circulaire	76

2.4	Cristallisation.....	77
3	Conception de nouveaux variants foldamères	79
3.1	Présentation des variants synthétisés	79
3.2	Résultats et discussion	81
3.2.1	Analyses par dichroïsme circulaire	81
3.2.2	Cristallisation	81
3.2.3	Description des structures	82
3.2.3.1	Position 4 du foldamère, variants F11 et F12	82
3.2.3.2	Position 3 du foldamère, variant F13	84
3.2.4	Comparaison des structures entre elles	85
3.2.4.1	Angles de rotation et RMSD	85
3.2.4.2	Sphère de coordination du Zn ²⁺	86
	Conclusion	88
	Références bibliographiques	89
	CHAPITRE 4 : Les foldamères pour la reconnaissance de surfaces de protéines d'intérêt thérapeutique	91
1	Introduction : présentation des protéines cibles	93
1.1	Interleukine 4 (IL-4)	93
1.2	Cyclophiline A (CypA)	94
2	Stratégie et conception	96
2.1	Méthode de <i>tethering</i> TM (Sunesis pharmaceutical).....	98
2.2	Production de mutants de protéines	98
2.2.1	Interleukine-4	99
2.2.2	Cyclophiline A	100
2.3	<i>Design</i> des foldamères.....	101
3	Liaison des foldamères aux mutants protéiques	104

3.1	Expériences d'accrochage et validation de la réaction par LCMS	104
3.2	Validation de la position de liaison des foldamères aux protéines mutées	106
3.3	<i>Screening</i> CD des interactions.....	109
3.4	Purification par HPLC	109
4	Conclusion	111
	Références bibliographiques	113
	CHAPITRE 5 : Cinétique d'inversion d'hélicité, introduction de monomères	
	méthyl pyridine au sein d'une séquence de quinolines.....	115
	Introduction	117
1	Résultats préliminaires	119
1.1	Induction de préférence conformationnelle hélicoïdale	119
1.2	Inversion d'hélicité	120
1.3	Vitesse d'inversion d'hélicité dans les foldamères de quinolines	120
1.4	Le monomère aminométhyl pyridine (P).....	121
2	Conception.....	121
3	Synthèse	124
3.1	Le monomère aminométhyl pyridine P	124
3.2	Synthèse des foldamères PQ par SPS.....	125
4	Etude de la cinétique d'inversion d'hélicité des foldamères PQ.....	126
4.1	Détermination de la concentration des échantillons	126
4.1.1	Détermination du coefficient d'extinction molaire ϵ par quinoline	127
4.1.1.1	Détermination du d_l optimal.....	128
4.1.1.2	Etalon interne.....	128
4.1.2	Courbe d'étalonnage UV.....	129
4.2	Induction d'hélicité dans différents solvants	130
4.3	Analyses.....	131

4.3.1	Spectres	131
4.3.1.1	Dichroïsme circulaire	131
4.3.1.2	RMN	133
4.3.2	Comparaison des spectres CD et RMN.....	135
4.3.3	Détermination des constantes de vitesse et des temps de demi-vie	135
4.4	Séquences contenant deux monomères P consécutifs	136
4.5	Vers la reconnaissance de surfaces de protéines	138
Conclusion		139
Références bibliographiques		141
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		143
PARTIE EXPERIMENTALE		147
1	General Procedures and Materials.....	149
2	Chemical synthesis	150
3	Solid Phase Synthesis of foldamers.....	160
3.1	General Procedure	160
3.2	Attachment of the ligand 55 or linkers 10 and 11 by solid phase synthesis.....	161
3.3	General condition for final acetylation	162
4	Circular dichroism	174
4.1	In the presence of HCA (chapter 3).....	174
4.2	With IL-4 and CypA (chapter 4)	174
4.3	For (PQ) _n foldamers (chapter 5)	174
5	Cocrystallisation of foldamers in the presence of HCA.....	175
6	Data collection and refinement statistics.....	176
References		176

ABRÉVIATIONS, UNITÉS

Ac	acétyle	A
AcOEt ou EtOAc	acétate d'éthyle	
AcOH	acide acétique	
ADN	acide désoxyribonucléique	
aPP	<i>avian pancreatic polypeptide</i>	
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle	B
Boc₂O	dicarbonate de di- <i>tert</i> -butyle	
Calcd	<i>calculated</i>	C
CD	<i>circular dichroism</i> (dichroïsme circulaire)	
CDCl₃	chloroforme deutéré	
CH₃CN	acétonitrile	
CypA	cyclophiline A	
DCM	dichlorométhane	D
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate	
DIEA	diisopropyléthylamine	
DMF	<i>N, N</i> -diméthylformamide	
DMSO(-d₆)	diméthylsulfoxyde (deutééré)	
DTT	dithiotréitol	
ESI	<i>electrospray ionisation</i>	E
EtOH	éthanol	
Ghosez reagent	1-chloro- <i>N,N</i> ,2-triméthyl-1-propenylamine	G
GSH	glutathion réduit	
GSSG	glutathion oxydé	
H₃PO₄	acide ortho phosphorique	H
HCA	<i>human carbonic anhydrase II</i>	
HRMS	<i>high resolution mass spectroscopy</i>	
HCl	acide chlorhydrique	
hDM2	<i>human double minute 2</i>	
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>	
<i>i</i>Bu	isobutoxy	I
IC₅₀	<i>inhibitory concentration</i>	
IL-4	interleukine 4	
Inh	inhibiteur	
IPP	interaction protéine-protéine	
k₁	constante de vitesse	K
K_D	constante de dissociation	
K_i	constante d'inhibition	
LCMS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>	L
LL	<i>long linker</i>	
Me	méthyle	M
MeOH	méthanol	
MS	<i>mass spectroscopy</i>	
NaCl	chlorure de sodium	N
p53	protéine 53	
Pd/C	palladium sur charbon activé	P
PDB	<i>protein data bank</i>	
pH	potentiel hydrogène	
PPh₃	triphénylphosphine	
PyBOP	hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxotripyrrolidinophosphonium	

quant.	quantitatif, <i>quantitative</i>	Q
RMN ou NMR	résonance magnétique nucléaire	R
RMSD	<i>root-mean-square deviation</i>	
SL	<i>short linker</i>	S
SPS	<i>solid phase synthesis</i>	
t. a. ou r. t.	température ambiante	T
t_{1/2}	temps de demi-vie	
TBAF	fluorure de tétra- <i>n</i> -butylammonium	
TFA	acide trifluoroacétique	
TIC	<i>total ion chromatogram</i>	
VIH	virus de l'immunodéficience humaine	V

Nomenclature des acides aminés

Alanine	Ala	A	Leucine	Leu	L
Arginine	Arg	R	Lysine	Lys	K
Asparagine	Asn	N	Méthionine	Met	M
Aspartate	Asp	D	Phénylalanine	Phe	F
Cystéine	Cys	C	Proline	Pro	P
Glutamate	Glu	E	Sérine	Ser	S
Glutamine	Gln	Q	Thréonine	Thr	T
Glycine	Gly	G	Tryptophane	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

Unités

°	degrès (angle)
°C	degrès Celsius
Å	angströms
cm	centimètre
équiv. ou equiv.	équivalent
g	gramme
kDa	kiloDalton
mg	milligramme
MHz	méga hertz
min	minute
mm	millimètre
mmol	milli mole
Mp	<i>melting point</i>
nm	nanomètre
ppm	parties par million
µL	microlitre

AVANT-PROPOS

Dans le but de développer de nouveaux outils pharmacologiques ou agents thérapeutiques, les industriels font face à des objectifs de plus en plus difficiles à cibler. C'est par exemple le cas des interactions protéine-protéine, siège de nombreuses fonctions biologiques telles que la réponse immunitaire, la transduction du signal de la surface de la cellule à son noyau. Des études ont estimé à 650 000 les interactions entre paires de protéines et leur dérèglement peut conduire à des cas pathologiques voire des cancers. C'est pourquoi elles sont des cibles d'intérêt majeur pour l'industrie pharmaceutique. Les complexes de protéines possèdent rarement un site actif bien défini. L'utilisation de petites molécules devient inappropriée pour développer un médicament ciblant de si larges surfaces. C'est pourquoi au cours des dernières décennies, les chimistes se sont tournés vers des molécules de taille moyenne, adoptant des conformations leur permettant d'interagir avec des surfaces protéiques : les foldamères.

L'intérêt de ces molécules est grandissant car elles permettent, sous l'influence d'interactions intramoléculaires non covalentes, de mimer des structures secondaires voire tertiaires et quaternaires retrouvées au sein des protéines. Les foldamères sont capables de mimer l'hélice α et les feuillets β , qui sont les structures secondaires les plus retrouvées, mais aussi d'accéder à des motifs différents, possédant ainsi des propriétés nouvelles et singulières. L'information du repliement est portée par le monomère, qui est la brique constitutive d'un foldamère et les scientifiques s'appliquent à les moduler pour obtenir des structures variées.

Dans un contexte biologique et dans le but de contourner le principal inconvénient des peptides naturels tels qu'une faible stabilité protéolytique, les scientifiques ont apporté des modifications au squelette des foldamères. Ainsi, les peptidomimes ont été développés pour augmenter la stabilité des peptides. Une autre classe de foldamères est formée par les oligomères polyaromatiques et est l'objet d'un intérêt particulier dans le groupe d'I. Huc.

Le groupe a en effet développé une expertise dans la compréhension de ces systèmes afin d'utiliser ces architectures stables et robustes dans un contexte biologique. Les foldamères développés par le groupe ont montré leur potentiel en tant que biomimes puisqu'ils ont la possibilité d'interagir avec un G-quadruplex d'ADN. Ces foldamères ont également permis de réaliser de la reconnaissance moléculaire *endo* avec l'encapsulation sélective du D-fructose. Le cœur des travaux de cette thèse s'intéresse au potentiel des foldamères d'oligoamides aromatiques pour la reconnaissance de surfaces de protéines. Le défi est d'autant plus grand

que ces foldamères et les protéines possèdent des structures chimiques complètement différentes et que leur mode d'interaction est inconnu à ce jour.

Le premier chapitre à caractère bibliographique, abordera le repliement des molécules, qu'elles soient d'origine naturelle ou artificielle. L'accent sera mis sur la façon dont les chimistes se sont inspirés de la nature et notamment des molécules repliées que sont l'ADN et les protéines, pour concevoir des foldamères en vue de la reconnaissance de surfaces de protéines. Le deuxième chapitre s'intéressera plus particulièrement aux foldamères développés dans le groupe d'I. Huc, au travers du travail effectué pour la synthèse des foldamères de quinolines et de leurs briques constitutives. Dans le chapitre 3, l'application de ces foldamères en reconnaissance de surfaces de protéines sera abordée avec l'anhydrase carbonique humaine II qui sert de protéine modèle pour comprendre les mécanismes d'interaction avec une surface protéique. Dans le chapitre 4, des cibles protéiques de plus grand intérêt thérapeutique seront discutées avec l'interleukine 4 et la cyclophiline A. Enfin le chapitre 5 présentera une étude plus fondamentale sur l'introduction de flexibilité dans une hélice à base de quinolines.

Cette thèse est l'aboutissement de trois années de recherche dans le groupe de chimie supramoléculaire biomimétique et thérapeutique dirigé par I. Huc. Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le cadre d'un vaste travail collaboratif d'une dizaine d'années. La distinction sera donc apportée quant à la restitution des efforts de chacun.

CHAPITRE 1 : Architectures moléculaires repliées
pour la reconnaissance de surfaces de protéines

Introduction

Le repliement est un concept primordial, maîtrisé par la nature pour induire certaines fonctions clés de molécules aussi sophistiquées que l'ADN et nous l'aborderons dans ce chapitre. Nous nous attacherons à la compréhension de la structuration d'autres molécules biologiques à travers l'exemple des protéines. Nous verrons ensuite les efforts mis en place par les chercheurs pour mimer la nature afin de mieux la comprendre. L'accent sera porté sur des molécules artificielles, s'auto-arrangeant par le biais d'interactions intramoléculaires : les foldamères. Enfin, nous aborderons des exemples de reconnaissance moléculaire par des molécules synthétiques.

PARTIE 1 : Le repliement dans la nature

1 A travers deux exemples : l'ADN et les protéines

La nature a choisi le repliement des molécules pour contrôler la conformation de ses architectures moléculaires. L'ADN est un exemple de cette machinerie moléculaire contrôlée par le repliement. C'est un polymère, constitué de deux brins construits à partir de nucléotides (4 bases nucléiques, un ose et un groupe phosphate). L'arrangement de ces brins forme une double hélice qui est la clé du stockage de l'information génétique.¹ L'hélice est organisée *via* des interactions π entre les acides nucléiques et des liaisons hydrogène intramoléculaires. (Figure 1)

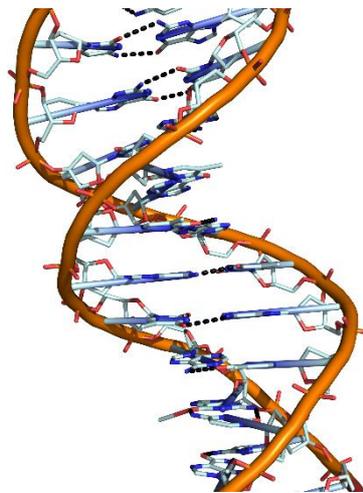


Figure 1. Interactions au sein de la double hélice d'ADN. Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés noirs.

Pour un autre exemple, les protéines sont au centre de toutes les fonctions cellulaires de chaque être vivant. Elles sont des milliers mais leur point commun est d'être construites à partir d'une vingtaine d'acides aminés naturels seulement. Ceux-ci sont capables de se replier sur eux-mêmes pour adopter une multitude de conformations spécifiques et compactes. C'est leur arrangement qui va conduire à la définition des propriétés caractéristiques de chaque protéine.

La séquence de ces acides aminés, liés les uns aux autres par le biais de liaisons peptidiques, forme la structure primaire de la protéine. L'organisation particulière des chaînes polypeptidiques constitue la structure secondaire de la protéine et se présente sous forme d'hélices α , feuillets β ou encore coudes. Ces chaînes repliées s'auto-arrangent en trois dimensions pour former la structure tertiaire des protéines. L'association de plusieurs peptides dans un complexe multimérique peut former la structure quaternaire (Figure 2).

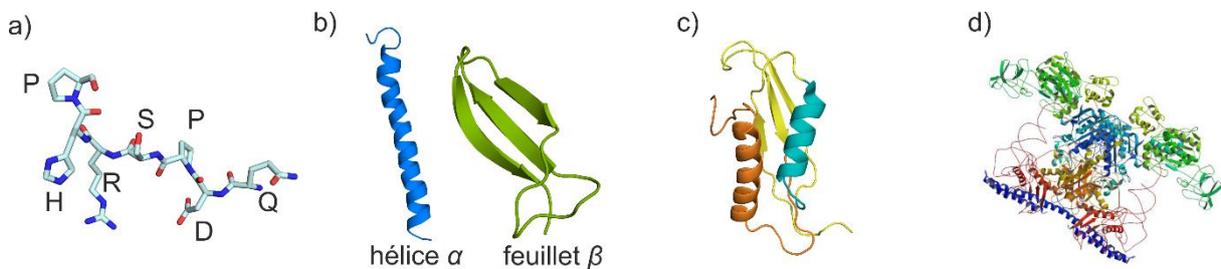


Figure 2. Structurations d'une protéine. a) Séquence primaire d'acides aminés. b) Structure secondaire : représentation d'une hélice α et d'un feuillet β . c) Repliement en structure tertiaire. d) Structure cristallographique de la phénylalanine ARNt synthétase (PDB = 1E1Y), arrangement en structure quaternaire.

2 Structure secondaire d'une protéine : modes de repliements courants

Le repliement d'une protéine en structure secondaire est dirigé par les atomes du squelette peptidique et des chaînes latérales des acides aminés qui forment des liaisons non covalentes. Parmi elles, on trouve les liaisons hydrogène intramoléculaires, les forces électrostatiques, les liaisons de Van Der Waals ou encore les effets hydrophobes.² Les deux formes majoritaires de la structure secondaire d'une protéine sont des structures périodiques : l'hélice α et les feuillets β ;³ le reste de la molécule étant les coudes et des brins statistiques. Dans cette section, nous allons aborder les forces qui favorisent l'organisation de ces structures secondaires majoritaires.

2.1 Hélice α

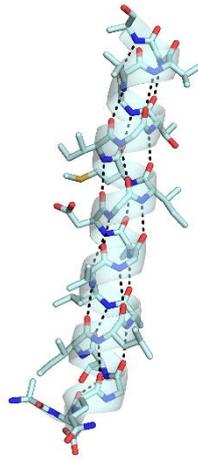


Figure 3. Représentation du réseau de liaisons hydrogène au sein d'une hélice α .

Une hélice α consiste en l'enroulement d'un brin peptidique sur lui-même pour former un cylindre. C'est une hélice droite dont le squelette est constitué d'acides aminés, entre 4 et 40 en général. Ils forment un réseau de liaisons hydrogène entre le groupement carbonyle d'un résidu i et l'amide d'un résidu $i+4$ (pour l'hélice α classique). La nomenclature est la suivante : hélice 3.6_{13} pour indiquer qu'il y a 3.6 résidus dans un tour formé d'un pseudo-cycle à 13 atomes. La distance verticale entre deux tours d'hélice est de 5.4 \AA . Comme visualisé sur la figure 3, les chaînes latérales pointent vers l'extérieur de l'hélice. Certaines hélices α peuvent être amphiphiles : les chaînes hydrophiles apparaissent alors d'un côté de la structure, à l'opposé des chaînes hydrophobes.² Il existe d'autres structures d'hélices comme l'hélice α_{310} plus contrainte ou encore l'hélice polyproline type II. C'est une hélice gauche formée d'une répétition d'unités proline. Ces structures restent cependant moins fréquentes que l'hélice α ou le feuillet β .

2.2 Feuillet β

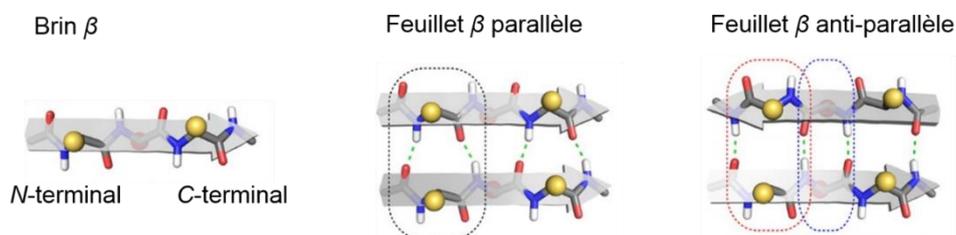


Figure 4. Représentation d'un feuillet β .

Les feuillets β forment une structure périodique constituée de brins β . Ce sont des enchaînements linéaires de quelques résidus (entre 5 et 8) stabilisés par des liaisons hydrogène

entre acides aminés distants (Figure 4). L'orientation de la liaison peptidique (du *N*-terminal vers le *C*-terminal) détermine la polarisation des feuillets β et leur arrangement spatial sera parallèle (*N*-terminal en face l'un de l'autre) ou anti-parallèle (*N*-terminal d'un brin face au *C*-terminal d'un autre brin). Les interactions par liaisons hydrogène formeront des feuillets β étendus alors que les interactions de Van der Waals ou hydrophobes forment des structures type *sandwich*.⁴

2.3 Technique d'analyse pour la caractérisation de la structure secondaire des protéines : diagramme de Ramachandran

Le squelette des acides aminés d'une protéine peut être décrit par les angles de torsion qui traduisent les rotations autour de la liaison N-C α (angle ψ) et C-C α (angle ϕ). (Figure 5) Ils possèdent des combinaisons admissibles et d'autres impossibles de par leur valeur énergétique trop importante. Par exemple, certaines conformations imposent un encombrement stérique entre les chaînes latérales et le squelette du peptide et sont donc impossibles. Le diagramme de Ramachandran⁵ (du nom de son inventeur) résume les valeurs autorisées de ces angles de torsions et possède des zones caractéristiques traduisant la structure spatiale des protéines. Il est ainsi possible de distinguer les repliements particuliers les plus courants : hélice α , feuillet β .

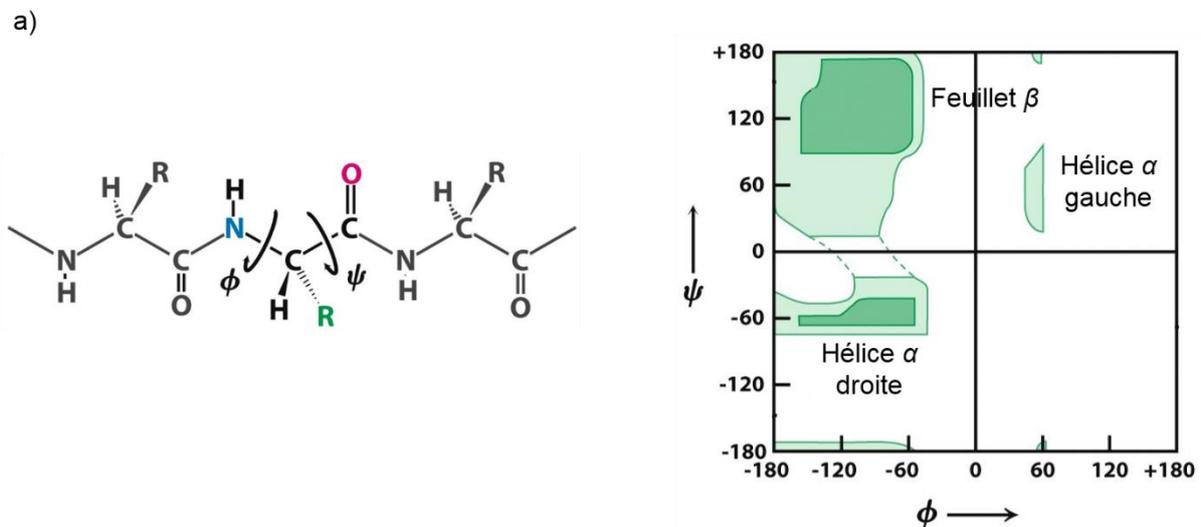


Figure 5. a) Représentation des angles dièdres d'une chaîne peptidique. b) Représentation schématique des zones caractéristiques d'un diagramme de Ramachandran.

Les protéines sont responsables de diverses activités essentielles à la vie telles que la reconnaissance de biomolécules dans les systèmes vivants, la catalyse, le transport, etc. Le postulat de Anfinsen en 1973 rapporte que « toute l'information nécessaire à la formation de la

conformation native d'une protéine, dans un environnement donné, est contenue dans sa séquence d'acides aminés ». ⁶ Ce postulat souligne le lien étroit entre la structure d'une protéine et sa fonction. Afin de comprendre des molécules aussi complexes que les protéines, les chercheurs ont développé des molécules artificielles capables de se replier sur elles-mêmes : les foldamères.

PARTIE 2 : Des architectures repliées artificielles pour mimer la nature

1 Les foldamères, définition

Une première définition a été donnée par S. Gellman en 1998. Elle présente les foldamères comme étant des « polymères possédant une forte tendance à adopter une conformation spécifique compacte ». ⁷ En 2000, J. S. Moore fait évoluer la définition et désigne les foldamères comme étant tout « oligomère se repliant en un état conformationnellement stable en solution et dont la structure est stabilisée par un ensemble d'interactions non-covalentes entre des unités monomériques non adjacentes ». ⁸ Ici, le terme foldamère fera référence à tout oligomère capable d'adopter une conformation repliée contrôlée - les polymères sont ainsi exclus - et renvoie à des objets de poids moléculaire compris entre 0,5 et 5 kDa, que l'on qualifiera de molécules de taille moyenne.

L'avantage majeur apporté par les foldamères synthétiques est qu'ils peuvent être construits avec autant de briques élémentaires que l'imagination / la chimie en fournit. Il est ainsi possible d'apporter une grande diversité tout en cherchant à retrouver des fonctions chimiques correspondant à celles de la nature.

Les foldamères sont trop nombreux pour être présentés ici de façon exhaustive mais de manière générale, ils se divisent en deux grandes familles : les foldamères biotiques et abiotiques. Les foldamères biotiques, miment les biopolymères et répondent à un mode de repliement similaire. Ils sont construits à partir d'homologues d'acides aminés α . Les foldamères abiotiques diffèrent de la nature par leur mode de repliement et leur squelette. ⁹

2 Des foldamères biotiques

2.1 Présentation

Les monomères non naturels sont la brique principale de la construction d'un foldamère. Ils offrent une diversité de taille, de forme, d'arrangement définissant ainsi une palette variée pour construire de nouveaux systèmes moléculaires permettant d'aller plus loin dans la compréhension des biomolécules. Ils sont également le siège de l'information dirigeant le repliement du système. Les informations sont apportées par le squelette, par le type d'interactions, par les préférences conformationnelles du monomère. Pour relier les monomères entre eux, la fonction amide est souvent utilisée comme au sein des peptides. De par la similarité structurale, le repliement de ces systèmes repose sur les mêmes interactions que celles des biomolécules. Ce sont principalement les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques et de Van Der Waals qui dirigent le repliement des foldamères biotiques.

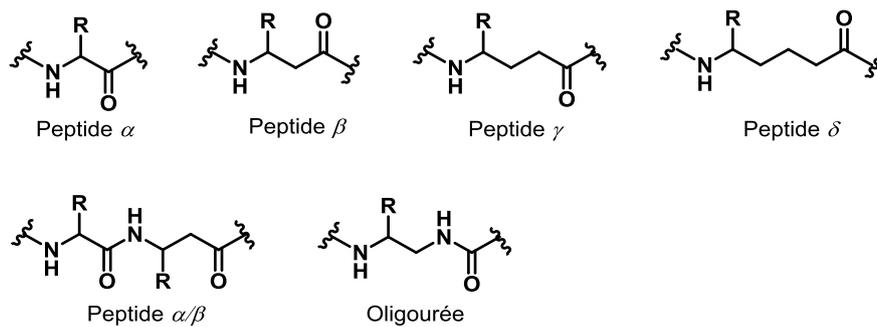


Figure 6. Exemples de briques aliphatiques.

2.2 Des exemples de repliements inspirés de la nature avec des foldamères biotiques

Les foldamères biotiques sont des outils pour accéder à des structures tertiaires ou quaternaires pour mimer la nature et comprendre le lien étroit entre fonction et repliement. Le groupe de S. Gellman a par exemple travaillé sur les peptides hybrides en remplaçant des acides aminés α d'une séquence peptidique par des homologues β . Ces peptides forment des hélices qui s'organisent en faisceau avec un cœur hydrophobe.¹⁰ Les résidus β sont représentés en cyan sur la Figure 7.

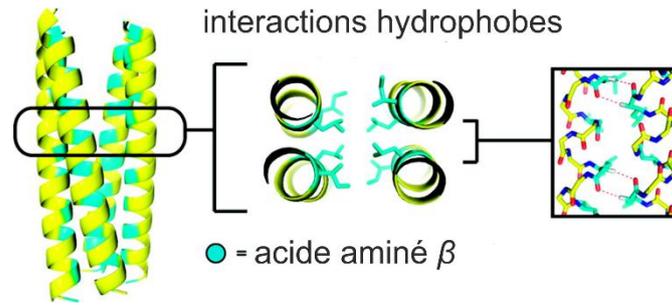


Figure 7. Structure cristallographique du faisceau d'hélice conçu par S. Gellman à l'aide de peptides β représentés en cyan.¹⁰

L'équipe de G. Guichard, spécialisée dans le motif oligourée a réussi à contrôler le repliement de chaînes protéomimes pour obtenir une structure quaternaire mimant l'assemblage des protéines.¹¹ Deux séquences primaires ont été conçues en faisant varier l'enchaînement d'oligourées à caractère hydrophobe ou hydrophile. Les oligourées sont stables en solution aqueuse et présentent une forte propension à se replier en mime d'hélice α . Les deux séquences d'oligourées possèdent la même structure secondaire mime d'hélice α et c'est au niveau de la structure quaternaire que les motifs sont complètement différents. La première séquence se replie en un faisceau d'hélices alors qu'une structure type nanotube est obtenue avec la séquence 2 (Figure 8).

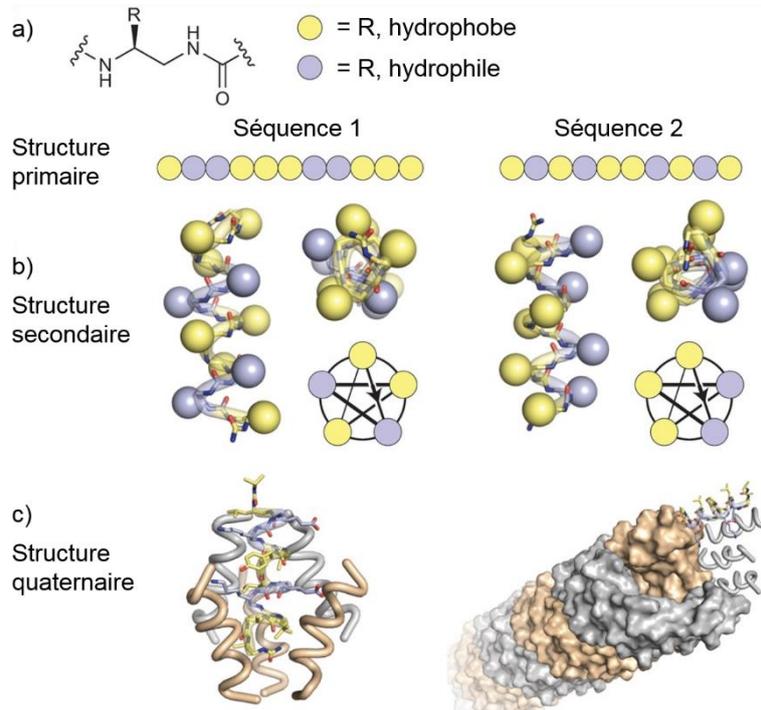


Figure 8. Oligourées comme protéomimes.¹² a) Représentation de l'unité monomérique et structure primaire de la séquence d'oligourées. b) Structure cristallographique : l'arrangement spatial montre que le foldamère adopte une structure secondaire en hélice α . c) Les deux motifs forment des structures quaternaires différentes : à gauche un assemblage en faisceau d'hélices et à droite un nanotube organique.

Le motif le plus représenté par les foldamères biotiques est l'hélice. Pour accéder à des repliements plus originaux, des règles s'éloignant de celles de la nature ont dû être développées avec les foldamères abiotiques, c'est le cas des foldamères aromatiques.

3 Des foldamères abiotiques aromatiques : d'autres modes de repliement

Le repliement des foldamères possédant des fragments aromatiques est dirigé par des interactions inter et intramoléculaires et est particulièrement prévisible.⁹ La rigidité du squelette aromatique limite le coût entropique lié à l'organisation de la molécule ce qui permet une grande stabilité de ces foldamères. Nous allons maintenant étudier les interactions capables de diriger le repliement de foldamères abiotiques.

3.1 Encombrement stérique

Les héliènes sont un exemple de foldamères générés par encombrement stérique. Le premier hétérohéliène de synthèse a été rapporté en 1903 par Meisenheimer et Witte.¹³ C'est une classe de molécules polyaromatiques caractérisée par plusieurs cycles benzène ou autres aromatiques (substitués ou non), fusionnés en *ortho*. L'encombrement stérique causé par les cycles aromatiques conduit au repliement hélicoïdal. De nombreuses méthodes de synthèse et l'introduction d'hétéroatomes dans les systèmes ont particulièrement enrichi cette classe de molécules. (Figure 9)

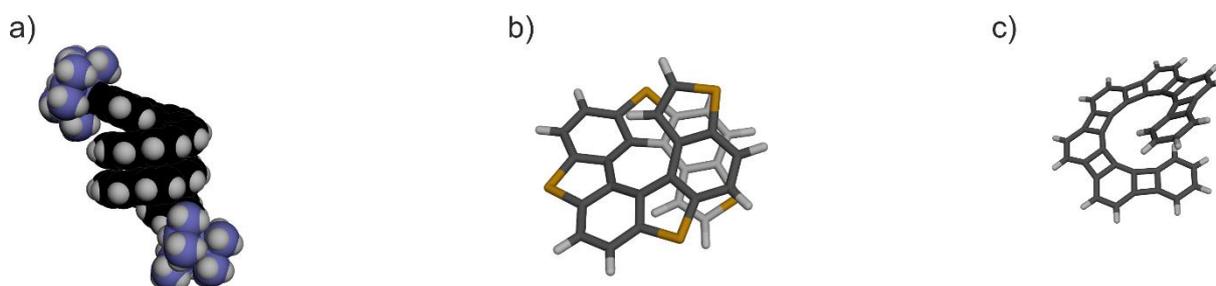


Figure 9. Structures cristallographiques de foldamères basés sur des restrictions conformationnelles. a) TIPSO-[16]héliène¹⁴ b) pentathia[9]hétérohéliène¹⁵ c) [7]héliphène.¹⁶

Un autre exemple de repliement généré par encombrement stérique est donné par les dérivés terphényle développés par le groupe d'A. Hamilton.¹⁷ Ces composés permettent de mimer l'arrangement spatial des chaînes latérales d'une hélice α . La molécule s'organise dans l'espace de telle manière à ce que l'encombrement stérique entre les chaînes latérales soit réduit au minimum : les positions i , $i+3/4$ et $i+7$ des chaînes latérales d'une hélice α sont ainsi mimées.

Cela est permis par la rotation autour de la liaison entre les cycles phényle et le terphényle adopte une conformation en quinconce (Figure 10). Le squelette rigide aryle diminue considérablement la flexibilité de ces systèmes.

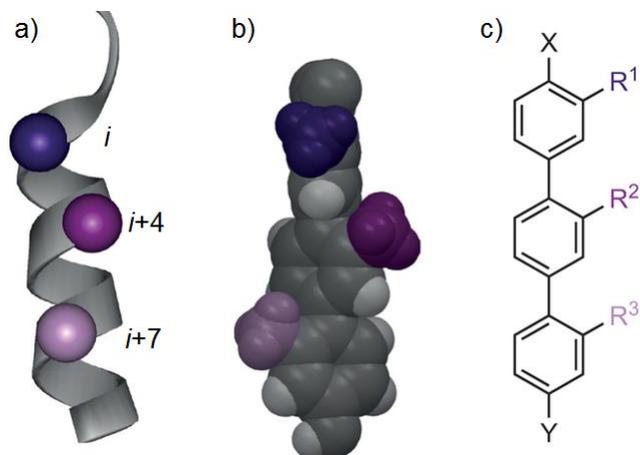


Figure 10. a) Représentation d'une hélice α avec les résidus i , $i+4$, $i+7$ mis en évidence. b) Structure cristallographique d'un dérivé terphényle et c) sa représentation.¹⁸

3.2 Interactions intermoléculaires

Un foldamère peut également se replier autour d'une entité. On le voit par exemple dans la formation de complexes avec des ions métalliques tels que le fer, le cuivre, etc. Le complexe est généré par des interactions entre l'oligomère et des ions métalliques selon leur sphère de coordination. Le père de la chimie supramoléculaire, J. M. Lehn, fut le premier à décrire de tels assemblages à travers les hélicates.¹⁹ Le groupe a synthétisé en particulier un oligomère pyridine-hydrazone **I.1** capable de former un hélicate en présence de Pb^{2+} .²⁰ (Figure 11)

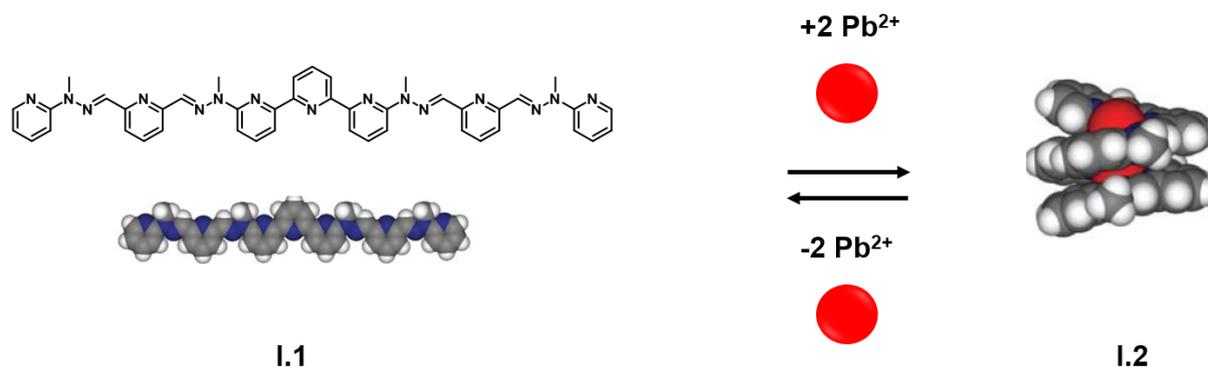


Figure 11. Principe du repliement de **I.1**, composé développé par le groupe de J.-M. Lehn. **I.2** = structure cristallographique du produit résultant.²⁰

D'autre part, l'étude de la complexation des anions s'est largement développée et présente un intérêt particulier de par leur importance en biologie, médecine et pour

l'environnement. Ils trouvent leur application dans la catalyse, le transport, la détection, etc.²¹ Le groupe de X.-J. Yang utilise des anions pour diriger le repliement de foldamères : par l'utilisation d'un ligand bis urée et d'ions phosphate,²² le groupe rapporte la formation d'une triple hélice présentée en figure 12.

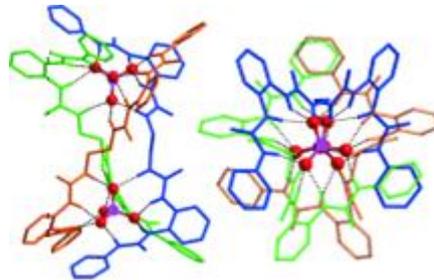


Figure 12. Structure cristallographique d'une triple hélice autour de deux anions PO_4^{3-} .²²

3.3 Interactions intramoléculaires : exemples avec la formation de mimes de feuillets β

La conformation en mimes de feuillets β est particulièrement rare avec les foldamères synthétiques.²³ Ceci est expliqué par le fait que ce sont des molécules souvent insolubles qui ont tendance à s'agréger et à précipiter. Elles sont donc difficiles à caractériser et isoler. Le groupe de J. Nowick rapporte la formation de feuillets macrocycliques contenant un acide aminé non naturel (Hao, constitué d'une hydrazine, de l'acide 5-amino-2-méthoxybenzoïque et d'acide oxalique).²⁴ Le groupe a en effet montré l'association de nonapeptides sous forme de dimères. Ceux-ci sont assemblés par le biais de liaisons hydrogènes intramoléculaires et c'est le même type d'interactions qui maintient le macrocycle sous forme de feuillets β , capables de s'assembler par la suite sous forme de fibres (Figure 13).

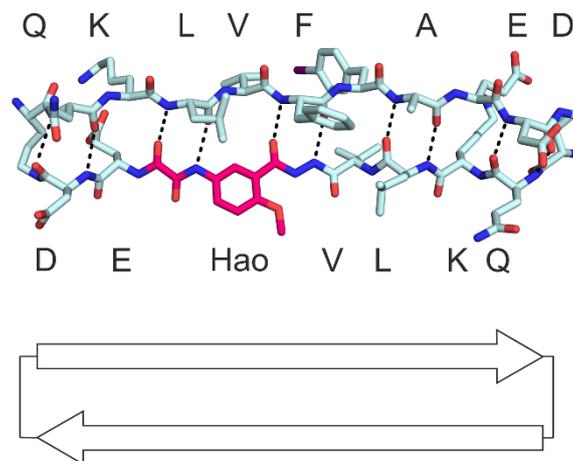


Figure 13. Structure cristallographique du feuillet développé par le groupe de J. Nowick. Les liaisons hydrogènes sont représentées en pointillés et le résidu aromatique Hao en rose.²⁴

Le groupe d'I. Huc rapporte la conception d'un foldamère aromatique capable de se replier sous forme de feuillet β . Des unités 4,6-dinitro-1,3-phénylènediamine jouent le rôle de coude et permettent de placer des segments aromatiques linéaires à une distance stratégique les uns des autres conduisant à des interactions π entre eux. Des études cristallographiques attestent de ces interactions entre les cycles aromatiques.²⁵ (Figure 14)

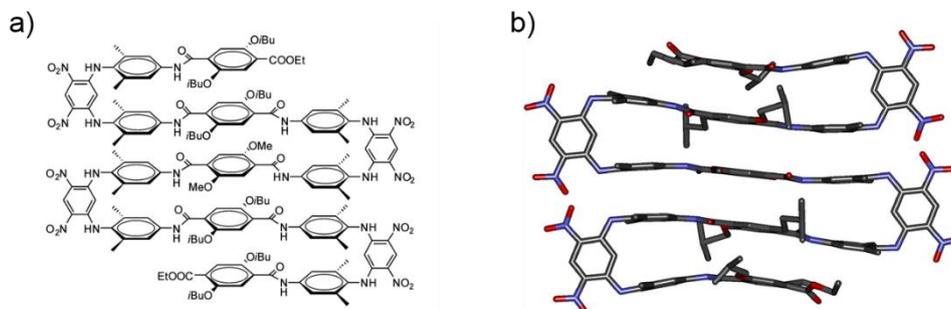


Figure 14. a) Représentation du foldamère **I.3**. b) Structure cristallographique du feuillet β .²⁵

3.4 Conformation hélicoïdale avec le motif quinoline

3.4.1 Des préférences conformationnelles au sein de la liaison aryl-amide

La liaison aryl-amide est très couramment retrouvée au sein des foldamères abiotiques.²⁶

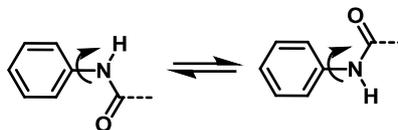


Figure 15. Rotation autour de la liaison aryl-amide.

C'est une liaison qui possède un accepteur de liaison hydrogène avec le carbonyle CO et un donneur de liaison hydrogène : le NH. La délocalisation du doublet non liant de l'azote confère à la fonction un caractère de double liaison partielle. La conjugaison avec le groupement aryle diminue la liberté de rotation autour de la liaison C-N par rapport à un amide aliphatique. La substitution du cycle aromatique peut diminuer encore plus, voire empêcher la rotation (ex. : substituant en *ortho* du cycle aromatique).²⁷

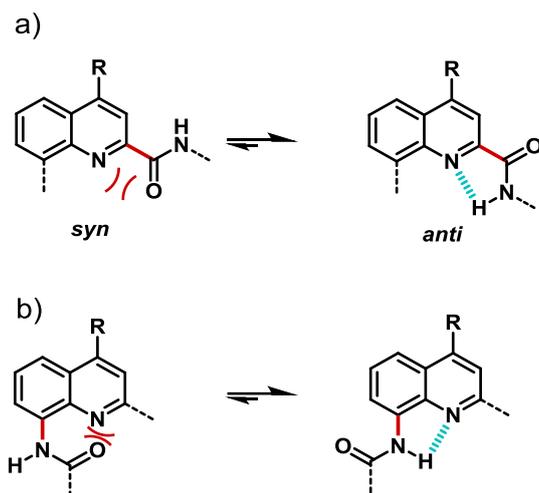


Figure 16. Représentation de la conformation préférentielle *anti* au sein des oligomères de quinolines. a) Autour de la liaison aryle-CONH. b) Autour de la liaison aryle-NHCO. Les répulsions électrostatiques sont schématisées par les parenthèses rouges et les liaisons hydrogène intramoléculaires en bleu. La liaison étudiée est représentée en rouge.

Le cycle aromatique peut porter un accepteur de liaison hydrogène, comme c'est le cas avec l'azote endocyclique des oligomères de quinolines développés par le groupe d'I. Huc. La formation d'une liaison hydrogène et les répulsions électrostatiques entre l'azote endocyclique et l'oxygène de l'amide favorisent la conformation *anti* de la liaison aryle-amide. (Figure 16)

3.4.2 Le motif hélicoïdal

Le monomère acide 8-amino-2-quinoline carboxylique développé par le groupe d'I. Huc porte les informations pour le repliement des foldamères de quinolines. L'addition d'un résidu quinoline à un dimère va induire une déviation due aux contraintes stériques et l'oligomère n'est pas plan. C'est une structure secondaire hélicoïdale qui est adoptée. Celle-ci est stabilisée par l'ajout de monomères quinoline, car les cycles aromatiques vont s'empiler faisant ainsi apparaître les interactions π . A cela s'ajoutent les préférences conformationnelles de la liaison aryl-amide dirigées par les liaisons hydrogène, les répulsions électrostatiques et la conjugaison électronique.

Les caractéristiques des hélices de quinolines formées dans le groupe d'I. Huc sont : le diamètre de 1,2 nm ; le pas de 3,4 Å, le nombre d'unités par tour : 2,5, qui est dû à la taille du monomère quinoline et la courbure qui est donnée par la position relative des fonctions amine et acide, à 60° l'une de l'autre.²⁸

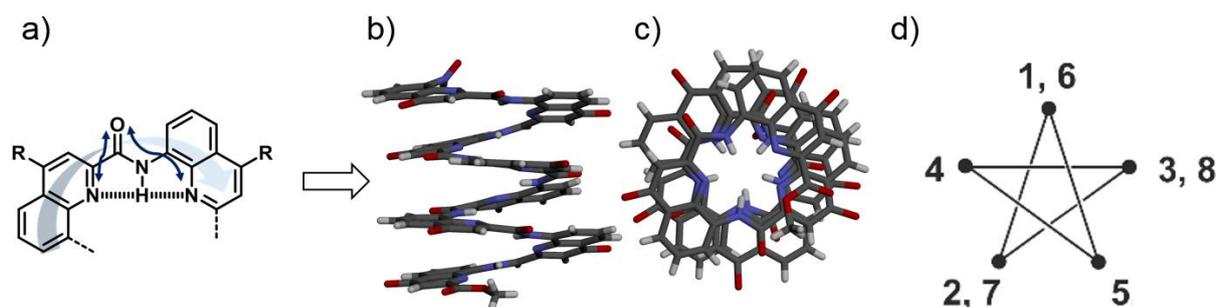


Figure 17. Représentation du repliement d'un foldamère de quinolines. a) Les interactions au sein du monomère. Flèches doubles bleues = répulsions électrostatiques. Ligne pointillée = liaisons hydrogène. Structure cristallographique d'un octamère de quinolines (chaînes latérales omises par souci de clarté). b) Vue de côté. c) Vue du dessus du même octamère. d) Représentation générale en étoile.

3.4.3 Stabilité hélicoïdale

La structure des foldamères de quinolines est bien définie en solution et leur stabilité hélicoïdale a été observée pour une large gamme de solvants : chloroforme,²⁹ toluène,³⁰ méthanol³¹ et en particulier dans l'eau.^{32,33} Il n'y a pas encore de condition déterminée où ces foldamères n'adoptent pas de conformation hélicoïdale, même à haute température ou dans le DMSO,³⁴ qui est un solvant moins favorable au repliement, du fait de sa capacité à rompre les liaisons hydrogène intramoléculaires. Ces systèmes possèdent une forte propension à cristalliser ce qui a permis de mettre en évidence les interactions particulières et la stabilité de ces foldamères à l'état solide.^{27,32,35} Cette stabilité hélicoïdale a été mise à profit par le groupe d'I. Huc pour concevoir des structures tertiaires en s'appuyant sur l'exemple de biomolécules réunissant des motifs secondaires pour accéder à des architectures plus complexes.

3.5 Vers des structures tertiaires et quaternaires

Partant de l'idée de limiter la liberté conformationnelle entre deux hélices, le groupe d'I. Huc a synthétisé le composé **I.4**. (Figure 18) Un espaceur éthylène glycol a été utilisé pour maintenir deux hélices côte à côte et permettre l'interaction entre celles-ci. La structure tertiaire résultante a été examinée à l'état solide puis en solution pour comprendre le comportement de **I.4**. Les études révèlent une communication entre les deux hélices par le biais de chaînes latérales. Les équilibres *PP/MM* vs *PM*, conformation *gauche* vs *anti* (de l'espaceur éthylène glycol), orientation parallèle vs perpendiculaire (des hélices) semblent être dépendants du solvant utilisé.³⁶

Cette molécule synthétique possède la taille d'une petite protéine (Figure 18) et il est important de noter que jusqu'à ce jour, la structure cristallographique de **I.4** est la plus large résolue par méthode directe.

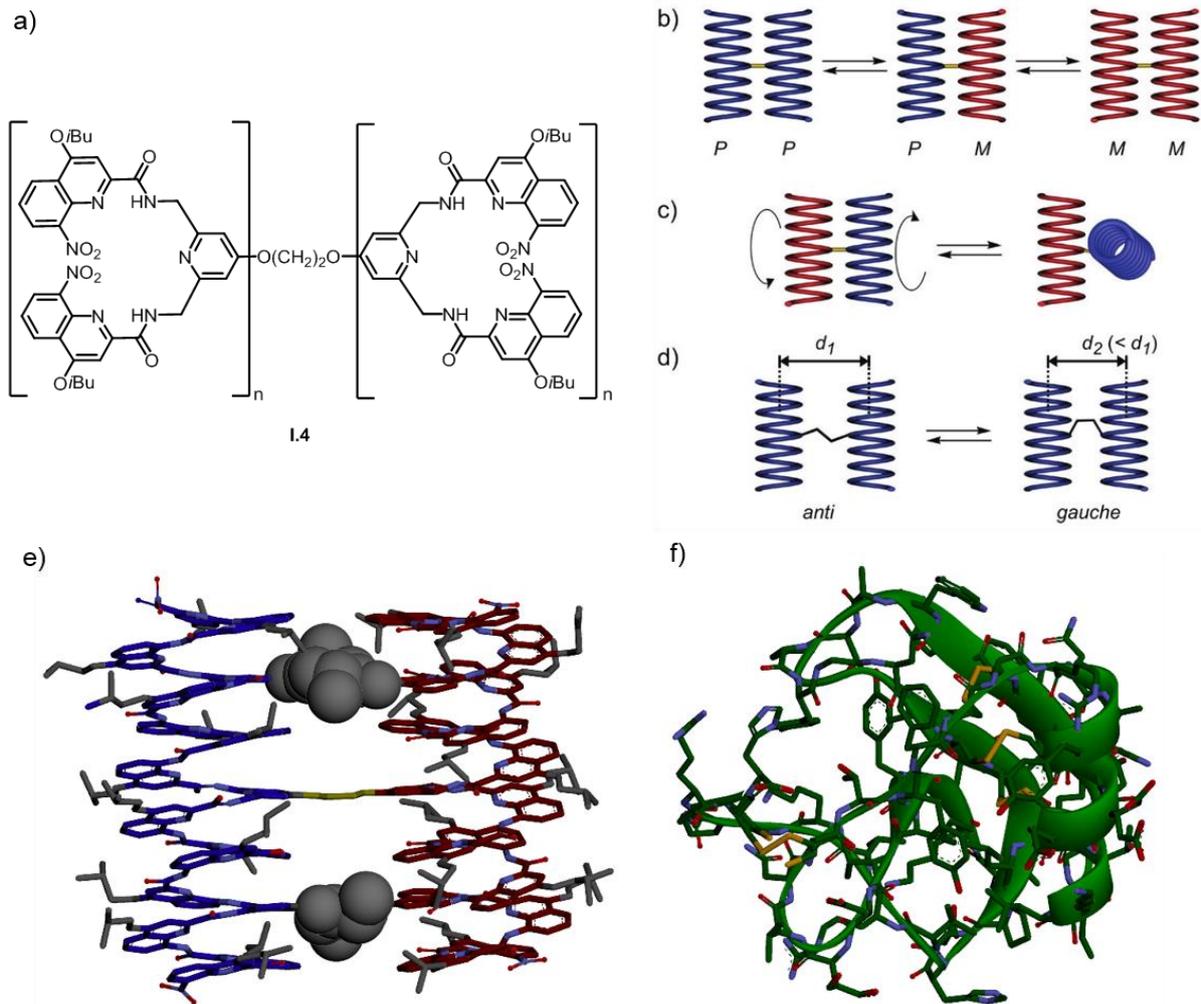


Figure 18. Assemblage en structure tertiaire d'un foldamère de quinolines développé par le groupe d'I. Huc.^{35b} a) Représentation du composé **I.4**. b) Inversion d'hélicité *P/M*. c) Rotation autour de l'espaceur. d) Conformation *gauche* vs *anti* de l'espaceur. e) Structure cristallographique du composé **I.4** à la même échelle qu'une f) protéine toxine de scorpion (PDB = 1AHO).

A l'image de certaines protéines, on peut retrouver des auto-assemblages de foldamère en structure quaternaire, comme par exemple ceux développés par l'équipe de W. DeGrado. Le groupe a en effet conçu un arylamide amphiphile **I.5** qui s'associe sous forme d'une structure type cage de 5 nm dans l'eau. Les interactions qui stabilisent le système sont comparables à celles vues dans les protéines : interactions hydrogènes, empilement aromatique, effets hydrophobes.³⁷ (Figure 19)

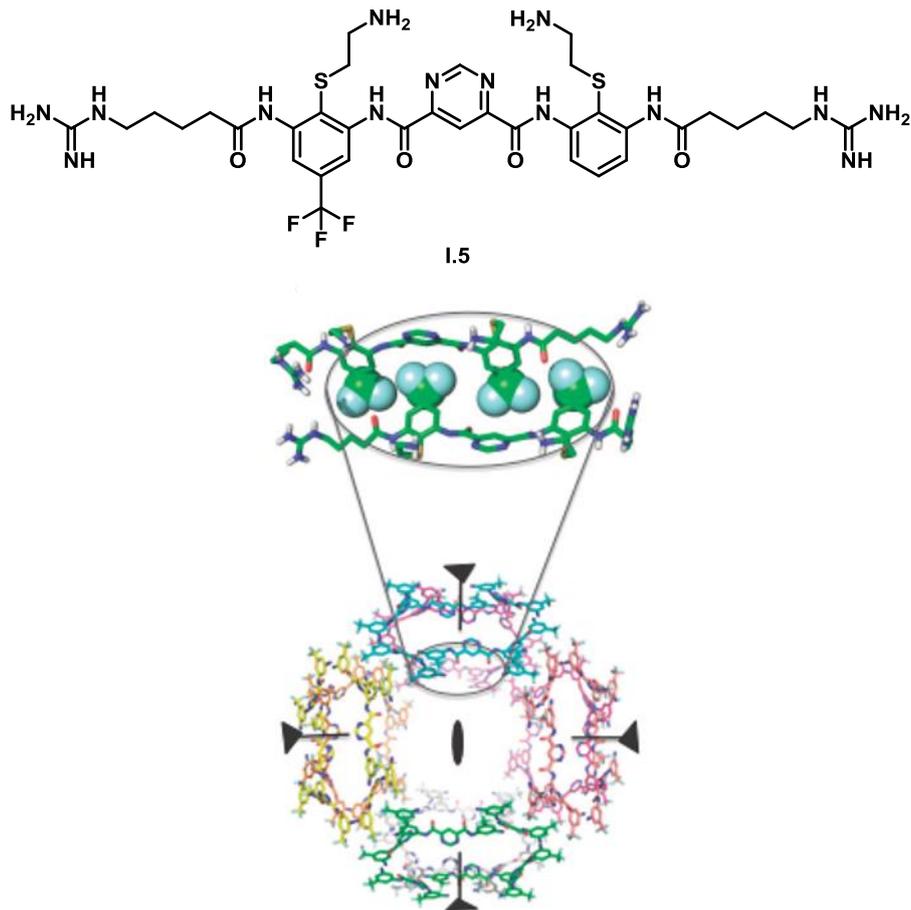


Figure 19. Structure du foldamère **I.5** et de l'empilement cristallographique résultant.³⁷

Nous venons de voir que les foldamères de manière générale permettent de mimer la nature pour appréhender les lois du repliement. Dans la partie suivante, nous allons nous focaliser sur le motif hélicoïdal et son utilisation en reconnaissance de surfaces de protéines. Les protéines sont capables de se reconnaître entre elles et vont former des complexes par le biais d'interactions protéine-protéine (IPP). Par l'étude de ces assemblages de protéines, nous allons tenter d'établir les caractéristiques requises pour la reconnaissance de surfaces de protéines par les foldamères.

PARTIE 3 : La forme hélicoïdale pour la reconnaissance de surfaces de protéines

1 Des assemblages de protéines : siège des interactions protéine-protéine (IPP)

Les assemblages de protéines sont responsables d'un grand nombre de processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, la régulation de la transcription, la transduction du signal, la réponse immunitaire, l'apoptose, etc.³⁸ Par exemple, l'engagement des cellules à l'apoptose est en grande partie gouverné par des interactions protéine-protéine entre les membres de la famille de la protéine Bcl-2.³⁹ Ces interactions protéine-protéine sont mises en jeu dans bon nombre de pathologies humaines telles que le cancer.⁴⁰ Ou encore, c'est grâce à des IPP que la fusion virale du VIH a lieu, permettant ainsi l'entrée du virus dans les cellules.

1.1 Les interactions protéine-protéine (IPP) : définition

Une protéine impliquée dans une IPP présente une face exposée et une face exclue du solvant. Les enzymes possèdent un site actif bien défini et localisé souvent à l'intérieur des protéines, avec lequel de petites molécules vont pouvoir interagir. A l'inverse, les zones impliquées dans les IPP sont généralement planes et possèdent de larges surfaces d'interactions : de l'ordre de 1500 à 3000 Å² alors qu'elles sont de 300 à 1000 Å² pour des interactions protéines – petites molécules.⁴¹ Pour mesurer la complexité de l'association de protéines, il faut aussi prendre en compte la complémentarité de forme, la distribution de charge, les interactions hydrophobes et électrostatiques en surface.⁴² Ces caractéristiques montrent bien que malgré l'enjeu thérapeutique considérable, les complexes de protéines sont difficiles à cibler. Pour les comprendre, les chercheurs ont essayé d'identifier les régions déterminantes pour la reconnaissance et la liaison entre protéines. C'est ainsi qu'ils ont établi une cartographie définissant les *hot spots*.

1.2 Les résidus importants impliqués dans les IPP : les *hot spots*

Les *hot spots* correspondent à un ensemble de résidus d'acides aminés contribuant fortement à l'association des partenaires protéiques. J. Wells et son équipe ont mené une étude consistant en la mutagénèse systématique de chaque résidu en alanine à l'interface de l'interaction entre l'hormone de croissance humaine et son récepteur (hGH/hGHbp). Si la

différence d'énergie libre de liaison entre la protéine native et le mutant conduit à une augmentation de 2 kcal/mol, alors le résidu fait partie du *hot spot*.⁴³ Il a ainsi été établi que la plupart du temps, les vastes surfaces de protéine en jeu ne contribuent pas dans leur intégralité à l'interaction et que les régions déterminantes pour la reconnaissance et l'affinité de liaison entre protéines peuvent être réduites à une surface de 500 Å².⁴⁴ Le plus souvent, seule une dizaine de résidus est responsable de la plus grande part d'énergie d'interaction.

Ces *hot spots* nous permettent d'affirmer qu'il n'est pas nécessaire de travailler avec des molécules aussi imposantes qu'une protéine pour être capable d'en reconnaître la surface. Nous allons étudier différents exemples de molécules de taille moyenne, pour reconnaître une surface de protéine.

2 Utilisation de biomolécules : les mini-protéines

Les mini-protéines sont des oligopeptides d'origine naturelle sur lesquels a été greffé un peptide épitope (c'est la partie spécifique qui se lie avec la protéine partenaire) ou des résidus *hot spots*. Cette technique prédétermine l'arrangement spatial des résidus et fournit des structures secondaires stables qui présentent parfois une bonne perméabilité cellulaire.⁴⁵

Concernant l'utilisation de mini-protéines en vue de cibler les IPP, l'interaction p53-hDM2 représente une des premières cibles étudiée.⁴⁶ La protéine 53 (p53) est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et les cellules prolifèrent lorsqu'elle est inactive. hDM2 est une protéine qui inactive p53 et sa surexpression conduit à des tumeurs agressives. Inhiber hDM2 permet de restaurer les fonctions de p53 et de limiter l'expansion de la tumeur. p53 se présente sous la forme d'une hélice α dont les chaînes latérales des résidus Phe19, Trp23 et Leu26 se logent dans une poche hydrophobe de hDM2.⁴⁷ Le groupe d'A. Schepartz a choisi de greffer ces résidus *hot spots* de p53 sur la face exposée au solvant de l'hélice α d'une mini-protéine devenant ainsi ligand de hDM2. Le groupe a utilisé le polypeptide pancréatique aviaire (aPP, *avian pancreatic polypeptide*) comme mini-protéine support : c'est une protéine repliée stable. Elle est formée d'une hélice α de 18 résidus et d'une hélice polyproline II de 8 résidus. Des études d'alignement structural ont permis de détecter les positions favorables des *hot spots* pour l'interaction avec hDM2. Des mutations de la séquence primaire d'aPP ont été proposées pour produire des bibliothèques de mutants mini-protéines. (Figure 20) De bons candidats ont été déterminés par différentes techniques pour moduler l'IPP p53-hDM2 avec de faibles valeurs

d'IC₅₀ de l'ordre de 3,2 μM contre 8,8 μM pour p53 et une constante de dissociation améliorée par rapport au peptide originel.⁴⁸

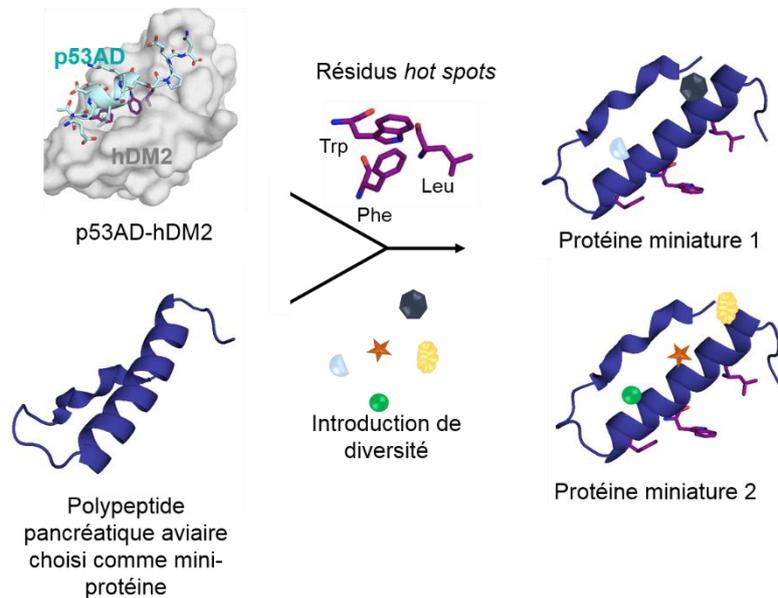


Figure 20. Principe du concept de mini-protéine.⁴⁸

L'inconvénient de cette méthode est qu'elle est particulièrement onéreuse. De plus, la biodisponibilité de molécules de si grande taille est loin d'être automatique. C'est pourquoi les chercheurs se sont appliqués à développer des systèmes artificiels de poids moléculaire plus faible que les mini-protéines : les peptidomimes. Ils miment des peptides naturels ou des protéines de par l'arrangement spatial de leurs chaînes latérales, tout en conservant la capacité à interagir avec la cible et produire le même effet biologique. La présence de caractéristiques artificielles améliore les propriétés des peptides mimés *in vivo* par une résistance accrue face aux protéases.⁴⁹ Nous allons donc traiter de quelques exemples de peptidomimes et leur utilisation pour la reconnaissance de surfaces de protéines. Nous soulignerons l'importance du repliement pour la fonction de ces molécules.

3 Foldamères peptidomimes : des foldamères aliphatiques, mimes d'hélices α

3.1 Peptidomimes β -peptidiques

Le groupe de D. Seebach est le premier à avoir synthétisé un peptide β **I.6** capable de mimer une hélice α pour la reconnaissance et l'inhibition de protéine. SR-B1 (*scavenger receptor class B, type I*) est une protéine membranaire impliquée dans le transport des lipides :

elle est responsable du transport du cholestérol dans le foie.⁵⁰ Cette protéine est généralement inhibée par des peptides ou des protéines de structure hélicoïdale amphipathique. Le nonapeptide amphiphile β **I.6** a pu inhiber le transport du cholestérol du petit intestin vers la lymphe et le système sanguin. Il est important de noter que seuls les peptides β présentant une face polaire et une face non polaire ont prouvé leur efficacité.⁵¹

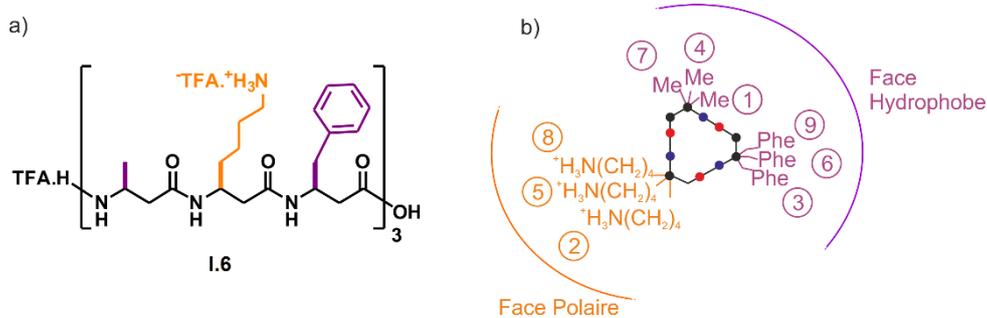


Figure 21. a) Représentation du nonapeptide β **I.6** développé par le groupe de D. Seebach pour l'inhibition de SR-B1. b) Arrangement spatial, vue du dessus du peptide **I.6**.⁵¹ En orange les résidus polaires qui s'orientent tous sur une même face. L'autre face étant occupée par les résidus hydrophobes en violet. Les ronds rouges représentent les oxygènes, les noirs, les carbones et les bleus, les azotes.

Pour un exemple plus récent, on peut citer les travaux du groupe d'A. Schepartz. Le groupe a conçu des décapeptides β inhibiteurs de la fusion de gp41, possédant une affinité comparable à celle du meilleur inhibiteur⁵² avec $K_i = 1,2 \mu\text{M}$.⁵³

3.2 Peptides hybrides

Concernant l'utilisation de peptides hybrides pour cibler une IPP, on retrouve l'interaction impliquée dans le virus du sida et étudiée par le groupe de S. Gellman. La protéine gp41 est une des protéines transmembranaires retrouvée à la surface du virus du sida (VIH). L'action d'un peptide de fusion présent dans gp41 induit l'entrée du virus dans les cellules cibles. De nombreux peptides α basés sur les séquences N ou C-terminales de la protéine gp41 ont été développés en tant qu'agents anti-VIH. Ils se lient à un intermédiaire de la protéine gp41 et empêchent ainsi la fusion virus-cellule.⁵⁴ Or, les peptides α sont sujets à la dégradation protéolytique. Basés sur ces séquences de peptides α anti-VIH, le groupe de S. Gellman a réalisé des modifications du squelette pour générer une série de peptides hybrides α/β . Ils ont montré que ces peptides hybrides étaient capables de mimer les propriétés fonctionnelles et structurales de la protéine gp41.^{49b}

Plus récemment, on trouve un exemple de reconnaissance et inhibition du domaine Bcl-2-BH3 par un peptide hybride **I.8** développé par D. P. Fairlie et S. Gellman. Les protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma) régulent la mort programmée des cellules. BH3, membre

de cette famille, est responsable du signalement de la mort cellulaire.⁵⁵ Des variations ont été apportées sur un peptide α de BH3 pour concevoir le peptide α/β **I.8**. Celui-ci peut mimer structurellement et fonctionnellement le peptide α parent **I.7** et inhiber les interactions protéine-protéine associées à la signalisation apoptotique. Le peptide α/β **I.8** montre une résistance à la protéolyse 100 fois supérieure à son homologue α .⁵⁶ (Figures 22-23)

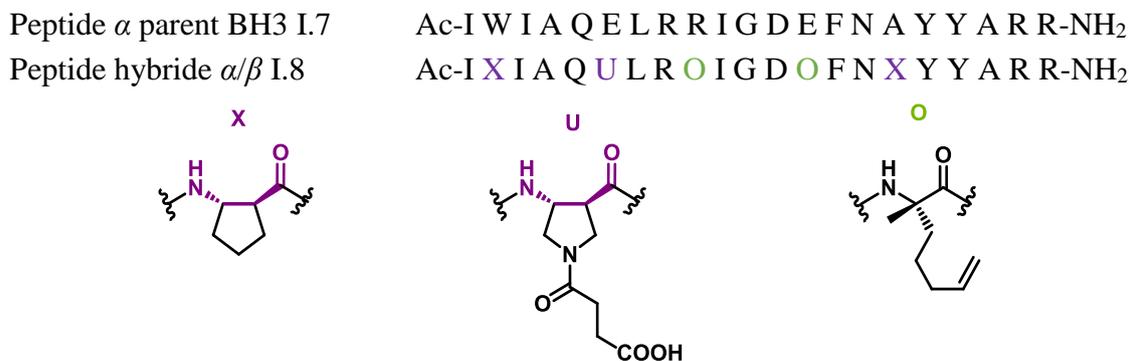


Figure 22. Structure des peptides **I.7** et α/β **I.8** pour la reconnaissance de la surface de Bcl-2. Les peptides β sont symbolisés en violet.

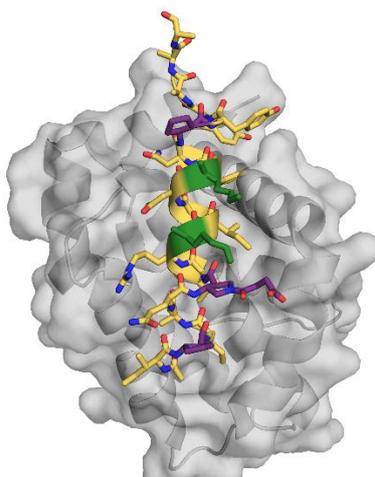


Figure 23. Structure cristallographique du peptide linéaire α/β **I.8** lié à Bcl-2. Les codes couleur de la figure précédente sont conservés.⁵⁶

3.3 Peptides contraints

Les peptides contraints permettent d'augmenter l'affinité pour la cible en stabilisant la structure conformationnelle. Il a été montré par R. H. Grubbs et G. L. Verdine que l'addition d'un lien covalent pour relier les chaînes latérales spatialement proches entre elles permet de stabiliser la structure d'une hélice.⁵⁷

Le récepteur aux œstrogènes α (ER α) est impliqué dans les cancers du sein et l'ostéoporose.⁵⁸ A l'aide d'une structure cristallographique du récepteur lié à un peptide,⁵⁹ une série de peptides contraints a été conçue. Un lien hydrocarbure a ainsi été ajouté entre deux

tours d'un peptide. La structure résultante est un mime d'hélice α avec une stabilité renforcée et bénéficie d'interactions hydrophobes favorables supplémentaires. Cela résulte en une diminution d'un facteur 10 de la constante de dissociation ($K_D = 0,35 \mu\text{M}$ contre $K_D = 2,5 \mu\text{M}$ pour le peptide linéaire).⁶⁰ (Figure 24)

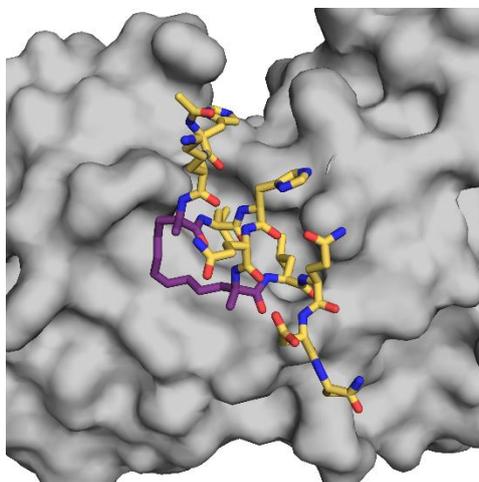


Figure 24. Structure cristallographique du peptide contraint **I.9** lié à ER α .⁶⁰

Un autre exemple est le récepteur à vitamine D (VDR). C'est une protéine permettant au corps humain de réagir de façon appropriée à la vitamine D en liant sa forme active (le calcitriol). L'un des rôles principaux de la vitamine D est de contrôler l'absorption du calcium et du phosphate dans l'intestin et dans le sang.⁶¹ Cibler cette interaction présente un intérêt thérapeutique pour le traitement de l'ostéoporose, de maladies auto-immunes, de cancers de la peau, etc. Une stratégie de stabilisation de structure hélicoïdale a été proposée par le groupe de M. Kurihara et implique le développement du peptide contraint **I.10** pour la reconnaissance du récepteur à vitamine D (VDR). Les précédentes petites molécules ou oligopeptides développés dans ce but présentent la séquence LXXLL où L = leucine et X = tout acide aminé. Cependant, leur structure secondaire est instable. Le groupe s'est donc basé sur cette séquence pour proposer le composé **I.10** avec une chaîne hydrocarbure entre i et $i+3$ permettant de former une hélice stable dont la modélisation montre qu'elle se superpose parfaitement au fragment coactivateur lié à VDR (Figure 25). **I.10** a ainsi montré une forte activité inhibitrice avec une IC_{50} de $3,2 \mu\text{M}$.⁶²

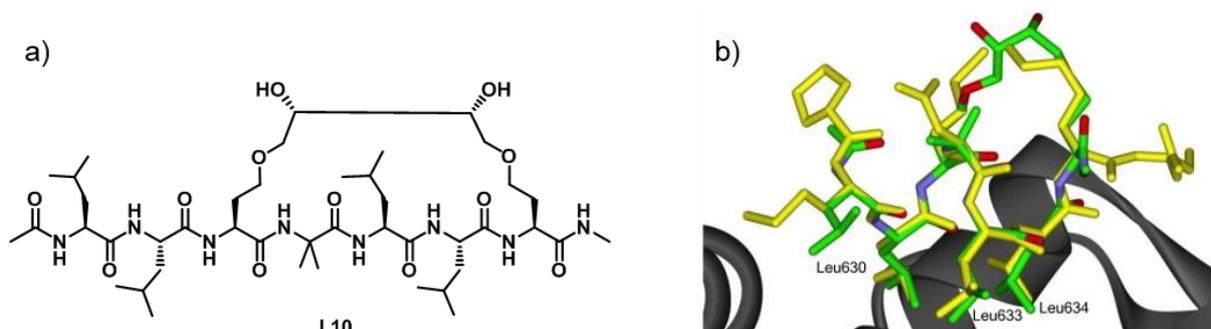


Figure 25. a) Structure du peptide contraint **I.10**. b) Modélisation du peptide contraint **I.10** en vert superposé à la structure cristallographique du fragment coactivateur lié à VDR en jaune.⁶²

3.4 Les peptoïdes



Figure 26. Comparaison de la structure d'un peptide α et d'un peptoïde.

Ces peptidomimes ont été introduits par R. N. Zuckermann dans les années 90.⁶³ Ce sont des polymères constitués de résidus glycines *N*-substitués où les chaînes latérales sont liées à l'azote de la fonction amide.

Le groupe de D. H. Appella a travaillé à l'inhibition du complexe p53-hDM2 et rapporte la conception de peptoïdes capables d'influer sur l'interaction p53-hDM2.⁶⁴ Rappelons que les résidus impliqués dans la fixation de p53 avec hDM2 sont les chaînes latérales Phe, Trp et Leu de p53 *via* des interactions hydrophobes. Des mimes de ces résidus ont été introduits dans un motif peptoïde et il a été montré que le composé résultant **I.11** possédait une bonne affinité pour hDM2. Il montre en effet une IC_{50} de l'ordre de 7 μ M contre 3 μ M pour p53. (Figure 27) Il est important de noter que c'est l'interaction avec hDM2 qui induit un arrangement hélicoïdal.

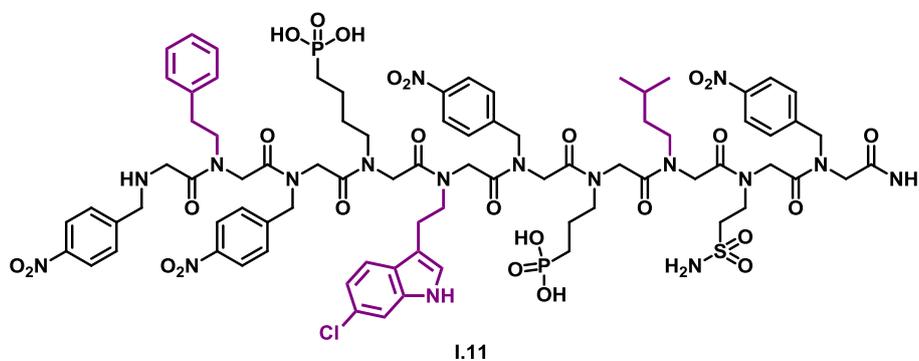


Figure 27. Structure du peptoïde **I.11** inhibant l'interaction hDM2-p53. Les résidus clés sont représentés en violet.⁶⁴

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF) est une protéine jouant un rôle dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et lymphatiques (vasculogénèse) et la croissance des vaisseaux existants (angiogénèse). La protéine VEGF est donc impliquée dans la croissance des tumeurs. Bloquer l'interaction de VEGF au récepteur VEGFR2 impliqué dans l'angiogénèse, présente un important intérêt thérapeutique. Le groupe de T. Kodadek a développé le peptoïde dimérique **I.12**.⁶⁵ Notons ici que l'idée de la formation d'un dimère est apparue après l'obtention de résultats peu convaincants concernant l'inhibition de VEGFR2 par des peptoïdes monomériques. Le groupe de T. Kodadek s'est donc appuyé sur le fait que VEGFR2 fonctionne en tant que dimère. **I.12** a ainsi permis d'inhiber VEGFR2 et la croissance de la tumeur (chez la souris).

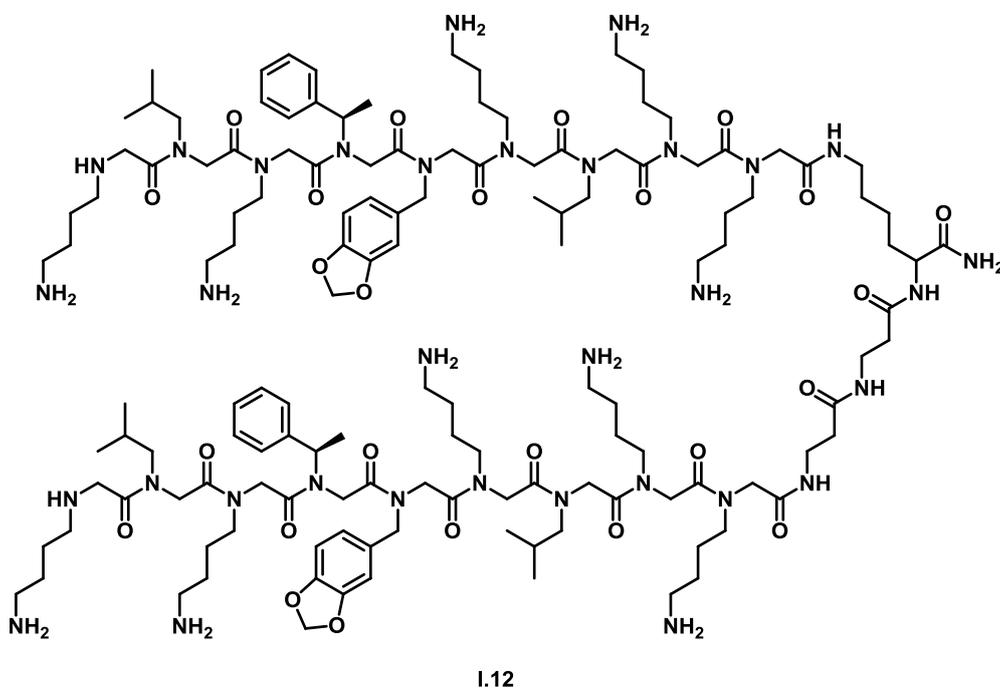


Figure 28. Peptoïde **I.12** inhibiteur de VEGFR2 et supprimant la croissance tumorale chez la souris ($K_D \sim 30$ nM, $IC_{50} \sim 1$ μ M).⁶⁵

Les peptidomimes permettent ainsi d'inhiber les IPP tout en présentant une résistance à la protéolyse intéressante. Toutefois, les foldamères abiotiques tels que les foldamères d'oligoamides aromatiques permettent aussi de cibler une surface de protéine.

4 Des foldamères d'oligoamides aromatiques pour la reconnaissance de surfaces de protéines

4.1 Systèmes linéaires mimes d'hélices α

Le groupe de S. Fletcher s'intéresse à la conception de mimes d'hélices α pour l'inhibition d'interactions protéine-protéine. En particulier, l'interaction Bak BH3-Bcl-x_L (Bcl-x_L est une protéine membre de la famille Bcl-2). Cette interaction, précédemment étudiée par RMN en solution a mis en évidence 4 résidus hydrophobes clés de l'interaction : Val74, Leu78, Ile81 et Ile85 jouant les rôles de i , $i+4$, $i+7$ et $i+11$ respectivement le long de l'hélice α impliquée dans la liaison.⁶⁶ Le groupe d'A. Hamilton a développé le composé trispyridylamide **I.13**, procurant une inhibition *in vitro* de l'interaction de l'ordre du micromolaire ($K_i = 1.6 \mu\text{M}$).⁶⁷ Le composé est un mime d'hélice α s'organisant *via* des interactions hydrogène et des répulsions stériques entre les chaînes latérales. S'appuyant sur ces résultats et à la suite de modélisations moléculaires, le groupe de S. Fletcher a synthétisé une série de foldamères oligoaromatiques mimes d'hélice α également, mais certaines des liaisons hydrogènes intramoléculaires ne sont plus présentes. Ces composés ont prouvé leur capacité d'inhibition, de l'ordre du nanomolaire ; probablement grâce à leur flexibilité accrue, leur permettant ainsi de mieux s'adapter pour interagir avec la cible.⁶⁸

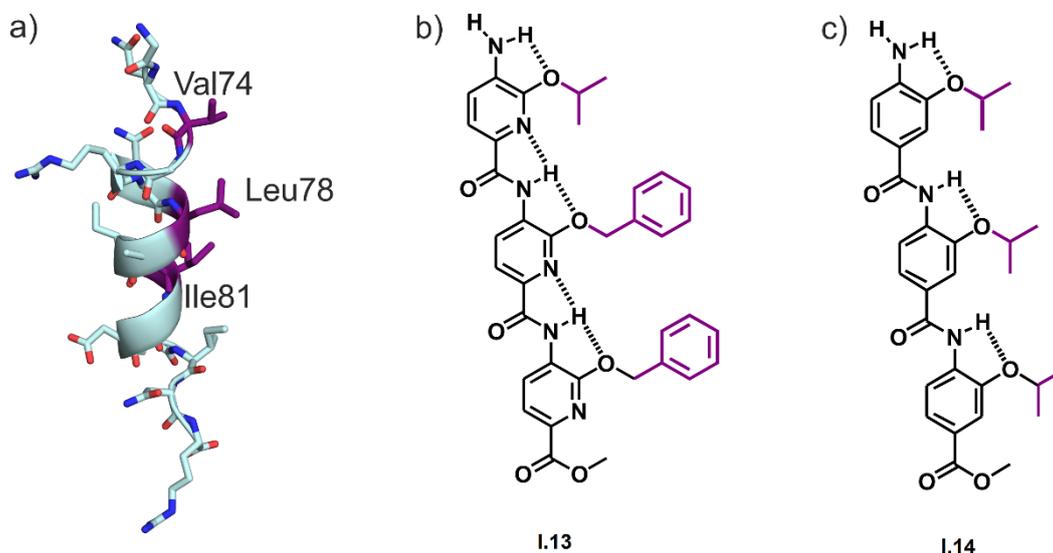


Figure 29. a) Hélice α impliquée dans l'interaction Bak BH3-Bcl-x_L. Les résidus clés de l'interaction sont mis en évidence en violet.⁶⁶ b) Structure du composé **I.13** développé par le groupe de A. D. Hamilton montrant une inhibition de l'ordre du micromolaire.⁶⁷ Interactions hydrogène représentées en pointillés. c) Structure d'un composé **I.14** conçu par le groupe de S. Fletcher montrant une inhibition de l'ordre du nanomolaire.⁶⁸

monomères aromatiques pour ajuster la forme de l'hélice : la pyridine, l'antracène, la pyridazine, etc. (Figure 31) Il est possible de manipuler ces monomères afin de changer la taille de la cavité hélicoïdale. L'angle entre les fonctions amine et acide va définir le rayon de courbure de l'hélice résultante. Ainsi, le monomère quinoline induit une courbure marquée de l'hélice quand le motif naphtyridine n'apporte presque pas de courbure.

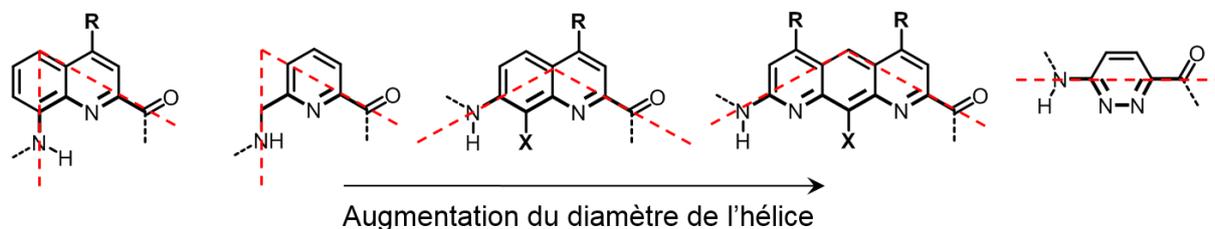


Figure 31. Représentation de quelques monomères développés par I. Huc pour influencer sur le rayon de courbure et donc le diamètre de l'hélice. Les angles formés entre l'amine et l'acide carboxylique sont représentés en pointillés rouges.

Le repliement hélicoïdal de ces foldamères hétérogènes induit la formation d'une cavité et de nombreux efforts ont été fournis depuis les vingt dernières années pour y accommoder une molécule invitée. Une stratégie d'évolution itérative de la séquence du foldamère a permis au groupe d'I. Huc de travailler sur la détermination de l'agencement stratégique des monomères au sein d'une séquence. Le diamètre de l'hélice a ainsi pu être ajusté pour développer une capsule hautement sélective pour le D-fructose.⁷⁰ (Figure 32)

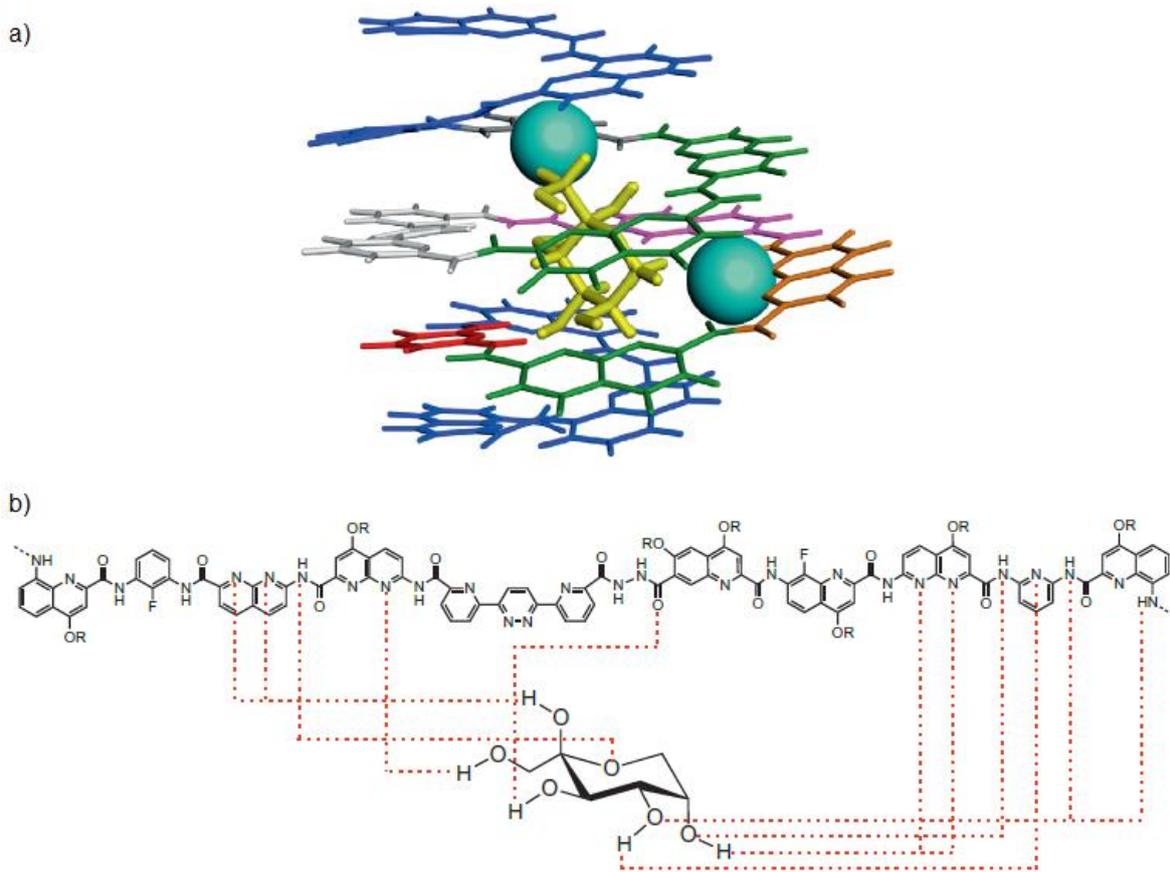


Figure 32. a) Structure cristallographique de la capsule contenant le D-fructose. b) Représentation de la capsule et de ses interactions avec le sucre.^{70a}

De tels récepteurs synthétiques présentent un intérêt particulier puisque, comme dans le cas des protéines, ce sont des liaisons non-covalentes, faibles et réversibles qui dirigent la formation de la cavité et permettent une reconnaissance *endo*. Il est également possible d'envisager une reconnaissance *exo* et le groupe d'I. Huc a travaillé cette approche en jouant sur les chaînes latérales de foldamères de quinolines.

4.2.2 Vers de la reconnaissance de surfaces de protéine

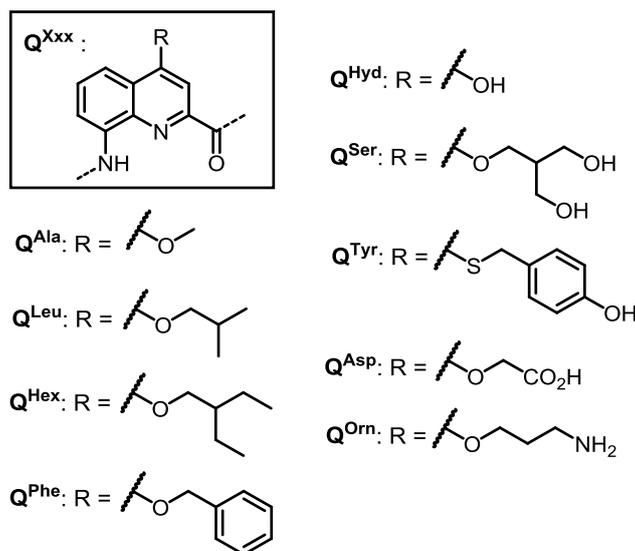


Figure 33. Représentation du monomère quinoline et des différentes chaînes latérales utilisées.

Les briques des foldamères de quinolines peuvent présenter des chaînes latérales protéogènes développées pour mimer celles des acides aminés. Elles vont permettre de retrouver des propriétés comme l'hydrosolubilité grâce aux monomères Q^{Orn} et Q^{Asp} . Les monomères Q^{Leu} , Q^{Hex} , Q^{Ala} apportent un caractère hydrophobe. Des interactions π sont permises grâce aux monomères Q^{Tyr} et Q^{Phe} (Figure 33). C'est l'agencement stratégique des chaînes latérales au sein d'une séquence de foldamère qui va permettre de cibler au mieux la surface d'une protéine. Cette approche a été récemment validée par le groupe d'I. Huc qui a ainsi pu mettre en évidence des interactions entre un foldamère de quinolines et l'anhydrase carbonique humaine II, par l'obtention d'une structure cristallographique du complexe.⁷¹

La grande prévisibilité, la stabilité et la taille intermédiaire (entre 0,5 et 5 kDa) des hélices développées par le groupe d'I. Huc offre une bonne alternative aux petites molécules pour cibler une surface de protéine. Comme les peptidomimes, les foldamères de quinolines présentent une bonne résistance aux protéases^{33b} ainsi qu'une bonne perméabilité membranaire.⁷²

Conclusion

Nous avons vu que le repliement était un concept clé à la base de la fonction et de l'information contenue dans une molécule, plus particulièrement avec le cas des protéines. Des molécules artificielles repliées permettent de mimer la nature pour mieux la comprendre et essayer de l'imiter. Certaines molécules artificielles possèdent des lois de repliement empruntées de la nature, c'est le cas des peptidomimes. D'autres permettent d'accéder à des structures secondaires plus originales et leur repliement fait appel à des paramètres supplémentaires. Le groupe d'I. Huc se propose d'utiliser les foldamères d'oligoamides aromatiques pour la reconnaissance de surfaces de protéines malgré le caractère complètement artificiel de leur squelette. A travers ce manuscrit, nous insisterons sur la synthèse de ces foldamères. Nous verrons leur utilisation et la stratégie mise en place pour détecter l'interaction foldamère/protéine. Les protéines étudiées sont l'anhydrase carbonique humaine II pour comprendre les mécanismes d'interaction et l'interleukine 4 ainsi que la cyclophiline A pour explorer des protéines d'intérêt thérapeutique plus important.

Références bibliographiques

1. Neidle, S., *Principles of nucleic acid structure*. Academic Press: 2010.
2. Alberts B, J. A., Lewis J, et al., *Molecular Biology Of The Cell 4th Edition*. New York: Garland Science: 2002.
3. Eisenberg, D., The discovery of the α -helix and β -sheet, the principal structural features of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 11207.
4. Cheng, P.-N.; Pham, J. D.; Nowick, J. S., The Supramolecular Chemistry of β -Sheets. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5477.
5. Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V., Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology* **1963**, *7*, 95.
6. Anfinsen, C. B., Principles that Govern the Folding of Protein Chain. *Science* **1973**, *181*, 223.
7. Gellman, S. H., Foldamers: A Manifesto. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173.
8. Prince, R. B.; Barnes, S. A.; Moore, J. S., Foldamer-Based Molecular Recognition. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2758.
9. Hecht, S.; Huc, I., *Foldamers: structure, properties and applications*. John Wiley & Sons: 2007.
10. Giuliano, M. W.; Horne, W. S.; Gellman, S. H., An α/β -Peptide Helix Bundle with a Pure β 3-Amino Acid Core and a Distinctive Quaternary Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9860.
11. Collie, G. W.; Pulka-Ziach, K.; Lombardo, C. M.; Fremaux, J.; Rosu, F.; Decossas, M.; Mauran, L.; Lambert, O.; Gabelica, V.; Mackereth, C. D.; Guichard, G., Shaping quaternary assemblies of water-soluble non-peptide helical foldamers by sequence manipulation. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 871.
12. Horne, W. S., Foldamers: Biomimetic and built to order. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 858.
13. Meisenheimer, J.; Witte, K., Reduction von 2-Nitronaphtalin. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1903**, *36*, 4153.
14. Mori, K.; Murase, T.; Fujita, M., One-Step Synthesis of [16]Helicene. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6847.
15. Caronna, T.; Sinisi, R.; Catellani, M.; Malpezzi, L.; Meille, S. V.; Mele, A., Photochemical synthesis and structural properties of high membered thiohelicenes. *Chem. Commun.* **2000**, 1139.
16. Han, S.; Bond, A. D.; Disch, R. L.; Holmes, D.; Schulman, J. M.; Teat, S. J.; Vollhardt, K. P. C.; Whitener, G. D., Total Syntheses and Structures of Angular [6]- and [7]Phenylene: The First Helical Phenylenes (Heliphenes). *Ang. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3223.
17. (a) Orner, B. P.; Ernst, J. T.; Hamilton, A. D., Toward Proteomimetics: Terphenyl Derivatives as Structural and Functional Mimics of Extended Regions of an α -Helix. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5382; (b) Yin, H.; Lee, G.-i.; Sedey, K. A.; Kutzki, O.; Park, H. S.; Orner, B. P.; Ernst, J. T.; Wang, H.-G.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D., Terphenyl-Based Bak BH3 α -Helical Proteomimetics as Low-Molecular-Weight Antagonists of Bcl-xL. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10191; (c) Yin, H.; Lee, G.-i.; Park, H. S.; Payne, G. A.; Rodriguez, J. M.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D., Terphenyl-Based Helical Mimetics That Disrupt the p53/HDM2 Interaction. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2704.
18. Azzarito, V.; Long, K.; Murphy, N. S.; Wilson, A. J., Inhibition of alpha-helix-mediated protein-protein interactions using designed molecules. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 161.
19. Lehn, J. M.; Rigault, A.; Siegel, J.; Harrowfield, J.; Chevrier, B.; Moras, D., Spontaneous assembly of double-stranded helicates from oligobipyridine ligands and copper(I) cations: structure of an inorganic double helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 2565.
20. Stadler, A.-M.; Kyritsakas, N.; Lehn, J.-M., Reversible folding/unfolding of linear molecular strands into helical channel-like complexes upon proton-modulated binding and release of metal ions. *Chem. Commun.* **2004**, 2024.
21. Busschaert, N.; Caltagirone, C.; Van Rossom, W.; Gale, P. A., Applications of Supramolecular Anion Recognition. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8038.
22. Li, S.; Jia, C.; Wu, B.; Luo, Q.; Huang, X.; Yang, Z.; Li, Q.-S.; Yang, X.-J., A Triple Anion Helicate Assembled from a Bis(biurea) Ligand and Phosphate Ions. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5721.
23. Guichard, G.; Huc, I., Synthetic foldamers. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5933.
24. Pham, J. D.; Spencer, R. K.; Chen, K. H.; Nowick, J. S., A Fibril-Like Assembly of Oligomers of a Peptide Derived from β -Amyloid. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12682.
25. Sebaoun, L.; Maurizot, V.; Granier, T.; Kauffmann, B.; Huc, I., Aromatic Oligoamide β -Sheet Foldamers. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2168.
26. Zhang, D.-W.; Zhao, X.; Hou, J.-L.; Li, Z.-T., Aromatic Amide Foldamers: Structures, Properties, and Functions. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5271.
27. Huc, I., Aromatic Oligoamide Foldamers. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004*, 17.
28. Jiang, H.; Léger, J.-M.; Dolain, C.; Guionneau, P.; Huc, I., Aromatic δ -peptides: design, synthesis and structural studies of helical, quinoline-derived oligoamide foldamers. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8365.

29. Jiang, H.; Léger, J.-M.; Huc, I., Aromatic δ -Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3448.
30. Dolain, C.; Léger, J.-M.; Delsuc, N.; Gornitzka, H.; Huc, I., Probing helix propensity of monomers within a helical oligomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 16146.
31. Berni, E.; Kauffmann, B.; Bao, C.; Lefeuvre, J.; Bassani, D. M.; Huc, I., Assessing the Mechanical Properties of a Molecular Spring. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8463.
32. Gillies, E. R.; Dolain, C.; Léger, J.-M.; Huc, I., Amphipathic Helices from Aromatic Amino Acid Oligomers. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7931.
33. (a) Qi, T.; Maurizot, V.; Noguchi, H.; Charoenraks, T.; Kauffmann, B.; Takafuji, M.; Ihara, H.; Huc, I., Solvent dependence of helix stability in aromatic oligoamide foldamers. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6337; (b) Gillies, E. R.; Deiss, F.; Staedel, C.; Schmitter, J.-M.; Huc, I., Development and Biological Assessment of Fully Water-Soluble Helical Aromatic Amide Foldamers. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4081.
34. Yuan, L.; Zeng, H.; Yamato, K.; Sanford, A. R.; Feng, W.; Atreya, H. S.; Sukumaran, D. K.; Szyperski, T.; Gong, B., Helical Aromatic Oligoamides: Reliable, Readily Predictable Folding from the Combination of Rigidified Structural Motifs. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16528.
35. (a) Jewginski, M.; Fischer, L.; Colombo, C.; Huc, I.; Mackereth, C. D., Solution Observation of Dimerization and Helix Handedness Induction in a Human Carbonic Anhydrase–Helical Aromatic Amide Foldamer Complex. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 727; (b) Delsuc, N.; Massip, S.; Léger, J.-M.; Kauffmann, B.; Huc, I., Relative Helix–Helix Conformations in Branched Aromatic Oligoamide Foldamers. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3165.
36. Delsuc, N.; Massip, S.; Léger, J.-M.; Kauffmann, B.; Huc, I., Relative Helix–Helix Conformations in Branched Aromatic Oligoamide Foldamers. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3165.
37. Pavone, V.; Zhang, S.-Q.; Merlino, A.; Lombardi, A.; Wu, Y.; DeGrado, W. F., Crystal structure of an amphiphilic foldamer reveals a 48-mer assembly comprising a hollow truncated octahedron. *Nat. Commun.* **2014**, *5*.
38. Pecuh, M. W.; Hamilton, A. D., Peptide and Protein Recognition by Designed Molecules. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2479.
39. J. Wilson, A., Inhibition of protein-protein interactions using designed molecules. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3289.
40. Ivanov, A. A.; Khuri, F. R.; Fu, H., Targeting protein–protein interactions as an anticancer strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 393.
41. Wells, J. A.; McClendon, C. L., Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* **2007**, *450*, 1001.
42. Fletcher, S.; Hamilton, A. D., Protein surface recognition and proteomimetics: mimics of protein surface structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 632.
43. Cunningham, B.; Wells, J., High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* **1989**, *244*, 1081.
44. Moreira, I. S.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J., Hot spots—A review of the protein–protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2007**, *68*, 803.
45. Daniels, D. S.; Schepartz, A., Intrinsically Cell-Permeable Miniature Proteins Based on a Minimal Cationic PPII Motif. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14578.
46. Milroy, L.-G.; Grossmann, T. N.; Hennig, S.; Brunsveld, L.; Ottmann, C., Modulators of Protein–Protein Interactions. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4695.
47. Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P., Structure of the MDM2 Oncoprotein Bound to the p53 Tumor Suppressor Transactivation Domain. *Science* **1996**, *274*, 948.
48. Kritzer, J. A.; Zutshi, R.; Cheah, M.; Ran, F. A.; Webman, R.; Wongjirad, T. M.; Schepartz, A., Miniature Protein Inhibitors of the p53–hDM2 Interaction. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 29.
49. (a) Disney, M. D.; Hook, D. F.; Namoto, K.; Seeberger, P. H.; Seebach, D., N-Linked Glycosylated β -Peptides Are Resistant to Degradation by Glycoamidase A. *Chem. Biodivers.* **2005**, *2*, 1624; (b) Horne, W. S.; Johnson, L. M.; Ketas, T. J.; Klasse, P. J.; Lu, M.; Moore, J. P.; Gellman, S. H., Structural and biological mimicry of protein surface recognition by α/β -peptide foldamers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 14751; (c) Sanborn, T. J.; Wu, C. W.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E., Extreme stability of helices formed by water-soluble poly-N-substituted glycines (polypeptoids) with α -chiral side chains. *Biopolymers* **2002**, *63*, 12.
50. Valacchi, G.; Sticozzi, C.; Lim, Y.; Pecorelli, A., Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2011**, *1229*, E1.
51. Werder, M.; Hauser, H.; Abele, S.; Seebach, D., β -Peptides as Inhibitors of Small-Intestinal Cholesterol and Fat Absorption. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1774.
52. Sia, S. K.; Carr, P. A.; Cochran, A. G.; Malashkevich, V. N.; Kim, P. S., Short constrained peptides that inhibit HIV-1 entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 14664.
53. Stephens, O. M.; Kim, S.; Welch, B. D.; Hodsdon, M. E.; Kay, M. S.; Schepartz, A., Inhibiting HIV Fusion with a β -Peptide Foldamer. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13126.

54. Matthews, T.; Salgo, M.; Greenberg, M.; Chung, J.; DeMasi, R.; Bolognesi, D., Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, *3*, 215.
55. (a) Marani, M.; Tenev, T.; Hancock, D.; Downward, J.; Lemoine, N. R., Identification of Novel Isoforms of the BH3 Domain Protein Bim Which Directly Activate Bax To Trigger Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 3577; (b) Danial, N. N.; Korsmeyer, S. J., Cell Death. *Cell* **116**, 205.
56. Checco, J. W.; Lee, E. F.; Evangelista, M.; Sleebs, N. J.; Rogers, K.; Pettikiriachchi, A.; Kershaw, N. J.; Eddinger, G. A.; Belair, D. G.; Wilson, J. L.; Eller, C. H.; Raines, R. T.; Murphy, W. L.; Smith, B. J.; Gellman, S. H.; Fairlie, W. D., α/β -Peptide Foldamers Targeting Intracellular Protein–Protein Interactions with Activity in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11365.
57. Shim, S. Y.; Kim, Y. W.; Verdine, G. L., A New $i, i+3$ Peptide Stapling System for α -Helix Stabilization. *Chemical biology & drug design* **2013**, *82*, 635.
58. Heldring, N.; Pike, A.; Andersson, S.; Matthews, J.; Cheng, G.; Hartman, J.; Tujague, M.; Ström, A.; Treuter, E.; Warner, M.; Gustafsson, J.-Å., Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 905.
59. Nettles, K. W.; Bruning, J. B.; Gil, G.; Nowak, J.; Sharma, S. K.; Hahm, J. B.; Kulp, K.; Hochberg, R. B.; Zhou, H.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S.; Kim, Y.; Joachimiak, A.; Greene, G. L., NF[κ]B selectivity of estrogen receptor ligands revealed by comparative crystallographic analyses. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 241.
60. Phillips, C.; Roberts, L. R.; Schade, M.; Bazin, R.; Bent, A.; Davies, N. L.; Moore, R.; Pannifer, A. D.; Pickford, A. R.; Prior, S. H.; Read, C. M.; Scott, A.; Brown, D. G.; Xu, B.; Irving, S. L., Design and Structure of Stapled Peptides Binding to Estrogen Receptors. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9696.
61. Fleet, J. C.; Schoch, R. D., Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2010**, *47*, 181.
62. Demizu, Y.; Nagoya, S.; Shirakawa, M.; Kawamura, M.; Yamagata, N.; Sato, Y.; Doi, M.; Kurihara, M., Development of stapled short helical peptides capable of inhibiting vitamin D receptor (VDR)–coactivator interactions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4292.
63. Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K., Peptoids: a modular approach to drug discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 9367.
64. Hara, T.; Durell, S. R.; Myers, M. C.; Appella, D. H., Probing the Structural Requirements of Peptoids That Inhibit HDM2–p53 Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1995.
65. Udugamasooriya, D. G.; Dineen, S. P.; Brekken, R. A.; Kodadek, T., A Peptoid “Antibody Surrogate” That Antagonizes VEGF Receptor 2 Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5744.
66. Sattler, M.; Liang, H.; Nettesheim, D.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Eberstadt, M.; Yoon, H. S.; Shuker, S. B.; Chang, B. S.; Minn, A. J.; Thompson, C. B.; Fesik, S. W., Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **1997**, *275*, 983.
67. Ernst, J. T.; Becerril, J.; Park, H. S.; Yin, H.; Hamilton, A. D., Design and Application of an α -Helix-Mimetic Scaffold Based on an Oligoamide-Foldamer Strategy: Antagonism of the Bak BH3/Bcl-xL Complex. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 535.
68. Yap, J. L.; Cao, X.; Vanommeslaeghe, K.; Jung, K.-Y.; Peddaboina, C.; Wilder, P. T.; Nan, A.; MacKerell, A. D.; Smythe, W. R.; Fletcher, S., Relaxation of the rigid backbone of an oligoamide-foldamer-based [small α]-helix mimetic: identification of potent Bcl-xL inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2928.
69. Barnard, A.; Long, K.; Martin, H. L.; Miles, J. A.; Edwards, T. A.; Tomlinson, D. C.; Macdonald, A.; Wilson, A. J., Selective and Potent Proteomimetic Inhibitors of Intracellular Protein–Protein Interactions. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2960.
70. (a) Chandramouli, N.; Ferrand, Y.; Lautrette, G.; Kauffmann, B.; Mackereth, C. D.; Laguerre, M.; Dubreuil, D.; Huc, I., Iterative design of a helically folded aromatic oligoamide sequence for the selective encapsulation of fructose. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 334; (b) Lautrette, G.; Wicher, B.; Kauffmann, B.; Ferrand, Y.; Huc, I., Iterative Evolution of an Abiotic Foldamer Sequence for the Recognition of Guest Molecules with Atomic Precision. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**.
71. Buratto, J.; Colombo, C.; Stupfel, M.; Dawson, S. J.; Dolain, C.; Langlois d'Estaintot, B.; Fischer, L.; Granier, T.; Laguerre, M.; Gallois, B.; Huc, I., Structure of a Complex Formed by a Protein and a Helical Aromatic Oligoamide Foldamer at 2.1 Å Resolution. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 883.
72. Iriondo-Alberdi, J.; Laxmi-Reddy, K.; Bouguerne, B.; Staedel, C.; Huc, I., Cellular Internalization of Water-Soluble Helical Aromatic Amide Foldamers. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1679.

CHAPITRE 2 : Synthèse des oligoquinolines

Introduction

Dans le but d'étudier l'interaction entre nos foldamères et des protéines, nous devons être capables de produire des oligomères les plus variés possibles. Nous pouvons apporter de la diversité à l'échelle du monomère. Ceci, en jouant sur la nature et/ou la position de la chaîne latérale, pour assurer les interactions avec les acides aminés de la surface de la protéine ciblée. En vue de l'interaction avec une cible protéique, les foldamères d'oligoamides aromatiques doivent aussi pouvoir être solubilisés en milieu aqueux. Grâce au type de chaîne latérale utilisé, nous allons obtenir des foldamères plus ou moins hydrosolubles.

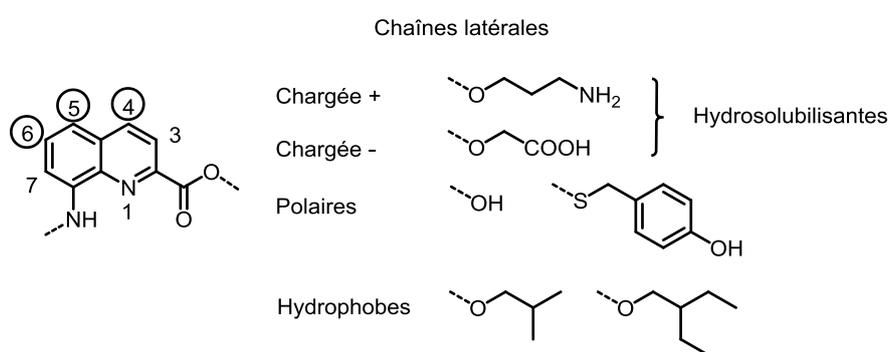


Figure 1. Représentation de la fonctionnalisation de la quinoline.

La quinoline est la brique principale pour la synthèse de nos foldamères. C'est un motif aisément fonctionnalisable et les chaînes latérales peuvent être introduites à plusieurs endroits. La position 4 de la quinoline reste cependant celle pour laquelle la chimie est la mieux maîtrisée. Néanmoins les positions 5 et 6 restent tout à fait envisageables (voir monomère Q^{50m} **4**). Pour répondre à la diversité de chaînes latérales requises pour ce projet, une série de monomères quinolines différents a été synthétisée lors de ce travail de thèse (Figure 1).

Ce chapitre détaillera la synthèse des différentes briques constitutives de nos foldamères oligoquinoline à savoir les monomères quinoline d'une part et les blocs (*linkers*) permettant d'ancrer les foldamères à la surface protéique, d'autre part. Enfin, nous aborderons l'assemblage de ces briques par synthèse sur support solide (SPS) pour obtenir les foldamères ligands schématisés ci-dessous (Figure 2).

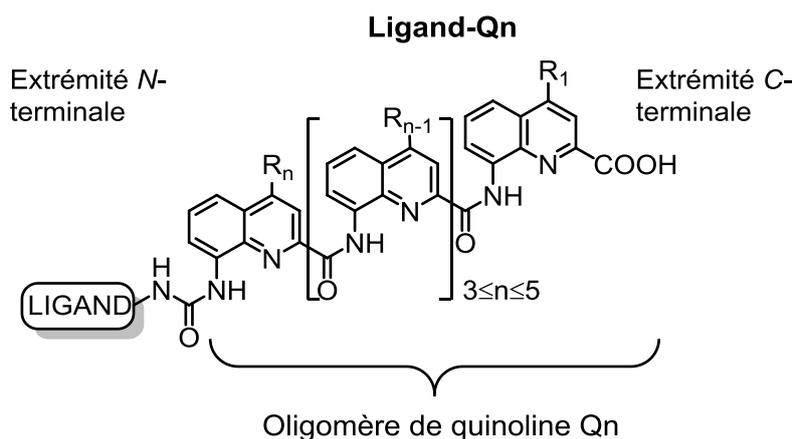


Figure 2. Représentation générale d'un foldamère de quinolines **Ligand-Qn** pour l'interaction avec une surface protéique.

1 Synthèse des monomères quinoline

Comme nous allons le développer un peu plus loin dans ce chapitre, les monomères de quinoline sont destinés à être utilisés en synthèse sur support solide employant une stratégie Fmoc. Pour cette raison, les chaînes latérales sont protégées avec une protection orthogonale, et sont labiles au TFA. D'où l'utilisation de groupement Boc ou *tert*-butyle. Toujours en vue d'être utilisés en SPS, les monomères nécessitent une grande pureté ($\geq 97\%$) qui sera déterminée par HPLC en phase inverse.

1.1 Monomères fonctionnalisés en position 4

La plupart des monomères utilisés sont fonctionnalisés en position 4. Historiquement dans le groupe, c'est en effet la première position envisagée et optimisée pour la synthèse d'oligomères en solution.¹ La position 4 se révèle facilement activable par réaction de Mitsunobu ou alkylation de la quinolinone **1**. La présence de l'azote en *para* sur la quinolinone rend la position 4 réactive.

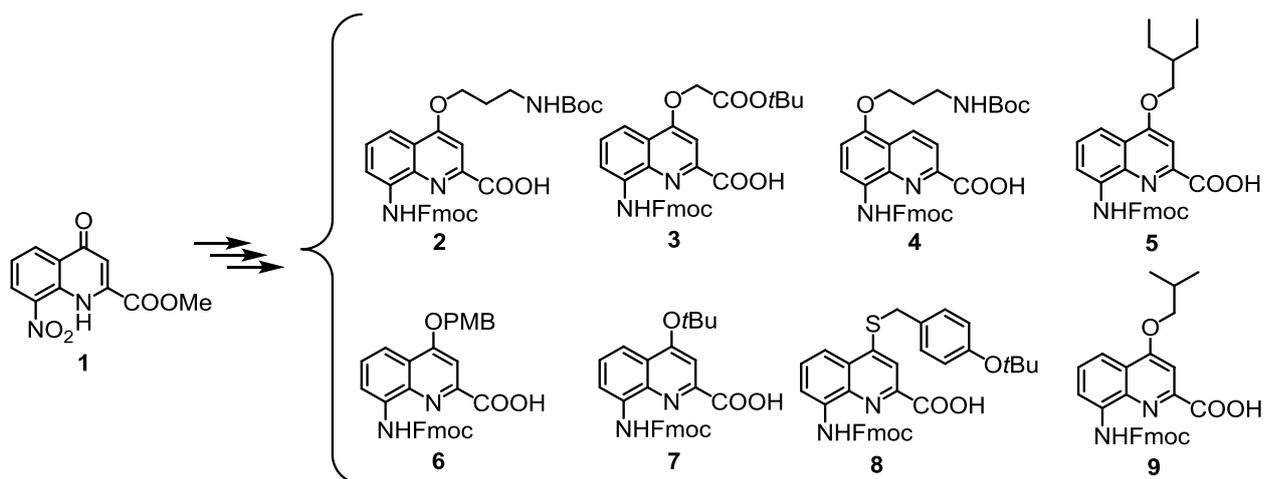


Figure 3. Liste des monomères quinoline Q (sous forme protégée) synthétisés au cours de ce travail de thèse.

Parmi les monomères synthétisés lors de la thèse (Figure 3), les monomères **2**, **3**, **6** à **9** avaient déjà été décrits au laboratoire² et un effort de développement synthétique a été effectué pour obtenir les composés **4** et **5**.

1.1.1 Schéma de synthèse général

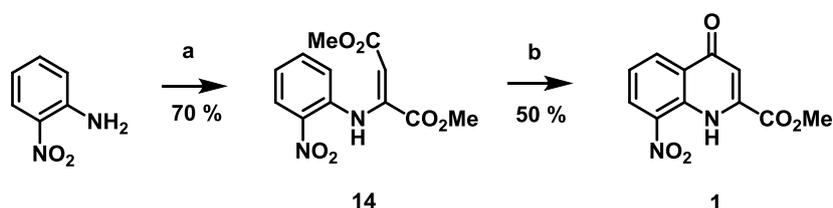


Schéma 1. Conditions d'obtention de l'intermédiaire quinolinone **1**. a) Dicarboxylate de diméthylacétylène, MeOH ; b) Diphényle éther, 260 °C.

L'intermédiaire clé de la synthèse de ces monomères est la quinolinone **1**. E. Merlet, technicien dans le groupe, le prépare aujourd'hui à l'échelle d'une centaine de grammes en s'inspirant des conditions décrites par N. P. Peet.³ La première étape consiste en la condensation du dicarboxylate de diméthylacétylène commercial sur la 2-nitroaniline. Une cyclisation thermique dans le diphényle éther permet ensuite d'accéder à l'intermédiaire **1** à partir duquel la fonctionnalisation du monomère va pouvoir s'effectuer.

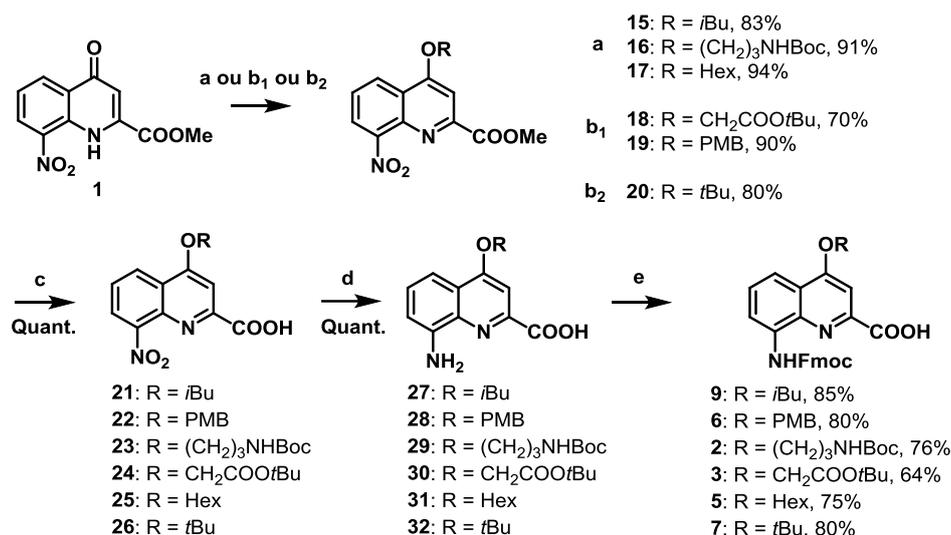


Schéma 2. Schéma de synthèse des monomères quinoline fonctionnalisés en position 4. a) ROH, PPh₃, DIAD, THF, N₂, t.a. ; b₁) PMBCl ou BrCH₂COO*t*Bu, NaI, K₂CO₃, Acétone, 60 °C ; b₂) *t*BuBr, Ag₂O, Acétone, t.a. ; c) LiOH.H₂O, THF/H₂O, t.a. ; d) H₂, 10 % Pd/C, THF/AE, t.a. ; e) FmocCl, 15 % NaHCO₃ aq., dioxane/eau, t.a..

Une réaction de Mitsunobu (conditions a, schéma 2) ou d'alkylation (conditions b₁ ou b₂, schéma 2) permet l'installation de la chaîne latérale. Les étapes suivantes consistent en la saponification de la fonction ester en présence d'hydroxyde de lithium, suivie de la réduction du groupement nitro en utilisant du palladium sur charbon activé et un ballon d'hydrogène. Ces deux étapes possèdent des rendements quantitatifs. La dernière étape de protection de l'acide aminé par un groupement fmoc est généralement celle qui possède les rendements limitants. La formation d'un sous-produit anhydride **33** rend en effet la purification difficile (Figure 4).

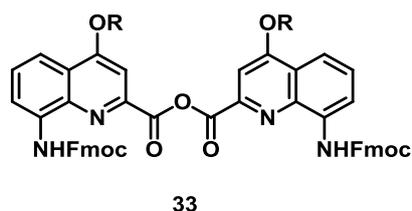


Figure 4. Structure du sous-produit anhydride **33**.

1.1.2 Une chaîne latérale polaire - Q^{OH}

L'intérêt de ce monomère est de posséder une chaîne latérale polaire, la plus simple possible. A l'origine, ce monomère était protégé sous forme éther par un groupement *para* méthoxy benzyle.⁴ Il a cependant été montré par des études RMN réalisées par C. Colombo, post-doctorante du groupe, que lors du clivage de la résine, le groupement PMB engendre des sous-produits issus du réarrangement de cette fonction sur le foldamère. Des efforts ont été réalisés dans le groupe par S. De, un post-doctorant, afin de développer ce monomère protégé

par un groupement *tert*-butyle. La difficulté de synthèse de ce variant réside dans la labilité du groupement, très sensible aux milieux acides.

Comme décrit dans le schéma 2, seule la première étape diffère des conditions de synthèse des monomères quinoline classiques. En effet, la chaîne latérale n'est plus introduite par une réaction de Mitsunobu mais par les conditions développées par S. De, impliquant de l'acétate d'argent et du bromure de *tert*-butyle dans l'acétone. Les étapes suivantes consistent en la saponification de la fonction ester, la réduction du groupement nitro, suivie de la protection de l'acide aminé correspondant par un groupement fmoc.

1.1.3 Une autre chaîne polaire - Q^{Tyr}

La synthèse de ce monomère diffère légèrement du schéma général (Schéma 3). Afin de bénéficier d'une chaîne à la fois polaire et pouvant apporter des interactions π - π , le groupe a choisi de développer le monomère **8**, mimant la tyrosine. Il faut d'abord synthétiser la chaîne latérale dont le thiol **36** est sensible à l'oxydation par l'oxygène de l'air.

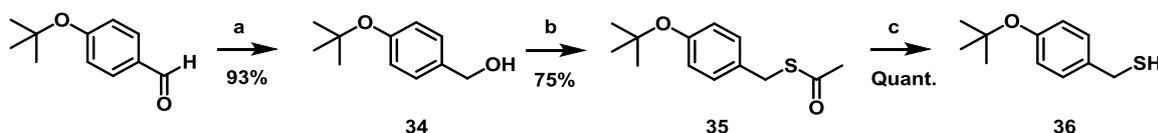


Schéma 3. Synthèse de la chaîne latérale pour l'obtention du monomère **8**. a) NaBH₄, MeOH, t.a. ; b) PPh₃, DIAD, HSAc, THF, 0 °C à t.a. ; c) NaOH, MeOH, t.a..

La première étape consiste en la réduction de l'aldéhyde en alcool primaire par le borohydrure de sodium dans le méthanol. Une réaction de Mitsunobu en présence de l'acide thioacétique permet de générer la fonction thioester. Celle-ci est enfin saponifiée grâce à l'hydroxyde de sodium dans le méthanol. La chaîne latérale **36** peut alors être introduite sur la quinolinone selon le schéma 4.

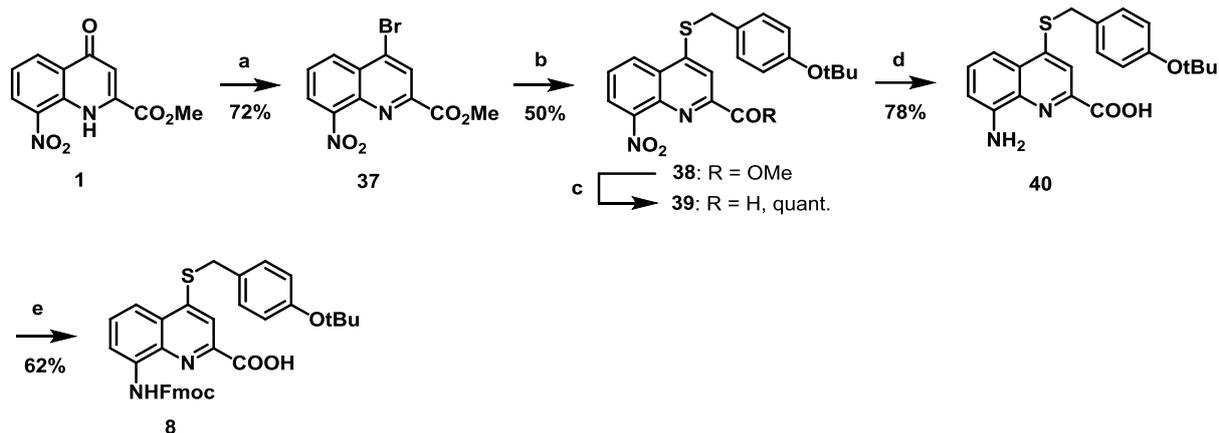


Schéma 4. Préparation du monomère **8**. a) POBr₃, DMF, 80 °C ; b) **36**, Cs₂CO₃, DMF, t.a. ; c) LiOH.H₂O, THF/H₂O, t.a. ; d) Pd/C, formate d'ammonium, métavanadate d'ammonium, AcOEt, EtOH, H₂O, reflux ; e) FmocCl, NaHCO₃, dioxane/H₂O, 0 °C à t.a..

Après fonctionnalisation de la quinolinone en quinoline bromée,⁴ une réaction de substitution nucléophile permet d'installer la chaîne latérale. L'étape de saponification est similaire aux conditions vues précédemment. Une différence réside cependant dans la réduction du groupement nitro. Elle est difficile puisqu'elle est limitée par une accumulation d'intermédiaires nitroso et les conditions habituelles ne sont plus suffisantes pour obtenir le produit désiré. C'est pourquoi dans ce cas, l'hydrogène est généré *in situ* à l'aide de formate d'ammonium et catalysé au vanadium en quantité catalytique.⁵ Le reste de la synthèse est similaire aux autres monomères. (Schéma 4) Notons ici l'utilisation d'un thioéther pour installer la chaîne latérale sur la quinoline. Auparavant, le monomère de type tyrosine portait la chaîne latérale *via* une fonction éther-oxyde. Or des études réalisées dans le groupe ont montré que dans le cas de ce monomère, la proportion de clivage de la chaîne latérale sous forme éther-oxyde était plus importante qu'avec la fonction thioéther.

1.1.4 Une chaîne hydrophobe - Q^{Hex}

Deux sortes de chaînes latérales hydrophobes sont disponibles au laboratoire : des chaînes aliphatiques et aromatiques. Après étude approfondie d'un de nos foldamères en interaction avec la protéine HCA (chapitre 3), il apparaît que le monomère Q^{Leu} se place bien dans une poche hydrophobe de la protéine en question. Nous souhaitons calquer les propriétés de ce monomère tout en améliorant sa fonction hydrophobe. C'est donc une version allongée qui a été proposée.

La synthèse du monomère hexyle **5** s'inspire grandement de son homologue court puisqu'elle suit exactement les mêmes étapes comme décrit plus haut. (Schéma 2) Les

rendements et purifications se sont avérés aussi bons que pour la version *i*Bu et de la même manière, seule la molécule finale nécessite une purification sur colonne chromatographique.

1.2 Développement d'un nouveau monomère quinoline fonctionnalisé en position 5

L'introduction de chaîne latérale en position 5 et 6 de la quinoline est explorée dans le groupe. C'est dans ce cadre que des efforts ont été réalisés quant à l'obtention d'un autre variant type ornithine. En plus de développer la chimie d'introduction d'une chaîne latérale en position 5, l'intérêt de ce monomère est avant tout d'améliorer l'interaction entre une cible protéique et un foldamère modèle, concept qui sera étudié dans les chapitres suivants.

Malgré la simplicité apparente de ce variant vis-à-vis de son homologue, la chimie s'est avérée plus compliquée qu'attendue. Tout d'abord, pour concevoir ce monomère il n'est plus possible de débiter avec l'intermédiaire quinolinone classique **1**.

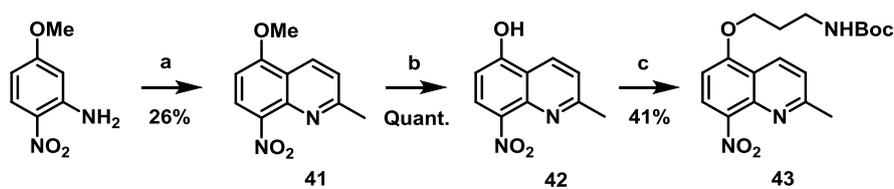


Schéma 5. Synthèse du composé **43** à partir de la 4-méthoxy-2-nitroaniline. a) Crotonaldéhyde/Paraldéhyde, HCl 37 %, H₃PO₄ 80 % ; b) NaOH, dioxane/eau, reflux ; c) HO-(CH₂)₃-NHBoc, PPh₃, DIAD, Et₃N, THF, t.a..

La formation du cycle quinoline à partir de la 4-méthoxy-2-nitroaniline est décrite de deux manières à partir du paraldéhyde⁶ ou du crotonaldéhyde.⁷ Dans les deux cas, des conditions très acides à chaud sont requises. Les rendements sont faibles, autour de 20 %. Cette première étape conduit à des sous-produits de polymérisation qui rendent la purification difficile. Il faut ensuite libérer la fonction phénol en déméthylant la position 5 du cycle. Les conditions classiques de déméthylation en présence de tribromure de bore⁸ dans le dichlorométhane à froid n'ont pas été concluantes et seul le produit de départ a été récupéré. Le même résultat a été obtenu en mettant le composé **41** en présence du chlorure de pyridinium à reflux.⁹ C'est l'utilisation d'un large excès d'hydroxyde de soude dans un mélange eau/dioxane à reflux pendant une nuit qui a permis de déméthoxyler la position 5 du cycle. La réacidification du milieu permet la précipitation du composé **42**, évitant ainsi une purification laborieuse de ce phénol.

La réaction de Mitsunobu pour installer la chaîne latérale en position 5 a posé des difficultés de par la faible réactivité du phénol. La fonction nitro en *para* de celui-ci induit une forte délocalisation électronique sur le cycle, conduisant à un appauvrissement de la nucléophilie du phénol, ainsi qu'à une acidité augmentée. Ceci explique le faible rendement d'obtention du produit désiré : de l'ordre de 10 %. C'est finalement en ajoutant une base aux conditions classiques de Mitsunobu que le composé **43** a pu être obtenu avec un rendement de l'ordre de 40 %.¹⁰

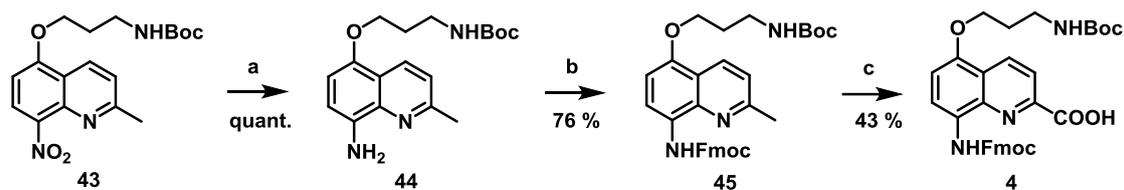


Schéma 6. Première voie de synthèse envisagée pour la préparation de **4**. a) H₂, Pd/C, THF, t.a. ; b) FmocCl, DIEA, THF, t.a. ; c) SeO₂, Pyridine, 70 °C.

A partir de là, deux voies ont été explorées. La première consistant à réduire le groupement nitro, le protéger par un fmoc et terminer par la fonctionnalisation en acide carboxylique. La réduction a pu s'effectuer dans les conditions standards utilisant un ballon d'hydrogène en présence de palladium sur charbon activé. C'est un rendement quantitatif qui a conduit au composé réduit **44**. Lequel a ensuite été engagé dans l'étape de protection par un groupement fmoc en employant les conditions classiques faisant intervenir du FmocCl en présence d'une base dans le THF. La dernière étape a consisté à oxyder le méthyle en acide carboxylique grâce à l'oxyde de sélénium.¹¹ Cependant, une purification optimale du produit désiré n'a pas pu être obtenue, nous avons supposé qu'il restait des résidus sélénium.

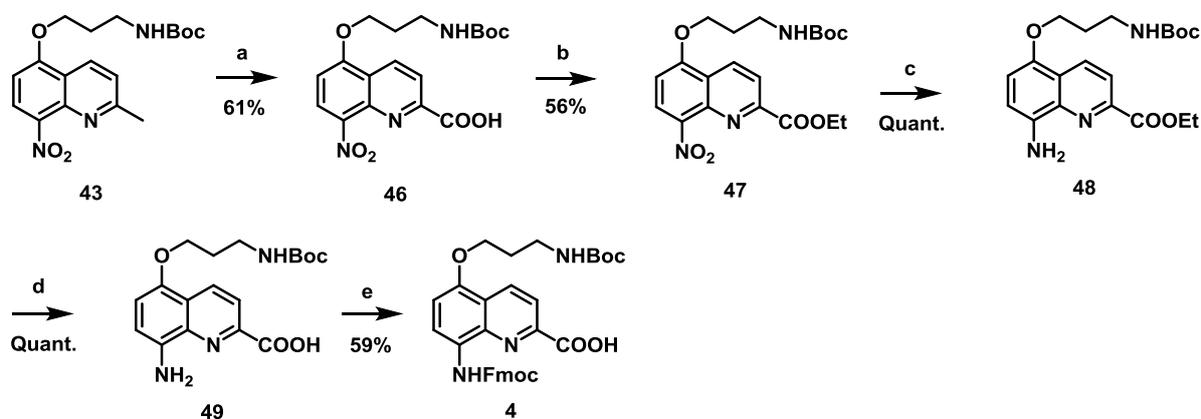


Schéma 7. Voie de synthèse validée pour la préparation du monomère **4**. a) SeO₂, pyridine, 70 °C ; b) 1. Réactif de Ghosez, CHCl₃, 0 °C à t.a. ; 2. EtOH, Et₃N, CHCl₃, t.a. ; c) Fe, AcOH, EtOH, reflux ; d) LiOH.H₂O, Dioxane/H₂O, t.a. ; e) FmocCl, 15 % NaHCO₃ aq., Dioxane, t.a..

C'est alors que la seconde voie a été envisagée. Elle consiste à commencer par l'oxydation du méthyle en acide carboxylique en présence d'oxyde de sélénium. Dans un souci de pureté, une étape d'estérification a été rajoutée pour pouvoir éliminer les résidus provenant probablement du sélénium. La fonction ester la plus simple a d'abord été choisie en introduisant un motif méthyle. Cette stratégie ne sera pas développée puisque la fonction n'a pas pu être déméthylée de façon convenable, ou alors en entraînant la perte de la chaîne latérale.

Un ester d'éthyle a alors été introduit grâce à une activation douce sous forme de chlorure d'acide, par le 1-chloro-*N,N*,2-triméthyl-1-propénylamine permettant de travailler en conditions neutres.¹²

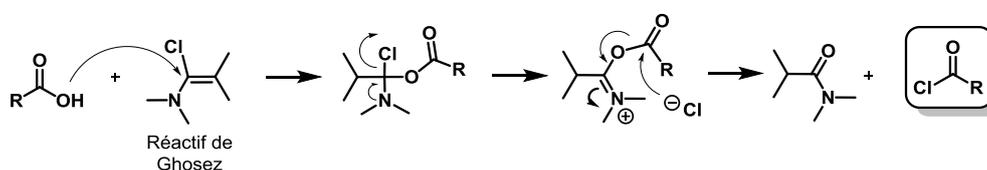


Figure 5. Mécanisme d'obtention d'un chlorure d'acyle grâce au réactif de Ghosez.

De l'éthanol en présence d'une base a ensuite été utilisé pour le couplage. Les méthodes classiques d'hydrogénation du groupement nitro ont conduit à la formation d'une grande quantité d'intermédiaires rendant la purification impossible. Des conditions impliquant du fer au reflux dans un mélange acide acétique/éthanol pendant 15 min ont été employées.⁶ La réaction est rapide, avec un rendement quantitatif et ne nécessite pas de purification. Il en est de même pour l'étape suivante de saponification. L'acide aminé résultant est finalement protégé par un groupement fmoc par les conditions de protection usuelles. Cette voie de synthèse permet d'obtenir le monomère protégé **4** en 8 étapes avec un rendement global de 2 %. Celui-ci est limité par la première étape de cyclisation pour obtenir la quinoline **41**. Nous pourrions éventuellement apporter des améliorations et augmenter le rendement de l'étape d'estérification. Cependant, nous avons fait le choix de ne pas réaliser le travail de méthodologie nécessaire à l'optimisation. Nous avons effectivement préféré produire le monomère **4** avec un haut niveau de pureté puisque pour son utilisation, seuls quelques centaines de milligrammes étaient requis.

2 Synthèse des ligands

2.1 Ligand pour HCA : inhibiteur sulfonamide

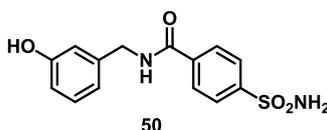


Figure 6. Ligand *N*-benzyle-4-sulfamoylbenzamide **50**.

En vue du projet impliquant l'anhydrase carbonique humaine II, nos foldamères seront ancrés à la protéine via l'inhibiteur sulfonamide **50** présentant une activité nanomolaire. L'ajout d'un espaceur à cet inhibiteur permet d'orienter le foldamère en direction du site actif de la protéine. (Chapitre 3) Les résultats issus de la cocrystallisation avec la protéine ont montré que l'espaceur devait être installé en position *mé*ta de l'inhibiteur. La synthèse du composé **50** n'a pas été répétée lors de ce travail de thèse car elle avait été effectuée précédemment en grande quantité par C. Colombo (post doctorante du groupe).

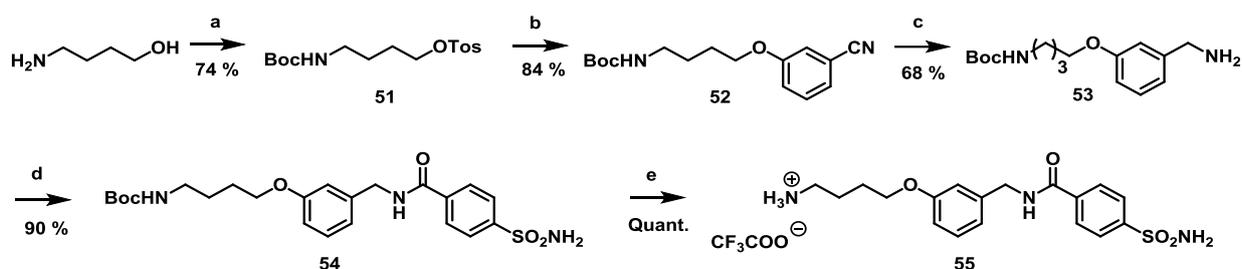


Schéma 8. Synthèse de **55**. a) 1. Boc_2O , THF, t.a. ; 2. TsCl , Et_3N , DMAP, DCM, t.a. ; b) 3-cyanophénol, K_2CO_3 , DMF, 70°C ; c) H_2 , Pd/C, MeOH, t.a. ; d) acide 4-sulfamoylbenzoïque, PyBOP, Et_3N , DMA, t.a. ; e) TFA/DCM (1/1), t.a..

Les étapes de synthèse consistent en la protection du 4-aminobutanol par un groupement Boc pour la fonction amine et un tosylate pour le phénol. Une réaction de substitution avec le 3-cyanophénol est ensuite réalisée. Le groupement cyano est réduit en amine, elle-même couplée avec l'acide 4-sulfamoylbenzoïque. Le composé **55** est finalement obtenu par déprotection de l'amine aliphatique grâce au TFA dans le dichlorométhane.

2.2 Linker pour l'interleukine 4 (IL-4) et la cyclophiline A (CypA) : disulfure activé

Dans le cadre du projet sur les protéines Cyclophiline A et Interleukine 4, nous nous sommes inspirés de la méthode de *tethering* développée par J. Wells.¹³ Elle consiste à accrocher covalamment les ligands à la surface protéique. Elle implique de posséder une fonction spécifique sur les foldamères, capable de se lier avec une cystéine libre en surface de la protéine par l'intermédiaire d'un pont disulfure. Nous avons opté pour une fonction disulfure portée par une pyridine. Ainsi la fonction réactive de nos foldamères est un disulfure activé capable de

réagir avec le thiol d'une cystéine situé sur la surface protéique. Ce disulfure activé sera relié aux foldamères oligoquinolines *via* un bras espaceur plus ou moins long. Ceci a donné la synthèse de deux molécules : **SL** (pour *short linker*) et **LL** pour (*long linker*) dérivant d'un intermédiaire commun **56**. Cet intermédiaire est synthétisé selon le schéma 9 suivant :

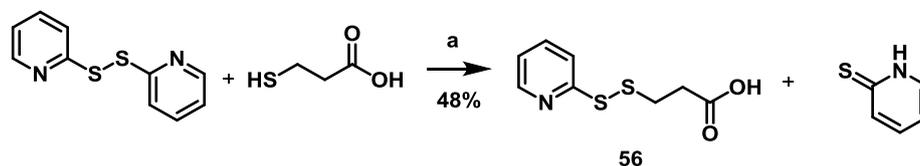


Schéma 9. Synthèse de l'intermédiaire **56**. a) AcOH, MeOH, t.a..

Un excès d'aldrithiol™ est mis en présence d'acide 3-mercaptopropionique¹⁴ pour conduire au composé **56** avec un rendement de 48 % s'expliquant par la conversion de l'aldrithiol en pyridine thione.

Pour le *linker* court **10**, la seconde étape consiste en la formation de la liaison amide avec la *N*-boc-éthylènediamine impliquant le HATU comme agent de couplage. Le composé **57** est obtenu par précipitation avec un rendement de 40 %. Le groupement Boc est ensuite quantitativement déprotégé par l'action du TFA dans le dichlorométhane. (Schéma 10)

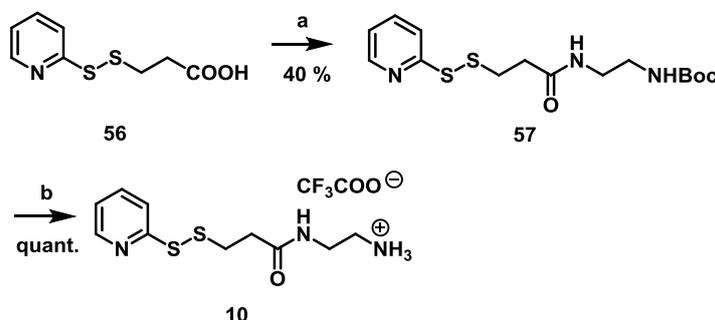


Schéma 10. Synthèse du *linker* court **10**. a) *N*-boc-éthylène-diamine, HATU, DIEA, THF, 0 °C à t.a. ; b) TFA, DCM, t. a..

En ce qui concerne le *linker* long, la synthèse requiert plus d'étapes puisqu'il faut d'abord produire l'amine boc triéthylène glycol. (Schéma 11)

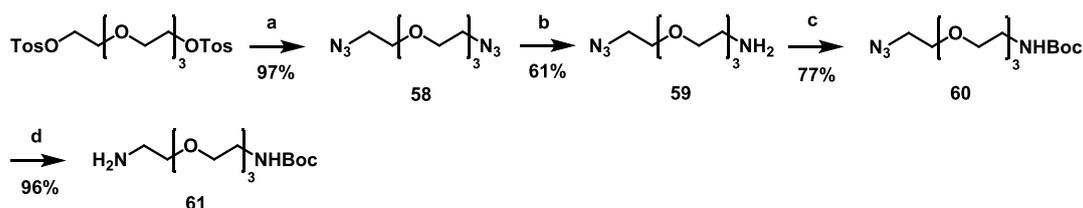


Schéma 11. Préparation de l'amine **61**. a) NaN₃, DMF, 65 °C ; b) PPh₃, Et₂O/THF/HCl 1M, t.a. ; c) Boc₂O, DCM, t.a. ; d) H₂, Pd/C, AcOEt, t.a..

Une réaction de substitution est réalisée sur le tétraéthylèneglycol bis *p*-toluènesulfonate commercial pour obtenir une fonction azoture à chaque extrémité de la chaîne. Il faut ensuite procéder à la dessymétrisation grâce à une réaction de Staudinger qui permet d'obtenir l'amine **59** avec un rendement de 61 %. On protège ensuite **59** par un groupement Boc pour obtenir le composé **60**. Une réduction de l'azoture en amine par hydrogénation catalysée au palladium sur charbon activé permet d'obtenir l'amine **61** qui sera utilisée pour le couplage avec **56**.

Différentes conditions de couplage peptidique ont alors été testées entre **56** et **61** et sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1. Conditions de couplage utilisées pour la formation du composé **11**.

Conditions	Conclusion
56 (1 equiv.), EDC (1.2 equiv.), HOBt (2 equiv.), DIEA (3 equiv.), DCM (c = 0.2 M)	$\eta = 20 \%$
56 (3 equiv.), HBTU (4.5 equiv.), éthyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acétate (oxyma) ¹⁵ (4.5 equiv.), DIEA (5 equiv.), DMF (c = 0.14 M)	Dégradation de 56 Pas de trace de 11
56 (3 equiv.), HATU (1.5 equiv.), DIEA (3 equiv.), THF (c = 0.7 M)	Pas de trace de 11
56 (1.3 equiv.), PyBOP (2 equiv.), DIEA (4 equiv.), CHCl ₃ (c = 0.7 M)	$\eta = 6 \%$

Aucune condition de couplage n'ayant donné de résultat satisfaisant, l'acide carboxylique **56** a été activé avec du pentachlorophénol.¹⁶ Une réaction de substitution permet d'obtenir le composé **63** avec un rendement de 73 % après purification par colonne chromatographique. Le groupement Boc est finalement déprotégé par l'action du TFA dans le dichlorométhane.

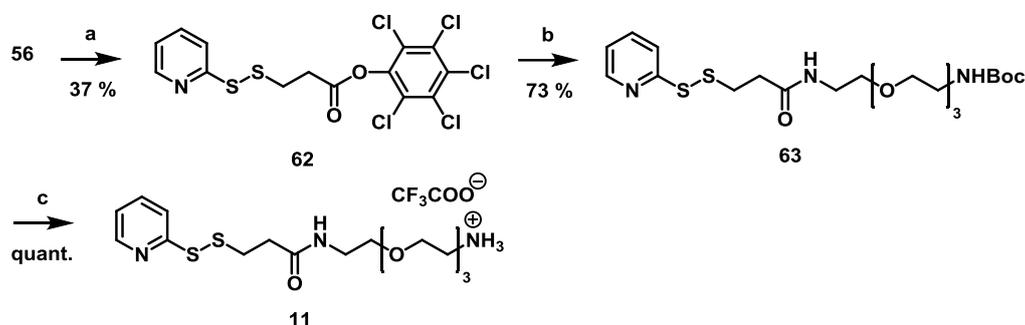


Schéma 12. Synthèse de **11**. a) Pentachlorophénol, EDC.HCl, DMAP, THF, t.a. ; b) **61**, Et₃N, THF, t.a. ; c) TFA, DCM, t. a..

Une fois les blocs de synthèse en main, leur assemblage a pu être réalisé en synthèse supportée.

3 Synthèse sur support solide (SPS)

3.1 Choix et intérêt

La synthèse sur support solide consiste en la synthèse de composés organiques, où la molécule d'intérêt est liée par un bras espaceur à une résine insoluble et les réactifs sont ajoutés en excès. Ceux-ci peuvent être facilement éliminés par lavage, filtration et la molécule désirée ne nécessite qu'une purification finale. Cette technique est couramment utilisée pour la synthèse de molécules biologiques telles que des peptides, des acides nucléiques et des oligosaccharides. Elle a été introduite par R. B. Merrifield dans les années 60.¹⁷

La synthèse sur support solide est bien adaptée pour élaborer rapidement des bibliothèques de foldamères les plus diverses possibles, avec de hauts niveaux de pureté. L'assistance par micro-ondes permet de diminuer le temps de ces réactions et d'améliorer la réactivité. Un autre avantage apporté par la SPS est l'isolation des sites réactionnels comme expliqué par R. Shi, F. Wang, et B. Yan.¹⁸ C'est un effet de pseudo dilution qui réduit les chances d'interactions intermoléculaires. La SPS est une méthodologie communément utilisée pour obtenir des foldamères aliphatiques peptidiques. Pour une liste non exhaustive, on retrouve de tels exemples avec le groupe de D. Seebach, qui a synthétisé les premiers foldamères d'acides aminés β sur support solide.¹⁹ La synthèse de γ -peptides en SPS est décrite par le groupe de M. Royo.²⁰ L'équipe de G. Guichard s'applique à la synthèse d'oligourées.²¹ On retrouve de nombreux exemples de peptoïdes synthétisés sur support solide avec R. N. Zuckermann,²² T. Kodadek,²³ C. Taillefumier,²⁴ etc. Le groupe d'A. J. Wilson décrit la première synthèse sur support solide d'un foldamère aromatique protéomimétique.²⁵ Le groupe d'I. Huc a proposé cette méthodologie de synthèse pour les foldamères aromatiques pour la première fois en 2010.^{2b} Elle est à présent couramment utilisée dans le groupe.^{2b, 4, 26}

3.2 Synthèse

3.2.1 Elaboration d'une séquence oligoquinoline Qn

La résine Wang a été choisie car elle permet la synthèse d'oligomères en stratégie Fmoc. Une faible substitution de la résine a été privilégiée (0.38-0.41 mol.g⁻¹) car au cours d'une longue synthèse d'oligomère, l'agrégation et le repliement du foldamère va s'opérer, rendant les fonctions amine de moins en moins réactives et accessibles. Cette résine présente l'avantage

d'être labile au TFA et son clivage libère la molécule synthétisée avec une fonction acide carboxylique, qui mime la position C-terminale des systèmes peptidiques.

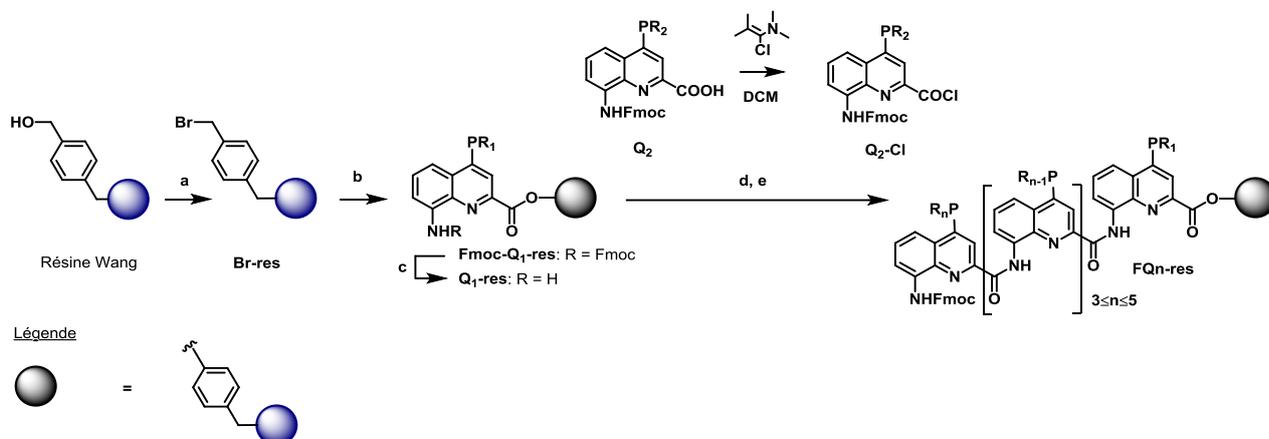


Schéma 13. Voie de synthèse générale d'un foldamère **FQn**. a) PPh_3 , CBr_4 , DMF, t.a. ; b) CsI , Q^{PR1} , DIEA, DMF, 2x5 min, micro-ondes (50 W, 50 °C) ; c) 20 % v/v pipéridine/DMF, 3x10 min, t.a. ; d) $\text{Q}_2\text{-Cl}$, DIEA, THF, 2x5 ou 15 min, micro-ondes (50 W, 50 °C) ; e) répéter c), d) n fois.

La résine Wang bromée étant sensible à l'humidité et particulièrement onéreuse, la bromation est réalisée à chaque synthèse selon la méthode décrite par J. Gosteli.²⁷ L'accrochage du premier monomère est ensuite effectué en présence d'iodure de césium, comme décrit par G. A. Morales.²⁸ Des conditions standards de déprotection d'un groupement fmoc en phase solide sont ensuite utilisées pour obtenir l'amine aromatique (20 % de pipéridine dans le DMF). Celle-ci est peu réactive car la délocalisation aromatique du doublet non liant de l'azote la rend peu nucléophile. Ainsi, pour pouvoir introduire le monomère suivant, une activation de celui-ci sous forme de chlorure d'acide est requise. Nos monomères portant des chaînes latérales acido labiles (*i.e.* Boc ou *tert*-butyle), une activation douce grâce au réactif de Ghosez est employée.¹² Le chlorure d'acide résultant est ensuite couplé à l'amine aromatique dans le THF en présence d'une base, la DIEA. Les cycles de déprotection (3x10 min) puis couplage à un chlorure d'acide sont répétés jusqu'à terminer la séquence oligomérique **FQn**. (Schéma 13) Les temps de couplage des monomères sont considérablement réduits par l'utilisation des micro-ondes. Selon la solubilité des monomères dans le THF, des séquences de couplage de 2x5 min ou 2x15 min sont utilisées.

Après chaque couplage, un test colorimétrique (test DESC)²⁹ est réalisé pour valider l'accomplissement de la réaction. (Schéma 14)

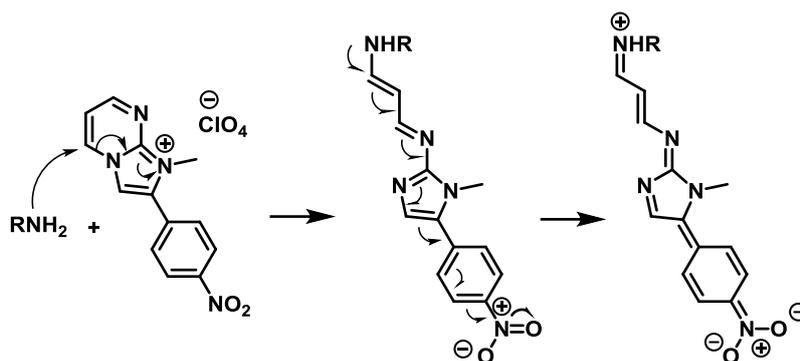


Schéma 14. Mécanisme de réaction entre une amine aromatique primaire et le dérivé pyrimidinium du test DESC.

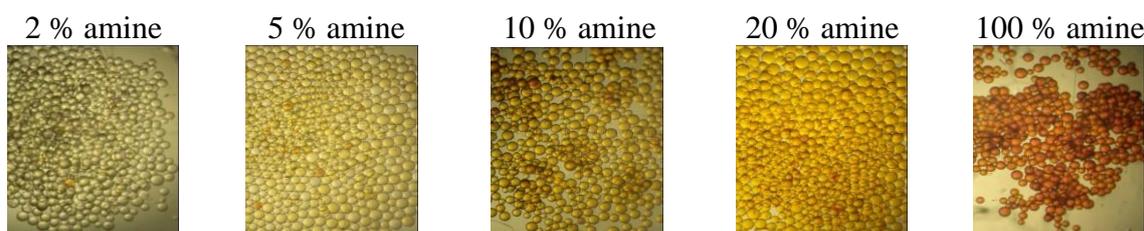


Figure 7. Représentation graduelle de la couleur des billes de résine en fonction du pourcentage d'amine libre. Photos réalisées par S. Dawson, ancien post-doctorant du groupe.

La présence de billes incolores est un test négatif prouvant l'absence d'amine libre sur la résine. Au contraire, des billes orange indiquent la présence d'amine n'ayant pas réagi. Plus la couleur est intense, plus elles sont nombreuses. (Figure 7)

3.2.2 Attachement d'un ligand – clivage de la résine

Le ligand permettant l'ancrage du foldamère sur la protéine est accroché au foldamère *via* une fonction urée. (Schéma 15)

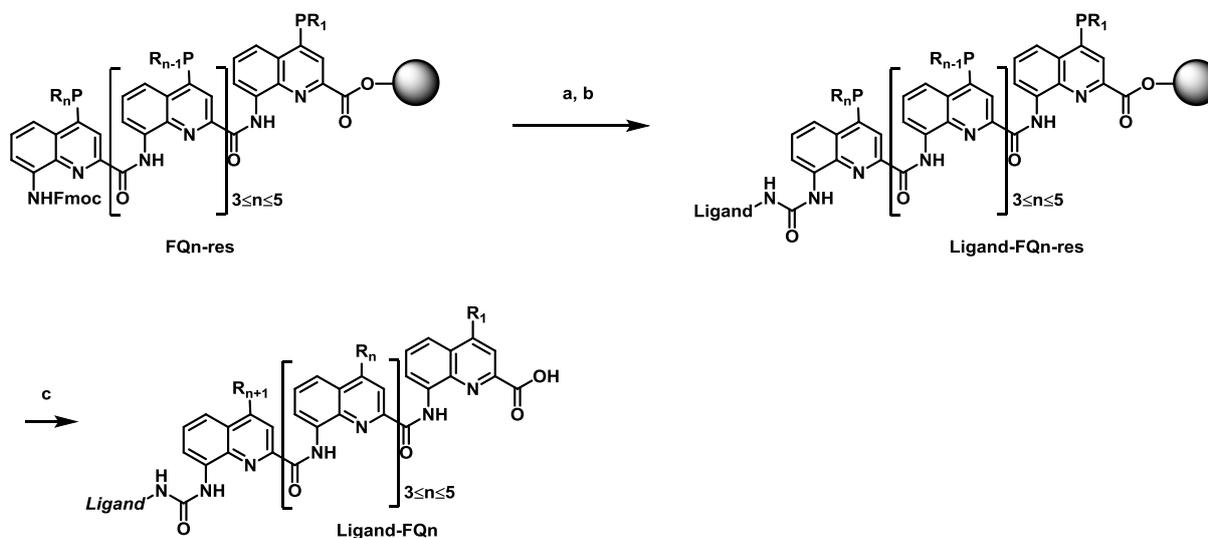


Schéma 15. Attachement d'un ligand. a) 20 % v/v pipéridine/DMF, 3x10 min ; b) 1. Triphosgène,

DIEA, THF, 5 min, micro-ondes (50 W, 50 °C) ; 2. **Ligand-NH₂**, DIEA, DMF/THF, 15 min, micro-ondes (50 W, 50 °C) ; c) TFA/TIS/H₂O, 2 h, t.a..

Après déprotection du groupement fmoc du composé **FQn-res**, un isocyanate est préparé grâce à l'action du triphosgène.³⁰ Un couplage est ensuite réalisé avec les composés **10 (SL)**, **11 (LL)** ou **55 (Inh)** pour former l'urée. Pour obtenir le foldamère **Ligand-Qn**, il faut finalement procéder à une étape de déprotection des chaînes latérales et clivage de la résine. Les conditions optimisées par le groupe utilisent un mélange de TFA, d'eau et de triisopropyle silane pour piéger les carbocations formés.⁴ Les bruts réactionnels ainsi obtenus ont une pureté oscillant entre 50 et 90 %. Une purification sur chromatographie HPLC permet d'obtenir les foldamères avec une pureté supérieure à 95 %. (Schéma 15) Notons que la SPS offre l'avantage de s'affranchir de multiple purifications intermédiaires comme en synthèse en solution. La liste des foldamères synthétisés au cours de cette thèse pour les projets de reconnaissance de surfaces protéiques est présentée ci-dessous. (Tableau 2, Figure 8)

Tableau 2. Liste des foldamères synthétisés pour les projets interaction foldamère/protéine. Link = **SL** ou **LL**, **Inh** = composé **55**.

Projet HCA (Chapitre 3)	Projet IL-4/CypA (Chapitre 4)
F11 : Inh-Q ^{Hex} -Q ^{OH} -Q ^{Orn} -Q ^{Asp}	F15 : SL-Q ^{Asp} -Q ^{Ala} -Q ^{OH} -Q ^{Hex}
F12 : Inh-Q ^{Ser} -Q ^{OH} -Q ^{Orn} -Q ^{Asp}	F16-17 : Link-Q ^{OH} -Q ^{Leu} -Q ^{Asp} -Q ^{Asp}
F13 : Inh-Q ^{Leu} -Q ^{Asp} -Q ^{Orn} -Q ^{Asp}	F18-19 : Link-Q ^{Orn} -Q ^{OH} -Q ^{Leu} -Q ^{Orn} -Q ^{5Asp}
F14 : Inh-Q ^{Leu} -Q ^{OH} -Q ^{5Orn} -Q ^{Asp}	F20-21 : Link-Q ^{Aad} -Q ^{OH} -Q ^{Asp} -Q ^{Orn}
	F22-23 : Link-Q ^{Orn} -Q ^{OH} -Q ^{Ala} -Q ^{Orn}

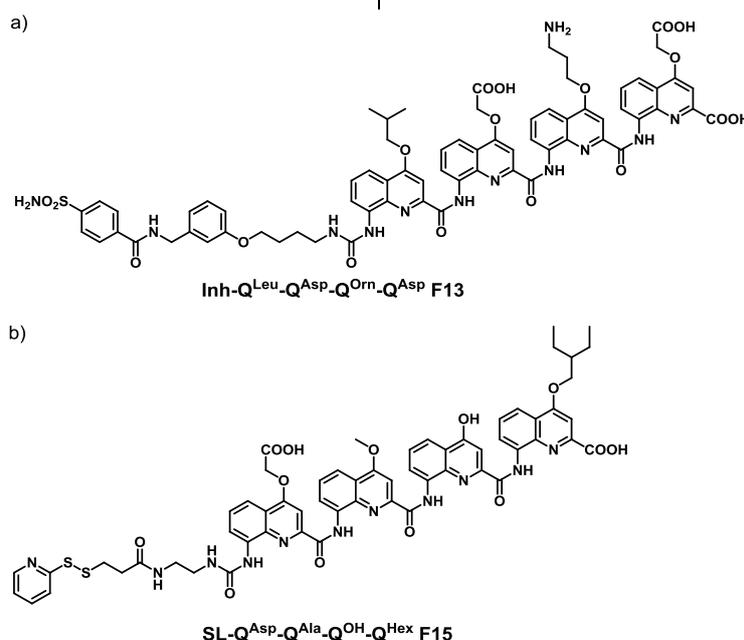


Figure 8. Structure type des foldamères. a) Pour le projet HCA. (Chapitre 3) b) Pour le projet IL-4/CypA. (Chapitre 4)

4 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté la synthèse des foldamères d'oligoamides, qui a consisté en la préparation de monomères quinoline portant des chaînes latérales variées, des ligands et de leur assemblage en synthèse sur support solide assistée par micro-ondes. Ce choix de méthode de synthèse a permis d'accéder plus rapidement à des oligomères variés et de grande pureté. Grâce à la synthèse sur support solide, il est en effet désormais possible de synthétiser et purifier un tétramère (à partir des précurseurs acide aminés protégés en Fmoc) en quelques jours seulement, contre une à deux semaines de préparation auparavant. Des excès de monomères sont utilisés mais il est important de noter que l'excédent est recyclé et une simple colonne chromatographique permet de réutiliser ces monomères avec un haut niveau de pureté.

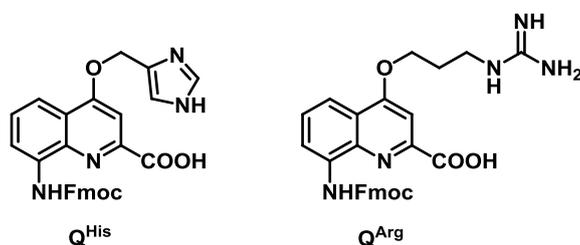


Figure 9. Exemples de monomères de quinoline dont la synthèse pourrait être envisagée.

Comme nous avons pu le voir à travers la préparation de **4**, le développement d'une nouvelle voie de synthèse peut s'avérer fastidieux. C'est cependant une étape indispensable pour des projets de reconnaissance de surfaces de protéines. Il est en effet primordial d'être capable d'apporter un maximum de diversité et de posséder une bibliothèque variée de monomères portant des chaînes latérales protéinogéniques. C'est dans ce but que la synthèse des monomères Q^{His} , Q^{Arg} , pourrait être envisagée. (Figure 9)

Références bibliographiques

1. Jiang, H.; Léger, J.-M.; Dolain, C.; Guionneau, P.; Huc, I., Aromatic δ -peptides: design, synthesis and structural studies of helical, quinoline-derived oligoamide foldamers. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8365.
2. (a) Gillies, E. R.; Deiss, F.; Staedel, C.; Schmitter, J.-M.; Huc, I., Development and Biological Assessment of Fully Water-Soluble Helical Aromatic Amide Foldamers. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4081; (b) Baptiste, B.; Douat-Casassus, C.; Laxmi-Reddy, K.; Godde, F.; Huc, I., Solid Phase Synthesis of Aromatic Oligoamides: Application to Helical Water-Soluble Foldamers. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7175.
3. (a) Jiang, H.; Léger, J.-M.; Huc, I., Aromatic δ -Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3448; (b) Peet, N. P.; Baugh, L. E.; Sunder, S.; Lewis, J. E., Synthesis and antiallergic activity of some quinolinones and imidazoquinolinones. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 298.
4. Buratto, J.; Colombo, C.; Stupfel, M.; Dawson, S. J.; Dolain, C.; Langlois d'Estaintot, B.; Fischer, L.; Granier, T.; Laguerre, M.; Gallois, B.; Huc, I., Structure of a Complex Formed by a Protein and a Helical Aromatic Oligoamide Foldamer at 2.1 Å Resolution. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 883.
5. (a) Baumeister, P.; Blaser, H.-U.; Studer, M., Strong reduction of hydroxylamine accumulation in the catalytic hydrogenation of nitroarenes by vanadium promoters. *Catal. Lett.* **1997**, *49*, 219; (b) Qi, T.; Deschrijver, T.; Huc, I., Large-scale and chromatography-free synthesis of an octameric quinoline-based aromatic amide helical foldamer. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 693.
6. Kimber, M. C.; Geue, J. P.; Lincoln, S. F.; Ward, A. D.; Tiekink, E. R. T., A Preparative and Preliminary Spectroscopic Study of Analogues of a Zinquin-Related Fluorophore. *Aust. J. Chem.* **2003**, *56*, 39.
7. Fahrni, C. J.; O'Halloran, T. V., Aqueous Coordination Chemistry of Quinoline-Based Fluorescence Probes for the Biological Chemistry of Zinc. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11448.
8. Felix, A. M., Cleavage of protecting groups with boron tribromide. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1427.
9. P. Kulkarni, P.; J. Kadam, A.; B. Mane, R.; V. Desai, U.; P. Wadgaonkar, P., Demethylation of Methyl Aryl Ethers using Pyridine Hydrochloride in Solvent-free Conditions under Microwave Irradiation. *J. Chem. Res., Synop.* **1999**, 394.
10. Dembinski, R., Recent Advances in the Mitsunobu Reaction: Modified Reagents and the Quest for Chromatography-Free Separation. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004*, 2763.
11. Simmons, R. L.; Yu, R. T.; Myers, A. G., Storable Arylpalladium(II) Reagents for Alkene Labeling in Aqueous Media. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15870.
12. Ghosez, L.; Haveaux, B.; Viehe, H. G., Alkyl and Aryl α -Chloro Enamines. *Ang. Chem. Int. Ed.* **1969**, *8*, 454.
13. Erlanson, D. A.; Braisted, A. C.; Raphael, D. R.; Randal, M.; Stroud, R. M.; Gordon, E. M.; Wells, J. A., Site-directed ligand discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 9367.
14. Chen, S.; Zhao, X.; Chen, J.; Chen, J.; Kuznetsova, L.; Wong, S. S.; Ojima, I., Mechanism-Based Tumor-Targeting Drug Delivery System. Validation of Efficient Vitamin Receptor-Mediated Endocytosis and Drug Release. *Bioconj. Chem.* **2010**, *21*, 979.
15. 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*, 9394.
16. Mandal, P. K.; Gao, F.; Lu, Z.; Ren, Z.; Ramesh, R.; Birtwistle, J. S.; Kaluarachchi, K. K.; Chen, X.; Bast, R. C.; Liao, W. S.; McMurray, J. S., Potent and Selective Phosphopeptide Mimetic Prodrugs Targeted to the Src Homology 2 (SH2) Domain of Signal Transducer and Activator of Transcription 3. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3549.
17. Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
18. Shi, R.; Wang, F.; Yan, B., Site-Site Isolation and Site-Site Interaction – Two Sides of the Same Coin. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2007**, *13*, 213.
19. Murray, J. K.; Gellman, S. H., Application of Microwave Irradiation to the Synthesis of 14-Helical β -Peptides. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1517.
20. Farrera-Sinfreu, J.; Zaccaro, L.; Vidal, D.; Salvatella, X.; Giralt, E.; Pons, M.; Albericio, F.; Royo, M., A New Class of Foldamers Based on cis- γ -Amino-l-proline_{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6048.
21. Guichard, G.; Semetey, V.; Rodriguez, M.; Briand, J.-P., Solid phase synthesis of oligoureas using O-succinimidyl-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)ethylcarbamate derivatives as activated monomers. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1553.
22. Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H., Efficient method for the preparation of peptoids [oligo(N-substituted glycines)] by submonomer solid-phase synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10646.

23. Udugamasooriya, D. G.; Dineen, S. P.; Brekken, R. A.; Kodadek, T., A Peptoid “Antibody Surrogate” That Antagonizes VEGF Receptor 2 Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5744.
24. Rasmussen, J. E.; Boccia, M. M.; Nielsen, J.; Taillefumier, C.; Faure, S.; Hjelmggaard, T., Rapid and convenient semi-automated microwave-assisted solid-phase synthesis of arylopeptoids. *Tetrahedron Letters* **2014**, *55*, 5940.
25. Campbell, F.; Plante, J. P.; Edwards, T. A.; Warriner, S. L.; Wilson, A. J., N-alkylated oligoamide [small alpha]-helical proteomimetics. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2344.
26. (a) Hu, X.; Dawson, S. J.; Nagaoka, Y.; Tanatani, A.; Huc, I., Solid-Phase Synthesis of Water-Soluble Helically Folded Hybrid α -Amino Acid/Quinoline Oligoamides. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 1137; (b) Shang, J.; Gan, Q.; Dawson, S. J.; Rosu, F.; Jiang, H.; Ferrand, Y.; Huc, I., Self-Association of Aromatic Oligoamide Foldamers into Double Helices in Water. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4992; (c) Mandal, P. K.; Collie, G. W.; Kauffmann, B.; Huc, I., Racemic DNA Crystallography. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14424; (d) Dawson, S. J.; Mészáros, Á.; Pethő, L.; Colombo, C.; Csékei, M.; Kotschy, A.; Huc, I., Controlling Helix Handedness in Water-Soluble Quinoline Oligoamide Foldamers. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 4265.
27. Mergler, M.; Nyfeler, R.; Gosteli, J., Peptide synthesis by a combination of solid-phase and solution methods III resin derivatives allowing minimum-racemization coupling of α -protected amino acids. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6741.
28. Morales, G. A.; Corbett, J. W.; DeGrado, W. F., Solid-Phase Synthesis of Benzopiperazinones. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1172.
29. Claerhout, S.; Ermolat'ev, D. S.; Van der Eycken, E. V., A New Colorimetric Test for Solid-Phase Amines and Thiols. *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 580.
30. Majer, P.; Randad, R. S., A Safe and Efficient Method for Preparation of N,N'-Unsymmetrically Disubstituted Ureas Utilizing Triphosgene. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1937.

CHAPITRE 3 : HCA comme preuve de concept
pour la reconnaissance de surfaces de protéines par
les foldamères

Introduction

Le chapitre 1 a montré que la reconnaissance de surfaces de protéines par des molécules synthétiques est un enjeu de taille. Le projet propose d'utiliser les foldamères d'oligoamides dans ce but, de par leur robustesse, la maîtrise de leur comportement en solution et par l'exploitation de leur chiralité hélicoïdale.

Les systèmes hélicoïdaux de ce projet ne comportent pas de centre asymétrique mais sont des objets chiraux : les hélices existent sous deux conformations *P* et *M*, images l'une de l'autre dans un miroir. Lorsque l'hélice se replie dans le sens des aiguilles d'une montre en s'éloignant du lecteur c'est la conformation *P*, on parle alors d'hélice droite. A l'inverse, la conformation *M* (hélice gauche) correspond à l'hélice enroulée dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (Figure 1). Les hélices synthétisées au laboratoire se présentent sous la forme de deux énantiomères en équilibre racémique.

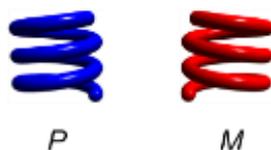


Figure 1. Représentation schématique d'énantiomères hélicoïdaux.

L'interaction entre le foldamère et la protéine (chirale) serait diastéréosélective et induirait une hélicité préférée pouvant être détectée par dichroïsme circulaire : on parle alors de dichroïsme circulaire induit.

Pour comprendre le dichroïsme circulaire, il faut savoir que toute onde lumineuse polarisée circulairement se divise en deux : une onde droite (tournant dans le sens horaire) et l'autre gauche (sens inverse des aiguilles d'une montre). (Figure 2)

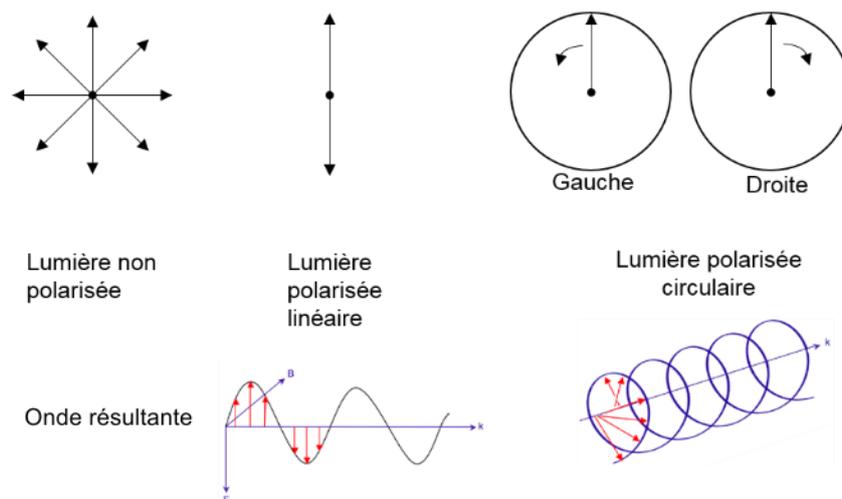


Figure 2. Représentation de la polarisation de la lumière.

Lorsque les ondes lumineuses polarisées (gauche et droite) traversent une substance chirale possédant un ou plusieurs chromophores, l'une va être plus ou moins absorbée par rapport à l'autre : l'onde résultante est ainsi polarisée elliptiquement. Cette différence d'absorbance (ΔA) est mesurée par dichroïsme circulaire (CD, *circular dichroism*).

$$\Delta A = A_G - A_D$$

D'après la loi de Beer Lambert, $A = \epsilon.l.c$

où ϵ = coefficient d'extinction molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, l = longueur du trajet optique en cm et c = concentration en $mol.L^{-1}$.

$$\text{Donc } \Delta A = (\epsilon_G - \epsilon_D).l.c = \Delta\epsilon.l.c$$

La spectroscopie CD mesure l'ellipticité de la polarisation et est rapportée en degré d'ellipticité θ ou en ellipticité molaire $[\theta]$:

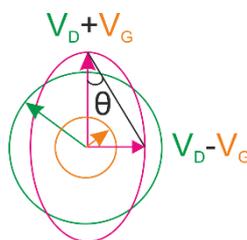


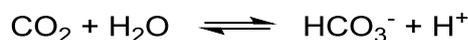
Figure 3. Représentation de l'ellipticité θ . V = champ électrique D = lumière polarisée droite. G = lumière polarisée gauche.

$$[\theta] = \frac{100 \times \theta}{c \times l} = \frac{2.303 \times \Delta A \times 180}{4\pi} \times \frac{100}{c \times l} = 3298 \Delta\epsilon$$

Ainsi, le dichroïsme circulaire est un outil permettant de détecter rapidement l'interaction d'une molécule avec une protéine : c'est la méthode de *screening* que nous avons retenue pour

l'étude des interactions protéine/foldamères.¹ Cette étude s'est basée dans un premier temps sur une protéine modèle : l'anhydrase carbonique humaine II (HCA).

Les anhydrases carboniques sont des enzymes ayant pour rôle de catalyser l'hydratation réversible du dioxyde de carbone en bicarbonate.



Cette fonction est particulièrement importante dans de nombreux processus biologiques tels que la respiration, la photosynthèse ou encore la régulation du pH.² Les anhydrases carboniques possèdent aussi une capacité d'hydratation des aldéhydes aliphatiques,³ aromatiques⁴ et d'hydrolyse des esters *in vitro*.⁵ Elles sont abondantes dans les tissus des mammifères, les plantes, les algues et les bactéries. Cinq familles d'anhydrases carboniques sont recensées (α , β , γ , δ et ϵ) ; leur point commun étant la nécessité de l'action d'un zinc cationique, présent dans le site actif, pour fonctionner.

L'anhydrase carbonique humaine II (HCA) fait partie de la classe monomérique α , comme cela est visible à travers les structures cristallographiques présentes dans la *Protein Data Bank*. Il y a plus de 500 structures dont la première est apparue en 1972 avec une résolution de 2.0 Å.⁶ Cette enzyme a un poids moléculaire de l'ordre de 30 kDa et est constituée d'une chaîne protéique de 260 acides aminés. Le site actif est situé dans une cavité amphiphile au fond de laquelle se loge un cation Zn^{2+} . Sa sphère de coordination est tétraédrique, en interaction avec trois histidines (His94, His96, His119), et une molécule d'eau. (Figure 4)

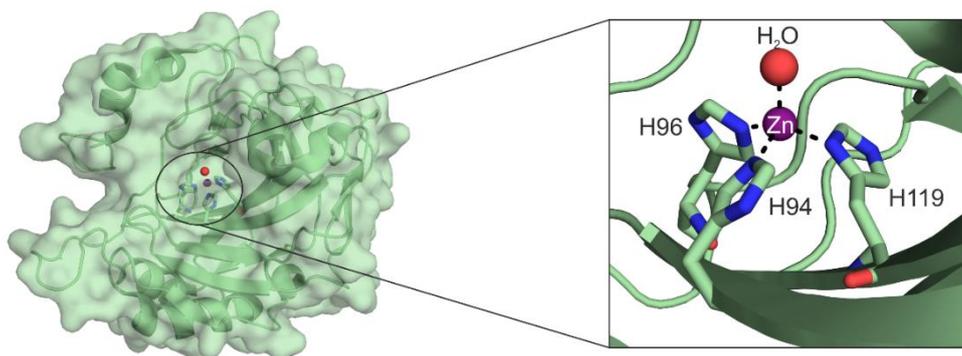


Figure 4. Structure cristallographique à la résolution atomique de l'enzyme HCA² (PDB = 3KS3) et zoom sur le site actif.

L'enzyme peut être directement achetée auprès de fournisseurs commerciaux (ex : Sigma Aldrich), toutefois, la protéine utilisée dans ce projet est produite à l'institut (IECB). Son expression est effectuée dans la souche *E. coli* BL21 (DE3) Gold pLysS. La protéine est purifiée

sur une colonne d'affinité⁷ à l'aide du *p*AMBS (*p*-aminométhylbenzène sulfonamide), qui est un inhibiteur de la protéine. Le rendement généralement obtenu est de 5.8 mg de protéine pour 1 litre de milieu LB.

L'enzyme HCA est particulièrement robuste puisqu'elle est stable au cours du temps et ne se dégrade pas à température ambiante, ce qui la rend facile à manipuler. De plus, cette protéine est connue pour cristalliser aisément, comme le montre le nombre important de données la concernant dans la PDB. Beaucoup de ces structures présentent la protéine cocrystallisée avec de petits inhibiteurs connus des anhydrases carboniques, les sulfonamides aromatiques, qui sont facilement accessibles par synthèse. Ils ont été particulièrement étudiés pour le traitement du glaucome, de l'épilepsie et de certains cancers. L'azote du sulfonamide de l'inhibiteur coordine le zinc du site actif et il y a des effets hydrophobes entre le cycle aromatique du sulfonamide et la cavité de l'enzyme.⁸

La manipulation aisée de la protéine HCA, sa faculté à cristalliser rapidement ainsi que l'accès aisé par synthèse à un inhibiteur ont permis de choisir HCA comme protéine modèle. Nous allons ainsi chercher à répondre à la question suivante : comment développer un foldamère d'oligoamides aromatiques capable de reconnaître spécifiquement la surface d'HCA ?

1 Stratégie

L'oligomère doit être fonctionnalisé en disposant stratégiquement des chaînes latérales protéomimes à sa surface. Elles doivent en effet présenter une complémentarité avec les acides aminés de la surface de la protéine. Sans réaliser de modélisation moléculaire, il faudrait donc fournir un travail considérable de synthèse pour cribler une large gamme de séquences de foldamères dans l'espoir d'une affinité avec la cible.

Pour s'épargner cette approche, coûteuse en temps et en composés, le groupe a choisi d'ancrer le foldamère à la protéine *via* un inhibiteur, maintenant ainsi l'oligomère au voisinage de la protéine, tout en permettant un certain degré de liberté à l'aide d'un espaceur. Les interactions même faibles peuvent être détectées par dichroïsme circulaire, qui sert de technique de *screening* pour les foldamères synthétisés. Par la suite, les foldamères présentant des propriétés d'interaction intéressantes (détectées par un fort signal de CD induit), font l'objet d'études structurales notamment par diffraction des rayons X, afin d'obtenir des informations

sur ces interactions à l'échelle atomique. A l'aide des données structurales et dans l'espoir d'obtenir un foldamère capable d'interagir avec la surface de la protéine en l'absence d'ancrage *via* l'inhibiteur, des modifications peuvent être envisagées sur la structure du foldamère (au niveau des chaînes latérales, du diamètre de l'hélice) afin d'optimiser la conception les interactions protéine-foldamère. De nouvelles séquences seront ainsi synthétisées et soumises aux mêmes étapes de sélection, la stratégie est itérative. (Figure 5)

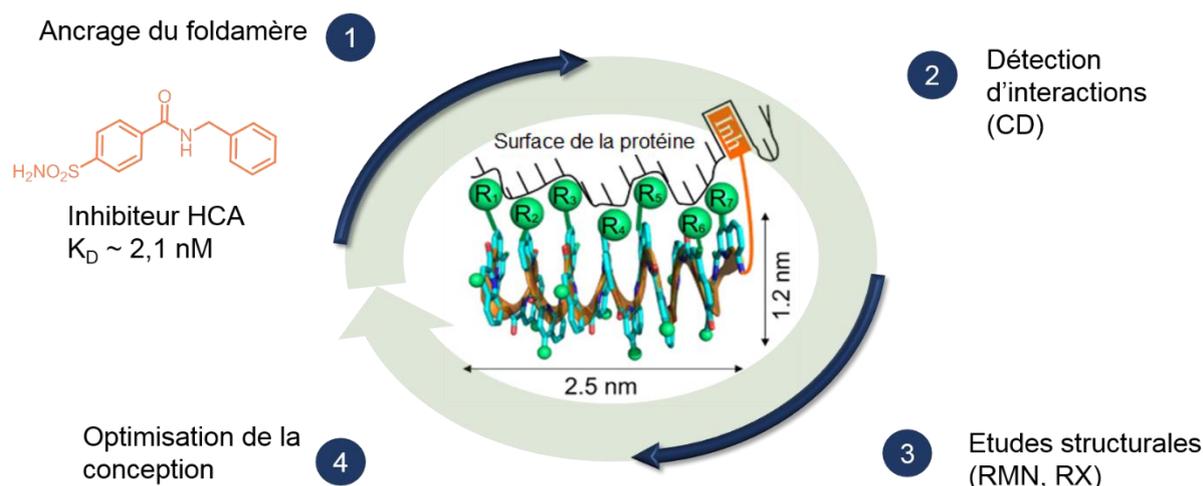


Figure 5. Schéma de la stratégie de développement de foldamères pour l'interaction avec la surface d'HCA.

Les résultats de ce projet sont le fruit d'un large travail collaboratif. En effet, pour citer les étapes clés, M. Stupfel a réalisé toutes les études préliminaires concernant les foldamères en solution et le développement du système d'ancrage à la protéine durant sa thèse. C. Colombo a préparé la première série de foldamères par SPS et s'est investie dans les études en solution des hits de cette série. L'équipe de B. Gallois s'est impliquée dans les études cristallographiques avec J. Buratto (pour le composé HCA-F1), B. Langlois d'Estaintot pour tout l'aspect cristallogénèse et T. Granier a réalisé la résolution des structures du projet présenté ici. Des études par RMN en solution ont été réalisées par C. Mackereth et M. Jewginski, qui s'est également investi dans de la synthèse par SPS et études structurales en solution.

2 Résultats préliminaires

Afin d'ancrer le foldamère à la protéine, des études de conception d'un ligand adapté ont été réalisées.

2.1 Conception du ligand

L'élaboration d'un ligand approprié pour l'interaction de foldamères avec HCA est le résultat de nombreuses investigations. Le choix de l'inhibiteur s'est porté sur le benzyl 4-aminosulfonylbenzamide (SBB) pour sa forte affinité avec la cible. Il possède en effet une constante de dissociation de l'ordre du nanomolaire.⁹

L'étude de la structure cristallographique d'HCA et SBB, déterminée par l'équipe de D. W. Christianson en 2000^{9a} a permis d'orienter le choix de la substitution de l'inhibiteur vers la position *méta* du cycle benzénique. Ainsi, le foldamère covalent lié pourrait s'orienter en dehors de la cavité de la protéine. Le résultat a été confirmé par la structure du composé **65**, cocrystallisé avec HCA, où la fonction phénol (lieu d'introduction du foldamère) pointe effectivement en dehors du site actif.

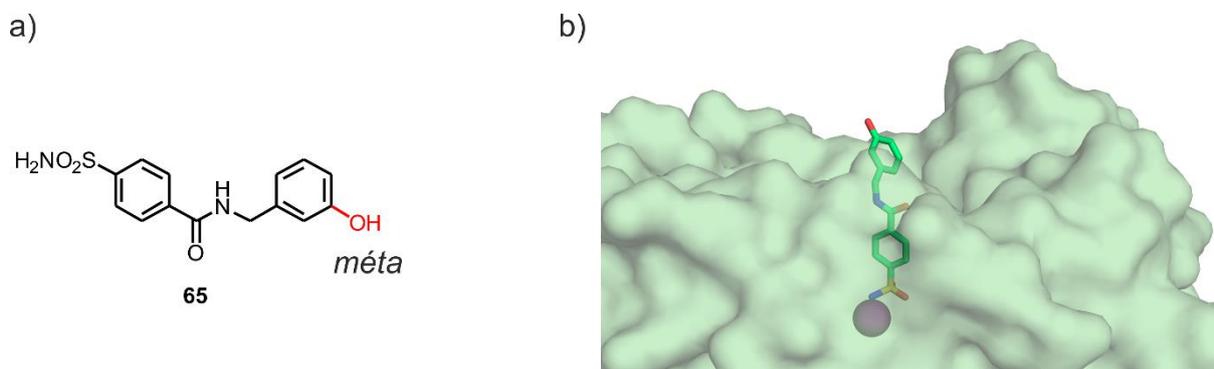


Figure 6. Structure cristallographique de **65** cocrystallisé avec HCA (PDB = 4MTY). La fonction OH pointe vers l'extérieur du site actif.

Trois positions étaient alors envisageables pour lier l'inhibiteur au monomère quinoline : *via* la position 4 du monomère, au niveau du C-terminal ou la position N-terminale (Figure 7).

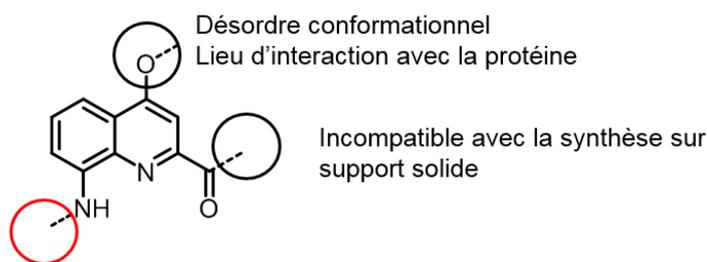


Figure 7. Positions envisageables pour accrocher l'inhibiteur à la quinoline.

Des études ont montré un désordre de positionnement de l'inhibiteur dans le site actif lorsqu'il était lié à la position 4 de la quinoline.¹⁰ De plus, dans le cadre de ce projet, la séquence d'oligoquinolines doit interagir avec la protéine *via* les chaînes latérales portées par les

quinolines. La position 4 a alors été exclue pour l'introduction de l'inhibiteur. Les foldamères sont synthétisés sur support solide, accrochés à la résine *via* la position C-terminale (Chapitre 2) et la séquence est allongée dans la direction N-terminale. C'est donc cette position qui a été choisie pour l'introduction de l'inhibiteur. Un espaceur aliphatique dont la longueur a été validée par modélisation, a été ajouté *via* une fonction urée. Cet espaceur apporte une liberté de mouvement au foldamère afin d'interagir avec la surface de la protéine.¹¹ (Figure 8)

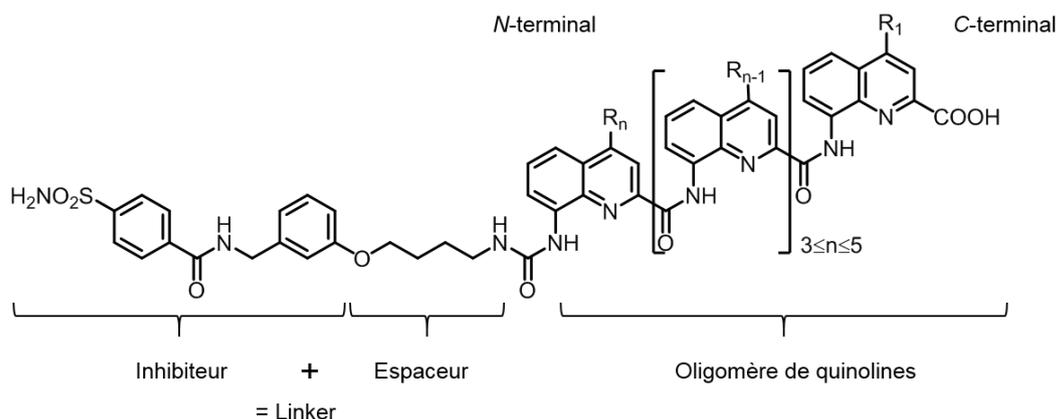


Figure 8. Représentation générale d'un foldamère pour l'interaction avec HCA.

2.2 Première série de foldamères synthétisés par SPS

Après des premiers essais de synthèse en solution des foldamères ligands d'HCA, une série de composés a ensuite été synthétisée par synthèse sur support solide.¹¹ Ces molécules ont été conçues sans étude de modélisation moléculaire préalable, à partir de la boîte à outils de quinolines protéinogènes disponible au laboratoire (Figure 9). Pour la pertinence de ce projet, l'interaction protéine/foldamère doit être identifiée rapidement (sous quelques jours). C'est pourquoi les séquences de foldamères ont été choisies courtes avec pas plus de cinq résidus, pour permettre une inversion d'hélicité rapide en solution. Comme le montrera le chapitre 5, la stabilité hélicoïdale (et donc le temps pour atteindre l'équilibre conformationnel) augmente avec la longueur de la séquence.¹²

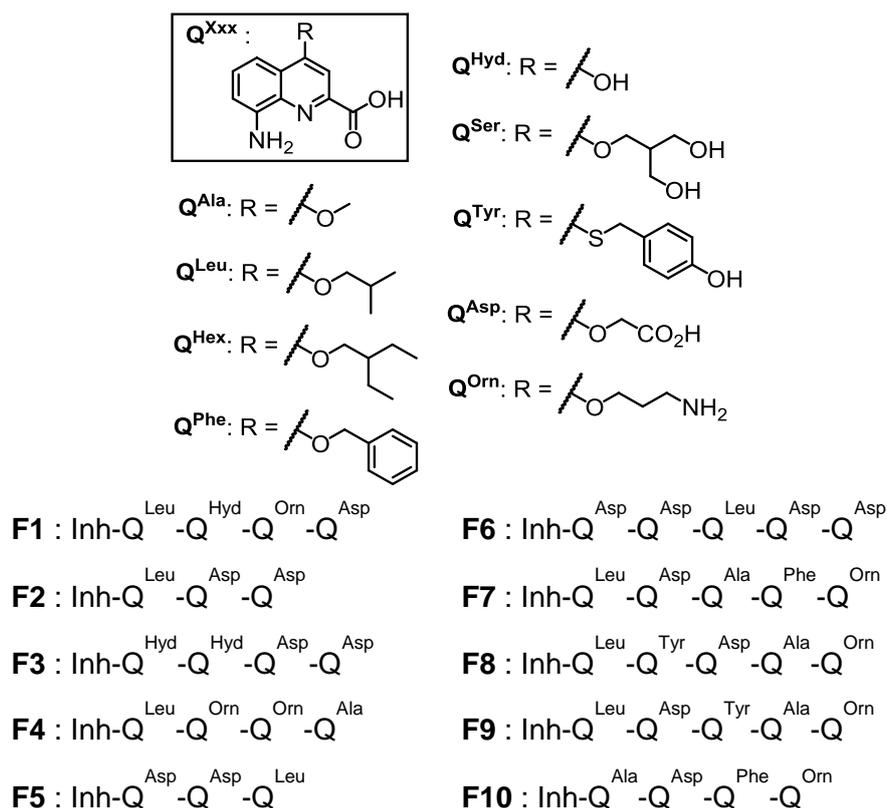


Figure 9. Représentation des monomères et séquences de foldamères (synthétisés par C. Colombo). Tous les foldamères sont en mélange racémique hélice *P*/hélice *M*.

2.3 Etudes par dichroïsme circulaire

Afin d'examiner le comportement des foldamères de quinolines en présence d'HCA, toutes les séquences ont été étudiées par CD entre 300 et 500 nm. C'est une fenêtre de longueurs d'ondes où la protéine HCA n'absorbe pas. Ainsi les signaux CD peuvent être attribués à la contribution des foldamères de quinolines. (Figure 10)

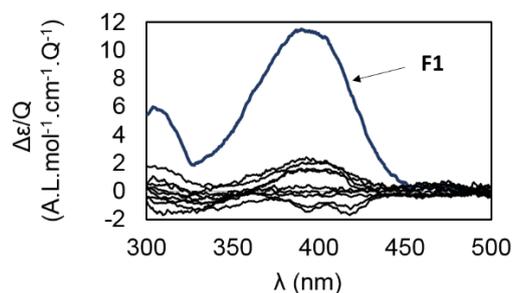


Figure 10. Spectres CD des composés **F1** à **F10**.

Parmi les composés **F1** à **F10**, seul **F1** présente un signal CD intense à 390 nm, traduisant l'induction d'hélicité *P* (signal positif) par la protéine après accrochage du foldamère.¹¹ L'interaction protéine-foldamère est ainsi détectée. Il est important de noter que les faibles signaux CD pour les composés **F2** à **F10** ne sont pas forcément significatifs d'une

absence d'interaction avec la protéine mais peuvent correspondre à l'absence de préférence d'hélicité.

2.4 Cristallisation

L'enzyme est cocrystallisée en présence des foldamères par B. Langlois d'Estaintot grâce à la technique de diffusion de vapeur bien décrite (gouttes suspendues ou assises).¹³ Les conditions de cristallisation classiques de la protéine native en présence de petits inhibiteurs¹⁴ n'ont pas donné de résultat satisfaisant avec nos foldamères. Ce sont des *screens* commerciaux (Hampton Research, JenaBiosciences ou Molecular Dimensions) qui ont permis de travailler avec un point de départ prometteur. Les conditions sont ensuite améliorées au cas par cas.

Le composé **F1** a été cocrystallisé avec HCA¹¹¹¹ et la structure a montré une dimérisation inattendue du complexe.¹¹ Deux protéines interagissent en effet ensemble avec deux foldamères. De manière générale dans ce chapitre, la chaîne protéique A est représentée en jaune tout comme le foldamère qui lui est lié. La chaîne B et le foldamère partenaire sont en vert (Figure 11). Comme attendu, les foldamères sortent de la cavité de l'enzyme et sont reliés au site actif par l'intermédiaire de l'inhibiteur, qui se loge dans la cavité de manière conventionnelle. Il y a effectivement une coordination entre l'azote de l'inhibiteur et le zinc du site actif de la protéine. De plus, des interactions hydrophobes peuvent être notées avec les résidus Leu197 et Phe130 de la protéine.

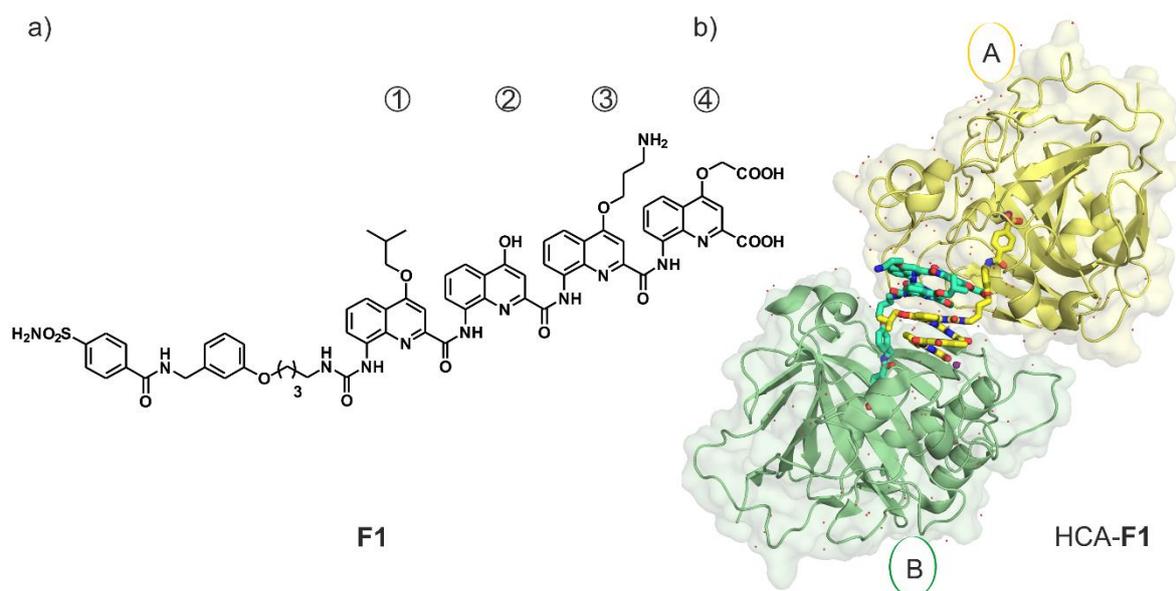


Figure 11. a) Représentation du foldamère **F1**. b) Structure cristallographique du complexe **HCA-F1** (PDB = 4LP6). La chaîne protéique A est représentée en jaune et est liée au foldamère jaune. Elle est en contact avec la chaîne B représentée en vert (elle-même en interaction avec le foldamère vert).

La formation du dimère induit l'orientation « perpendiculaire » du foldamère à la protéine. L'oligomère ne présente pas directement les chaînes latérales à la protéine, comme la conception le prévoyait. L'induction d'hélicité droite qui avait été observée par CD est confirmée par la structure. Chaque foldamère interagit par empilement π avec le second foldamère et des interactions privilégiées sont notées avec la chaîne HCA opposée. Les deux chaînes protéiques sont en contact *via* des molécules d'eau et des cations Zn^{2+} .

Si l'on regarde plus en détail les interactions mises en jeu par les foldamères, on constate que la position 4 Q^{Leu} apparaît dans une poche hydrophobe formée des résidus Pro201, Leu203 de la protéine et de l'espaceur. Le monomère 3 Q^{OH} se trouve dans une position distale de la sphère de coordination du zinc. Enfin les positions 2 (Q^{Om}) et 1 (Q^{Asp}) semblent en interaction avec la protéine *via* des liaisons hydrogène pontées par des molécules d'eau. La position C-terminale du foldamère apparaît dans la sphère de coordination du Zn^{2+} , également constituée d'une molécule d'eau et des histidines 4 et 64 (Figure 12).

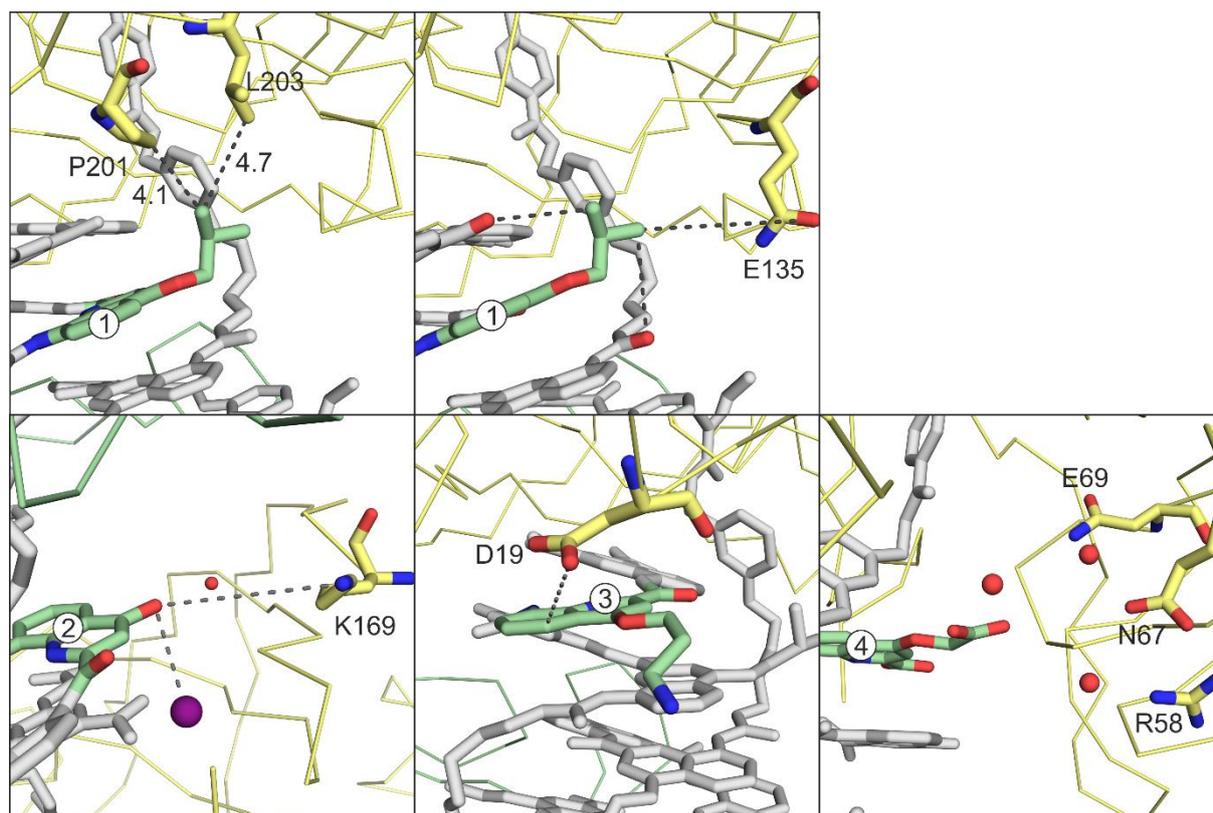


Figure 12. Interactions foldamère/protéine mises en évidence au niveau des différentes positions du foldamère **F1**. Les chiffres encadrés représentent la position du monomère Q étudié. (PDB = 4LP6)

Cette structure a permis d'obtenir des informations sur l'organisation d'un foldamère accroché à une protéine et a soulevé des questions comme le rôle du zinc pour l'obtention d'un complexe dimérique.

3 Conception de nouveaux variants foldamères

3.1 Présentation des variants synthétisés

La question de ce travail de thèse concerne les interactions protéine-foldamère. Est-il possible de modifier la séquence du foldamère **F1** afin d'augmenter les interactions avec la protéine, tout en conservant un complexe dimérique ?

Pour répondre à cette question, la structure cristallographique obtenue a été étudiée et des modifications ont été apportées au niveau des chaînes latérales du foldamère modèle **F1** (Figure 14). La position 4 du composé modèle **F1** étant dans une poche hydrophobe, l'hydrophobie de la chaîne latérale a été accrue en produisant le variant **F11**. Dans ce but, la synthèse du monomère **5** a été réalisée (Chapitre 2). La proximité avec le carbonyle de la Gln135, du foldamère en vis-à-vis et du même foldamère à un tour de distance a inspiré la production l'isostère hydrophile de **F1** avec le variant **F12**. En effet, l'interaction avec la protéine pourrait être renforcée par la formation d'un pont salin avec Gln135. De plus, les carbonyles des foldamères pourraient interagir avec les nouvelles fonctions alcools, stabilisant ainsi d'autant plus le dimère de foldamères (Figure 13).

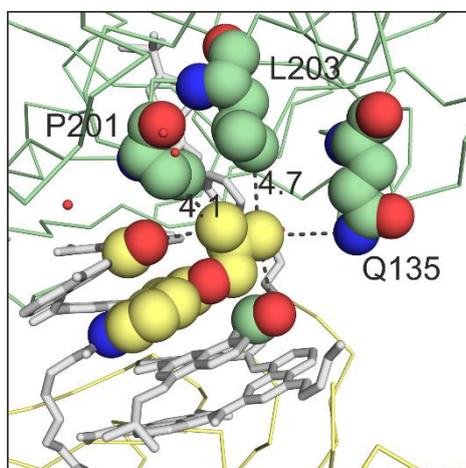


Figure 13. Représentation des interactions possibles avec la protéine au niveau de la position 4 Q^{Leu} du foldamère **F1**.

Le variant **F13** pourrait éventuellement se lier au Zn²⁺ à proximité ou avec la Lys169 grâce à l'introduction du monomère Q^{Asp} en position 3. Le variant **F14** pourrait interagir avec Asp19 de la protéine grâce au déplacement de la chaîne type ornithine sur la position 5 de la quinoline. Le développement de ce nouveau monomère a impliqué des efforts de synthèse détaillés dans le chapitre 2. La position 1 du foldamère a été gardée intacte car aucune variation évidente à effectuer n'a été identifiée.

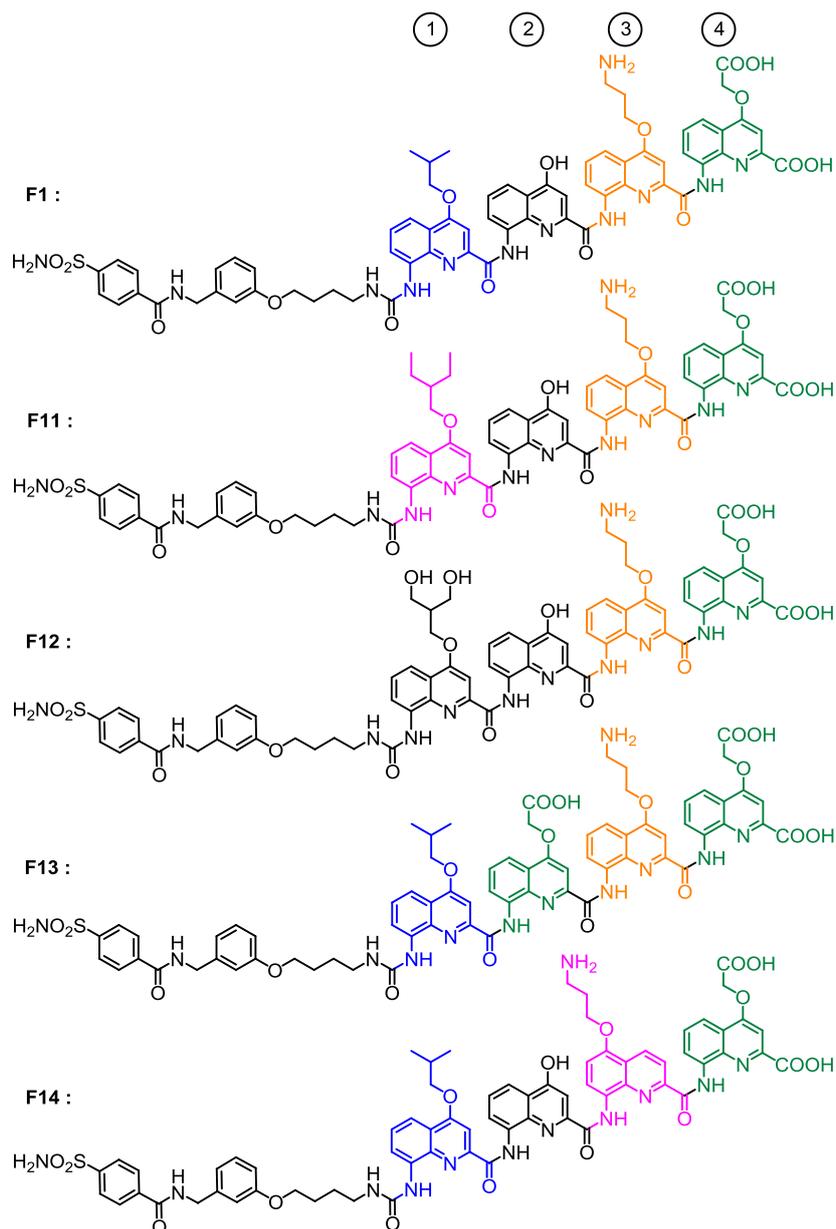


Figure 14. Représentation du foldamère modèle **F1** et des variants pour l'interaction avec HCA. Les monomères identiques possèdent des couleurs similaires. Les monomères représentés en rose ont nécessité des efforts de synthèse détaillés dans le chapitre 2.

3.2 Résultats et discussion

3.2.1 Analyses par dichroïsme circulaire

Afin d'identifier l'éventuelle induction d'une préférence d'hélicité par la protéine sur les foldamères, les spectres CD des composés **F11** à **F14** ont été enregistrés. Les échantillons ont été préparés à une concentration de 34.5 μM avec un équivalent de foldamère préalablement dissous dans le DMSO et incubé avec la protéine à température ambiante pendant 2 jours dans un tampon phosphate aqueux à pH = 7.4. (Figure 15)

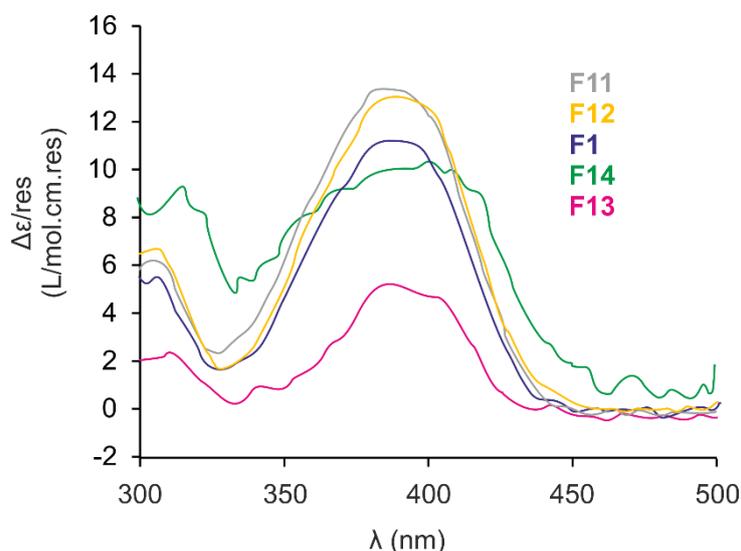


Figure 15. Spectres CD des composés **F11** à **F14** (34.5 μM dans un tampon NaH_2PO_4 à 50 mM, pH = 7.4).

Des bandes CD intenses sont observées dans chacun des cas, indiquant un effet de la surface de la protéine sur le foldamère, interprété comme une interaction entre les deux parties. A l'instar du composé modèle **F1**, l'hélicité *P* semble être préférée dans tous les cas (bandes CD positives). L'étape 3 du processus a pu être réalisée et ces foldamères ont été utilisés pour des essais de cristallisation avec la protéine.

3.2.2 Cristallisation

Comme pour le composé modèle **F1**, c'est la diffusion de vapeur avec la technique de la goutte suspendue qui a permis d'obtenir des résultats. Les complexes sont dans le tampon Tris à 50 mM, pH 8.0, avec le DMSO nécessaire à la solubilisation du foldamère (1 à 2 %) et en présence de 0.3 mM de NaN_3 . Seules les données des composés **F11**, **F12** et **F13** ont pu être collectées au Synchrotron de Grenoble, les autres cristaux n'étant pas de qualité suffisante. Les structures ont été résolues par remplacement moléculaire en utilisant la structure cristallographique d'HCA à haute résolution (PDB = 3KS3).

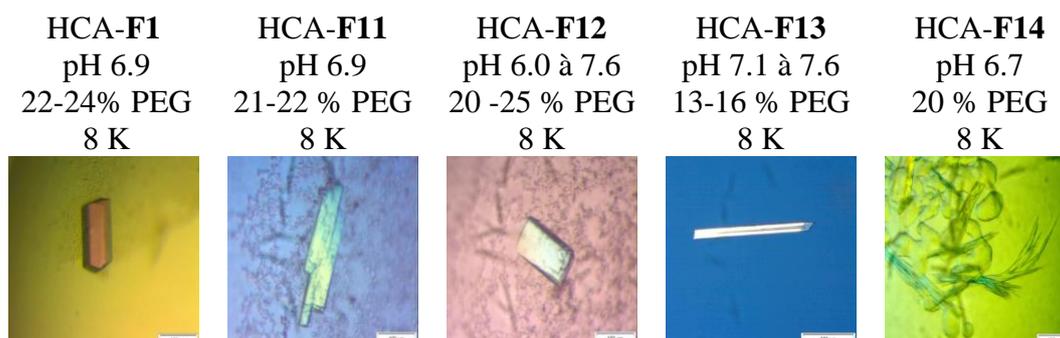


Figure 16. Conditions de cristallisation des complexes HCA-foldamère et images des cristaux. Concentration = 0.3 mM et 1.2 équiv. de foldamère. Toutes les conditions contiennent 0.2 mM ZnAc₂, 0.1 M sodium cacodylate et 0.3 mM de NaN₃.

3.2.3 Description des structures

Les structures des composés HCA-F11 et HCA-F12 ont été résolues à 2.6 et 2.2 Å (PDB 5L6T et 5L70), celle de HCA-F13 a été résolue à 2.9 Å (PDB = 5L9E). Les cristaux de HCA-F11 et HCA-F12 sont isomorphes de ceux de HCA-F1 : ils ont des paramètres de maille comparables et le même groupe d'espace $P2_1$. HCA-F13 cristallise dans le groupe d'espace $I2$, le volume de la maille est 4,5 fois plus grand. Il y a quatre complexes HCA-F13 dans l'unité asymétrique, chacun formant un dimère avec un complexe symétrique, généré par un axe de symétrie d'ordre 2.

Toutes ces structures présentent de grandes similitudes avec celle du composé modèle HCA-F1 : on observe la formation de dimères de complexe HCA-foldamère comparables à celui observé dans HCA-F1 : l'axe de l'hélice du foldamère est « perpendiculaire » à la surface protéique ; le foldamère lié à la chaîne A interagit avec la chaîne B et vice versa, les foldamères présentent une hélicité droite et interagissent ensemble par empilement π en s'imbriquant l'un dans l'autre. Des différences significatives existent entre ces structures et seront évoquées plus loin.

3.2.3.1 Position 4 du foldamère, variants F11 et F12

Une molécule de glycérol est présente au niveau du site actif, en surface de la protéine, alors qu'elle était absente de la structure HCA-F1. Un résidu supplémentaire de la protéine est visible dans ces deux structures : His3. La chaîne latérale type ornithine de la position 2 était en désordre conformationnel dans le complexe modèle. C'est pourquoi elle n'était pas résolue entièrement pour la chaîne B du foldamère F1, alors qu'elle est complètement visible pour les complexes HCA-F11 et HCA-F12.

Pour le composé **F11** les distances entre les nouvelles chaînes latérales et les résidus Pro201 et Leu203 constituant la poche hydrophobe, sont du même ordre de grandeur que pour le composé modèle HCA-**F1**. (Figure 17).

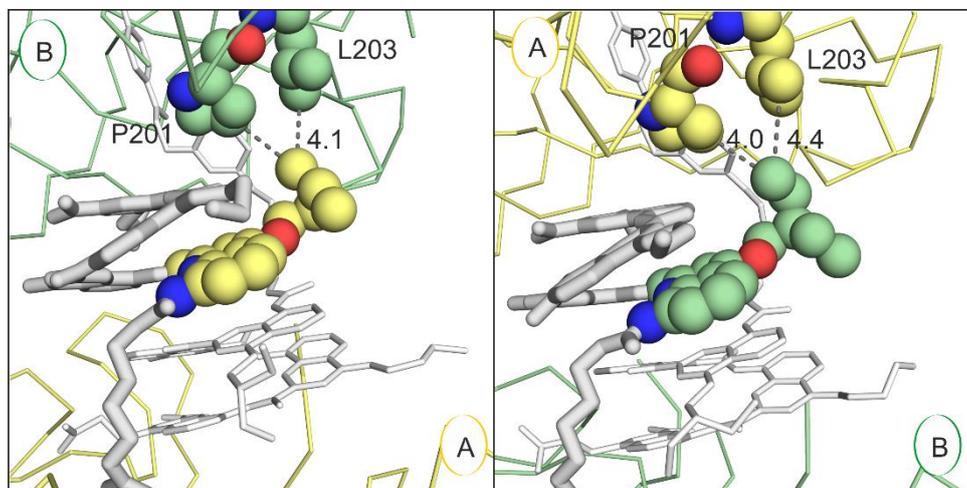


Figure 17. Interactions impliquant Q^{Hex} dans le complexe HCA-**F1**. Zoom sur le foldamère lié à la chaîne protéique A (à gauche) et B (à droite). Les distances entre résidus sont indiquées en angströms.

Concernant le variant diol **F12**, on constate que même si la chaîne latérale du foldamère lié à la chaîne protéique A paraît s'orienter en direction des carbonyles des foldamères, les distances entre les nouvelles fonctions alcools et les carbonyles sont trop grandes pour qu'il y ait interaction. Il en est de même pour l'interaction envisagée avec Gln135. La variation conçue ne paraît pas avoir amélioré les interactions avec la protéine de façon considérable.

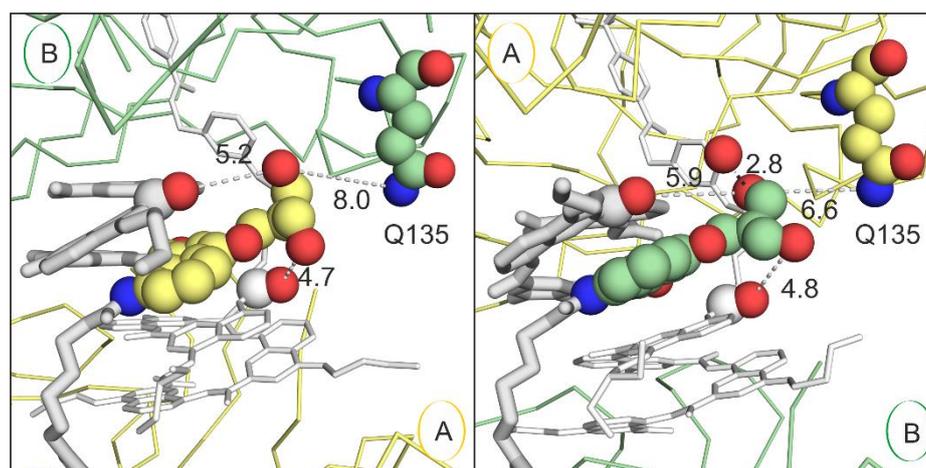


Figure 18. Q^{Ser} dans le complexe HCA-**F12**. Zoom sur le foldamère lié à la chaîne protéique A (à gauche) et B (à droite). Les distances entre résidus sont indiquées en angströms.

3.2.3.2 Position 3 du foldamère, variant **F13**

Chaque complexe HCA-**F13** forme un dimère généré par un axe de symétrie d'ordre 2. Les quatre dimères sont notés A-A', B-B', C-C' et D-D'. L'unité asymétrique est présentée en Figure 19.

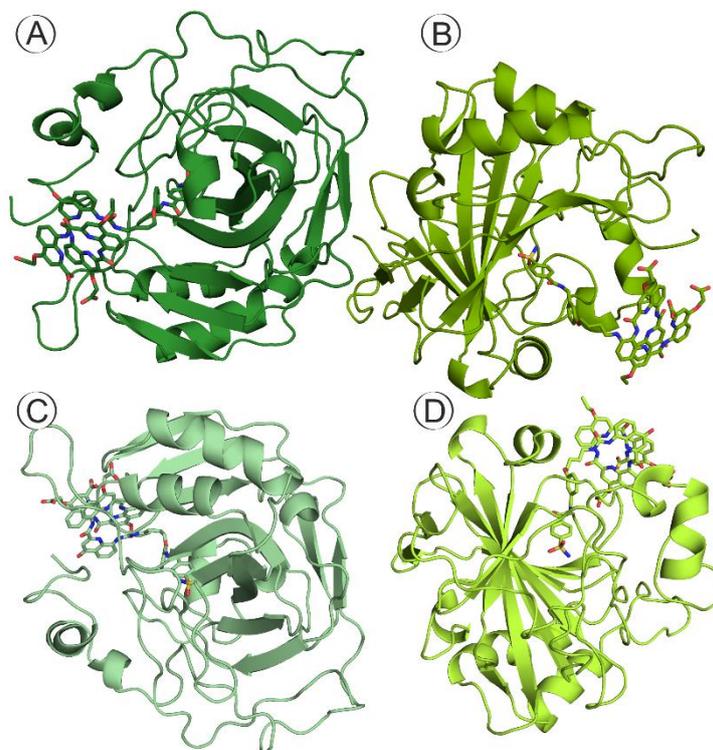


Figure 19. Représentation de l'unité asymétrique : quatre chaînes protéiques et le foldamère qui leur est lié. Chaque complexe HCA-**F13** forme un dimère avec un complexe symétrique généré par un axe de symétrie d'ordre 2 (non représenté ici).

Contrairement aux complexes HCA-**F1**, HCA-**F11** et HCA-**F12**, la Lys169 n'est pas observée en entier dans les chaînes A, C et D ce qui peut être dû à un désordre conformationnel ou à la qualité du cristal (pour HCA-**F13**). Dans le cas du foldamère lié à la chaîne B, la Lys169 est observée entièrement mais la distance entre l'acide carboxylique de la chaîne latérale Q^{Asp} du foldamère et l'amine de Lys169 est longue : l'interaction électrostatique est faible.

Pour les chaînes A, B et D de HCA-**F13**, la chaîne latérale de l'acide carboxylique de Q^{Asp} est directement impliquée dans la sphère de coordination du Zn²⁺. Dans le cas du dimère C-C', la présence d'une molécule d'eau forme un pont entre Q^{Asp} et Zn²⁺ qui est pentacoordiné dans ce cas-ci (Figure 20).

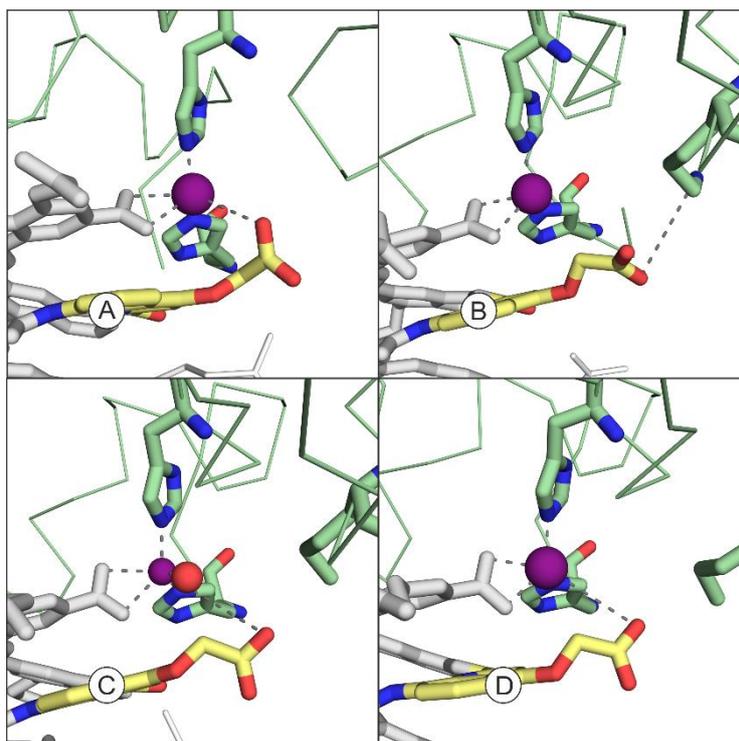


Figure 20. La position 2 Q^{ASP} dans le complexe HCA-F13. Les chaînes protéiques A, B, C, D sont représentées en jaune. Zoom sur le foldamère directement lié. Les chaînes A', B', C', D' sont en vert. La distance entre résidus est indiquée en angströms. Zn²⁺ est représenté en violet et H₂O en rouge.

3.2.4 Comparaison des structures entre elles

3.2.4.1 Angles de rotation et RMSD

Afin d'avoir une idée du degré d'identité entre les structures, nous avons calculé le RMSD après superposition des carbones α des chaînes protéiques et du squelette des foldamères (Tableau 1). Les valeurs sont toutes inférieures à 0.5, ce qui montre que ces structures présentent un haut degré de similitude. Les sous-unités d'HCA ne sont donc pas altérées par la présence des foldamères.

La seule différence notable d'un dimère à l'autre concerne l'orientation relative des chaînes protéiques au sein du dimère. En effet, en superposant une chaîne protéique de chaque dimère sur la chaîne A de HCA-F1, on observe une différence d'orientation entre les deux autres chaînes du dimère, donnée par l'angle de rotation qu'il faut appliquer pour les faire coïncider (Figure 21, Tableau 1).

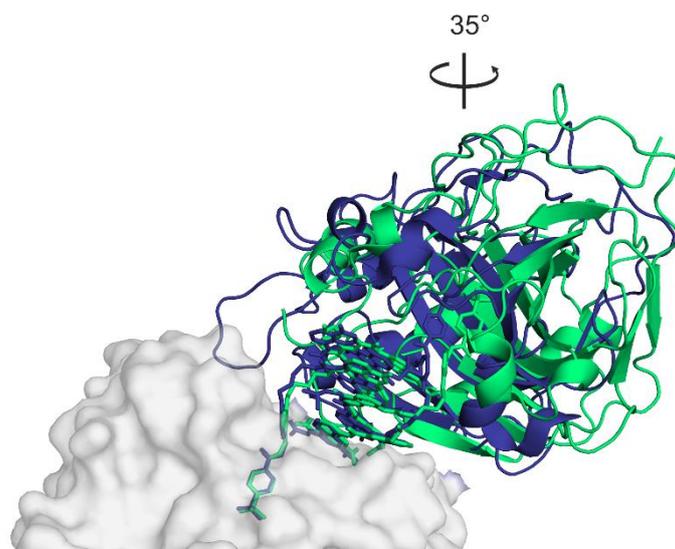


Figure 21. Représentation de la rotation à réaliser pour superposer la chaîne protéique B de **F13** (en vert) à celle de **F1** (bleu) après avoir superposé les chaînes A (surfaces représentées en gris) des deux dimères.

Tableau 1. Valeurs de RMSD et angles de rotation. ¹Chaîne A de HCA-**F1** (PDB = 4LP6) superposée à la chaîne A de HCA-**F11** ou **F12** (B, C, D de HCA-**F13**). ²Chaîne partenaire superposée à la chaîne B du complexe modèle. Calcul de l'angle de rotation et du RMSD.

	RMSD C_{α}	Angle de rotation ² (°)
HCA-F11		
Chaîne A ¹	0.206	
Chaîne B ²	0.213	3.36
HCA-F12		
Chaîne A ¹	0.213	
Chaîne B ²	0.212	4.53
HCA-F13		
Chaîne A ¹	0.319	34.6
Chaîne B ¹	0.300	34.9
Chaîne C ¹	0.275	35.9
Chaîne D ¹	0.267	35.5

Les valeurs angulaires obtenues dans la structure HCA-**F13** sont bien plus importantes que celles correspondant aux structures HCA-**F11** et HCA-**F12**. On peut alors se demander où se situe la différence dans ces structures.

3.2.4.2 Sphère de coordination du Zn^{2+}

Nous nous sommes intéressés à la sphère de coordination du zinc de la position C-terminale. (Figure 22)

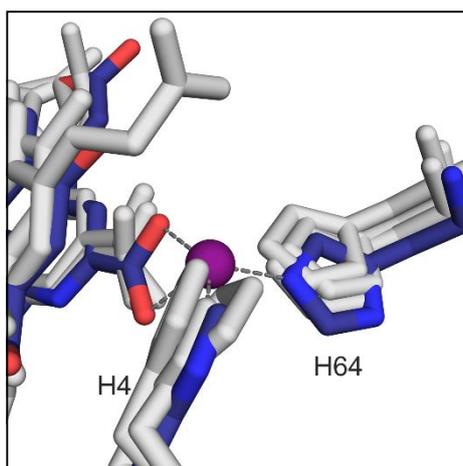


Figure 22. Superposition de la position 1 de tous les foldamères (HCA-F1 chaîne A, HCA-F11 chaîne B, HCA-F12 chaîne B, HCA-F13 chaîne A). Zoom sur la sphère de coordination du zinc. Notons que la molécule de zinc représentée est celle de HCA-F1 pour ne pas encombrer la figure car les Zn^{2+} ne se superposent pas parfaitement.

Pour toutes les structures obtenues, la sphère de coordination du zinc est une pyramide à base carrée dont les ligands sont le carboxylate *C*-terminal du foldamère (ligand bidentate) et les azotes des histidines 4 et 64. L'orientation de la quinoline en position 1 du foldamère par rapport à la chaîne protéique avec laquelle elle interagit *via* le carboxylate et le zinc est constante dans toutes les structures. En effet, les sphères de coordination du Zn^{2+} des différents dimères se superposent très bien. (Figure 22) Donc dans un dimère, le foldamère de la chaîne A a toujours la même orientation par rapport à celui de la chaîne B. Ceci alors que les chaînes protéiques A et B n'ont pas la même orientation relative dans les structures. (Figure 21) Donc, puisque l'hélicité et la forme hélicoïdale des foldamères ne change pas d'une structure à l'autre, la variation d'orientation de la deuxième chaîne protéique par rapport à la première est due à une rotation au niveau de l'espaceur du foldamère.

Conclusion

L'ensemble des données structurales récoltées grâce à la cocrystallisation des variants foldamères avec HCA concorde pour répondre à la question de ce chapitre. Les trois nouvelles structures obtenues ont présenté une complexation dimérique avec des structures très proches du composé modèle. Les variations réalisées *ab initio* n'ont pas permis d'apporter de nouvelles interactions significatives. Cette étude a cependant permis de confirmer la validation de notre stratégie d'ancrage d'un foldamère à une protéine pour étudier les interactions. Celles-ci sont détectées par CD et les analyses permettent de prédire l'hélicité induite par la protéine. De plus les nouveaux dimères obtenus montrent que la protéine n'est pas perturbée par la présence du foldamère. Son repliement n'est en effet pas affecté. C'est la conformation de l'espaceur qui induit l'orientation des chaînes protéiques entre elles.

L'apport de variations suite à l'étude des données structurales s'avère cependant insuffisant pour améliorer considérablement les interactions avec la protéine. Pour être plus pertinent, c'est une étude de modélisation moléculaire qui devrait être envisagée. La limite de ce modèle réside dans le fait que le foldamère n'interagit pas de façon espérée avec la protéine, à savoir par des interactions directes entre les chaînes latérales de l'oligomère et la surface de la protéine. L'objectif pour la suite serait donc de déstabiliser ce dimère pour observer la forme monomérique de la protéine, complexée avec nos foldamères.

Pour comprendre la dimérisation du complexe, des études ont été réalisées par M. Jewginski, post-doctorant du groupe. Il a ainsi été montré que la formation de ce complexe dimérique est également observée en solution en fonction du tampon utilisé et dépend du pH. L'étude d'un complexe monomérique (par l'addition de Q^{ASP} en position C-terminale au composé **F1**) en solution a prouvé que l'hélicité *P* était induite par l'interaction avec la protéine et non pas par la dimérisation et indépendante de l'utilisation de Zn²⁺. Cet argument valide l'hypothèse que l'interaction entre le foldamère et la protéine (chirale) est diastéréosélective et induit une hélicité préférée.¹⁵

HCA a parfaitement joué son rôle de protéine modèle en permettant l'obtention récurrente de cristaux avec nos composés. Cependant son intérêt thérapeutique reste moindre et c'est pour cette raison que d'autres protéines ont été envisagées.

Références bibliographiques

1. Rodger, A.; Marrington, R.; Roper, D.; Windsor, S., Circular dichroism spectroscopy for the study of protein-ligand interactions. *Protein-ligand interactions: methods and applications* **2005**, 343.
2. Avvaru, B. S.; Kim, C. U.; Sippel, K. H.; Gruner, S. M.; Agbandje-McKenna, M.; Silverman, D. N.; McKenna, R., A Short, Strong Hydrogen Bond in the Active Site of Human Carbonic Anhydrase II. *Biochem.* **2010**, *49*, 249.
3. Pocker, Y.; Dickerson, D. G., The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. V. Kinetic studies of enzyme-catalyzed hydrations of aliphatic aldehydes. *Biochem.* **1968**, *7*, 1995.
4. Pocker, Y.; Meany, J. E., The Catalytic Versatility of Erythrocyte Carbonic Anhydrase. II. Kinetic Studies of the Enzyme-Catalyzed Hydration of Pyridine Aldehydes*. *Biochem.* **1967**, *6*, 239.
5. (a) Kaiser, E. T.; Lo, K.-W., Carbonic anhydrase catalyzed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitro- α -toluenesulfonic acid sultone. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 4912; (b) Pocker, Y.; Sarkanen, S., Carbonic Anhydrase: Structure, Catalytic Versatility, and Inhibition. In *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, John Wiley & Sons, Inc.: 2006; pp 149.
6. Liljas, A.; Kannan, K.; Bergsten, P.; Waara, I.; Fridborg, K.; Strandberg, B.; Carlbom, U.; Järup, L.; Lövgren, S.; Petef, M., Crystal structure of human carbonic anhydrase C. *Nat New Biol* **1972**, *235*, 131.
7. Hu, P. Y.; Waheed, A.; Sly, W. S., Partial rescue of human carbonic anhydrase II frameshift mutation by ribosomal frameshift. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 2136.
8. Di Fiore, A.; Maresca, A.; Alterio, V.; Supuran, C. T.; De Simone, G., Carbonic anhydrase inhibitors: X-ray crystallographic studies for the binding of N-substituted benzenesulfonamides to human isoform II. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11636.
9. (a) Kim, C.-Y.; Chang, J. S.; Doyon, J. B.; Baird, T. T.; Fierke, C. A.; Jain, A.; Christianson, D. W., Contribution of Fluorine to Protein-Ligand Affinity in the Binding of Fluoroaromatic Inhibitors to Carbonic Anhydrase II. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12125; (b) Jain, A.; Whitesides, G. M.; Alexander, R. S.; Christianson, D. W., Identification of Two Hydrophobic Patches in the Active-Site Cavity of Human Carbonic Anhydrase II by Solution-Phase and Solid-State Studies and Their Use in the Development of Tight-Binding Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2100.
10. Stupfel, M. Reconnaissance de surfaces de protéines par des foldamères aromatiques. 2010.
11. Buratto, J.; Colombo, C.; Stupfel, M.; Dawson, S. J.; Dolain, C.; Langlois d'Estaintot, B.; Fischer, L.; Granier, T.; Laguerre, M.; Gallois, B.; Huc, I., Structure of a Complex Formed by a Protein and a Helical Aromatic Oligoamide Foldamer at 2.1 Å Resolution. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 883.
12. Delsuc, N.; Kawanami, T.; Lefeuvre, J.; Shundo, A.; Ihara, H.; Takafuji, M.; Huc, I., Kinetics of Helix-Handedness Inversion: Folding and Unfolding in Aromatic Amide Oligomers. *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 1882.
13. McPherson, A., *Introduction to macromolecular crystallography*. John Wiley & Sons: 2011.
14. Abbate, F.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Orioli, P.; Stubbs, M. T.; Klebe, G., Nonaromatic Sulfonamide Group as an Ideal Anchor for Potent Human Carbonic Anhydrase Inhibitors: Role of Hydrogen-Bonding Networks in Ligand Binding and Drug Design. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3583.
15. Jewginski, M.; Fischer, L.; Colombo, C.; Huc, I.; Mackereth, C. D., Solution Observation of Dimerization and Helix Handedness Induction in a Human Carbonic Anhydrase-Helical Aromatic Amide Foldamer Complex. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 727.

CHAPITRE 4 : Les foldamères pour la reconnaissance de surfaces de protéines d'intérêt thérapeutique

1 Introduction : présentation des protéines cibles

Ce chapitre est la transition entre l'étude des interactions entre un foldamère d'oligoamides aromatiques lié à l'enzyme modèle HCA vers l'exploration de surfaces de protéines d'intérêt thérapeutique. Cette étude est plus ambitieuse car on se confronte ici à la reconnaissance de surfaces plus larges, impliquées dans des interactions protéine-protéine et non plus à des sites actifs restreints, propices au développement de petits inhibiteurs. Les protéines étudiées ici sont l'interleukine 4 et la cyclophiline A, qui sont des cibles thérapeutiques de choix dans le but de développer ultérieurement des inhibiteurs. L'objectif est de tester une bibliothèque de foldamères avec ces protéines pour en reconnaître spécifiquement la surface.

1.1 Interleukine 4 (IL-4)

L'interleukine humaine 4 (IL-4) est une protéine faisant partie de la famille des cytokines. Elle est principalement sécrétée par les lymphocytes T. C'est une petite protéine de 15 kDa dont les 129 acides aminés qui la constituent se replient sous forme de quatre hélices α et d'un feuillet β antiparallèle. Une particularité notable est le maintien conformationnel de cette structure par 3 ponts disulfure. (Figure 1) La séquence d'IL-4 ne présente pas de cystéine libre. La protéine a été étudiée par RMN¹ et cristallographie,² notamment en liaison avec son récepteur IL-4R α .

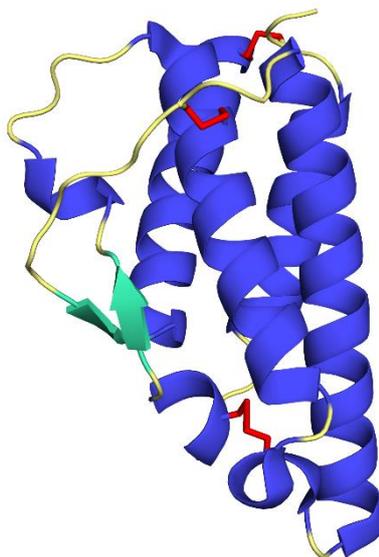


Figure 1. Structure cristallographique de la protéine IL-4. Les ponts disulfure sont représentés en rouge.³ (PDB = 2B8U)

Le rôle principal d'IL-4 est la régulation de la réponse immunitaire dans les allergies telles que les rhinites, conjonctivites, l'asthme ou encore dans les cancers ou le SIDA.⁴ IL-4

permet la communication intercellulaire par sa liaison au récepteur IL-4R α , lui-même responsable du développement d'une réponse allergique. C'est pourquoi l'étude de l'interface d'interaction IL-4/IL-4R α présente un intérêt thérapeutique. Nombre des stratégies d'inhibition du complexe IL-4/IL-4R α visent à bloquer les voies de signalisation en amont mais son inhibition spécifique reste à ce jour encore en développement. En effet, cibler le récepteur est délicat car il est aussi impliqué dans l'interaction avec l'interleukine 13 et cela peut engendrer des effets secondaires.⁵

Des anticorps visant IL-4⁶ ou son récepteur⁷ ont été développés et semblent efficaces *in vitro* et *in vivo*, mais ce sont des molécules coûteuses à produire. Le motif épitope d'IL-4 impliqué dans l'interaction avec IL-4R α a été greffé sur un motif *leucine zipper* pour concevoir une mini-protéine pouvant se lier à IL-4R α .⁸ Cependant, l'affinité avec le récepteur s'est montrée trop faible pour envisager une application thérapeutique. Il n'y a pas à notre connaissance de petite molécule capable de se lier spécifiquement à IL-4 avec une grande affinité, d'où notre intérêt pour cette protéine.

1.2 Cyclophiline A (CypA)

Une autre cible de choix de ce projet est la cyclophiline A (CypA). Les cyclophilines sont des protéines retrouvées dans tous les tissus, appartenant à la famille des immunophilines. Elles possèdent une activité d'isomérase peptidyl prolyl *cis-trans* puisqu'elles modifient l'activité de certaines protéines en catalysant l'isomérisation *cis-trans* de liaisons peptidiques des résidus proline. Il existe 16 types de cyclophilines humaines, distingués par leur structure et la plus abondante est la cyclophiline A (CypA), retrouvée dans les lymphocytes T.⁹ C'est une petite protéine de 18 kDa formée d'une chaîne polypeptidique de 165 acides aminés. Elle possède une structure en tonneau β , constitué de 2x4 brins β perpendiculaires, antiparallèles et de deux hélices α . Contrairement à IL-4, cette protéine ne possède pas de pont disulfure. (Figure 2)

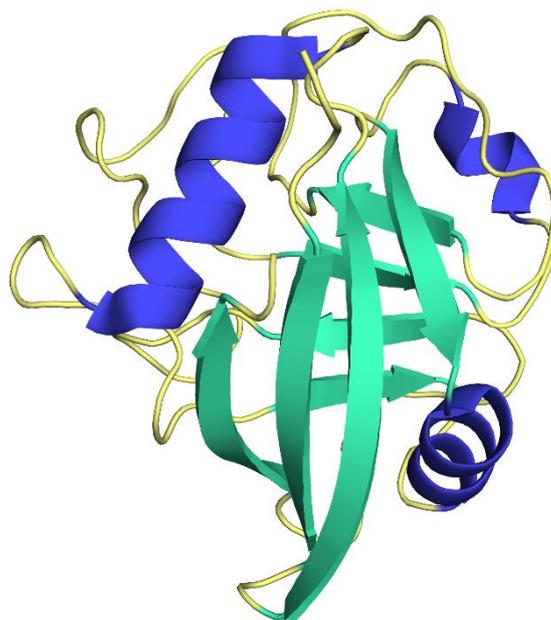


Figure 2. Structure cristallographique de la protéine CypA.¹⁰ (PDB = 1CWA)

La cyclophiline A possède un rôle biologique important puisqu'elle est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que le repliement des protéines, le trafic, l'assemblage, l'immunomodulation et la signalisation cellulaire. CypA est surexprimée dans des cas de cancers où elle joue un rôle dans le développement de métastases.¹¹ Pour ces raisons, cette protéine est très étudiée et sa structure a été déterminée par RMN¹² et diffraction aux rayons X, seule, ou en interaction, avec par exemple la cyclosporine A^{10, 13} ou un récepteur : CD147.¹⁴

Le récepteur CD147 est une protéine transmembranaire impliquée dans la régulation de nombreuses familles protéiques. Dans certains cas pathologiques, sa surexpression est telle qu'il est considéré comme un biomarqueur de certains cancers.¹⁴ CD147 est également un récepteur de la cyclophiline A. La participation de CypA à des interactions protéine-protéine montre que son site de liaison possède une large surface. De par l'implication de cette protéine dans un grand nombre de pathologies, il y a un besoin d'offrir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour cibler le site de liaison de CypA, afin de trouver de nouveaux inhibiteurs.

IL-4 et CypA ont été choisies pour leur important intérêt thérapeutique, l'objectif de ce projet étant de développer un foldamère capable de reconnaître spécifiquement la surface de ces protéines dans une visée thérapeutique, à savoir à terme le développement de nouveaux inhibiteurs d'interactions protéine-protéine. D'un point de vue pratique, leur taille relativement petite permet d'utiliser la RMN en solution pour obtenir des informations structurales. Le choix

s'est volontairement porté sur des protéines de structures secondaires distinctes : l'une principalement formée d'hélices α (IL-4) et l'autre de feuilletts β (CypA). Le projet permettra ainsi d'étudier le type d'interactions entre différentes structures secondaires et les foldamères d'oligoamides aromatiques synthétisés au laboratoire.

Ce projet s'inscrit sur une dizaine d'années déjà et a impliqué les efforts d'étudiants comme M. Stupfel durant sa thèse. Elle a exploré la synthèse de ligands et des foldamères en solution notamment. J. Buratto s'est impliqué dans les premières investigations de cristallogénèse lors de sa thèse. Ce travail collaboratif inclut aussi M. Laguerre pour les études préliminaires de modélisation, M. Hugues pour la purification des adduits protéine/foldamère, C. Mackereth pour les études RMN conjointement à M. Jewginski également impliqué dans le design et l'expression des mutants CypA. K. Bathany et J.-M. Schmitter pour la digestion trypsique et les études de masse, B. Langlois D'Estaintot pour la cocrystallisation des composés avec les protéines, T. Granier pour la résolution des structures.

2 Stratégie et conception

La stratégie de ce projet est directement liée à celle appliquée à l'anhydrase carbonique puisqu'elle propose de développer des foldamères fonctionnalisés pour reconnaître spécifiquement des surfaces de protéines en connectant le foldamère directement à la protéine. Toutefois, cet ancrage ne peut plus se réaliser de la même manière que pour HCA. En effet, ces protéines ne possèdent pas un site actif bien défini avec un inhibiteur connu. Nous avons donc choisi de maintenir le foldamère à proximité de la surface protéique par l'intermédiaire cette fois, d'un lien covalent.

L'accrochage du foldamère doit être spécifique, c'est-à-dire être réalisé à une unique position définie. Pour que la réaction soit chimiosélective, il est possible de cibler un acide aminé possédant une fonction particulière et étant peu abondant en surface de protéine, comme c'est le cas de la cystéine.¹⁵ La cyclophiline A possède quatre cystéines libres dans sa séquence mais d'après sa structure cristallographique, elles sont enfouies au sein de la protéine. Elles ne sont donc pas en théorie, accessibles pour l'accrochage d'un foldamère. Les cystéines de la protéine IL-4 sont quant à elles toutes impliquées dans des ponts disulfure. C'est pourquoi nous proposons dans les deux cas d'introduire une cystéine en surface, par mutagénèse dirigée, à proximité du site de liaison de la protéine avec son récepteur. Le groupe a choisi de lier les

foldamères aux protéines ciblées par la formation d'un pont disulfure entre un foldamère portant une fonction disulfure activée et la cystéine introduite par mutation à la surface de la protéine.

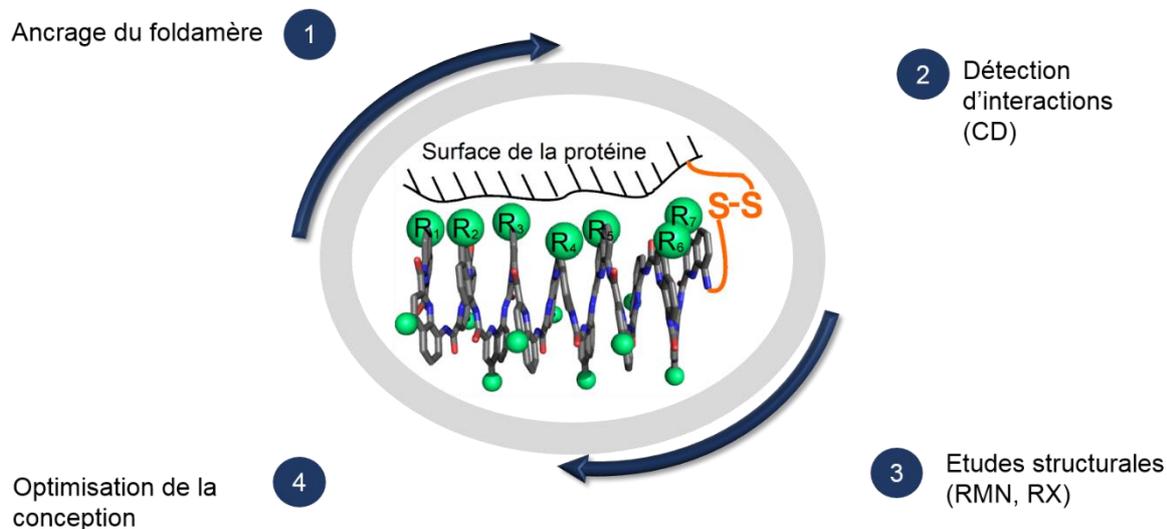


Figure 3. Schéma de la stratégie de développement de foldamères pour l'interaction avec des protéines présentant une cystéine libre en surface.

Une autre possibilité avait été explorée par le groupe et consistait à introduire un maléimide avec la réaction de Mickaël.¹⁶ Toutefois, cette méthode n'a pas été retenue car elle introduit un centre chiral au sein des foldamères. En effet, la méthode de *screening* utilisée pour la détection d'interactions foldamère/protéine est le dichroïsme circulaire. L'interaction avec la protéine est stéréosélective et déplace l'équilibre du foldamère vers une hélicité gauche ou droite, conduisant à un signal CD. Or la présence d'un centre chiral au sein d'un foldamère peut déplacer l'équilibre conformationnel vers une hélicité préférentielle (selon la force de l'induction dans le solvant donné).¹⁷ Il est alors délicat d'identifier si l'induction d'hélicité provient de l'interaction avec la protéine ou du centre chiral seul. De plus, il faudrait séparer les diastéréoisomères avant de réaliser la cristallogénèse avec la protéine.

Notre stratégie propose donc la formation d'un pont disulfure pour ancrer le foldamère à la protéine de façon covalente (Figure 3, étape 1). Le *screening* CD permet d'identifier des *hits* qui seront analysés structurellement par RMN en solution et/ou cristallographie par rayons X (Figure 3, étape 3). Les interactions mises en jeu dans les adduits formés seront ainsi identifiées, ce qui permettra ensuite d'optimiser les séquences de foldamères pour améliorer les interactions et renforcer l'affinité du foldamère pour la surface protéique (Figure 3, étape 4). De nouvelles séquences seront ainsi synthétisées et soumises au même parcours de sélection : c'est une stratégie itérative.

2.1 Méthode de *tethering*TM (Sunesis pharmaceutical)

La méthode de *tethering* a été développée par J. A. Wells au sein de l'entreprise Sunesis Pharmaceuticals dans les années 2000.¹⁸ Elle est basée sur l'échange thiol/pont disulfure pour identifier des molécules d'intérêt présentant une affinité avec une protéine cible. Ainsi, une protéine possédant un thiol libre en surface, par l'intermédiaire d'une cystéine, est mise en présence d'une bibliothèque de composés présentant un pont disulfure, capable de s'échanger avec le thiol libre à pH 8 en milieu réducteur. L'échange thiol/disulfure est rapide et les interactions non covalentes entre un fragment et la cible favorisent l'augmentation de la concentration locale de ce fragment et donc la formation d'un pont disulfure avec la protéine. Cette technique permet d'identifier des molécules interagissant avec la protéine cible, même faiblement et les adduits formés sont analysés par masse.¹⁹ (Figure 4) Notre approche s'inspire de la méthode de *tethering* et la cystéine mutée est introduite par mutation à la surface de la protéine.

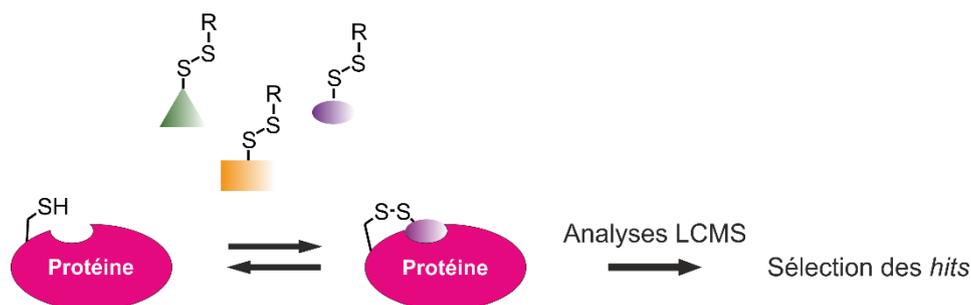


Figure 4. Schéma de la méthode de *tethering*.

La méthode de *tethering* a déjà permis l'identification d'inhibiteurs d'IPP telles que l'interaction IL-2/IL-2R α .²⁰ La différence que nous allons apporter pour appliquer cette méthode de *tethering* à nos protéines de choix est que nous n'allons pas travailler en conditions réductrices pour la formation du pont disulfure. En effet, les ponts disulfure d'IL-4 sont sensibles et réduits dans ces conditions.²¹ De plus, pour pouvoir étudier l'adduit formé par RMN et/ou rayons X, le foldamère doit rester ancré à la protéine.

2.2 Production de mutants de protéines

Des mutations ont été apportées aux protéines ciblées afin d'introduire une cystéine libre dans la séquence, à proximité des surfaces d'interaction et accessibles pour y ancrer un foldamère.

2.2.1 Interleukine-4

Les cystéines de la protéine IL-4 sont impliquées dans des ponts disulfures nécessaires au maintien conformationnel de la structure secondaire. L'absence de cystéine libre dans la séquence offre l'avantage de ne pas risquer de former de pont disulfure avec la cystéine mutée. La position de la cystéine mutée a été déterminée par modélisation moléculaire en prenant comme critère que sa localisation soit à la fois en surface de la protéine et proche du site d'interaction d'IL-4 avec son récepteur. Ainsi, c'est le résidu sérine 16 qui a été choisi pour de la mutagenèse dirigée. (Figure 5)

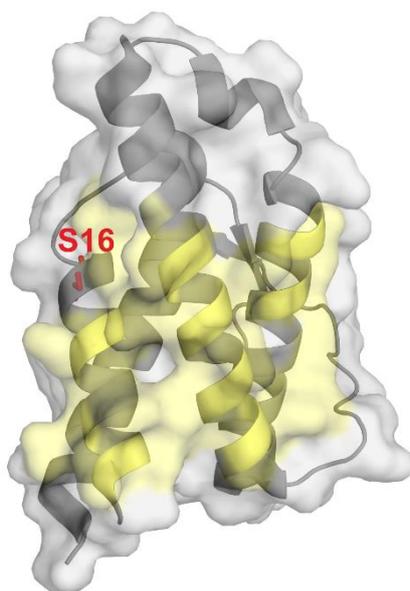


Figure 5. Représentation (en jaune) de la surface d'interaction entre IL-4 et le récepteur IL-4R α ainsi que la position de la sérine (en rouge) à muter en cystéine pour l'accrochage d'un foldamère.

La protéine mutée est produite en s'appuyant sur des méthodes décrites²¹ et porte un glutathion sur le résidu S16C. En effet, la production fait intervenir une étape de dénaturation/renaturation réalisée à l'aide d'un tampon contenant du glutathion. Ce dernier doit donc être retiré avant l'ancrage d'un foldamère. La déglutathionylation chimique est extrêmement délicate car elle n'est pas spécifique et réduit également les ponts disulfure nécessaires au maintien de la structure secondaire d'IL-4. C'est pourquoi une déglutathionylation enzymatique a été envisagée à l'aide de la glutarédoxine et la glutathion réductase.²¹ (Figure 6) La protéine est ensuite purifiée sur une colonne d'exclusion de taille et une analyse de masse confirme la présence de trois ponts disulfure.

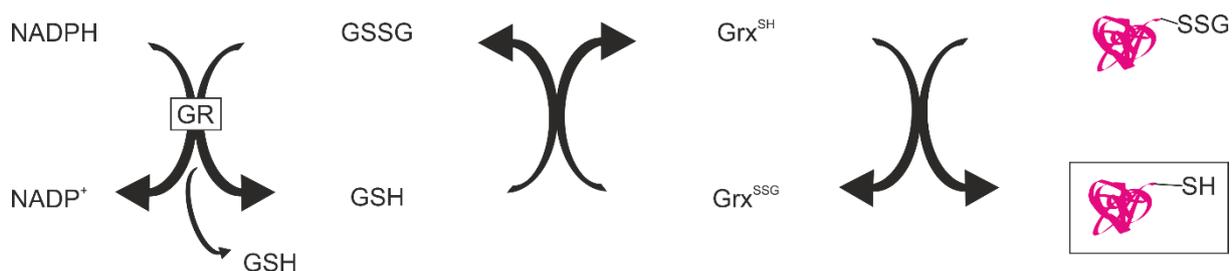


Figure 6. Déglutathionylation par voie enzymatique de l'IL-4 S16C.²¹ La diminution de l'absorbance (à $\lambda = 340$ nm) due à la disparition de NADPH permet de suivre la réaction. Le glutathion de la protéine mutée (Prot-SSG) est transféré à la glutarédoxine (Grx^{SH}) permettant de synthétiser le glutathion oxydé (GSSG) lui-même consommé par la glutathion réductase (GR) à l'aide du NADPH.

2.2.2 Cyclophiline A

Contrairement à IL-4, la cyclophiline A possède plusieurs cystéines enfouies et une plus en surface : le résidu 52. (Figure 7)

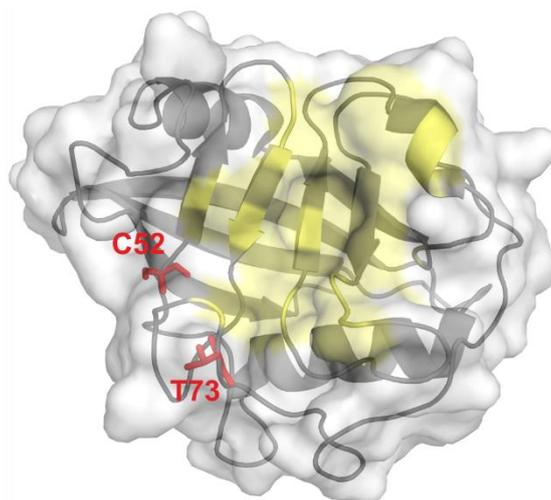


Figure 7. Représentation (en jaune) de la surface d'interaction entre CypA et l'inhibiteur CsA ainsi que les positions des mutations envisagées (en rouge) pour l'accrochage d'un foldamère. **N.B. :** à notre connaissance, il n'y a pas de structure cristallographique représentant CypA liée à son récepteur CD147. Cependant, des études par RMN en solution ont montré que CD147 se lie à CypA au niveau de site de liaison.¹⁴ Pour cette étude nous avons fait l'approximation que la liaison de CsA et CD147 à CypA implique des résidus similaires.

Pour apporter une cystéine en surface, la mutation de la thréonine 73 a été envisagée. (Figure 7) Ainsi, le mutant CypA C52A T73C a été produit. Nous avons d'abord pensé que la cystéine 52 n'était pas accessible pour l'accrochage d'un foldamère. Or la figure 8 montre qu'il y a une différence de déplacements chimiques des amides entre la protéine native et la protéine native liée à un *linker* court. Ceci prouve qu'une molécule telle que **57** se lie à C52. C'est pourquoi nous avons choisi de muter ce résidu en alanine.

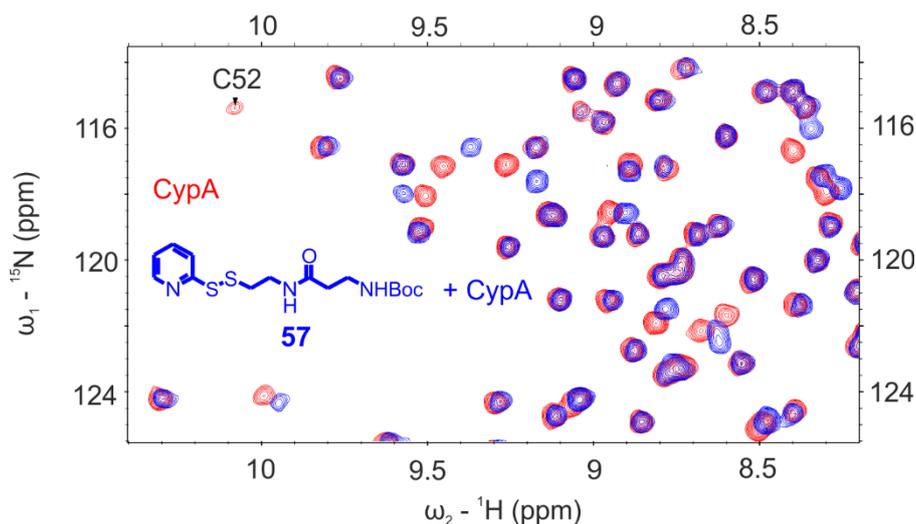


Figure 8. Région ^1H , ^{15}N du spectre TROSY de CypA native et CypA native + 1.2 équiv. **57** dans un tampon Tris à 10 mM, 50 mM NaCl, pH = 7.5, T = 22 °C. Spectromètre Bruker 700 MHz.

Avant d'ancrer le foldamère à CypA, la protéine doit être réduite car les cystéines libres s'oxydent facilement, aboutissant à la formation de dimères de protéine. La réduction est réalisée à l'aide de DTT (dithiothréitol), lui-même retiré par colonne Sefadex juste avant la réaction d'accrochage du foldamère.

2.3 Design des foldamères

Pour ce projet, le choix a été fait de s'affranchir de la modélisation moléculaire pour guider la conception de foldamères. La technique est effectivement coûteuse en temps et il n'existe pas à ce jour de champ de force optimisé pour les interactions protéine/foldamère. De plus, les surfaces impliquées dans les sites de liaison des protéines d'intérêt sont larges, ce qui multiplie les possibilités et elles présentent des charges réparties différemment selon les protéines IL-4 et CypA. (Figure 9)

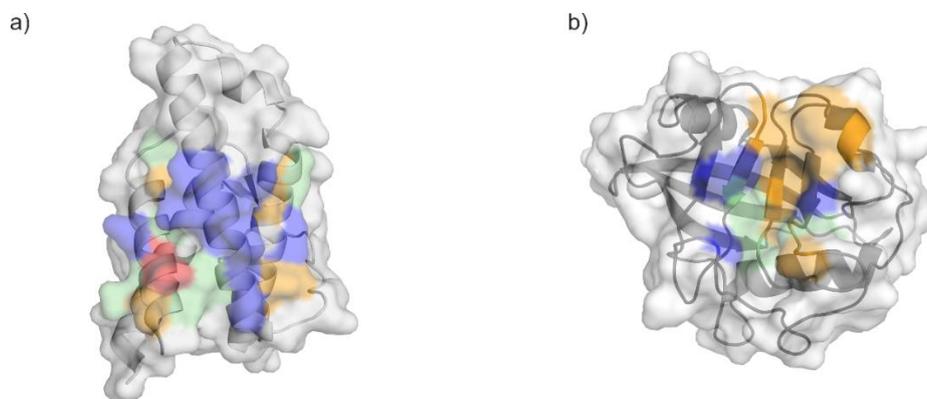


Figure 9. Représentation des surfaces d'interaction des protéines avec leur récepteur (ou ligand). Les résidus basiques sont en rouge, acides en bleu, hydrophobes en orange et polaires neutres en vert. Surface d'interaction entre a) IL-4 et IL-4R α . b) CypA et CsA.

La première série de foldamères à tester sur les deux protéines a été conçue de manière à fournir une bibliothèque variée de composés chargés différemment, à partir des monomères quinoline disponibles au laboratoire. (Figure 10) Les séquences ont aussi été choisies pour être solubilisées en milieu aqueux. Elles n'incluent pas plus de cinq quinolines pour que l'équilibre conformationnel soit atteint rapidement. Rappelons que notre étude perd de son intérêt si nous devons attendre trop longtemps une réponse concernant une interaction avec la protéine, comme ce serait le cas avec les longs foldamères de quinolines. (Chapitre 5)

Pour lier la protéine au foldamère, ce dernier doit posséder une fonction capable de réagir avec un thiol. Pour ce faire, un disulfure activé par une pyridine a été développé et connecté au foldamère par un espaceur. Deux longueurs d'espaceur ont été explorées : un *linker* court, susceptible de limiter les mouvements du foldamère et ainsi de favoriser la cristallogénèse des adduits formés et un *linker* plus long avec 3 fonctions éthylèneglycol, accordant au foldamère une plus grande liberté de mouvement pour se positionner sur la surface de la protéine et interagir au mieux avec elle. Les fonctions éthylèneglycol permettent également d'accroître la solubilité en milieu aqueux. (Figure 10)

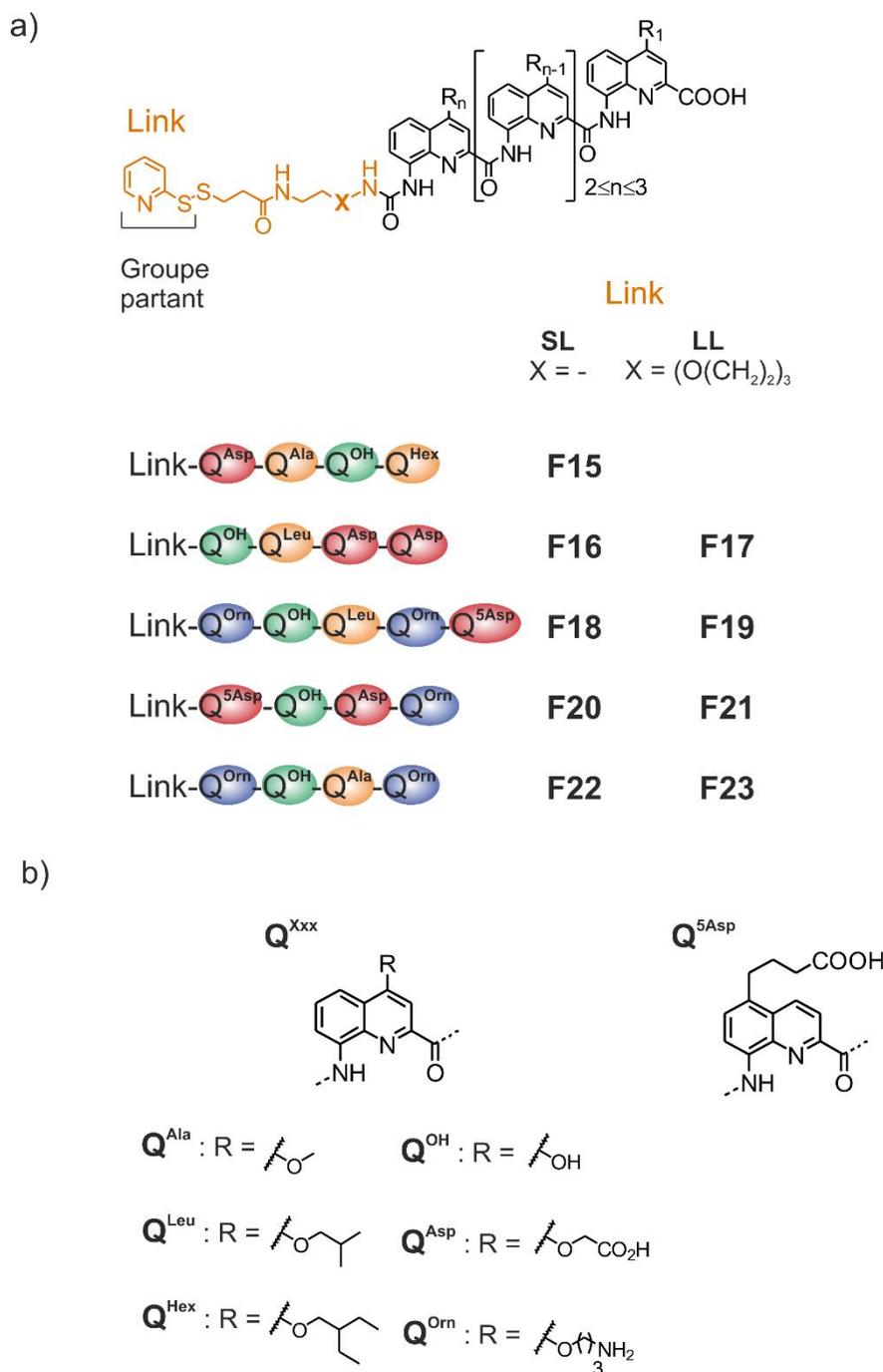


Figure 10. a) Représentation d'un foldamère type et de la première série de foldamères conçue pour du *tethering* sur IL-4 S16C, CypA C52A T73C. Les résidus basiques sont en rouge, acides en bleu, hydrophobes en orange et polaires neutres en vert. **SL** = *linker* court, **LL** = *linker* long. b) Représentation des monomères utilisés.

Comme discuté dans le chapitre 2, le couplage du *linker* au foldamère est réalisé *via* la position *N*-terminale du foldamère, à l'aide d'une fonction urée. L'oligomère est synthétisé sur support solide par formation d'un lien ester entre la résine Wang bromée et l'acide carboxylique du premier monomère. La SPS permet d'accéder rapidement à une bibliothèque variée de foldamères, qui après purification par HPLC semi-préparative, vont pouvoir être reliés aux protéines par la méthode de *tethering*.

3 Liaison des foldamères aux mutants protéiques

Le processus de liaison des foldamères pour la reconnaissance de surfaces de protéines est le suivant : les foldamères sont accrochés à la protéine par formation d'un pont disulfure, la réaction est validée par HPLC ou LCMS, la localisation du foldamère sur la cystéine mutée est vérifiée par digestion trypsique. Ce processus est suivi d'analyses physico-chimiques : un *screening* CD des interactions est réalisé, les adduits formés sont purifiés et enfin des expériences de cristallogenèse sont réalisées.

Ce projet étant un travail collaboratif encore en cours de progrès, les résultats présentés ici sont amenés à évoluer.

3.1 Expériences d'accrochage et validation de la réaction par LCMS

Les conditions d'accrochage des foldamères aux protéines ont préalablement été optimisées avec comme critère la nécessité de réduire au maximum les quantités de composés utilisées. Plusieurs concentrations et équivalents de foldamères ont été testés. Il a été montré que la protéine est entièrement complexée avec deux équivalents de foldamère et que le signal CD est suffisamment intense pour détecter une interaction lorsque la concentration de la protéine est de 20 μM . Pour le choix du tampon, Tris a été sélectionné car il permet également de réaliser des expériences RMN en solution.

Ainsi, deux équivalents de foldamère ont été incubés en présence de 20 μM des mutants IL-4 S16C et CypA C52A T73C dans un tampon Tris 10 mM à pH = 7.5, NaCl à 50 mM et 3 % de DMSO pour favoriser la solubilisation des foldamères. La solution de foldamère dans le DMSO est ajoutée sous agitation lente pour éviter la précipitation. Deux exemples représentatifs d'analyses par LCMS sont donnés en figures 11 et 12.

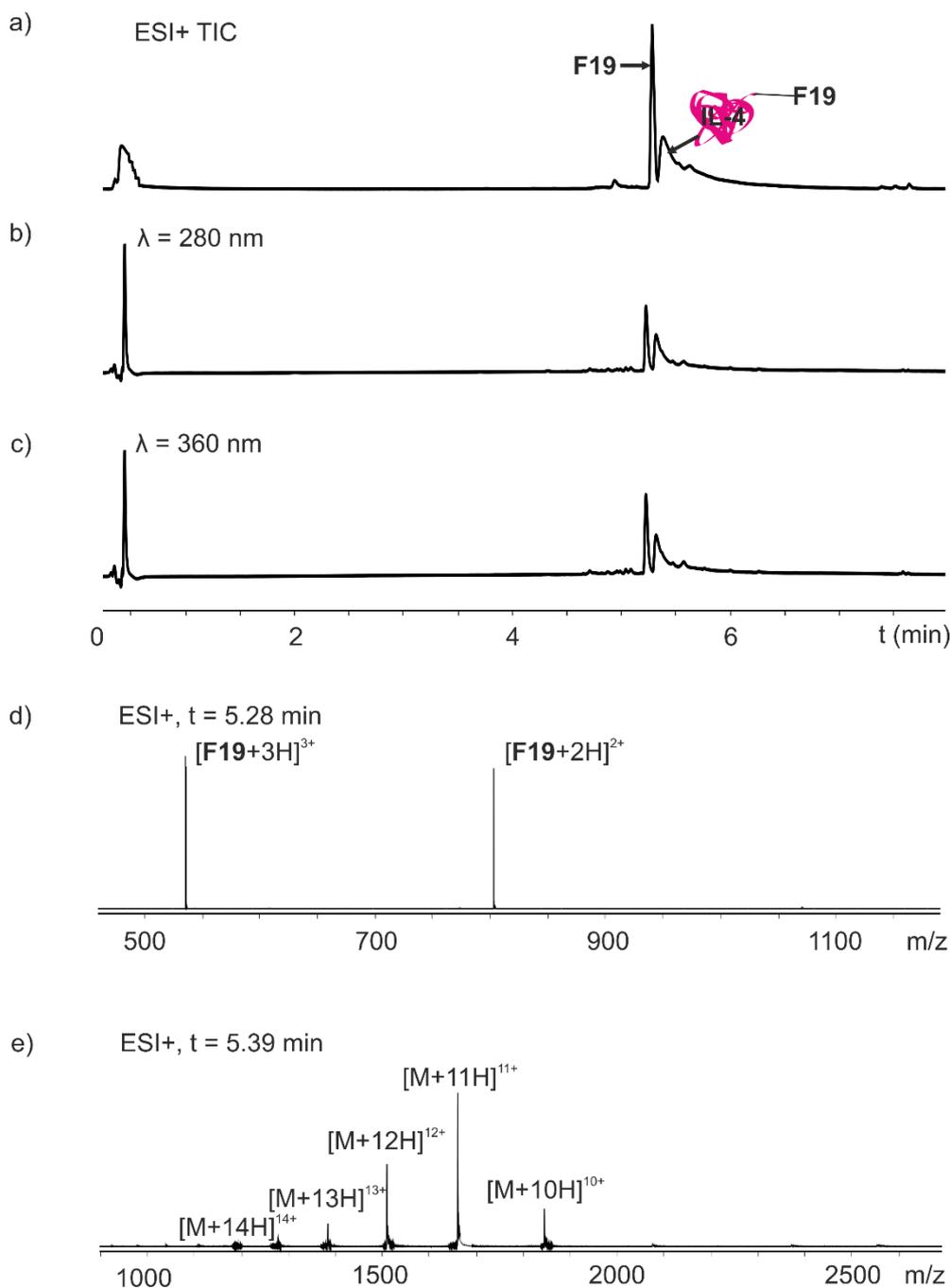


Figure 11. Spectres LCMS du complexe IL-4/F19 dans un tampon Tris à pH = 7.5, NaCl à 50 mM et 3 % de DMSO. a) Spectre TIC. b) Chromatogramme UV à 280 nm. c) Chromatogramme UV à 360 nm. d) Spectre de masse du pic à t = 5.3 min, c'est le foldamère **F19** seul. e) Spectre de masse du pic à t = 5.4 min, c'est le complexe M = IL-4/F19.

Les analyses LCMS montrent la présence de deux composés majoritaires. Les chromatogrammes à 280 et 360 nm sont similaires. La protéine n'absorbant pas à 360 nm, les deux pics observés seraient le foldamère **F19** seul et **F19** lié à IL-4 S16C. Ce résultat est confirmé par les spectres de masse observés. Ceci montre que le foldamère **F19** est bien lié à la protéine IL-4 de manière quantitative puisqu'on n'observe pas de pic de protéine seule. Des résultats similaires sont obtenus avec la protéine CypA. (Figure 12)

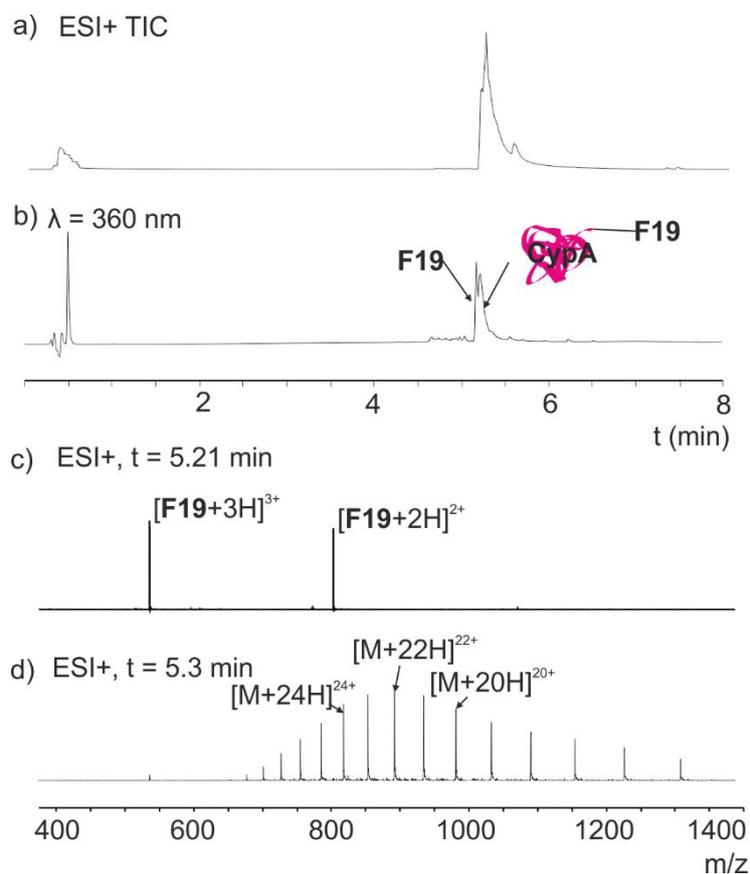


Figure 12. Spectres LCMS du complexe CypA/**F19** dans un tampon Tris à pH = 7.5, NaCl à 50 mM et 3 % de DMSO. a) Spectre TIC. b) Chromatogramme UV à 360 nm. d) Spectre de masse du pic à $t = 5.2$ min, c'est le foldamère **F19** seul. e) Spectre de masse du pic à $t = 5.3$ min, c'est le complexe $M = \text{CypA}/\mathbf{F19}$. La protéine est bien complexée avec **F19**.

3.2 Validation de la position de liaison des foldamères aux protéines mutées

Afin de vérifier que la liaison des foldamères aux protéines a bien lieu au niveau des cystéines mutées, des expériences de digestion trypsique ont été réalisées. Elles consistent à employer la trypsine, une protéase capable d'hydrolyser les liaisons peptidiques pour lesquelles le carbonyle est suivi d'une arginine ou d'une lysine.²² Ainsi des fragments de protéine sont obtenus et analysés par LCMS. (Figure 13)

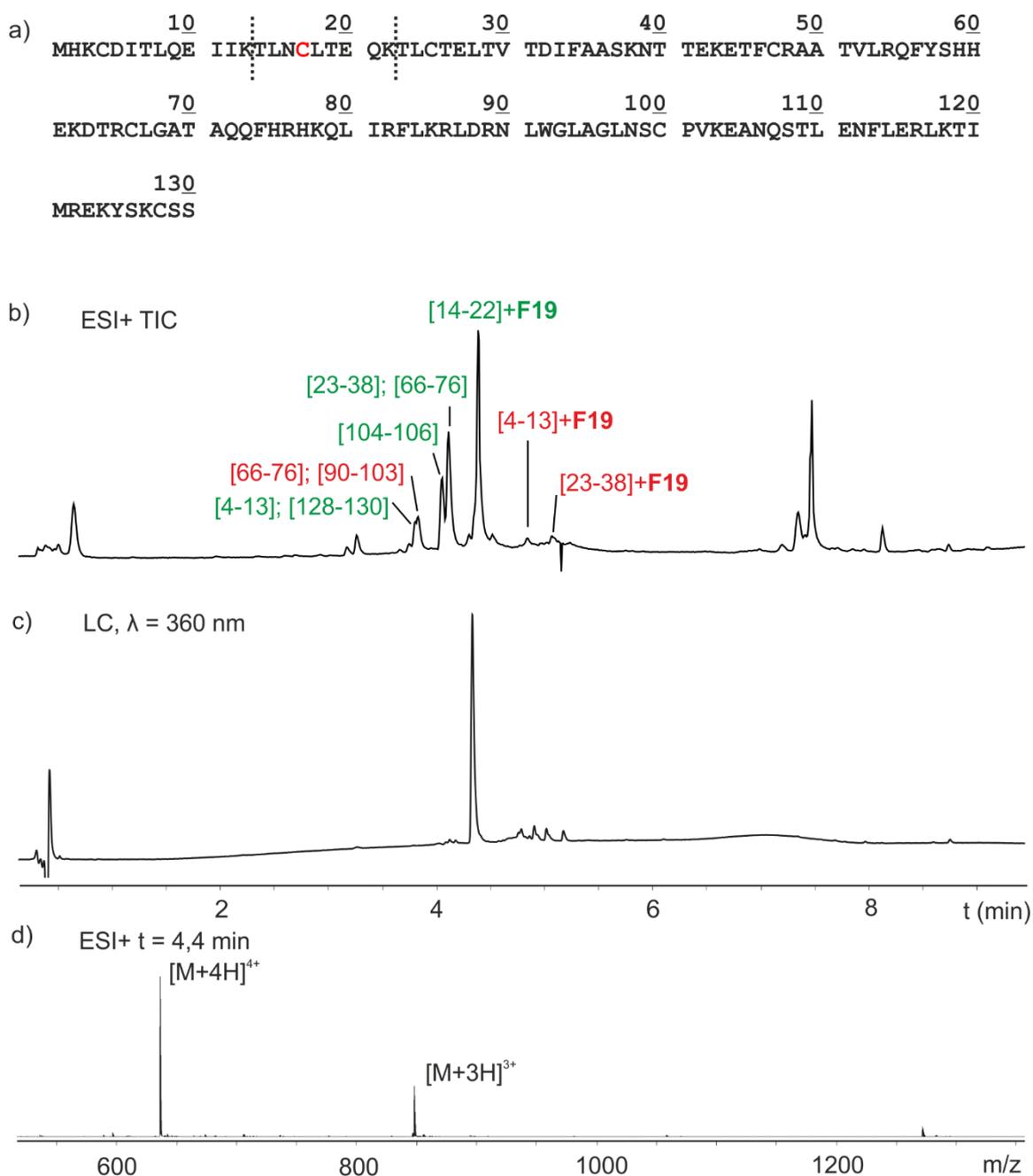


Figure 13. a) Séquence de la protéine mutée IL-4 S16C. Mise en évidence du fragment [14-22] et de la cystéine mutée. Remarque : la protéine mutée est produite avec une méthionine supplémentaire par rapport à IL-4 native. Les résidus sont numérotés à partir de celle-ci. La cystéine mutée porte donc le numéro 17. Les fragments en rouge sont des fragments non désirés. b) Spectre TIC. c) Chromatogramme UV à 360 nm. d) Spectre de masse du pic majoritaire. M = Fragment [14-22] + F19.

Le pic majoritaire sur les chromatogrammes TIC et LC possède une masse correspondant au fragment [14-22] + F19. Rappelons que contrairement au chromatogramme UV, le signal TIC n'est pas quantitatif. En croisant les résultats des signaux TIC et LC, on voit que les fragments contenant le foldamère sur une autre cystéine sont minoritaires. Le foldamère F19 est majoritairement ancré sur la cystéine mutée comme désiré.

La CypA étant marquée à l'azote 15, des expériences de RMN en solution ont pu être réalisées pour la validation du site d'ancrage du foldamère à la protéine. 1.2 équivalent de *linker 57* a été mis en présence de la protéine native et de la protéine mutée CypA C52A T73C. La perturbation des déplacements chimiques des amides est quantifiée et reportée sur la structure cristallographique.²³ Pour la protéine native, la liaison au *linker 57* induit des perturbations au niveau des déplacements chimiques autour de la cystéine 52. Ce qui montre que *57* se lie à C52. (Figure 14, a et b) Dans le cas de la protéine mutée, il n'y a plus de perturbation autour de C52. Elles sont en revanche situées autour de T73C. Ce qui prouve que les mutations ont été effectives et que *57* se lie bien à T73C. (Figure 14, c et d) Notons que les perturbations sont moindres dans ce dernier cas. En effet, la thréonine 73 est exposée au solvant. Le *linker 57* étant une petite molécule, il est probablement majoritairement exposé au solvant et les interactions avec la protéine sont faibles. nature

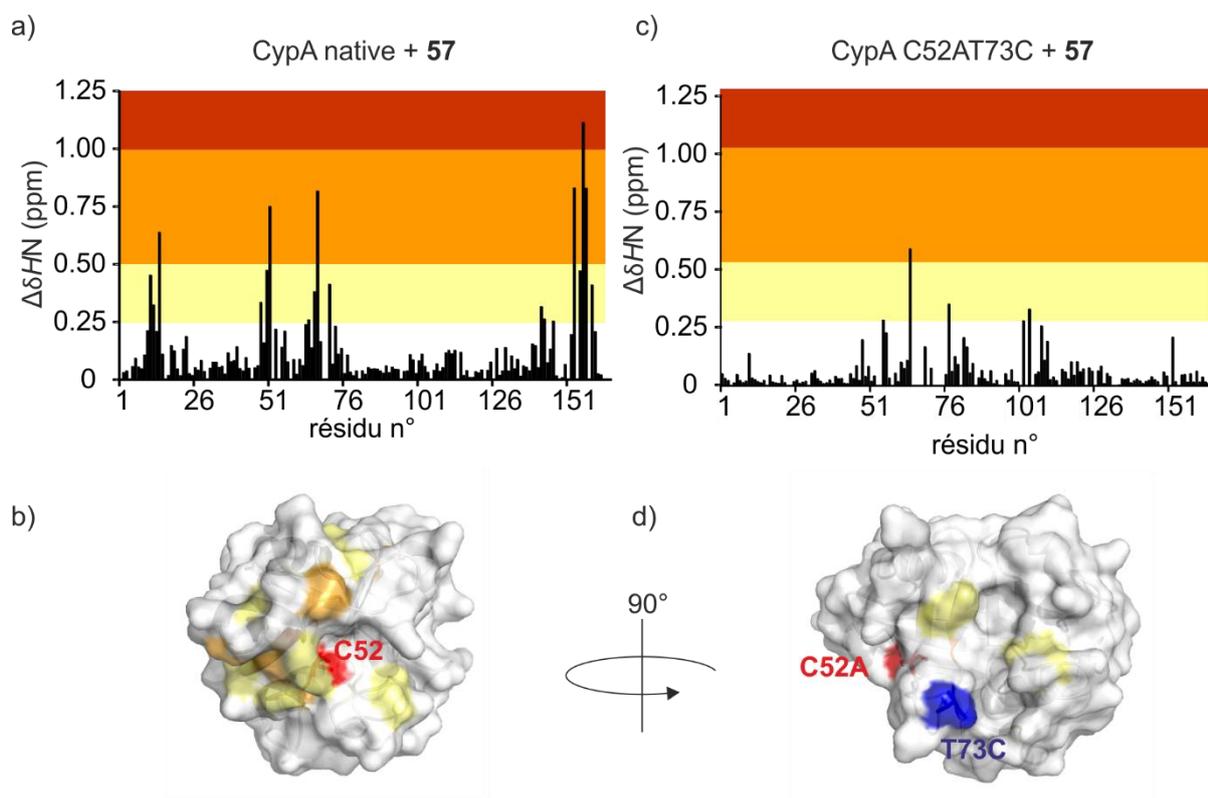


Figure 14. Quantification de la perturbation des déplacements chimiques suite à la liaison de CypA avec *57*.²³ La perturbation est considérée significative lorsque $\Delta\delta_{HN} > 0.25$. a) CypA native et c) CypA mutée C52AT73C. Le même code couleur est utilisé pour reporter ces perturbations sur la structure de CypA (PDB = 1CWA) b) CypA native d) CypA C52AT73C. Echantillons préparés à 100 μM + 1.2 équivalent de *57* dans un tampon Tris à 10 mM, 50 mM NaCl, pH = 7.5, T = 22 °C. Spectromètre 700 MHz.

Les résultats concordent pour affirmer que les foldamères sont ancrés sur la position mutée choisie, l'étape suivante du processus consiste à investiguer les éventuelles interactions avec les protéines mutées.

3.3 Screening CD des interactions

Pour ce faire, les spectres CD de tous les composés ont été mesurés à température ambiante après 48h d'incubation pour permettre l'équilibre conformationnel des foldamères interagissant avec la surface de la protéine. (Figure 15)

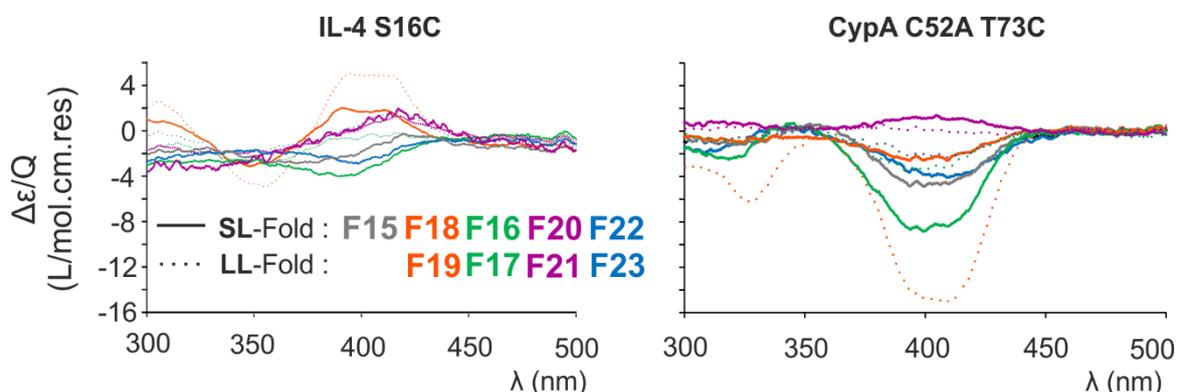


Figure 15. Spectres CD de 2 équivalents des composés **F15** à **F23** incubés en présence de 20 μM de protéine dans un tampon Tris à pH = 7.5, NaCl à 50 mM et 3 % de DMSO. Les échantillons sont placés sous agitation douce à température ambiante pendant 2h puis conservés à 4 °C pendant 48h.

De manière générale, les signaux CD sont majoritairement positifs (hélicité droite stabilisée) avec la protéine IL-4 et négatifs (hélicité gauche stabilisée) en présence de CypA. Le composé **F19** montre un signal CD intense en présence des deux protéines et **F16** en présence de CypA. On remarque que ce composé possède un *linker* long alors que d'autres composés présentant un signal CD non négligeable (**F16** par exemple) possèdent un *linker* court : ce résultat montre la pertinence du choix de deux longueurs de *linker* différentes pour tester les interactions protéine/foldamères.

3.4 Purification par HPLC

Afin de maximiser les chances de cocrystallisation, une purification par HPLC des échantillons présentant un signal CD intense est réalisée. (Figure 16)

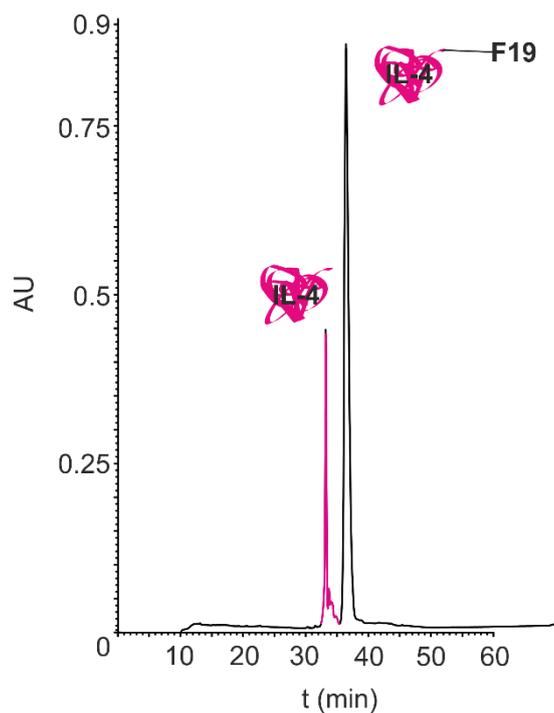


Figure 16. Purification par HPLC du complexe IL-4/**F19**. Spectre à 280 nm. Solvant A : H₂O + 0.1 % TFA, solvant B = CH₃CN + 0.1 % TFA. Gradient : 0 % de B pendant 5 min puis 0-70 % de B pendant 65 min.

La protéine CypA est dénaturée dans les milieux acides, c'est pourquoi les conditions de purification sont à ce jour en cours d'optimisation.

Le complexe **F19**/IL-4 S16C est quant à lui en cours de tests de cristallogénèse.

4 Conclusion

L'étude exploratoire envisagée dans ce chapitre a permis d'appréhender des protéines d'intérêt thérapeutique dans le but d'interagir spécifiquement avec un foldamère d'oligoamides aromatiques. La conception a été réalisée *ab initio*, sans s'appuyer sur des épitopes connus de ces protéines. Ce travail collaboratif a permis de produire des mutants protéiques pour investiguer l'interaction avec des foldamères, grâce à la méthode de *tethering*. La stratégie mise en place permet d'obtenir des informations rapidement, sans dégradation des échantillons, à une échelle analytique (une fois les protéines mutées et les foldamères synthétisés) par des techniques de détection telles que le dichroïsme circulaire et la LCMS. Ainsi, nous avons pu détecter 2 composés méritant une étude approfondie : **F19** et **F16**. A ce jour, les études sont encore en cours et nous n'avons pas encore d'information structurale sur ces adduits.

Références bibliographiques

1. Powers, R.; Garrett, D. S.; March, C. J.; Frieden, E. A.; Gronenborn, A. M.; Clore, G. M., Three-dimensional solution structure of human interleukin-4 by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science* **1992**, *256*.
2. (a) LaPorte, S. L.; Joo, Z. S.; Vaclavikova, J.; Colf, L. A.; Qi, X.; Heller, N. M.; Keegan, A. D.; Garcia, K. C., Molecular and Structural Basis of Cytokine Receptor Pleiotropy in the Interleukin-4/13 System. *Cell* **2008**, *132*, 259; (b) Hage, T.; Sebald, W.; Reinemer, P., Crystal Structure of the Interleukin-4/Receptor α Chain Complex Reveals a Mosaic Binding Interface. *Cell* **1999**, *97*, 271.
3. Kraich, M.; Klein, M.; Patiño, E.; Harrer, H.; Nickel, J.; Sebald, W.; Mueller, T. D., A modular interface of IL-4 allows for scalable affinity without affecting specificity for the IL-4 receptor. *BMC Biology* **2006**, *4*, 1.
4. Paul, W. E.; Seder, R. A., Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**, 241.
5. Bankaitis, K. V.; Fingleton, B., Targeting IL4/IL4R for the treatment of epithelial cancer metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* **2015**, *32*, 847.
6. Hart, T. K.; Blackburn, M. N.; Brigham-Burke, M.; Dede, K.; Al-Mahdi, N.; Zia-Amirhosseini, P.; Cook, R. M., Preclinical efficacy and safety of pascolizumab (SB 240683): a humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma. *Clinical & Experimental Immunology* **2002**, *130*, 93.
7. Kakkar, T.; Sung, C.; Gibiansky, L.; Vu, T.; Narayanan, A.; Lin, S.-L.; Vincent, M.; Banfield, C.; Colbert, A.; Hoofring, S.; Starcevic, M.; Ma, P., Population PK and IgE Pharmacodynamic Analysis of a Fully Human Monoclonal Antibody Against IL4 Receptor. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 2530.
8. Domingues, H.; Cregut, D.; Sebald, W.; Oschkinat, H.; Serrano, L., Rational design of a GCN4-derived mimetic of interleukin-4. *Nat Struct Mol Biol* **1999**, *6*, 652.
9. Nigro, P.; Pompilio, G.; Capogrossi, M. C., Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis* **2013**, *4*, e888.
10. Mikol, V.; Kallen, J.; Pflügl, G.; Walkinshaw, M. D., X-ray Structure of a Monomeric Cyclophilin A-Cyclosporin A Crystal Complex at 2.1 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **1993**, *234*, 1119.
11. Naoumov, N. V., Cyclophilin inhibition as potential therapy for liver diseases. *Journal of Hepatology* **2014**, *61*, 1166.
12. Ottiger, M.; Zerbe, O.; Güntert, P.; Wüthrich, K., The NMR solution conformation of unligated human cyclophilin A1. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *272*, 64.
13. (a) Dornan, J.; Taylor, P.; Walkinshaw, M. D., Structures of Immunophilins and their Ligand Complexes. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 1392; (b) Kallen, J.; Spitzfaden, C.; Zurini, M. G. M.; Wider, G.; Widmer, H.; Wüthrich, K.; Walkinshaw, M. D., Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin A determined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Nature* **1991**, *353*, 276.
14. Schlegel, J.; Redzic, J. S.; Porter, C. C.; Yurchenko, V.; Bukrinsky, M.; Labeikovskiy, W.; Armstrong, G. S.; Zhang, F.; Isern, N. G.; DeGregori, J.; Hodges, R.; Eisenmesser, E. Z., Solution Characterization of the Extracellular Region of CD147 and Its Interaction with Its Enzyme Ligand Cyclophilin A. *Journal of Molecular Biology* **2009**, *391*, 518.
15. Spicer, C. D.; Davis, B. G., Selective chemical protein modification. *Nat. Commun.* **2014**, *5*.
16. Stupfel, M. Reconnaissance de surfaces de protéines par des foldamères aromatiques. 2010.
17. Dolain, C.; Jiang, H.; Léger, J.-M.; Guionneau, P.; Huc, I., Chiral Induction in Quinoline-Derived Oligoamide Foldamers: Assignment of Helical Handedness and Role of Steric Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12943.
18. Erlanson, D. A.; Braisted, A. C.; Raphael, D. R.; Randal, M.; Stroud, R. M.; Gordon, E. M.; Wells, J. A., Site-directed ligand discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 9367.
19. Erlanson, D. A.; Wells, J. A.; Braisted, A. C., Tethering: Fragment-Based Drug Discovery. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2004**, *33*, 199.
20. Braisted, A. C.; Oslob, J. D.; Delano, W. L.; Hyde, J.; McDowell, R. S.; Waal, N.; Yu, C.; Arkin, M. R.; Raimundo, B. C., Discovery of a Potent Small Molecule IL-2 Inhibitor through Fragment Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3714.
21. Duppatla, V.; Gjorgjevikj, M.; Schmitz, W.; Kottmair, M.; Mueller, T. D.; Sebald, W., Enzymatic Deglutathionylation to Generate Interleukin-4 Cysteine Muteins with Free Thiol. *Bioconj. Chem.* **2012**, *23*, 1396.
22. Huynh, M.-L.; Russell, P.; Walsh, B., Tryptic Digestion of In-Gel Proteins for Mass Spectrometry Analysis. In *Two-Dimensional Electrophoresis Protocols*, Tyther, R.; Sheehan, D., Eds. Humana Press: Totowa, NJ, 2009; pp 507.
23. Jewginski, M.; Fischer, L.; Colombo, C.; Huc, I.; Mackereth, C. D., Solution Observation of Dimerization and Helix Handedness Induction in a Human Carbonic Anhydrase–Helical Aromatic Amide Foldamer Complex. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 727.

CHAPITRE 5 : Cinétique d'inversion d'hélicité,
introduction de monomères méthyl pyridine au sein
d'une séquence de quinolines

Introduction

La nature s'appuie sur des interactions non covalentes réversibles pour induire des changements conformationnels porteurs d'informations ou fonctions spécifiques. C'est le cas par exemple, de l'hémoglobine. Ce sont des changements conformationnels qui permettent à la protéine de lier ou relâcher le dioxygène pour le transporter dans le sang.¹ Un autre exemple est le cas de la rhodopsine, protéine retrouvée dans les cellules de la rétine. Les photons sont transformés en signaux chimiques par un changement conformationnel de la protéine permettant ainsi aux humains et animaux vertébrés de percevoir la lumière.² Le transport de l'information par des changements conformationnels est un challenge important pour les chimistes.

C'est dans ce cadre que le groupe de J. Clayden a eu l'idée de travailler avec un foldamère possédant un groupe photosensible à une extrémité. Ce dernier est un témoin du changement conformationnel ayant lieu sous action photochimique, le tout au sein d'une bicouche lipidique. L'information du changement d'hélicité est transmise sur plusieurs nanomètres et est détectée par RMN du solide des atomes de fluor.³ (Figure 1)

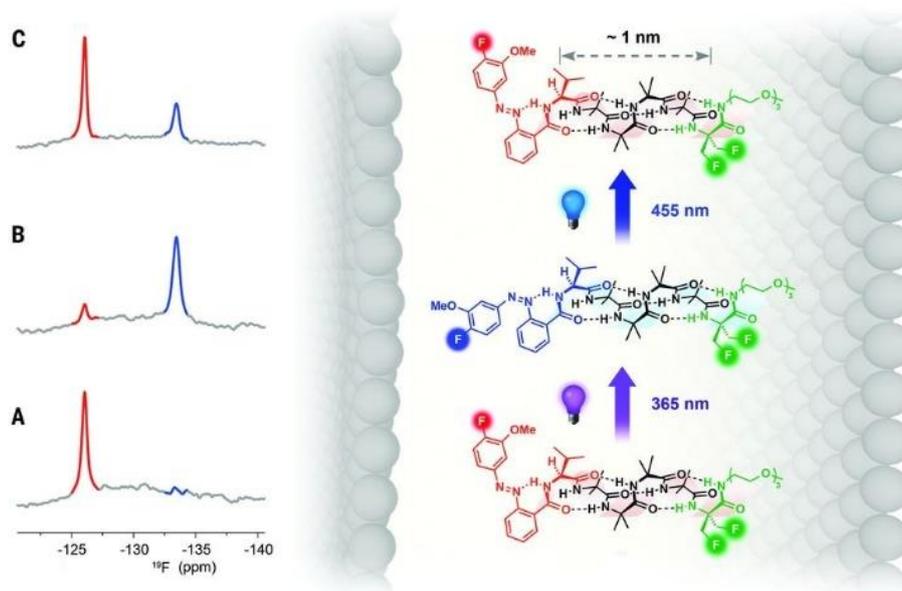


Figure 1. Portion du spectre RMN ¹⁹F du solide de la partie N-terminale du substituant fluoroarène. a) Echantillon équilibré dans le noir E/Z d'azobenzène. b) Irradiation à 365 nm (ratio E/Z, 14/86). c) Irradiation à 455 nm (ratio E/Z, 69/31 E/Z).³

Cette étude permet de mimer, avec une petite molécule, le comportement de protéines de signalisation qui, par un changement conformationnel, transmettent une information généralement au sein de faisceaux d'hélices transmembranaires.

Un autre exemple issu des recherches du groupe de J. Clayden concerne le développement d'un oligomère possédant le 2-pyridylacétamide en position terminale. Ce groupement a la capacité de se lier sélectivement à un acide carboxylique ou phosphorique de façon non covalente par liaison hydrogène. La conséquence étant une induction d'hélicité variant selon l'acide chiral utilisé. Ainsi, c'est une hélice *P* qui est formée par complexation avec l'acide carboxylique choisi et une hélicité *M* avec un acide phosphorique fort (Figure 2).⁴ Comme dans la nature, c'est la compétition entre différents ligands qui induit un changement conformationnel et pourrait donc générer une propriété particulière.

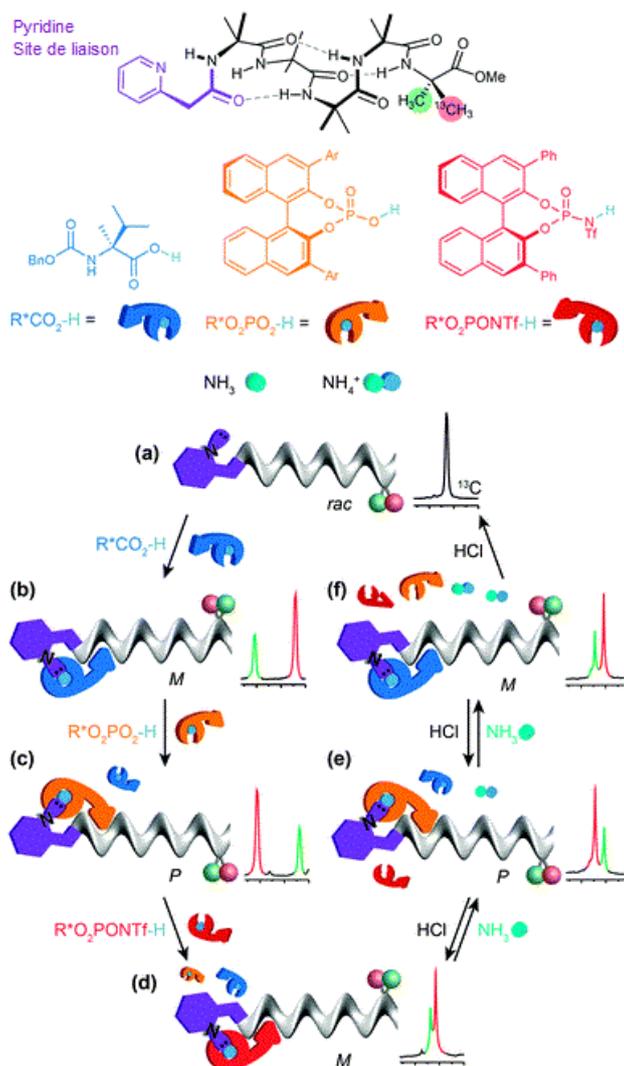


Figure 2. Changement conformationnel d'un foldamère par liaison non covalente.⁵ Liaison hydrogène avec : b) l'acide carboxylique chiral induit une préférence pour la conformation *M* ; c) Conformation *P* préférée avec l'acide phosphorique chiral ; d) Conformation *M* restaurée avec un autre acide phosphorique ; e-f) Utilisation d'ammoniac pour supprimer la liaison hydrogène et retrouver le foldamère sous sa forme native (a).

Dans ce chapitre nous allons nous appuyer sur le changement conformationnel comme rapporteur de l'information. Le chapitre 1 a montré que les foldamères de quinolines possèdent un repliement hélicoïdal particulièrement prédictible et stable dans une large gamme de

solvants. Nous allons nous intéresser à la dynamique des hélices d'oligoamides à travers la cinétique d'inversion d'hélicité. Rappelons que les foldamères étudiés au cours de cette thèse sont destinés à cibler une surface de protéine. Plus la séquence de l'oligomère est longue, plus les chances d'interactions sont accrues car il y a d'autant plus de chaînes latérales protéomimes présentées à la protéine. Or l'équilibre conformationnel est atteint d'autant plus lentement que le foldamère est long. Afin d'augmenter la cinétique d'inversion d'hélicité tout en augmentant la longueur des foldamères, il est donc nécessaire d'introduire une zone de flexibilité au sein des foldamères de quinolines. Nous nous appuyerons sur le phénomène d'induction chirale afin de travailler avec des diastéréoisomères détectables par RMN ou HPLC et la cinétique d'inversion d'hélicité sera suivie par dichroïsme circulaire pour des raisons de praticité.

1 Résultats préliminaires

1.1 Induction de préférence conformationnelle hélicoïdale

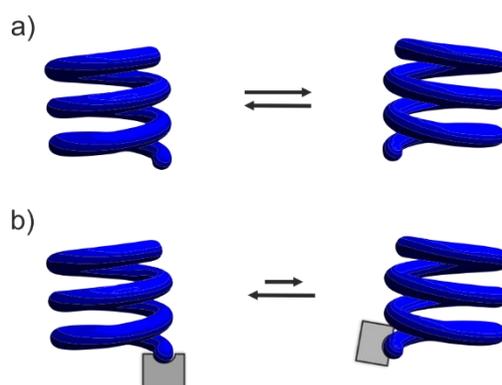


Figure 3. Représentation schématique de l'équilibre entre hélice droite et gauche. a) énantiomères. b) diastéréoisomères.

Les foldamères de quinolines existent sous la forme d'un mélange racémique d'hélices *P* et *M*. Pour induire une préférence d'hélicité, il est possible d'ajouter un centre chiral à une extrémité du foldamère,⁶ au sein d'une chaîne latérale,⁷ de jouer sur la liaison à une molécule invitée.⁸

Pour maintenir l'information chirale sur tout le brin, il n'est pas nécessaire d'introduire un groupement chiral sur chaque unité, mais un point stratégique est suffisant. Il est ainsi possible d'ajouter un centre asymétrique dans une séquence de foldamère avec par exemple l'ajout d'un acide aminé naturel *L* qui induit un sens d'hélicité préférentiel. Ainsi, les hélices droite et gauche ne sont plus énantiomères mais diastéréoisomères (P^L et M^L) et sont donc visualisables par les méthodes classiques d'analyse HPLC ou RMN.

1.2 Inversion d'hélicité

Pour inverser le sens d'hélicité, le foldamère doit passer par un état déplié (partiellement). L'inversion d'hélicité ne peut en effet avoir lieu qu'après rupture de liaisons hydrogène autour de la liaison aryl-amide. Le groupe a montré que le foldamère ne passe pas par un état complètement déplié : des calculs de mécanique moléculaire indiquent qu'une rotation de 180° autour de la liaison aryl-amide crée un centre d'inversion local qui va se propager le long du foldamère.⁹ De récentes études de modélisation moléculaire ont confirmé ce résultat.¹⁰ L'inversion commence au second résidu (ou avant-dernier). L'intermédiaire possédant une seule liaison aryl-aryl dépliée va propager l'information de l'inversion. L'enroulement de cette partie du foldamère vers l'hélicité opposée est simultané au déroulement de la liaison aryl-amide suivante.¹⁰ Ceci montre un effet communicatif d'un phénomène partant de l'extrémité du foldamère et se propageant le long du squelette de l'oligomère.

1.3 Vitesse d'inversion d'hélicité dans les foldamères de quinolines

S. Dawson, ancien post doctorant du groupe a synthétisé le composé **66** et réalisé la séparation des diastéréoisomères P^L et M^L par HPLC en phase inverse. Le suivi HPLC et CD a montré l'absence de racémisation mesurable dans l'eau sur une longue période (un an), démontrant une cinétique d'inversion de cet octamère extrêmement lente en conditions aqueuses. De manière générale, la vitesse d'inversion d'hélicité diminue quand la longueur du foldamère de quinolines augmente.⁹

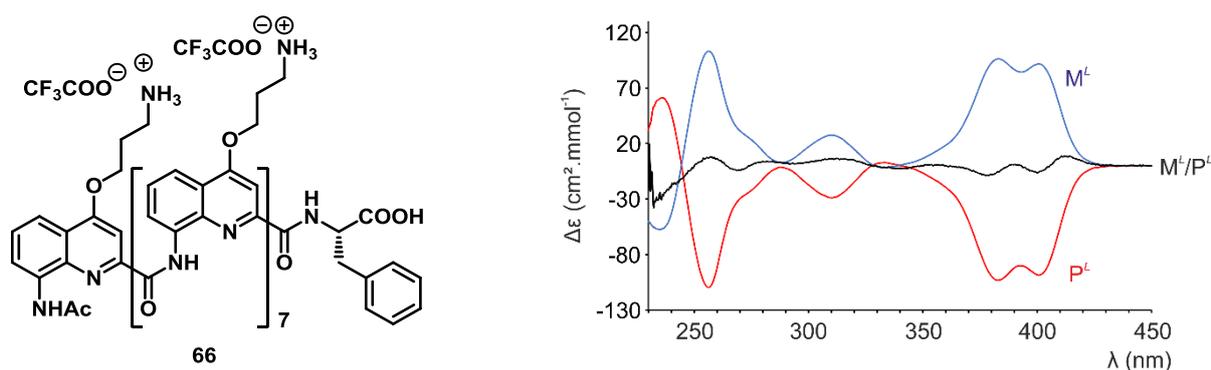


Figure 4. Spectres CD des diastéréoisomères P et M **66** séparés dans l'eau, à 22 °C.

En effet, C. Colombo (précédente post-doctorante du groupe) a montré qu'à l'inverse, il faut environ 24 h pour qu'un tétramère soit à l'équilibre complet, de 48 à 72 h pour un pentamère et à partir d'un hexamère les temps deviennent beaucoup trop longs pour être visualisables. L'intérêt de ces longs foldamères est moindre dans le cadre de notre méthode de

screening par dichroïsme circulaire : il faudrait attendre trop longtemps pour atteindre l'équilibre conformationnel.¹¹ C'est la raison pour laquelle les foldamères étudiés dans les chapitres 3 et 4 ont une taille maximale limitée à 5 monomères quinoline. Or rappelons que pour interagir avec une surface de protéine il est avantageux de travailler avec des foldamères possédant un grand nombre de chaînes latérales protéomimes, ce qui signifie concevoir de longs foldamères. Il faut donc introduire une zone de flexibilité.

1.4 Le monomère aminométhyl pyridine (P)

Des études préliminaires du groupe proposent l'incorporation de résidus aminométhyl pyridine dans une séquence de quinolines.^{6c, 12} Un degré de liberté est ajouté par rapport à la quinoline car une rotation supplémentaire est permise grâce au groupement méthylène de la pyridine. Cette flexibilité est telle qu'un oligomère constitué d'aminométhyl pyridines uniquement ne montre pas de signe de repliement stable.¹³ (Figure 5)

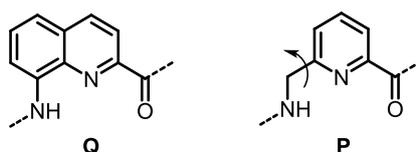


Figure 5. Comparaison des monomères quinoline Q et aminométhyl pyridine P. La flèche indique la rotation supplémentaire permise dans P.

Toutefois, l'introduction de quelques monomères P au sein d'une séquence de quinolines n'empêche pas le repliement hélicoïdal dicté par les monomères Q.^{12, 14} Ainsi, l'aminométhyl pyridine introduite de façon stratégique permet d'apporter de la flexibilité pour influencer sur la cinétique d'inversion d'hélicité.

2 Conception

L'étude menée dans ce chapitre vise à apporter des éléments de réponses aux questions suivantes : comment introduire de la flexibilité au sein de nos foldamères pour bénéficier d'une inversion d'hélicité la plus rapide possible dans l'eau ? Où faut-il placer les monomères P dans la séquence ? Et enfin, peut-on envisager l'introduction de plusieurs monomères P consécutifs sans modifier le caractère hélicoïdal du foldamère ?

Un oligomère de quinolines replié en hélice présente 2,5 résidus par tour : il peut donc être envisagé comme une étoile à 5 branches.¹⁵ (Figure 6) Pour définir où positionner les P dans la

séquence, il faut prendre en compte le fait que ce monomère ne porte pas de chaîne latérale et n'entre donc pas – *a priori* – en jeu pour l'interaction avec une protéine. Un *design* où les chaînes latérales protéomimes se retrouvent sur une même face de l'oligomère et sont en nombre majoritaire a été privilégié. Ceci implique que la séquence du foldamère ne doit pas contenir plus de 2/5 (40 %) d'aminométhyl pyridines (par rapport au nombre total de monomères inclus dans la séquence).

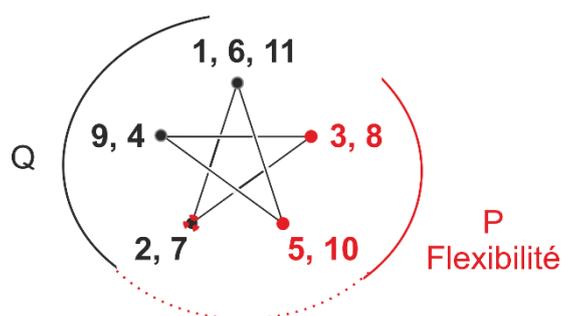


Figure 6. Représentation en étoile d'un foldamère hélicoïdal à 2,5 résidus par tour.

Pour l'induction d'hélicité, l'extrémité C-terminale a été choisie pour accrocher la L-phénylalanine. La position N-terminale reste ainsi libre pour l'introduction d'un ligand de protéine. L'extrémité C-terminale du foldamère doit coder deux informations : le repliement hélicoïdal et l'induction d'hélicité. La L-phénylalanine a été choisie car, outre le fait qu'elle peut être introduite facilement par SPS, des études précédentes montrent que c'est un inducteur fort dans le DMSO,¹⁶ l'induction d'hélicité devrait être similaire dans l'eau.

Les foldamères hélicoïdaux de quinolines étant formés de 2,5 résidus par tour, trois quinolines suffisent à former un tour d'hélice, (Figure 7, a) ce qui est également le cas de la séquence PQQ. (Figure 7, b)

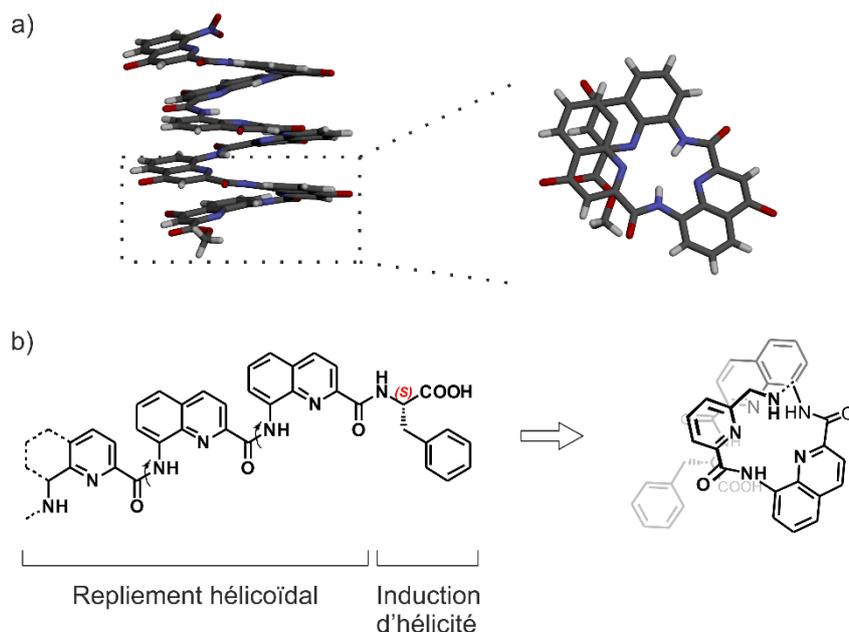


Figure 7. a) Structure cristallographique d'un octamère de quinolines. Les chaînes latérales ont été supprimées par souci de clarté. Zoom sur les trois premières quinolines de la séquence : on note la formation d'un tour d'hélice. b) Représentation de la séquence PQQ-Phe et de son repliement hélicoïdal.

Travailler avec des « blocs de trimères » de type PQQ permet d'assurer une cinétique d'inversion rapide puisque qu'à partir d'un tétramère (QQQQ ou PQQQ), la cinétique diminuerait considérablement. C'est pourquoi la séquence de foldamère ne contient pas plus de deux quinolines consécutives. Deux familles ont ainsi été conçues de sorte que les aminométhyl pyridines occupent 2/5 de la séquence de foldamère (Figure 8). Les familles sont construites en démarrant par un bloc commun QPQQ-Phe avec l'hypothèse que l'amplitude de l'induction d'hélicité ne devrait pas être dépendante de la famille étudiée.

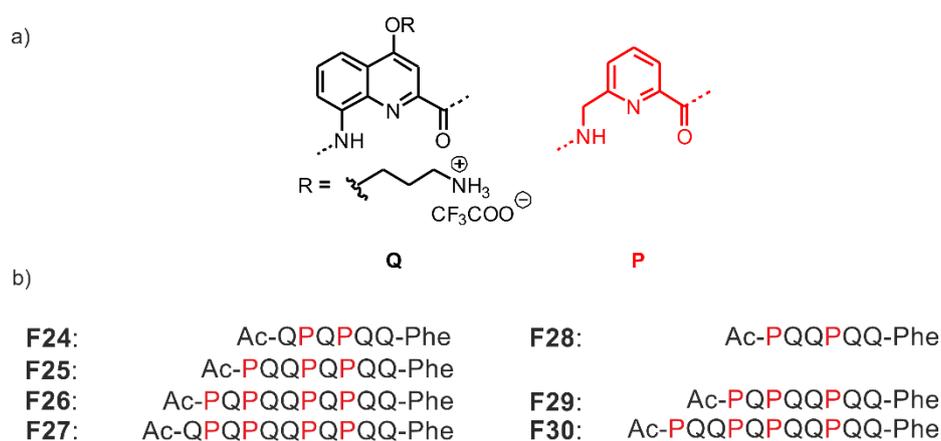


Figure 8. a) Représentation des monomères. b) Conception des deux familles de foldamères.

Afin de favoriser la solubilité du foldamère en milieu aqueux, le monomère quinoline portant une chaîne latérale de type ornithine a été choisi. Pour simplifier la synthèse, le

monomère *P* ne possède pas de chaîne latérale. L'introduction de la diversité en position 4 du cycle est cependant en cours d'élaboration dans le groupe.

La stratégie de l'étude consiste à synthétiser les foldamères présentés en figure 8 et à suivre leur cinétique d'inversion d'hélicité par dichroïsme circulaire.

3 Synthèse

3.1 Le monomère aminométhyl pyridine P

La synthèse débute par une étape clé: la dessymétrisation du diméthylpyridine-2,6-dicarboxylate commercial par une monoréduction grâce au tétrahydroborate de sodium. L'intermédiaire bromé est ensuite obtenu grâce à une réaction d'Appel. Puis la substitution nucléophile du brome par l'azoture de sodium permet d'obtenir le composé **68**. Ensuite, deux voies de synthèse ont été envisagées. La première proposée consistait en la saponification de l'ester du composé **68** puis réduction de l'azoture en amine pour conduire au produit **70**. A ce stade, des problèmes de solubilité ont été rencontrés et **70** a été perdu sur la Celite®. (Schéma 1)

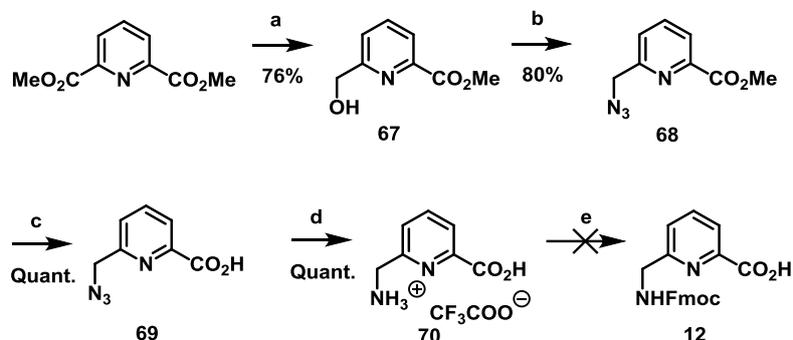


Schéma 1. Première voie de synthèse de **12**. a) NaBH₄, DCM/MeOH, 0 °C à t.a. ; b) 1. PPh₃, CBr₄, DMF 2. NaN₃, t.a. ; c) LiOH.H₂O, THF, t.a. ; d) H₂, Pd/C, THF, t.a. ; e) FmocOSu, NaHCO₃ aq., dioxane/H₂O, t.a..

La deuxième voie de synthèse adoptée par la suite est une réduction/protection one-pot de l'azoture en amine protégée par un groupement boc. L'ester de méthyle est ensuite saponifié, le groupement boc déprotégé et le groupement fmoc est finalement installé sur l'acide aminé résultant. Le composé **12** est obtenu avec un rendement global de 29 % en 6 étapes. La pureté du produit final, cruciale pour un monomère destiné à la SPS, a été validée par HPLC (> 97 %).

Les foldamères sont préparés par synthèse sur support solide assistée par micro-ondes. Une première étape consiste à fonctionnaliser la résine Wang à faible *loading* (0.38 mmol.g⁻¹) avec la L-phénylalanine protégée (Fmoc-Phe-OH).¹⁷ Le groupement Fmoc est ensuite déprotégé à l'aide d'une solution de pipéridine dans le DMF (20 % v/v). Le premier monomère quinoline est couplé après avoir été activé sous forme de chlorure d'acide à l'aide du réactif de Ghosez. Un test de Kaiser permet de vérifier que le couplage est intégral.¹⁸ Ce test est spécifique aux amines aliphatiques et renseigne sur la présence ou non d'amine primaire. Si la ninhydrine contenue dans le test réagit avec une amine primaire, la résine prend une couleur bleue intense.

Le couplage d'une quinoline ou d'une aminométhyl pyridine à une autre quinoline est réalisé de la même manière, par activation préalable au réactif de Ghosez. L'aminométhyl pyridine doit être sous forme de chlorure de pyridinium pour former un chlorure d'acide stable grâce au réactif de Ghosez. Le couplage à une aminométhyl pyridine est réalisé par une méthode plus douce employant HOBt/HBTU, conditions classiques pour des amines aliphatiques. Ces étapes sont répétées autant de fois que nécessaire pour allonger la séquence du foldamère. La partie *N*-terminale est finalement acétylée par une méthode douce utilisant l'anhydride acétique si c'est une amine aliphatique et à l'aide du chlorure d'acétyle et micro-ondes pour l'amine aromatique. La dernière étape consiste à déprotéger les chaînes latérales et à cliver le foldamère de la résine par l'action du TFA. Une purification par HPLC semi-préparative permet d'accéder à l'oligomère avec un haut niveau de pureté.

4 Etude de la cinétique d'inversion d'hélicité des foldamères PQ

4.1 Détermination de la concentration des échantillons

Cette étude se base sur le dichroïsme circulaire pour suivre l'évolution de l'hélicité au cours du temps. Or, l'ellipticité θ est proportionnelle à la concentration de l'échantillon. Pour comparer les inductions d'hélicité des différents foldamères par CD, il est donc nécessaire de disposer d'un moyen pour mesurer précisément la concentration des échantillons. Les foldamères pouvant être hygroscopiques, ils ne permettent pas d'envisager la pesée pour préparer des échantillons de concentration précise. Le coefficient d'extinction molaire a été déterminé pour accéder à la concentration *via* la spectroscopie d'absorption UV. En effet, la loi de Beer Lambert indique que :

$$A = \epsilon.l.c$$

(où A = absorbance, ϵ = coefficient d'absorption molaire en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$, l = largeur de cuve en cm, c = concentration de la solution en $mol \cdot L^{-1}$)

Afin de s'assurer d'être en dehors de la longueur d'onde d'absorbance de l'aminométhyl pyridine, les mesures sont effectuées à 375 nm, ce qui correspond aussi à un maximum local d'absorbance pour un foldamère de quinolines.¹⁹ Ainsi, l'absorbance observée est proportionnelle au nombre de quinolines, les aminométhyl pyridines n'absorbant pas à 375 nm.

4.1.1 Détermination du coefficient d'extinction molaire ϵ par quinoline

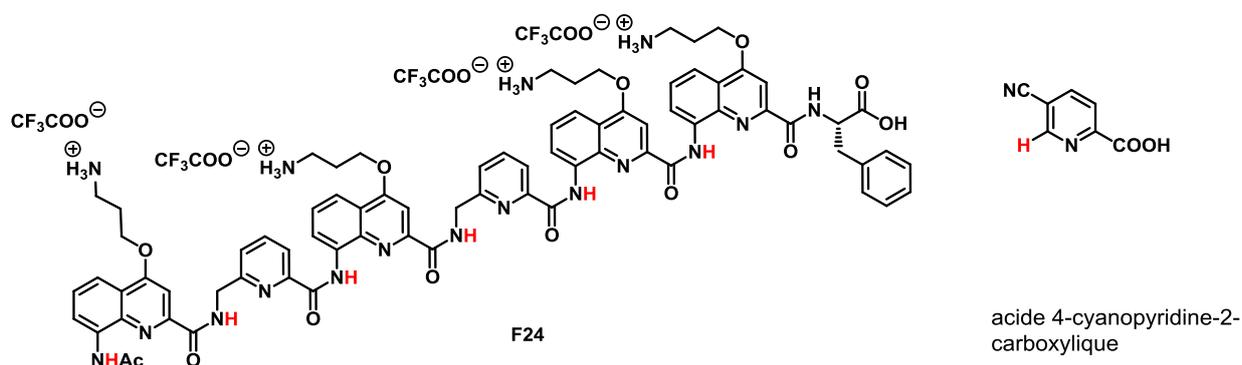


Figure 9. Représentation des composés modèles. Les protons d'intérêt pour l'étude RMN sont mis en évidence en rouge.

Pour déterminer la concentration d'un échantillon à partir de son absorbance, il faut connaître la valeur du coefficient d'extinction molaire de la molécule. Le composé **F24** a été choisi comme foldamère modèle qui servira à réaliser plusieurs solutions étalon pour déduire le coefficient d'extinction molaire. La spectroscopie RMN est utilisée pour déterminer la composition exacte de la solution mère.

L'acide 4-cyanopyridine-2-carboxylique est choisi comme étalon interne pour déterminer la concentration exacte de **F24** par RMN du proton. Si la concentration de l'acide 4-cyanopyridine-2-carboxylique est connue précisément (dilutions successives d'une solution concentrée préparée par pesée d'une « grande » quantité de **F24**), la comparaison de l'intégration du signal d'un proton caractéristique de cet étalon à celle des signaux des NH d'amide de **F24** permet de retrouver la concentration de **F24**. L'acide 4-cyanopyridine-2-carboxylique a été choisi car il présente en RMN du proton un signal à 9.1 ppm isolé par rapport à ceux des foldamères PQ.

4.1.1.1 Détermination du $d1$ optimal

Avant de réaliser toute expérience RMN, il faut s'assurer que les protons d'intérêt ont totalement relaxé pour les comparer quantitativement entre eux. Il faut que l'aimantation des noyaux soit de retour à l'équilibre entre 2 scans, c'est le réglage du délai de relaxation $d1$. Il dépend fortement de l'environnement chimique de la molécule. Des spectres RMN de l'acide 4-cyanopyridine-2-carboxylique sont mesurés avec $d1$ croissant (Figure 10). On peut considérer qu'un noyau a totalement relaxé lorsque l'augmentation du $d1$ ne change plus l'intensité du signal. La figure 10 montre qu'en choisissant $d1 = 20$ s tous les protons d'intérêt ont relaxé et sont quantitativement comparables entre eux.

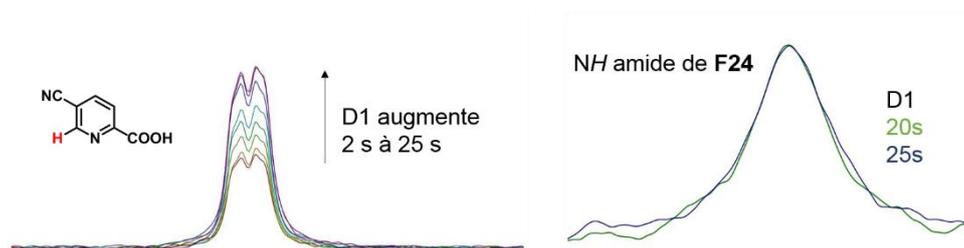


Figure 10. Détermination du $d1$ optimal (i) zoom sur le signal de l'acide 4-cyanopyridine-2-carboxylique à 9.1 ppm. Superposition des spectres RMN pour $d1 = 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20$ et 25 s. Pour que le signal soit complètement relaxé, il faut choisir $d1 = 20$ ou 25 s. (ii) zoom sur le signal d'amide de **F24** à 11.5 ppm. Avec $d1 = 20$ s, le signal est totalement relaxé.

4.1.1.2 Etalon interne

Le composé **F24** a été dissout dans le DMSO- d_6 pour une concentration finale de 2 mM environ, auquel a été ajouté l'acide 4-cyanopyridine-2-carboxylique de telle manière à ce qu'il ait une concentration exacte finale de 2 mM dans le tube RMN. La concentration de **F24** a alors pu être déterminée en comparant les intégrations des signaux d'amide de **F24** et de l'acide carboxylique. (Figure 11)

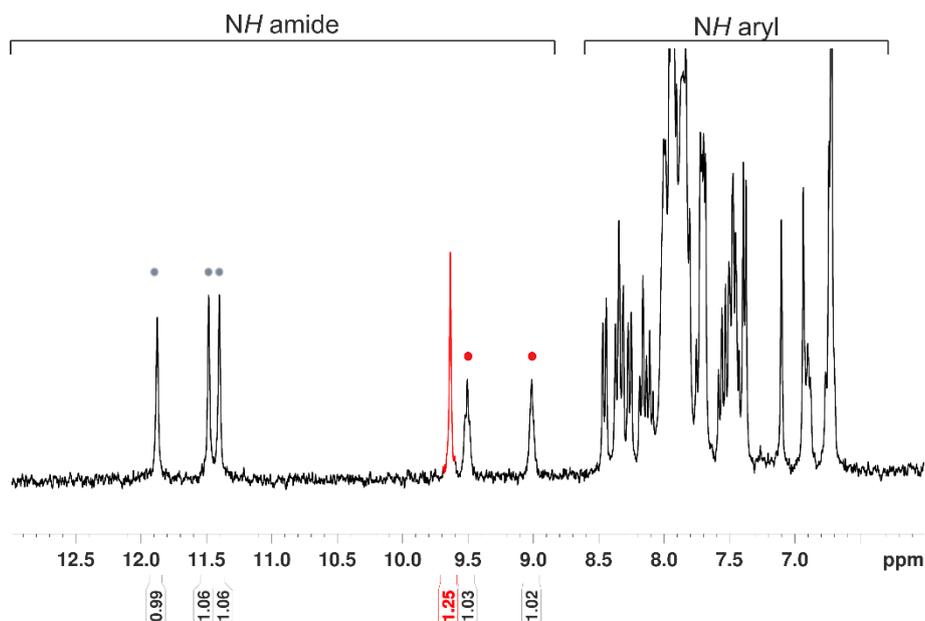


Figure 11. Spectre RMN ^1H du composé **F24** et de l'acide 4-cyanopyridine-2-carboxylique (signal caractéristique en rouge) à 2 mM dans le DMSO- d_6 . Une moyenne des signaux intégrant pour les fonctions amides du foldamère (ronds gris pour les amides de quinolines, et rouges pour ceux des aminométhyl pyridines) a été utilisée pour obtenir la concentration de **F24**.

La solution mère de **F24** dont la concentration exacte est maintenant connue a pu être utilisée pour préparer une série de solutions filles diluées.

4.1.2 Courbe d'étalonnage UV

L'échantillon de **F24** est dilué en série avec du DMSO et l'absorbance UV est mesurée à 375 nm à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop. Les données sont utilisées pour générer une courbe d'étalonnage (Figure 12), permettant d'extraire le coefficient d'extinction de **F24** à 375 nm. Ainsi, $\epsilon = 21371 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Puisque ce foldamère possède 4 quinolines, on a $\epsilon/Q = 5340 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

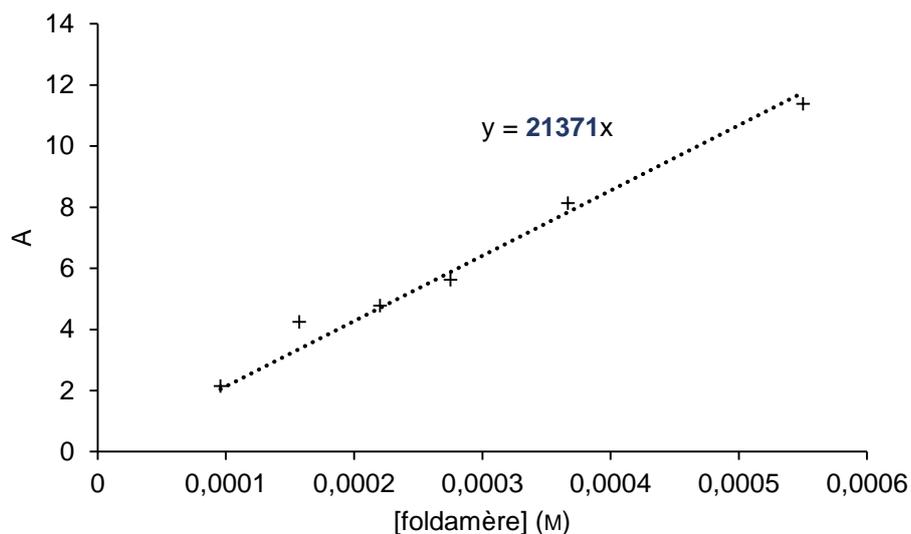


Figure 12. Courbe d'étalonnage $A = f(c)$ donnant le coefficient d'extinction de **F24** à 375 nm $5340 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{Q}^{-1}$.

Cette valeur permet de préparer des échantillons des foldamères **F24** à **F30** dans le DMSO dont la concentration est mesurée par absorbance à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop.

4.2 Induction d'hélicité dans différents solvants

Des études précédemment menées par le groupe ont montré que l'induction d'hélicité dépend du solvant utilisé.²⁰ Pour suivre la cinétique d'inversion d'hélicité, une condition A doit être trouvée, pour laquelle le foldamère est dans un certain équilibre conformationnel et une autre condition B où il adopte un équilibre conformationnel différent. Les équilibres conformationnels des conditions A et B doivent être suffisamment différents pour être distinguables qualitativement par dichroïsme circulaire.

Le composé modèle **74** a ainsi été incubé dans différents solvants et le signal CD a été mesuré une fois l'équilibre atteint (Figure 13).

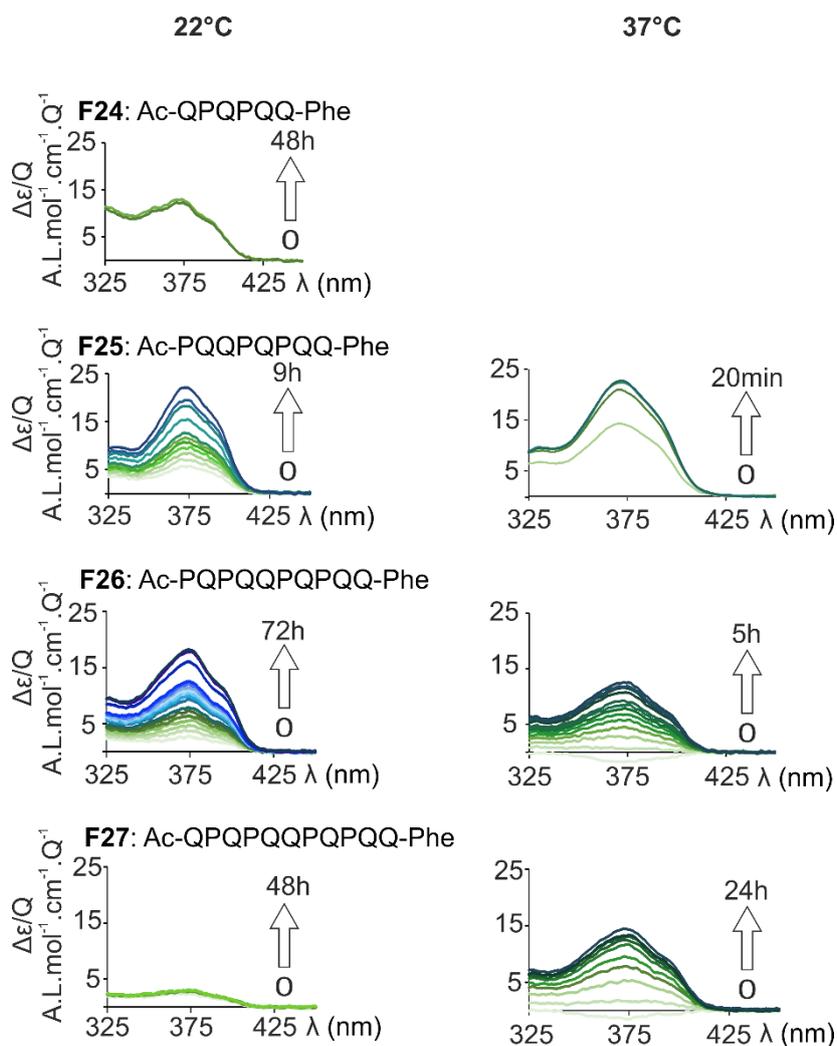


Figure 14. Evolution au cours du temps des spectres CD des composés **F24** à **F27** de la famille 1 à 22 °C (à gauche) et 37 °C (à droite) après avoir subi le traitement suivant : (i) Incubation dans le TFA (30 min). (ii) Evaporation du TFA puis ajout de tampon H₂O + 12.5 mM NH₄OAc pH = 7.2 tel que c = 35 μM.

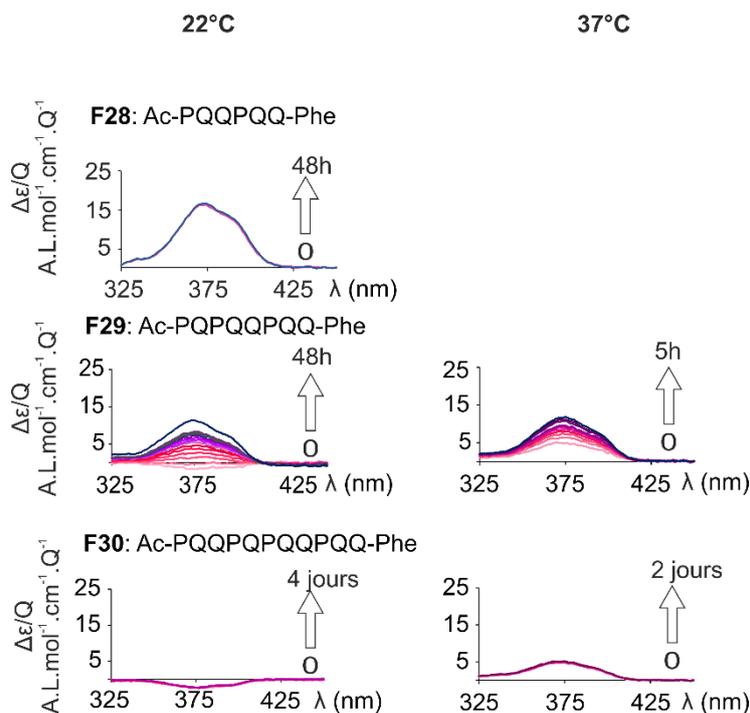


Figure 15. Evolution au cours du temps des spectres CD des composés **F28** à **F30** de la famille 2 à 22°C (à gauche) et 37 °C (à droite) après avoir subi le traitement suivant : (i) Incubation dans le TFA (30 min). (ii) Evaporation du TFA puis ajout de tampon H₂O + 12.5 mM NH₄OAc pH = 7.2 tel que c = 35 μM .

L'observation des spectres de dichroïsme circulaire permet de confirmer qu'il y a bien induction de chiralité par la L-phénylalanine (Figures 14, 15) dans l'eau quelle que soit la température. Lorsque l'équilibre est atteint, tous les composés présentent un maximum vers 375 nm, ce qui confirme le repliement hélicoïdal pour ces séquences. On note également un épaulement vers 400 nm constant. C'est la forme hélicoïdale *P* qui est préférée, ce qui est cohérent avec l'induction d'hélicité droite par un acide aminé L.^{6c}

Le spectre du composé **F30** à 22°C montre un signal CD négatif : l'équilibre n'est pas atteint sur la durée de la mesure. Les composés **F24** et **F28** sont à l'équilibre instantanément. Au contraire, les composés **F27** (à 22 °C) et **F30** (aux deux températures) ne sont pas à l'équilibre et l'échange *P/M* semble particulièrement lent. De manière générale, l'augmentation de la cinétique d'inversion est liée à l'augmentation de température.

4.3.1.2 RMN

Les spectres RMN de certains composés ont été mesurés dans l'eau tamponnée après avoir été incubé dans le TFA (Figures 16 et 17).

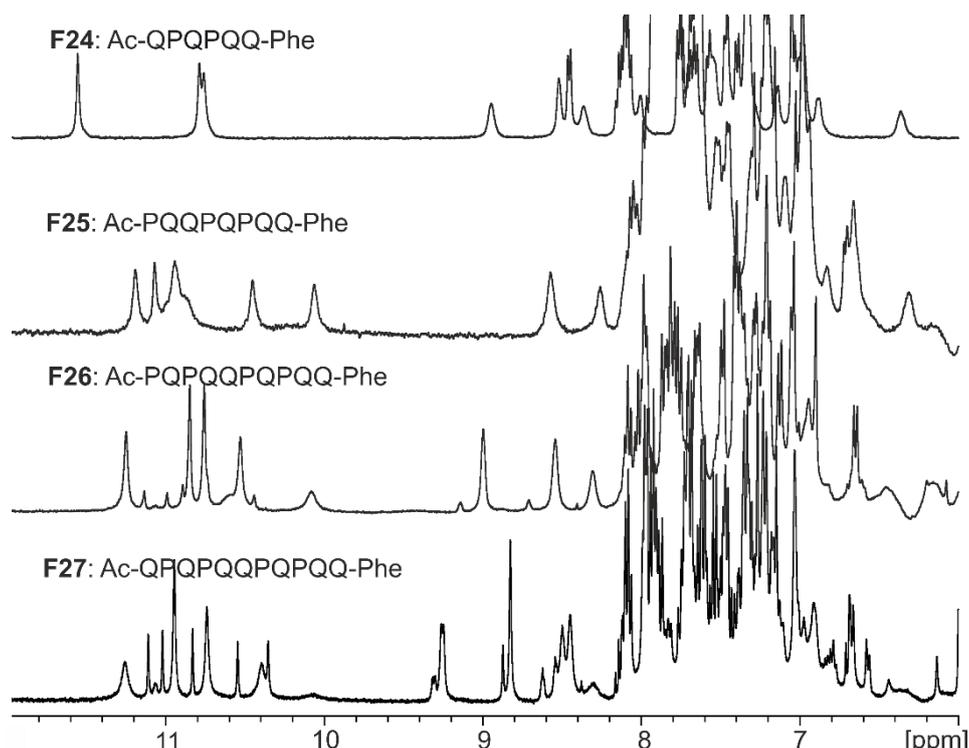


Figure 16. Spectres RMN à 22 °C des composés de la famille 1 à l'équilibre dans H₂O + 12.5 mM NH₄OAc (pH = 7.2)/D₂O (9/1). Zoom sur la région aromatique, NH amide.

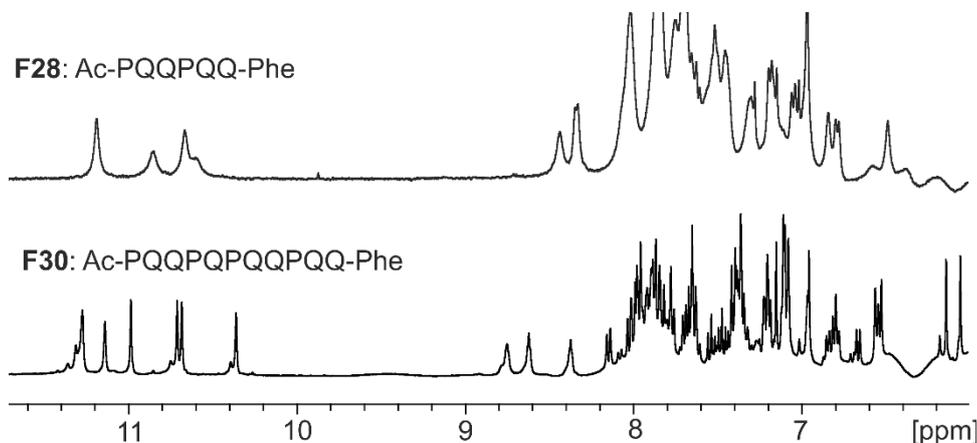


Figure 17. Spectres RMN à 22 °C des composés de la famille 2 après 48 h dans H₂O + 12.5 mM NH₄OAc (pH = 7.2)/D₂O (9/1). Zoom sur la région aromatique, NH amide.

Tous les spectres RMN de ces espèces dans l'eau montrent des signaux fins répartis sur une large gamme de déplacements chimiques malgré la nature répétitive des séquences, ce qui est en adéquation avec un repliement organisé, de type hélicoïdal. De la même manière, le déblindage des signaux d'amide entre 10 et 12 ppm est caractéristique des interactions hydrogène mises en jeu dans le repliement hélicoïdal de ces foldamères. Nous nous sommes concentrés sur ces signaux caractéristiques car le reste des spectres est difficile à interpréter. De façon générale, les signaux d'amide de quinolines sont bien distincts et déblindés par rapport à

ceux des aminométhyl pyridines qui se rapprochent de la région des aromatiques. Pour les spectres des composés **F26**, **F27**, **F30** deux espèces sont visibles.

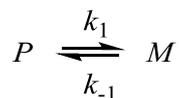
4.3.2 Comparaison des spectres CD et RMN

Les composés **F24** et **F28** atteignent leur équilibre instantanément et ne présentent qu'une seule espèce en RMN, ce qui n'est pas cohérent avec le choix de la L-phénylalanine comme inducteur chiral faible. Les hélices *P* et *M* seraient donc en échange rapide à l'échelle de la RMN pour ces composés. Ceci ne serait plus le cas pour les composés **F26**, **F27**, **F30** pour lesquelles deux espèces sont visibles sur le spectre RMN à l'équilibre.

4.3.3 Détermination des constantes de vitesse et des temps de demi-vie

Les mesures CD consistent à étudier la cinétique d'inversion de la conformation *M* vers la forme majoritaire *P*. La réaction est monomoléculaire, de cinétique d'ordre 1. Or, une réaction d'ordre 1 se caractérise par une loi de vitesse de la forme suivante :

(où $[M]$ = concentration de la conformation *M* au temps *t* et $[M]_0$ représente cette concentration à l'état initial)



$$v = k_1 [M] = - \frac{d[M]}{dt} \quad (\text{équation 1})$$

Soit par intégration entre le temps initial et l'instant actuel,

$$\ln [M] = - k_1 t + \ln [M]_0 \leftrightarrow \ln \frac{[M]}{[M]_0} = - k_1 t \quad (\text{équation 2})$$

Le temps de demi-vie étant la durée au bout de laquelle on atteint la moitié du maximum de signal correspondant à l'équilibre, on a, $[M] = [M]_0/2$ d'où :

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_1}$$

Pour accéder à k_1 et $t_{1/2}$, il suffit de suivre le signal CD à une longueur d'onde donnée. Les valeurs ont été relevées à 375 nm. L'équation 2 montre que la pente de la courbe $\ln(1 - \theta/\theta_{lim}) = f(t)$ (Figure 18) permet de déterminer la constante de vitesse et donc le temps de demi-vie. Les données sont rassemblées dans le tableau 1.

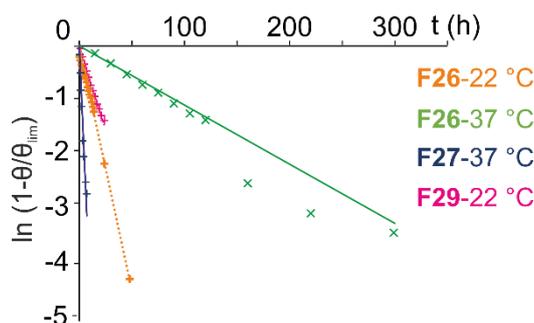


Figure 18. Courbes $\ln(1-\theta/\theta_{lim}) = f(t)$ pour les composés **F26** et **F29** à 22°C et **F26**, **F27** à 37°C.

Tableau 1. Constante de vitesse et temps de demi-vie pour les foldamères **F24** à **F30**. [r] = équilibre atteint trop rapidement, [s] = composé cinétiquement stable.

			n (Q)	n (P)	T (°C)	k_1 (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
Famille 1	F24	Ac-QQPQQQ-Phe	4	2	22/37	[r]	[r]
	F25	Ac-PQQPQQQ-Phe	5	3	22/37	[r]	[r]
	F26	Ac-PQPQQPQQQ-Phe	6	4	22	$8.9 \cdot 10^{-2}$	7.8
					37	$6.5 \cdot 10^{-1}$	1.1
F27	Ac-QQPQQPQQQ-Phe	7	4	22	[s]	[s]	
				37	$6.7 \cdot 10^{-1}$	1.3	
Famille 2	F28	Ac-PQQPQQ-Phe	4	2	22/37	[r]	[r]
	F29	Ac-PQPQQPQQQ-Phe	5	3	22	$6.0 \cdot 10^{-2}$	11.5
					37	[r]	[r]
	F30	Ac-PQQPQQPQQQ-Phe	7	4	22/37	[s]	[s]

L'étude des données présentées dans le tableau 1 montre qu'à longueur de séquence égale, la cinétique d'inversion d'hélicité est plus rapide pour la famille 1, ce qui indique que cette dernière est plus flexible. C'est pourquoi l'élongation de cette famille a été explorée tout en rajoutant de la flexibilité par l'introduction de deux monomères P consécutifs au centre de la séquence.

4.4 Séquences contenant deux monomères P consécutifs

Pour cela les composés **F31** et **32** ont été synthétisés. (Figure 19)



Figure 19. Séquences contenant deux monomères P consécutifs

Leurs spectres CD et RMN sont présentés en figures 20 et 21 et les résultats de la détermination de k_1 et $t_{1/2}$ par extrapolation des valeurs de l'ellipticité molaire à 375 nm sont résumés dans le tableau 2.

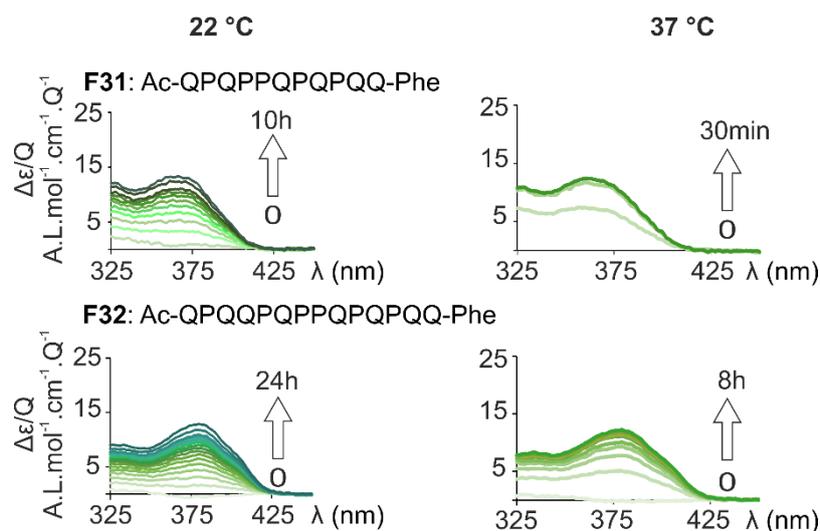


Figure 20. Evolution au cours du temps des spectres CD à 22 °C (à gauche) et 37 °C (à droite) des composés **F31** et **F32** après avoir subi le traitement suivant : (i) Incubation dans le TFA (30 min). (ii) Evaporation du TFA puis ajout de tampon H₂O + 12.5 mM NH₄OAc pH = 7.2 tel que c = 35 μM.

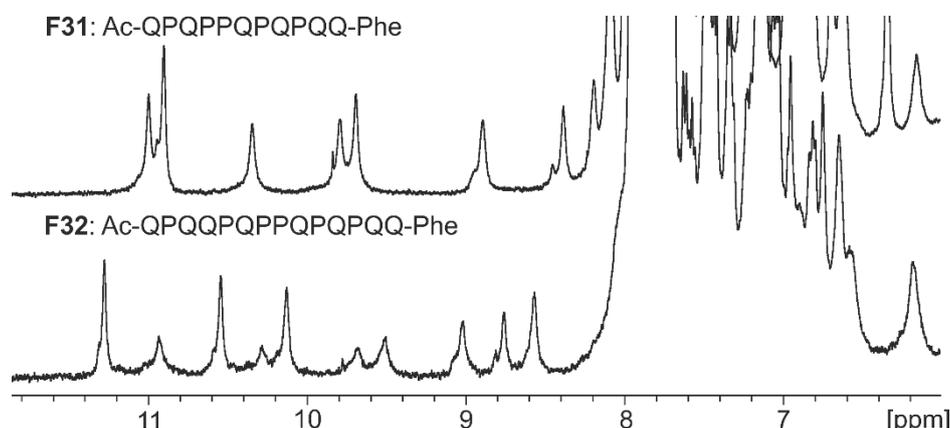


Figure 21. Spectres RMN à 22 °C des composés **F31** et **F32** à l'équilibre dans H₂O + 12.5 mM NH₄OAc (pH = 7.2)/D₂O (9/1). Zoom sur la région aromatique, NH amide.

Tableau 2. Constante de vitesse et temps de demi-vie pour les foldamères **F31** et **F32**. [r] = équilibre atteint trop rapidement, [s] = composé cinétiquement stable.

		n (Q)	n (P)	T (°C)	k ₁ (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)
F31	Ac-QPQPPQPQPQQ-Phe	6	5	22	4.6.10 ⁻¹	1.5
				37	[r]	[r]
F32	Ac-QPQQPQPPQPQPQQ-Phe	8	6	22	1.3.10 ⁻¹	5.4
				37	1.9	0.4

En comparant ces données aux valeurs précédentes, on constate qu'à longueur de séquence égale, le composé **F31** atteint l'équilibre 5 fois plus rapidement que le composé **F26**. La présence deux résidus P consécutifs en milieu de séquence rajoute donc considérablement de la flexibilité. Ce qui est également montré par les résultats obtenus pour le 14-mer **F32**, dont

les valeurs k_1 et $t_{1/2}$ peuvent être calculées (à 22 °C comme à 37 °C) ce qui n'était pas le cas pour le plus long foldamère de la famille 1 (**F27**, 11-mer).

4.5 Vers la reconnaissance de surfaces de protéines

Afin d'appliquer l'introduction de la flexibilité au sein d'un foldamère protéomime dans le but de reconnaître des surfaces de protéines, le composé **F33** a été synthétisé. Celui-ci a été conçu pour interagir avec HCA en s'inspirant du plus long foldamère **F27** de la famille 1, car il présente une cinétique d'inversion rapide. La séquence se base sur le foldamère modèle **F1** (Chapitre 3). Les quinolines additionnelles ont été choisies avec des chaînes latérales mimant l'acide aspartique pour des questions de solubilité en milieu aqueux et de cristallogénèse. Cependant, aucune induction d'hélicité n'a été observée lorsque le foldamère a été accroché à la protéine, que ce soit à 22 °C ou 37 °C et ce, même après 14 jours d'incubation (Figure 22). Ce résultat semble montrer que cette séquence ne présente pas d'interaction particulière avec la surface de la protéine HCA, ou alors qu'il n'y a pas de discrimination entre les hélices *P* et *M*. Aucune tentative de cocristallisation de ce composé avec HCA n'a été réalisée.

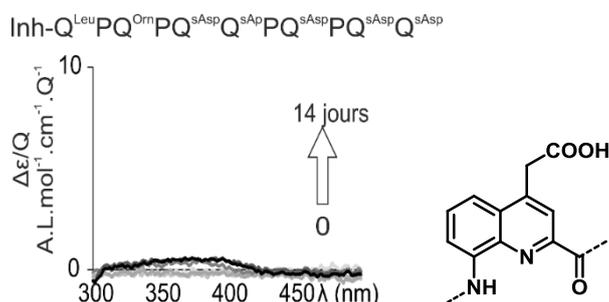


Figure 22. Spectres CD du composé **F33**. 35 μM HCA II + 1,3 equiv. **F33** + 3 % DMSO dans 50 mM NaH_2PO_4 . Résultats mesurés entre le temps initial et 14 jours d'incubation. Même après augmentation de la température à 37 °C, les signaux CD restent inchangés.

Conclusion

L'étude menée dans ce chapitre a permis de confirmer que l'introduction d'un monomère aminométhyl pyridine au sein d'une séquence de quinolines permet d'apporter de la flexibilité dans l'eau et ne s'oppose pas à un repliement hélicoïdal des foldamères. En vue d'interagir avec une protéine, les séquences nécessitent d'être pensées avec attention pour bénéficier d'une face protéomime capable de reconnaître la surface d'une protéine.

Il faudrait procéder à de la modélisation moléculaire pour définir les résidus à incorporer dans une séquence pour ensuite déterminer où placer les zones de flexibilité. Un travail itératif pourrait être réalisé. Il serait également envisageable de travailler avec des systèmes aliphatiques apportant encore plus de déstabilisation grâce aux nombreuses rotations permises (Figure 23).

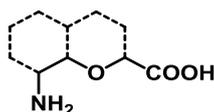


Figure 23. Une autre source de flexibilité. Les pointillés montrent que comme le motif quinoline, c'est un acide aminé δ .

Références bibliographiques

1. (a) Shibayama, N.; Sugiyama, K.; Tame, J. R. H.; Park, S.-Y., Capturing the Hemoglobin Allosteric Transition in a Single Crystal Form. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5097; (b) Perutz, M. F., Control by phosphorylation. *Nature* **1988**, *336*, 202.
2. (a) Choe, H.-W.; Kim, Y. J.; Park, J. H.; Morizumi, T.; Pai, E. F.; Krausz, N.; Hofmann, K. P.; Scheerer, P.; Ernst, O. P., Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* **2011**, *471*, 651; (b) Hubbard, R.; Kropf, A., The action of light on rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1958**, *44*, 130.
3. De Poli, M.; Zawodny, W.; Quinonero, O.; Lorch, M.; Webb, S. J.; Clayden, J., Conformational photoswitching of a synthetic peptide foldamer bound within a phospholipid bilayer. *Science* **2016**, *352*, 575.
4. Brioché, J.; Pike, S. J.; Tshepelevitsh, S.; Leito, I.; Morris, G. A.; Webb, S. J.; Clayden, J., Conformational Switching of a Foldamer in a Multicomponent System by pH-Filtered Selection between Competing Noncovalent Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6680.
5. Le Bailly, B. A. F.; Clayden, J., Dynamic foldamer chemistry. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4852.
6. (a) Maurizot, V.; Dolain, C.; Huc, I., Intramolecular Versus Intermolecular Induction of Helical Handedness in Pyridinedicarboxamide Oligomers. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *2005*, 1293; (b) Noguchi, H.; Takafuji, M.; Maurizot, V.; Huc, I.; Ihara, H., Chiral separation by a terminal chirality triggered P-helical quinoline oligoamide foldamer. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1437*, 88; (c) Dolain, C.; Jiang, H.; Léger, J.-M.; Guionneau, P.; Huc, I., Chiral Induction in Quinoline-Derived Oligoamide Foldamers: Assignment of Helical Handedness and Role of Steric Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12943; (d) Kendhale, A. M.; Poniman, L.; Dong, Z.; Laxmi-Reddy, K.; Kauffmann, B.; Ferrand, Y.; Huc, I., Absolute Control of Helical Handedness in Quinoline Oligoamides. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 195.
7. Demizu, Y.; Doi, M.; Kurihara, M.; Maruyama, T.; Suemune, H.; Tanaka, M., One-Handed Helical Screw Direction of Homopeptide Foldamer Exclusively Induced by Cyclic α -Amino Acid Side-Chain Chiral Centers. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 2430.
8. Ferrand, Y.; Kendhale, A. M.; Kauffmann, B.; Grélard, A.; Marie, C.; Blot, V.; Pipelier, M.; Dubreuil, D.; Huc, I., Diastereoselective Encapsulation of Tartaric Acid by a Helical Aromatic Oligoamide. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7858.
9. Delsuc, N.; Kawanami, T.; Lefeuvre, J.; Shundo, A.; Ihara, H.; Takafuji, M.; Huc, I., Kinetics of Helix-Handedness Inversion: Folding and Unfolding in Aromatic Amide Oligomers. *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 1882.
10. Abramyan, A. M.; Liu, Z.; Pophristic, V., Helix handedness inversion in arylamide foldamers: elucidation and free energy profile of a hopping mechanism. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 669.
11. Buratto, J.; Colombo, C.; Stupfel, M.; Dawson, S. J.; Dolain, C.; Langlois d'Estaintot, B.; Fischer, L.; Granier, T.; Laguerre, M.; Gallois, B.; Huc, I., Structure of a Complex Formed by a Protein and a Helical Aromatic Oligoamide Foldamer at 2.1 Å Resolution. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 883.
12. Sánchez-García, D.; Kauffmann, B.; Kawanami, T.; Ihara, H.; Takafuji, M.; Delville, M.-H.; Huc, I., Nanosized Hybrid Oligoamide Foldamers: Aromatic Templates for the Folding of Multiple Aliphatic Units. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8642.
13. Delsuc, N.; Godde, F.; Kauffmann, B.; Léger, J.-M.; Huc, I., The Herringbone Helix: A Noncanonical Folding in Aromatic-Aliphatic Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11348.
14. Delsuc, N.; Poniman, L.; Léger, J.-M.; Huc, I., Assessing the folding propensity of aliphatic units within helical aromatic oligoamide foldamers. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4464.
15. Gillies, E. R.; Dolain, C.; Léger, J.-M.; Huc, I., Amphipathic Helices from Aromatic Amino Acid Oligomers. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7931.
16. Dawson, S. J.; Mészáros, Á.; Pethő, L.; Colombo, C.; Csékei, M.; Kotschy, A.; Huc, I., Controlling Helix Handedness in Water-Soluble Quinoline Oligoamide Foldamers. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 4265.
17. Chan, W.; White, P., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. OUP Oxford: 2000.
18. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
19. Tsiamantas, C.; Dawson, S. J.; Huc, I., Solid phase synthesis of oligoethylene glycol-functionalized quinolinecarboxamide foldamers with enhanced solubility properties. *Comptes Rendus Chimie* **2016**, *19*, 132.
20. Qi, T.; Maurizot, V.; Noguchi, H.; Charoenraks, T.; Kauffmann, B.; Takafuji, M.; Ihara, H.; Huc, I., Solvent dependence of helix stability in aromatic oligoamide foldamers. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6337.

**CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Le repliement est un concept maîtrisé par la nature pour réaliser un grand nombre de fonctions biologiques cruciales. L'inspiration de la nature est omniprésente pour les scientifiques pour tenter de la mimer et créer des objets sophistiqués. L'important n'étant pas de copier mais d'améliorer certaines propriétés, les foldamères ont prouvé être une approche attrayante pour concevoir des architectures repliées artificielles dont la structure est modulable selon le choix des briques constitutives. En effet, ils possèdent une taille moyenne et une structure particulièrement bien définie en solution et à l'état solide. Parmi ces foldamères, le groupe d'I. Huc a choisi d'étudier les foldamères d'oligoamides aromatiques.

Leur conception est aujourd'hui bien maîtrisée dans le groupe. L'utilisation de la synthèse sur support solide assistée par micro-ondes a réduit considérablement les temps d'obtention des oligomères. Dans un souci de diversité, les membres du groupe fournissent de nombreux efforts pour développer de nouveaux monomères dont les chaînes latérales miment celles des acides aminés. Les perspectives sont nombreuses et la quinoline offre plusieurs positions de substitution pour y introduire des chaînes latérales. La position 4 est couramment utilisée, la position 5 a été abordée dans ce travail de thèse et sera probablement exploitée plus avant dans les années à venir, tout comme les positions 6 et 7. De nouvelles chaînes latérales protéinogènes seront également développées comme celle mimant l'histidine ou la lysine. Tous ces efforts de synthèse sont dirigés vers un but commun : optimiser au mieux les interactions protéine/foldamère tout en s'assurant de leur solubilité en milieu aqueux.

Les travaux de cette thèse se sont concentrés sur la reconnaissance de surfaces de protéines et s'articulent autour d'un objectif : développer des foldamères capables de reconnaître spécifiquement une surface de protéine. La stratégie pour cette vaste étude a été d'ancrer le foldamère à la protéine pour le maintenir à sa surface, même en absence de forte affinité. Une première pierre a été portée à l'édifice lors de la résolution de la structure d'un foldamère avec l'anhydrase carbonique humaine II. Des études structurales ont ainsi pu être effectuées et nous avons cherché à modifier les foldamères pour améliorer les interactions avec la protéine et ainsi stabiliser le complexe dimérique formé. La conclusion principale de cette étude est que le complexe dimérique HCA/foldamère s'oriente par l'intermédiaire de l'inhibiteur, la protéine n'étant pas perturbée par la présence du foldamère. La modularité de la séquence de foldamère permet d'obtenir très rapidement de nouveaux oligomères même s'il est difficile d'apporter des changements d'intérêt *ab initio*. Les travaux futurs dans ce but nécessiteront l'emploi de la modélisation moléculaire avec le développement de champs de

force optimisés pour les interactions protéine/foldamère. Pour améliorer les interactions avec la surface de la protéine, nous avons cherché durant cette thèse à modifier le foldamère lui-même, mais il aurait également été envisageable de muter la protéine. Ce travail s'avère cependant plus fastidieux.

L'utilisation des connaissances acquises lors de ce premier projet « modèle » et la combinaison de techniques telles que le dichroïsme circulaire, la RMN ou la LCMS ont permis de réaliser d'autres avancées avec des protéines d'intérêt thérapeutique telle que l'interleukine 4 ou la cyclophiline A. La nouvelle stratégie d'accrochage impliquant la formation d'un pont disulfure a ainsi pu être validée. Des adduits foldamère/protéine d'intérêt présentant des interactions entre eux, caractérisées par CD, ont pu être identifiés et sont à ce jour en cours d'étude notamment dans le but d'obtenir un jalon crucial à ce projet : l'information structurale apportée par la cristallographie.

L'étude fondamentale sur l'introduction de flexibilité au sein des foldamères de quinolines a montré que le monomère aminométhyl pyridine, introduit de façon stratégique, permettait d'augmenter considérablement la cinétique d'inversion d'hélicité des foldamères. Ce résultat est directement applicable aux investigations impliquant l'interaction entre un foldamère et une protéine. En effet, jusqu'alors les études ont été restreintes à des foldamères courts car ils sont capables d'atteindre leur équilibre conformationnel rapidement. De longs foldamères contenant des aminométhyl pyridines vont ainsi pouvoir être conçus. Les chances d'interactions avec une protéine seront accrues et probablement plus fortes puisqu'elles couvriront une plus large surface de protéine. L'objectif ultime est en effet de concevoir un foldamère capable d'interagir avec une protéine par l'intermédiaire de ses chaînes latérales, sans utilisation d'un ancrage à la cible.

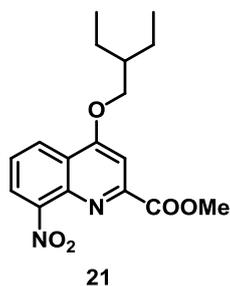
En plus de moduler la flexibilité des foldamères de quinolines, il est possible de changer le diamètre de l'hélice en y incorporant d'autres monomères. Pour apporter des chaînes latérales non disponibles à ce jour sur la quinoline, le groupe a montré qu'il était possible d'incorporer des acides aminés au sein de la séquence, avec le maintien de la forme hélicoïdale. Le tout dans le but de s'adapter au mieux à la surface de la protéine pour à terme, développer des inhibiteurs d'interaction protéine-protéine dans un contexte thérapeutique en effervescence. Des études de toxicité et de métabolisme seront alors à envisager.

PARTIE EXPERIMENTALE

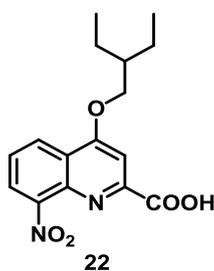
1 General Procedures and Materials

Low loading Wang resin was purchased from Novabiochem. 1-chloro-*N,N*,2-trimethylpropenylamine (Ghosez reagent) and anhydrous *N,N*-dimethylformamide (DMF) were purchased from Sigma Aldrich. Chloroform, triethylamine and *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) were distilled over calcium hydride. Analytical grade organic solvents were used for solid phase synthesis. Dry organic solvents for solution and solid phase synthesis were dispensed from a solvent purification system that passes solvents through packed columns (THF, CH₂Cl₂, Toluene: dry neutral alumina). Milli-Q water was delivered from a PureLab Prima 7/15/20 system. RP-HPLC quality acetonitrile (CH₃CN) and MilliQ water were used for RP-HPLC analysis and purification. Reactions requiring anhydrous conditions were performed under nitrogen. ¹H NMR spectra were measured at 300 MHz or 400 MHz and ¹³C NMR spectra were measured at 75 or 100 MHz on Bruker-DPX spectrometers. Chemical shifts are reported in ppm and are calibrated against residual solvent signals of CDCl₃ (δ 7.26, 77.2), DMSO-d₆ (δ 2.50, 39.4), or to the reference signal of TMS (δ 0.00 ppm for ¹H) from 10 μ M 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid sodium salt in H₂O/D₂O (9:1, v/v%). All coupling constants are reported in Hertz (Hz). Signals were abbreviated as s, singlet; brs, broad singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet. Silica gel chromatography were performed using Merck Kieselgel Si 60. Thin layer chromatography were performed using Merck Kieselgel Si 60 F254 plates and observed under UV light (254 and 365 nm). SPS was carried out manually at atmospheric pressure using a CEM Discover microwave oven and SPS station in the proprietary reactor vessels. The temperature of microwave-assisted reactions was controlled by an optical fiber probe internal to the reaction mixture. RP-HPLC analysis were performed using a Macherey-Nagel Nucleodur C18 HTEC column (4.6 x 100 mm, 3 μ m) at 1 mL/min with running solvents: Milli-Q water containing 0.1% v/v TFA (solvent A), CH₃CN containing 0.1% v/v TFA (solvent B), 12.5 mM NH₄Ac-NH₄OH in Milli-Q water, adjusted to pH 8.5 (solvent C), and CH₃CN (solvent D). Monitoring by UV detection was carried out at 214 nm, 254 nm and 300 nm using a diode array detector. Purification of oligoamides was performed at 4 mL/min on a C18 column (21 mm x 125 mm, 5 μ m) by semi-preparative RP-HPLC. The mobile phases were the same as for the analytic system. Monitoring by UV detection was carried out at 254 nm and 300 nm using a diode array detector. High resolution electrospray ionization time-of-flight (ESI-TOF) mass spectra were measured in the positive ion mode on a Waters/Micromass Q-ToF Ultima. Melting points of either recrystallized solids or amorphous powders were measured in open capillary tubes, using a digital Büchi B-540 melting point apparatus. CD spectra were recorded on a Jasco J-815 Circular Dichroism spectrometer using quartz cells of 1, 2, or 10 mm optical path length. Scans were measured over a wavelength range of 300–500 nm, with a response time of 0.5 s and a scanning speed of 50 nm.min⁻¹. IR spectra were recorded between 4000 and 400 cm⁻¹ with a Bruker IFS55 (OPUS/IR 3.0.2) FT-IR spectrometer, and all samples were dissolved in dichloromethane before analysis as a thin film on a zinc-selenium pellet after solvent evaporation. Production of HCA was performed as previously reported¹.

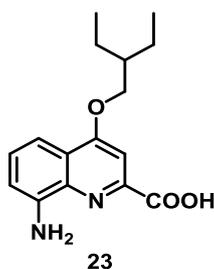
2 Chemical synthesis



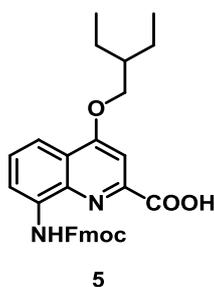
Compound 21: DIAD (5.2 mL, 26 mmol, 1.3 equiv.) was added dropwise at 0°C to a stirred solution of **1** (5.0 g, 20 mmol), 2-ethyl-1-butanol (3.7 g, 30 mmol, 1.5 equiv.) PPh₃ (6.9 g, 26 mmol, 1.3 equiv.) in dry THF (45 mL). The reaction mixture was stirred overnight at rt under N₂. After completion of the reaction, DCM (30mL) and MeOH (60mL) were added. DCM was evaporated slowly at the rotavapor. The precipitate was filtered off and washed with cold MeOH to afford compound **21** as a pale brownish powder (6.3 g, 94%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.45 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H), 8.11 (dd, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.65 (dd, *J* = 8.3, 7.7 Hz, 1H), 4.23 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.04 (s, 3H), 1.96 – 1.81 (m, 1H), 1.67 – 1.55 (m, 4H), 1.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.72, 162.92, 151.34, 148.43, 140.02, 126.36, 126.00, 125.06, 123.39, 102.20, 71.71, 53.34, 40.72, 23.54, 11.19. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₁₇H₂₀N₂O₅ [M+H]⁺: 333.14450 found 333.14446. Mp = 136.9-138.2°C.



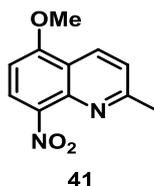
Compound 22: To a stirred solution of compound **21** (3.0 g, 9.0 mmol) in a 2/1 THF/H₂O mixture (240 mL/60 mL) LiOH·H₂O (0.7 g, 13 mmol, 1.5 equiv.) was added in one portion. The mixture was stirred 20 min at rt. After completion of the reaction, a treatment by gradual addition of 1M HCl until acidic pH (3-4) and extraction with DCM were done. The combined organic layers were washed with water, saturated NaCl, dried over MgSO₄ and evaporated. The crude product was purified by precipitation in DCM/MeOH to afford compound **22** as a yellow/pale brown solid (2.5 g, 87%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.52 (dd, *J* = 8.5, 1.4 Hz, 1H), 8.23 (dd, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.73 (dd, *J* = 8.5, 7.6 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.91 (m, 1H), 1.67 – 1.53 (m, 4H), 1.01 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 164.55, 163.69, 149.39, 147.13, 138.35, 127.26, 126.67, 126.34, 123.83, 100.33, 72.48, 40.71, 23.55, 11.21. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₁₆H₁₈N₂O₅ [M+H]⁺: 317.11320 found 317.11436. Mp = 107.7-109.5°C.



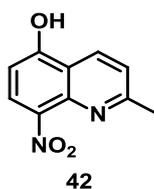
Compound 23: To a stirred solution of compound **22** (2.0 g, 6.0 mmol) in THF (120 mL) Pd/C (0.2 g, 10% by mass) was added and placed under H₂ atmosphere. The resulting mixture was stirred at rt overnight, filtered through Celite® and washed with EtOAc. The solvents were evaporated and the orange residue dried under reduced pressure to afford compound **23** in quantitative yield (1.7 g). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12.80 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 8.2, 1.0 Hz, 1H), 6.87 (dd, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 1H), 6.50 (s, 2H), 4.20 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 1.78 (m, 1H), 1.63 – 1.38 (m, 4H), 0.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 165.77, 162.36, 146.53, 144.35, 136.29, 129.36, 122.71, 109.64, 106.32, 99.26, 70.46, 40.12, 23.02, 10.99. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₁₆H₂₀N₂O₃ [M+H]⁺: 289.15467 found 289.15531. Mp = 141.3-143.2°C.



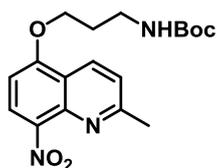
Compound 5: 30 mL of a 15% aqueous solution of NaHCO₃ was added to a stirred solution of **23** (0.9 g, 3.2 mmol) in dioxane (30 mL) at 0°C. A solution of FmocCl (0.9 g, 3.7 mmol, 1.1 equiv.) in dioxane (12 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred 1h at 0°C then overnight at rt. Water was added and 1M HCl was added slowly to reach pH 3-4, then extraction with DCM was carried out. The combined organic layers were washed with water, saturated NaCl, dried over MgSO₄ and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (from 100% DCM to DCM/MeOH 90/10) to give compound **5** as a white powder (1.2 g, 75%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.62 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.91 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.60 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.35 (m, 2H), 4.65 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.39 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.23 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.88 (m, 1H), 1.68 – 1.52 (m, 4H), 1.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 165.50, 162.78, 153.51, 146.79, 143.71, 140.81, 137.45, 135.69, 128.40, 127.77, 127.20, 125.15, 121.91, 120.22, 116.46, 114.48, 100.41, 70.96, 66.40, 46.60, 22.97, 10.99. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₃₁H₃₀N₂O₅ [M+H]⁺: 511.22275 found 511.22382. Mp = 217.5-219.5°C.



Compound 41: 4-methoxy-2-nitroaniline (50 g, 0.3 mol) was suspended in 37% conc. HCl (310 mL). Paraldehyde (79 mL, 0.6 mol, 2 equiv.) was added portionwise during 15 min. The reaction mixture was stirred 3h at 130°C. After cooling down to rt, 320 mL of 8M NaOH were added slowly over ice bath. 500 mL of iced water were added to the black mixture which was filtered. The solid was dissolved in DCM, washed with a saturated solution of NH₄Cl, water, brine, and then dried over MgSO₄. Solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by short column chromatography (Cyclohexane/EtOAc 8/2 to 7/3) and fractions evaporated under reduced pressure. A further crystallization in Ac₂O/Cyclohexane gave compound **41** as a yellow solid (17 g, 26%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.08 (s, 3H), 2.78 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 162.08, 158.45, 140.68, 140.49, 130.91, 126.26, 122.40, 118.85, 101.66, 56.28, 25.65. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₁₁H₁₀N₂O₃ [M+H]⁺: 219.07642 found 219.07606. Mp = 118.5-121.2°C.

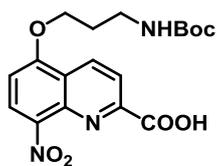


Compound 42: Compound **41** (10 g, 23 mmol) was suspended in 230 mL dioxane/water (1/1). NaOH (18 g, 0.5 mol, 10 equiv.) was added in one portion as a solid. The reaction mixture was stirred overnight at reflux. After completion of the reaction, dioxane was removed under reduced pressure. The reaction mixture was neutralized with 37% conc. HCl down to pH 8, then pH 6-7 was reached with a slow addition of citric acid as a solid. The precipitate was filtered off and washed with a 1M HCl solution. Toluene coevaporations were used to dry the yellow solid which was used in the next step without further purification (4.7 g, quantitative yield). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 15.26 (s, 1H), 9.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.44 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 2.89 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.18, 159.56, 140.30, 137.14, 132.20, 127.47, 122.01, 118.10, 107.07, 24.96. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₁₀H₈N₂O₃ [M+H]⁺: 205.06077 found 205.06040. Mp = 227.8-230.6°C.



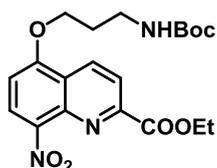
43

Compound 43: A mixture of **42** (10 g, 46 mmol), PPh₃ (17 g, 65 mmol, 1.4 equiv.), boc-aminopropanol (9.8 g, 56 mmol, 1.2 equiv.) and dry THF (50 mL) was put at 0°C under N₂. DIAD (13 g, 65 mmol, 1.4 equiv.) was added dropwise and the mixture was stirred at 0°C for 15 min, then overnight at rt. The precipitate was filtered off and the solvent was evaporated from the filtrate. The product was purified by consecutive precipitations in DCM/Cyclohexane then Et₂O to yield compound **43** as a pale yellow powder (6.8 g, 41%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.71 (s, 1H), 4.28 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.48 – 3.37 (m, 1H), 2.78 (s, 3H), 2.22 – 2.10 (m, 2H), 1.44 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 162.18, 157.72, 156.08, 140.67, 140.60, 131.00, 126.35, 122.48, 118.94, 102.36, 79.29, 66.90, 37.72, 29.50, 28.38, 25.71. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₁₈H₂₃N₃O₅ [M+H]⁺: 362.17105 found 362.16982. Mp = 95.2-97.9°C.



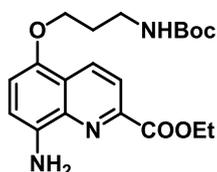
46

Compound 46: To a solution of compound **43** (6.8 g, 19 mmol) in freshly distilled pyridine (37 mL), SeO₂ (6.3 g, 56 mmol, 3 equiv.) was added in one portion. The reaction mixture was stirred 4h at 70°C. Filtration over Celite® and washing with EtOAc were carried out. The solvent was removed under reduced pressure and the compound was purified by column chromatography in DCM/MeOH (from 100% DCM to 5% MeOH in DCM). A further precipitation in DCM gave compound **46** as an orange solid (4.5 g, 61%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.79 – 4.65 (m, 1H), 4.36 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.55 – 3.36 (m, 3H), 2.27 – 2.13 (m, 2H), 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 165.73, 156.95, 155.70, 150.78, 140.88, 139.21, 132.87, 127.27, 121.63, 120.93, 105.48, 77.55, 67.18, 36.89, 28.82, 28.20. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₁₈H₂₁N₃O₇ [M+H]⁺: 392.14523 found 392.14399. Mp = 135.5-139.1°C.



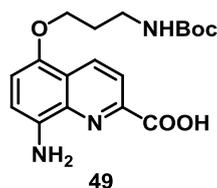
47

Compound 47: The acid **46** (4.5 g, 11 mmol) was suspended in 40 mL dry CHCl_3 under N_2 . 1-chloro-*N,N,N*-trimethylpropenylamine (3.0 mL, 23 mmol, 2 equiv.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt for 2h resulting in a homogeneous solution, then evaporated to provide the corresponding acid chloride. To a solution of the acid chloride in 10 mL dry CHCl_3 , ethanol (3.4 mL, 57 mmol, 5 equiv.) in 30 mL of dry CHCl_3 containing triethylamine (3.4 mL, 57 mmol, 5 equiv.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at rt overnight. After completion of the reaction, was washed with a 5% aqueous solution of citric acid, water and brine. After drying over MgSO_4 , the solvent was removed under reduced pressure and the residue was then purified by column chromatography (100% DCM to DCM/EtOAc 96/4) to yield compound **47** as a pale yellow powder (2.6 g, 56%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.78 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.31 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.27 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 4.72 (s, 1H), 4.53 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.33 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.52 – 3.35 (m, 2H), 2.25 – 2.10 (m, 2H), 1.50 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.43 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 164.04, 156.92, 155.66, 149.78, 140.76, 139.16, 132.99, 127.47, 121.55, 120.96, 105.62, 77.50, 67.17, 61.82, 36.82, 28.77, 28.16, 14.04. HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 420.17653 found 420.17759. Mp = 166.4-169.4°C.

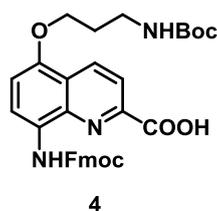


48

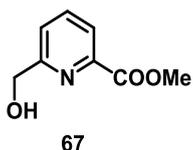
Compound 48: Compound **47** (2.2g, 5.2 mmol), Fe (0.7 g, 13 mmol, 2.5 equiv.), AcOH (22 mL) and EtOH (66 mL) were heated 20 min at 70°C under N_2 . Fe was removed with a magnetic bar, then a saturated aqueous solution of NaHCO_3 was added carefully to the reaction mixture. The aqueous layer was extracted with DCM, washed with NaHCO_3 , water and brine and dried over MgSO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the residue was then purified by column chromatography (100% DCM to DCM/EtOAc 1/1) to yield compound **48** as a bright orange solid (2.0 g, quantitative yield). ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 5.57 (s, 2H), 4.44 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.08 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.24 – 3.12 (m, 2H), 2.01 – 1.85 (m, 2H), 1.45 – 1.37 (m, 3H), 1.38 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 164.74, 155.67, 144.77, 143.77, 139.63, 136.86, 131.71, 121.52, 119.90, 110.48, 108.94, 77.46, 66.42, 61.30, 37.12, 29.34, 28.22, 14.15. HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 390.20235 found 390.20121. Mp = 144.8-148.9°C.



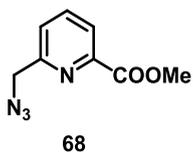
Compound 49: Compound **48** (2.0 g, 5.2 mmol) was solubilized in dioxane (30 mL). Water (17 mL) was added. LiOH.H₂O (0.6 g, 15 mmol, 3 equiv.) was added in one portion. The reaction mixture was stirred 20 min at rt. Citric acid was added until acidic pH (3-4) and extractions with DCM were carried out. The combined organic layers were washed with water, brine, dried over MgSO₄ and evaporated. A bright orange solid **49** was obtained (1.5 g, quantitative yield). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.90 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.22 – 3.08 (m, 2H), 1.99 – 1.83 (m, 2H), 1.35 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 166.45, 155.74, 145.60, 143.60, 140.05, 136.30, 131.95, 121.63, 119.43, 110.72, 108.83, 77.56, 66.56, 37.21, 29.42, 28.29. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₁₈H₂₃N₃O₅ [M+H]⁺: 362.17105 found 362.17079. Mp = 149.2-149.8°C.



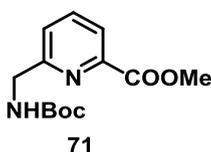
Compound 4: 25 mL of a 13% aqueous solution of NaHCO₃ was added to a stirred solution of **49** (0.7 g, 2.0 mmol) in dioxane (20 mL) at 0°C. A solution of FmocCl (0.7 g, 2.6 mmol, 1.3 equiv.) in dioxane (10 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred 1h at 0°C then overnight at rt. Water was added and 1M HCl was added slowly to reach pH 3-4, then extraction with DCM was carried out. The combined organic layers were washed with water, saturated NaCl, dried over MgSO₄ and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (from 100% DCM to DCM/MeOH 90/10) to give compound **4** as a bright yellow solid (450 mg, 59%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.20 (s, 1H), 8.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.25 (brs, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.79 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.46 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.42 – 7.32 (m, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.96 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 4.45 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.20 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.29 – 3.12 (m, 2H), 2.08 – 1.90 (m, 2H), 1.38 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 166.75, 155.84, 153.54, 148.54, 143.82, 140.86, 137.51, 132.32, 128.53, 127.74, 127.20, 125.20, 120.92, 120.17, 116.37, 107.26, 77.58, 66.36, 66.19, 54.90, 48.76, 46.75, 37.26, 29.29, 28.28. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₃₃H₃₃N₃O₇ [M+H]⁺: 584.23913 found 584.23774. Mp = 188.9-192.0°C.



Compound 67: Dimethylpyridine,2,6-dicarboxylate (1.0 g, 5.1 mmol) was dissolved in 114 mL of a 1/1 DCM/MeOH mixture and placed at 0°C under N₂. NaBH₄ (0.4 g, 10 mmol, 2 equiv.) was added in one portion and the reaction mixture was stirred 30 min at 0°C then 2h at rt. Solvent were removed under reduced pressure and a 5% citric acid solution was added carefully to reach pH 4-5. Aqueous layer was extracted with DCM/MeOH (8/2), dried over MgSO₄ and evaporated. The residue was then purified by column chromatography to yield compound **67** as a white solid (0.6 g, 66%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.85 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.86 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.32 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.70, 160.30, 147.19, 137.83, 124.14, 123.98, 64.74, 53.01. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₈H₉NO₃ [M+H]⁺: 168.16970 found 168.06554. Mp = 89.5-91.5°C.



Compound 68: Compound **67** (0.57 g, 3.4 mmol) PPh₃ (1.34 g, 5.11 mmol, 1.5 equiv) and CBr₄ (1.70 g, 5.11 mmol, 1.5 equiv.) were added in that order to a stirred solution of dry DMF (30m) under N₂. The reaction mixture was stirred 2h at rt. NaN₃ (0.67 g, 10 mmol, 3 equiv.) was added in one portion and the resulting mixture was stirred at rt overnight. Et₂O and H₂O were added and the aqueous layer was extracted with Et₂O. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and evaporated. The residue was then purified by column chromatography (100% DCM to DCM/EtOAc 8/2) to yield compound **68** as a brown oil (0.39g, 60%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.12 – 8.06 (m, 1H), 7.90 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.63 – 7.57 (m, 1H), 4.65 (s, 2H), 4.02 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.70, 160.30, 147.19, 137.83, 124.14, 123.98, 64.74, 53.01. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₈H₈N₄O₂ [M+H]⁺: 193.07200 found 193.07198.



Compound 71: Compound **68** (0.2 g, 1.0 mmol) was dissolved in dry THF (10 mL) and put under N₂. Boc₂O (0.7 g, 3.1 mmol, 3 equiv.) Boc₂O (681 mg, 3.12 mmol, 3 equiv.) and Pd/C (20 mg, 10% by mass) were added in one portion to the mixture which was then placed under hydrogen atmosphere. The resulting mixture was stirred at rt overnight, filtered through Celite®. The residue was then purified by column chromatography (100% DCM to DCM/EtOAc 7/3) to yield compound **71** as a yellow oil (0.2 g, 88%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.02 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.82 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* =

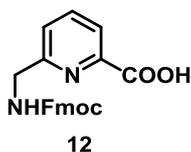
7.8 Hz, 1H), 5.44 (s, 1H), 4.53 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 1.46 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 165.58, 158.76, 156.01, 147.37, 137.67, 125.11, 123.72, 79.62, 52.82, 45.95, 28.35. HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 267.13393 found 267.13386.



Compound 72: Compound **71** (0.2 g, 0.7 mmol) was solubilized in THF (6 mL). Water (2 mL) was added. $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (47 mg, 1.1 mmol, 1.5 equiv.) was added in one portion. The reaction mixture was stirred 1h at rt. Citric acid was added until acidic pH (3-4) and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 and evaporated. A white solid was obtained (0.2 g, quantitative yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.14 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.94 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.23 (s, 1H), 4.51 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.49 (s, 1H), 1.47 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 165.85, 158.05, 156.26, 146.20, 138.76, 125.70, 123.00, 79.90, 45.46, 28.33. HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 253.11828 found 253.11809.

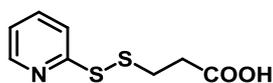


Compound 73: Compound **72** (0.2 g, 0.7 mmol) was suspended in DCM (1 mL). TFA (300 μL) was added. The reaction mixture was stirred 2h at rt. Solvent were removed under reduced pressure (toluene coevaporations) to obtain compound **73** in a quantitative yield. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.16 – 7.96 (m, 2H), 7.71 (dd, $J = 6.5, 2.3$ Hz, 1H), 4.30 (s, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.49, 153.47, 147.24, 138.91, 126.01, 123.85, 42.52. HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 153.06585 found 153.06509.



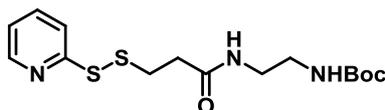
Compound 12: 62 mL of a 10% aqueous solution of NaHCO_3 was added to a stirred solution of **73** (0.7 g, 3.7 mmol) in dioxane (35 mL) at 0°C . A solution of FmocOSu (1.4 g, 4.1 mmol, 1.1 equiv.) in dioxane (10 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred 1h at 0°C then overnight at rt. Water was added and 1M HCl was added slowly to reach pH 3-4. The precipitated compound was filtered, washed with water and Et_2O to give compound **12** as a white powder (1.2 g, 85%). ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.07 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.84 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.36 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 4.31 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 4.23 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ

168.25, 157.77, 156.66, 156.28, 143.89, 140.77, 137.30, 127.63, 127.11, 125.26, 122.23, 121.65, 120.11, 65.54, 46.81, 45.75. HRMS (ES⁺): m/z calcd for C₂₂H₁₈N₂O₄ [M+H]⁺: 375.13393 found 375.13408. Mp = 183.5-185.4°C.



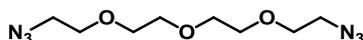
56

Compound 56: To a mixture of 2,2-dipyridyldisulfide (16.6 g, 75 mmol) and AcOH (3.4 mL) in MeOH (250 mL), 3-mercaptopropionic acid (4.00 g, 38 mmol, 0.5 equiv.) in MeOH (10 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred 3h under N₂ at rt. The solvent was evaporated. The crude residue was then purified by neutral alumina column chromatography (EtOAc/Cyclohexane 8/2 then EtOAc/Cyclohexane/AcOH 8/2/0.02) to yield compound **56** as a white solid (4.00 g, 48%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.48 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.76 – 7.62 (m, 1H), 7.57 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.22 – 7.14 (m, 1H), 3.09 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.79 (t, J = 6.6 Hz, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 175.53, 159.43, 149.01, 137.75, 121.10, 120.20, 33.74, 33.46. HRMS (ES⁺): m/z calcd for C₈H₉NO₂S₂ [M+H]⁺: 216.01475 found 216.01466. Mp = 73-74.5°C.



57

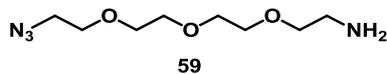
Compound 57: To a solution of compound **56** (1.0 g, 6.6 mmol) and HATU (2.6 g, 7.0 mmol, 1.5 equiv.) in THF (8mL), DIEA (4 mL, 23 mmol, 5 equiv.) was added under N₂ at 0°C. The reaction mixture was stirred 1 min at 0°C. *N*-boc-ethylenediamine (1.1 g, 7.0 mmol, 1.5 equiv.) was dissolved in 3 mL dry THF and added dropwise. The resulting mixture was stirred overnight at rt. The precipitate was filtered off, dissolved in DCM and washed with a 5% aq. solution of citric acid. The combined organic layers were washed with water, brine, dried over MgSO₄ and evaporated. The residue was then purified by precipitation in DCM/Et₂O to yield compound **57** as a white solid (0.7 g, 40%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.47 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.71 – 7.51 (m, 2H), 7.18 – 7.05 (m, 1H), 6.93 (brs, 1H), 4.94 (s, 1H), 3.48 – 3.35 (m, 2H), 3.34 – 3.18 (m, 2H), 3.08 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.60 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.58, 159.63, 156.82, 149.64, 137.24, 121.09, 120.27, 79.62, 40.49, 40.37, 35.77, 34.83, 28.44. HRMS (ES⁺): m/z calcd for C₁₅H₂₃N₃O₃S₂ [M+H]⁺: 358.12536 found 358.12524. Mp = 131.1-139.3°C.



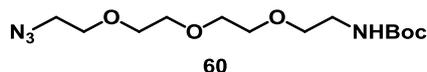
58

Compound 58: Tetraethyleneglycol bis *p*-toluenesulfonate (10 g, 20 mmol) was solubilized in dry DMF (28 mL) and NaN₃ (3.2 g, 50 mmol, 2.5 equiv.) was added in one portion. The reaction mixture was stirred overnight at 65°C under N₂. Water was added to dissolve the white precipitate. The aqueous layer

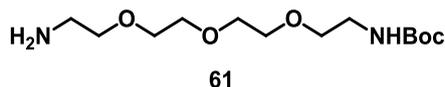
was extracted with EtOAc, washed with water, brine, dried over MgSO₄ and evaporated to give compound **58** as a transparent oil (4.2 g, 87%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.73 – 3.63 (m, 12H), 3.45 – 3.32 (m, 4H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 70.50, 70.49, 69.83, 50.50. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₈H₁₆N₆O₃ [M+NH₄]⁺: 262.16221 found 262.16221. IR (neat) = 2109 (ν_{N₃}) cm⁻¹.



Compound 59: Compound **58** (4.0 g, 16 mmol) was dissolved in Et₂O (71 mL), THF (31 mL) and 37% conc. HCl (38 mL). PPh₃ (4.3 g, 16 mmol, 1 equiv.) was dissolved in Et₂O (20 mL) and added dropwise. The reaction mixture was stirred overnight at rt. The organic layer was removed. Aqueous layer was brought to pH 1 by slow addition of 4M HCl. The aqueous layer was washed thoroughly with Et₂O. NaOH was added carefully as a solid to bring pH to 10. The aqueous layer was extracted with DCM, washed with water, brine, dried over MgSO₄ and evaporated to give compound **59** as a pale yellow oil (2.2 g, 61%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.72 – 3.58 (m, 10H), 3.54 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.39 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 2.90 (t, *J* = 4.4 Hz, 2H), 2.65 (s, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 72.73, 69.93, 69.89, 69.55, 69.31, 49.93, 41.11. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₈H₁₈N₄O₃ [M+H]⁺: 219.14517 found 219.14484. IR (neat) = 2109 (ν_{N₃}) cm⁻¹.

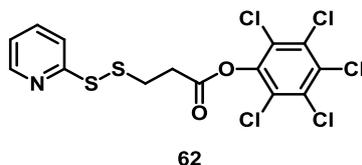


Compound 60: Compound **59** (2.0 g, 9.4 mmol) was dissolved in dry DCM (30 mL). Boc₂O (2.0 g, 9.2 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry DCM (10 mL) and added dropwise at 0°C under N₂ over 30 min. The reaction mixture was stirred 3h at rt then washed with a 5% aq. solution of citric acid, water, brine, dried over MgSO₄ and evaporated. The crude residue was then purified by column chromatography (Petroleum ether/EtOAc 7/3 then Petroleum ether/EtOAc/Et₃N 7/3/0.01). After evaporation to dryness, washing with sat. aq. solution of NH₄Cl, DCM extraction and evaporation, compound **60** was obtained as a white solid (2.3 g, 77%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.02 (s, 1H), 3.72 – 3.57 (m, 10H), 3.54 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.39 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.35 – 3.27 (m, 2H), 1.44 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 155.64, 70.29, 70.25, 70.22, 69.86, 69.80, 69.70, 50.27, 40.01, 28.05. HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₁₃H₂₆N₄O₅ [M+H]⁺: 231.14517 found 231.14499. IR (neat) = 2109 (ν_{N₃}) cm⁻¹.

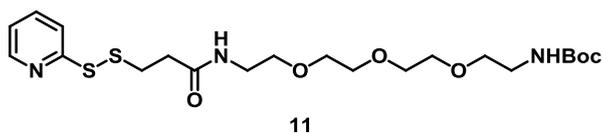


Compound 61: To a stirred solution of compound **60** (2.6 g, 8.2 mmol) in EtOAc (120 mL), Pd/C (0.26 g, 10% by mass) was added to the mixture and placed under hydrogen atmosphere. The resulting mixture was stirred at rt overnight, filtered through Celite® and washed with EtOAc. The solvents were evaporated and the residue dried under reduced pressure to afford compound **61** as a transparent oil (1.7 g, quantitative yield). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.29 (s, 1H), 3.69 – 3.57 (m, 8H), 3.58 – 3.46 (m, 4H), 3.35 – 3.25 (m, 2H), 2.86 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 156.10,

79.08, 73.41, 70.60, 70.57, 70.32, 70.28, 41.74, 40.42, 28.47. HRMS (ES⁺): m/z calcd for C₁₃H₂₈N₂O₅ [M+H]⁺: 205.15467 found 205.15465.



Compound 62: Compound **56** (2.0 g, 9.3 mmol), pentachlorophenol (4.9 g, 18 mmol, 2 equiv.), EDC.HCl (8.0 g, 42 mmol, 4.5 equiv.) and DMAP (0.6 g, 4.6 mmol, 0.5 equiv.) were put under N₂ and dry THF was added. The reaction mixture was stirred overnight at rt. The white gel was filtered off. The filtrate was evaporated to dryness. The crude residue was then purified by column chromatography (Cyclohexane/Toluene). A further crystallization in Et₂O afforded compound **62** as a white solid (4.0 g, 37%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.51 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 7.73 – 7.59 (m, 2H), 7.18 – 7.05 (m, 1H), 3.18 (s, 4H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 167.64, 159.39, 149.97, 143.94, 137.24, 132.14, 131.80, 127.68, 121.14, 120.12, 33.51, 33.01. HRMS (ES⁺): m/z calcd for C₁₄H₈Cl₅NO₂S₂ [M+H]⁺: 463.84823 found 463.84832. Mp = 71.4-72.9°C.



Compound 11: Compounds **61** (0.2 g, 0.7 mmol) and **62** (0.4 g, 0.8 mmol, 2.5 equiv.) were placed under N₂. Dry THF (1 mL) and Et₃N (120 μL, 0.9 mmol, 1.3 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred overnight at rt. Solvent was evaporated then DCM was added. A 5% aq. solution of citric acid was used for washing, water, brine, dried over MgSO₄ and evaporated to give compound **X** as a yellow oil (2.2 g, 61%). The crude residue was then purified by column chromatography (DCM/MeOH 97/3) to yield compound **11** as a transparent oil (0.5 g, 73%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.47 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.75 – 7.55 (m, 2H), 7.18 – 7.01 (m, 1H), 6.78 (s, 1H), 3.70 – 3.41 (m, 15H), 3.36 – 3.25 (m, 2H), 3.07 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.61 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.89, 159.84, 156.12, 149.69, 137.31, 137.17, 120.90, 120.06, 70.48, 70.42, 70.27, 70.23, 70.18, 69.97, 40.37, 39.40, 35.62, 34.56, 28.47. HRMS (ES⁺): m/z calcd for C₂₁H₃₅N₃O₆S₂ [M+H]⁺: 490.20400 found 490.20377.

3 Solid Phase Synthesis of foldamers

3.1 General Procedure

Solid Phase Synthesis of foldamers was performed accordingly to reference 2². In particular, low loading Wang resin with a loading of 0.38 mmol.g⁻¹ was used. Wang resin was converted to a bromomethyl Wang resin. Each first monomer was anchored to the bromomethyl Wang resin in the

presence of cesium iodide. The introduction of the subsequent monomers was done via acid chloride activation with Ghosez reagent. Microwaves were applied during coupling steps (50 °C, 50W, for 5-15 min). Fmoc deprotection was performed at room temperature with a 20% v/v solution of piperidine in DMF. Coupling completion was confirmed with a modified DESC colorimetric test: few resin beads were suspended in DMF. 5 drops of a 0.1 M solution of DESC in DMF and 2 drops of a 20% v/v solution of DIEA in DMF were added. The mixture was heated at 60°C for 5 min. The supernatant was removed and the beads washed with DMF. Clear beads correspond to a successful coupling. Cleavage and deprotection of acid labile side chains was performed with a freshly prepared TFA solution containing triisopropylsilane (TIS) and water (TFA/TIS/H₂O 95/2.5/2.5). Crude purity was determined by RP-HPLC using the appropriate solvent system.

General procedure for on-resin (di-*tert*-butyl) silyl deprotection: The resin bound quinoline foldamer was suspended in anhydrous THF and a 1 M solution of TBAF in THF (16 equiv) was added. It was then treated with microwaves (50 W, ramp to 50 °C over 5 min, then hold at 60 °C for 15 min). The resin was washed briefly with anhydrous THF, and the process repeated once. The resin was then washed thoroughly with DMF and stirred for 2 min at room temperature in DMF. Then washed with DMF, DCM, DCM/MeOH (50/50%, v/v%), and MeOH/H₂O (50/50%, v/v%) in that order for three cycles.

General Procedure for PQ foldamers: Low-loading Wang resin was functionalized with Fmoc-Phe-OH by using the well-documented anhydride method³. The introduction of the subsequent monomers was done *via* acid chloride activation with Ghosez reagent or HOBt, HBTU coupling conditions. To convert the P monomer in an acid chloride, a pre-activation as an HCl salt was carried out. The P monomer was suspended in MeOH, HCl 37% (1 equiv.) was added dropwise and the mixture was stirred 30 min at rt. Solvent was removed under reduced pressure and toluene coevaporations were used to dry the white solid. Couplings of Q or P to Q were assisted by microwaves as previously reported². Couplings of Q or P to P were carried out as following: monomer (3 equiv.) suspended in DMF. DIEA (6 equiv.), HOBt (3 equiv.) and HBTU (3 equiv.) added. Dry DMF added to the resin. The reaction was assisted by the microwaves (70°C, 25W, 10 min) and the process repeated once. The resin was then washed thoroughly with DMF and stirred for 2 min at room temperature in DMF. Then washed with DMF, DCM, DCM/MeOH (50/50%, v/v%), and MeOH/H₂O (50/50%, v/v%) in that order for three cycles.

3.2 Attachment of the ligand 55 or linkers 10 and 11 by solid phase synthesis

To Fmoc-Qn-resin (0.41 mmol.g⁻¹, 0.021 mmol) a 20% v/v solution of piperidine in DMF (2 mL) was added and the resin was stirred for 10 min at room temperature, then washed briefly with DMF and the process repeated twice. The resin was then washed thoroughly with DMF, then with THF. The resin was swollen in 2 mL anhydrous THF and DIEA (36 µL, 0.21 mmol, 10 equiv.) was added. Trichlorophosgene (21 mg, 0.069 mmol, 3.3 equiv.) was dissolved in 1.5 mL of anhydrous THF and

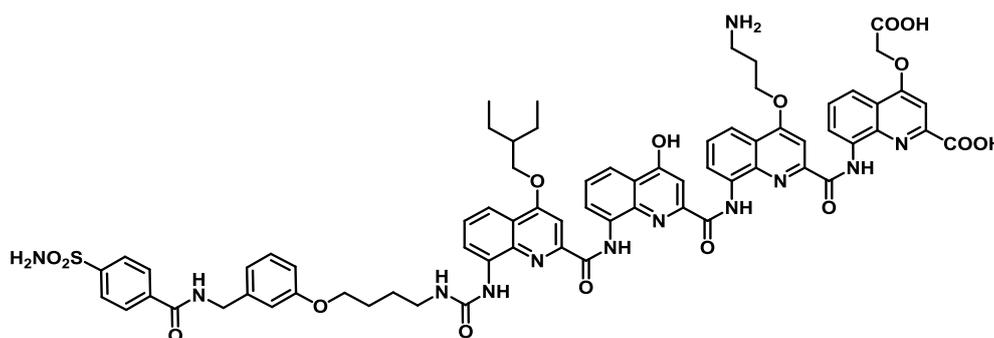
added to the resin, which was then treated with microwaves (50 W, 50 °C, 5 min). The resin was then washed thoroughly with anhydrous THF. Compound **55**, **10** or **11** (22 mg, 0.063 mmol, 3 equiv.) was dissolved in 2 mL anhydrous DMF/THF (1:1), DIEA (22 μ L, 0.12 mmol, 6 equiv.) was added and the mixture stirred for 10 min. The pH was confirmed to be neutral, and the solution was added to the resin, which was then treated with microwaves (50 W, 50 °C, 15 min). The resin was then washed thoroughly with DMF, CH₂Cl₂ and CH₂Cl₂/MeOH 1/1, then dried and desiccated under vacuum.

3.3 General condition for final acetylation

To Fmoc-Qn-resin (0.41 mmol.g⁻¹) a 20% v/v solution of piperidine in DMF was added and the resin was stirred for 10 min at room temperature, then washed briefly with DMF and the process repeated twice. The resin was then washed thoroughly with DMF, then with THF. The resin was swollen in anhydrous THF.

For Q monomer: DIEA (6 equiv.) was added. Acetyl chloride (3 equiv.) was dissolved in dry THF and added to the resin. The solution was treated with microwaves (50 W, 60 °C, 15 min) and the process repeated once. The resin was then washed thoroughly with DMF, CH₂Cl₂ and CH₂Cl₂/MeOH 1/1, then dried and desiccated under vacuum.

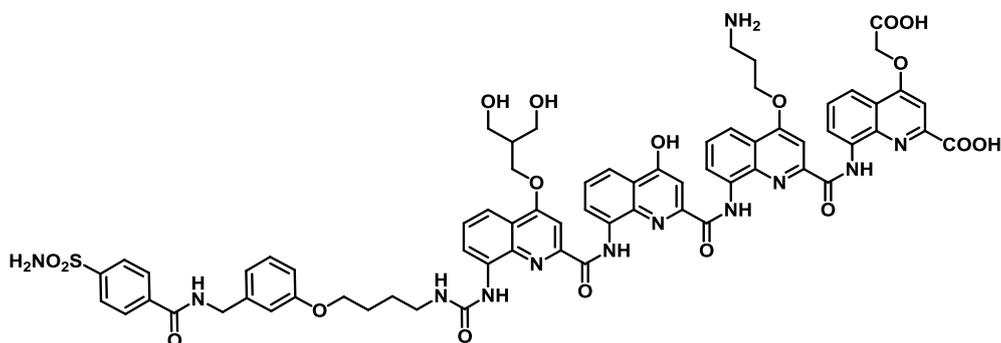
For P monomer: DIEA (10 equiv.) was added. Acetic anhydride (5 equiv.) was dissolved in dry THF and added to the resin. The solution was stirred 20 min at rt under N₂. The resin was then washed thoroughly with THF and the process was repeated once. The resin was then washed thoroughly with DMF, CH₂Cl₂ and CH₂Cl₂/MeOH 1/1, then dried and desiccated under vacuum.



F11

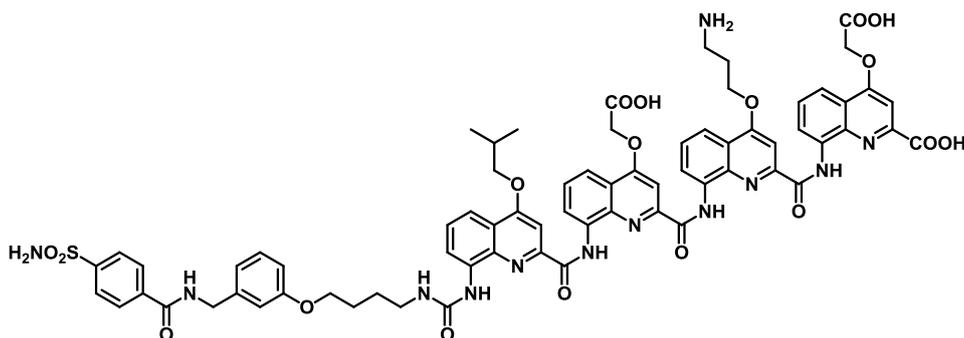
Compound F11: Crude compound was obtained in 52% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 30-70% Solvent B in 25 min (tr = 14 min). Purified Yield = 18%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12.20 (s, 1H), 11.65 (s, 1H), 11.64 (s, 1H), 9.16 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.90 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.55 – 8.30 (m, 2H), 8.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.97 – 7.76 (m, 6H), 7.76 – 7.53 (m, 5H), 7.46 (s, 1H), 7.36 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.29 – 7.10 (m, 3H), 6.95 – 6.70 (m, 4H), 6.56 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 5.04 – 4.72 (m, 2H), 4.56 – 4.27 (m, 5H), 4.27 – 4.13 (m, 1H), 3.93 – 3.83 (m, 2H), 3.19 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 2.96 – 2.79 (m, 1H), 2.73 (s, 1H), 2.33 – 2.20 (m, 2H), 2.14 – 1.85 (m, 1H), 1.89 – 1.64 (m, 4H),

1.64 – 1.49 (m, 2H), 1.49 – 1.32 (m, 2H), 1.32 – 1.04 (m, 9H). HRMS (ES⁺): m/z calcd for C₇₀H₆₈N₁₂O₁₆S [M+H]⁺: 1365.46697 found 1365.47398.



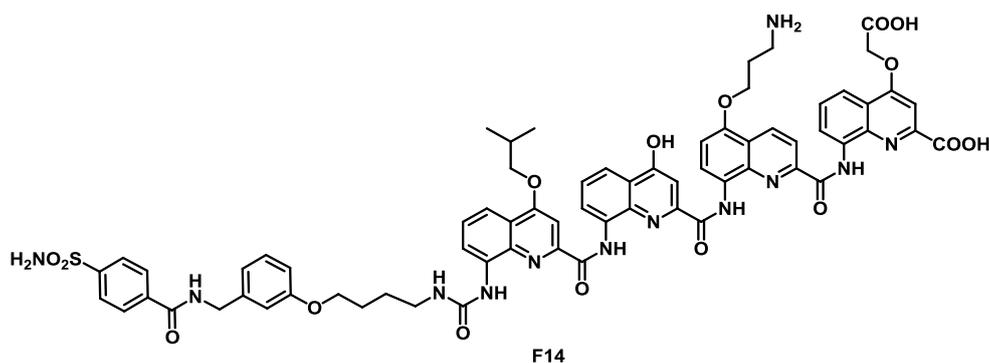
F12

Compound F12: The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 25-40% Solvent B in 25 min ($t_r = 14.6$ min). Purified Yield = 8%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.18 (s, 1H), 11.63 (s, 1H), 11.63 (s, 1H), 9.32 – 9.08 (m, 1H), 8.91 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.55 – 8.27 (m, 2H), 8.14 – 7.56 (m, 14H), 7.56 – 7.30 (m, 1H), 7.30 – 7.06 (m, 3H), 7.01 – 6.70 (m, 4H), 6.64 – 6.48 (m, 4H), 4.79 (d, $J = 17.0$ Hz, 4H), 4.62 (s, 2H), 4.43 (d, $J = 5.6$ Hz, 5H), 4.21 (s, 3H), 3.84 (d, $J = 22.6$ Hz, 9H), 1.57 (s, 5H).

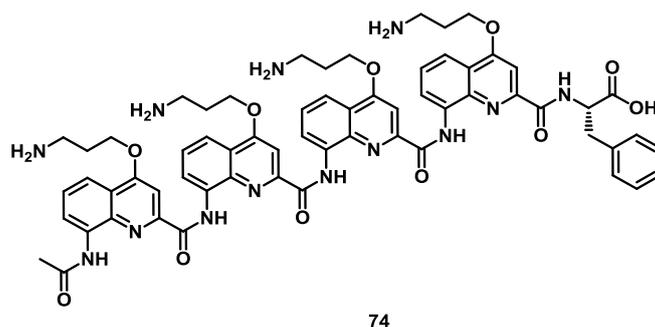


F13

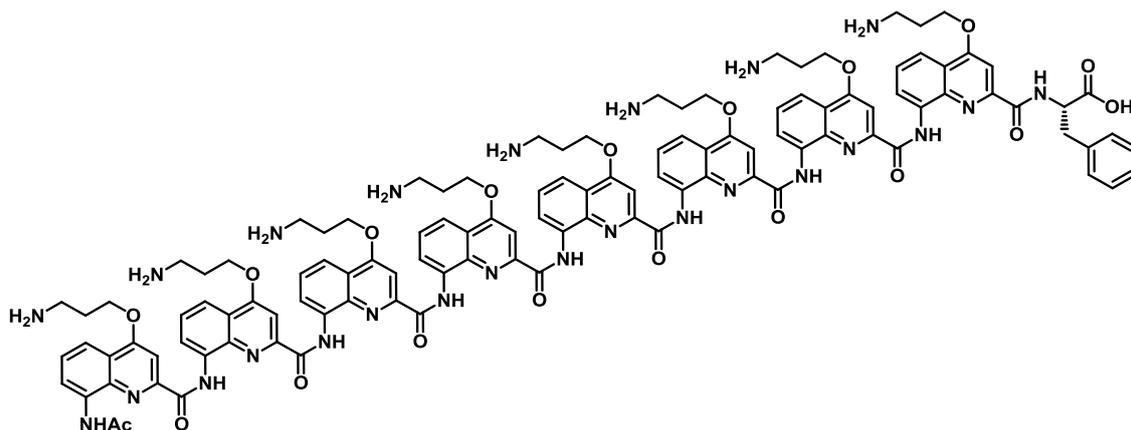
Compound F13: Crude compound was obtained in 71% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 30-60% Solvent B in 30 min ($t_r = 13.4$ min). Purified Yield = 40%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.15 (s, 1H), 11.70 (s, 1H), 11.63 (s, 1H), 9.20 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.86 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.54 – 8.34 (m, 2H), 8.09 – 7.80 (m, 7H), 7.81 – 7.60 (m, 3H), 7.56 (s, 1H), 7.51 – 7.38 (m, 2H), 7.32 – 7.08 (m, 3H), 6.95 – 6.71 (m, $J = 25.8, 7.8$ Hz, 3H), 6.61 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.87 (dd, $J = 38.3, 16.3$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 4.40 – 4.28 (m, 2H), 4.28 – 4.13 (m, 1H), 3.90 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.17 (s, 1H), 2.73 (s, 1H), 2.28 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.67 – 1.52 (m, 2H), 1.48 – 1.33 (m, 2H), 1.27 (t, $J = 6.3$ Hz, 6H). HRMS (ES⁺): m/z calcd for C₇₀H₆₆N₁₂O₁₈S [M+H]⁺: 1395.44115 found 1395.44719.



Compound F14: Crude compound was obtained in 78% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 10-100% Solvent B in 23 min ($t_r = 17.2$ min). Purified Yield = 37%. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11.98 (s, 1H), 11.84 (s, 1H), 11.62 (s, 1H), 11.58 (s, 1H), 9.16 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.90 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.54 – 8.32 (m, 3H), 8.09 – 7.78 (m, 12H), 7.78 – 7.66 (m, 3H), 7.66 – 7.55 (m, 2H), 7.53 – 7.28 (m, 5H), 7.28 – 7.10 (m, 5H), 6.82 (dd, $J = 26.4, 8.6$ Hz, 3H), 6.61 (s, 1H), 6.54 (d, $J = 12.6$ Hz, 3H), 5.07 – 4.69 (m, 2H), 4.50 – 4.26 (m, 5H), 1.69 – 1.49 (m, 2H), 1.35 – 1.16 (m, 6H). HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{68}\text{H}_{64}\text{N}_{12}\text{O}_{16}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1337.43567 found 1337.44491.

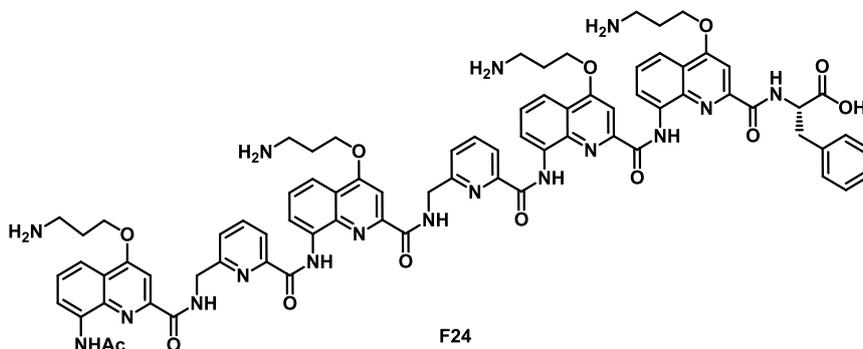


Compound 74: Crude compound was obtained in 84% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 5-50% Solvent B in 33 min ($t_r = 16.4$ min). Purified Yield = 31%. ^1H NMR of the diastereomers mixture (70/30 ratio). When possible the minor diastereomer is described in italic (300 MHz, DMSO-d_6) δ 12.48 (s, 1H), *12.06* (s, 1H), 11.62 (s, 1H), *11.53* (s, 1H), 11.52 (s, 1H), *11.36* (s, 1H), 9.20 (s, 1H), *9.04* (s, 1H), 8.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), *8.84* – 8.75 (m, 1H), 8.60 – 8.32 (m, 1H), *8.45* – 8.36 (m, 1H), 8.30 – 7.57 (m, 26H), 7.49 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.43 – 7.19 (m, 3H), 7.12 (s, 1H), 7.04 – 6.46 (m, 10H), 4.81 – 4.49 (m, 6H), 4.49 – 3.89 (m, 9H), 3.04 – 2.65 (m, 3H), 1.82 – 1.58 (m, 4H). HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{63}\text{H}_{65}\text{N}_{13}\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1180.49993 found 1180.50216.



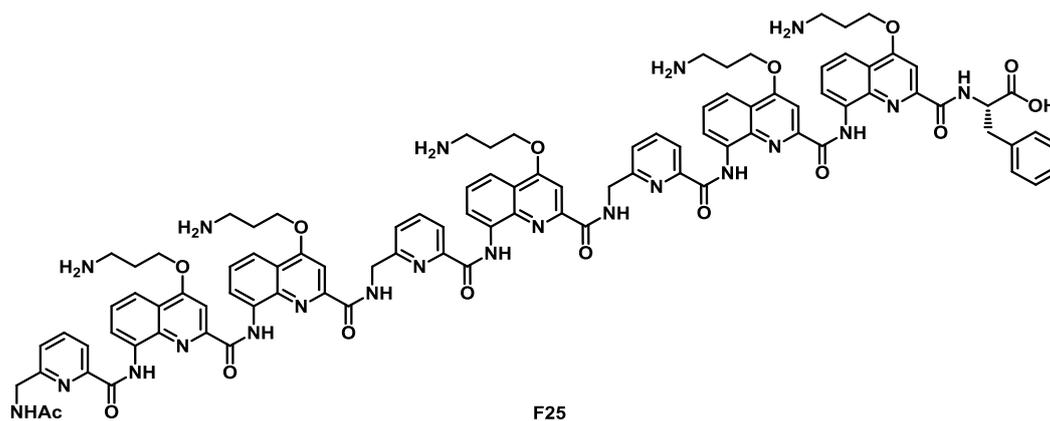
66

Compound 66: Crude compound was obtained in 97% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 10-30% Solvent B in 25 min ($t_r = 16.0$ min). Purified Yield = 40%. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.49 (s, 1H), 11.28 (s, 1H), 11.06 (s, 2H), 10.97 (s, 1H), 10.93 (s, 1H), 10.85 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.59 – 8.40 (m, 2H), 8.38 – 8.14 (m, 9H), 8.14 – 7.83 (m, 14H), 7.83 – 7.27 (m, 13H), 7.27 – 7.01 (m, 3H), 7.01 – 6.92 (m, 1H), 6.77 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.63 (s, 2H), 6.57 – 6.40 (m, 3H), 6.33 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 5.95 (s, 1H), 4.62 – 4.12 (m, 12H), 4.12 – 3.81 (m, 2H), 3.22 – 3.00 (m, 10H), 2.37 – 1.97 (m, 10H), 1.29 – 1.06 (m, 10H). HRMS (ES $^+$): m/z calcd for C $_{115}$ H $_{117}$ N $_{25}$ O $_{19}$ [M+H] $^+$: 2152.90579 found 2152.90303.

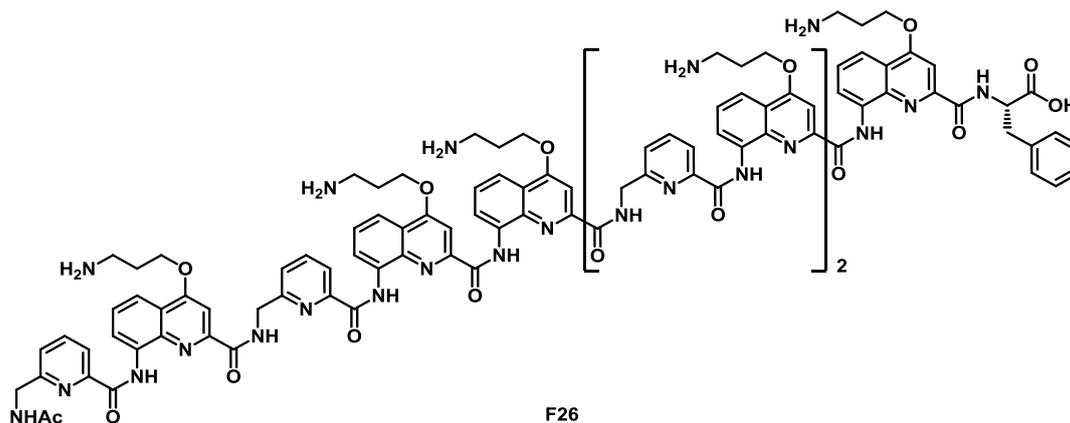


F24

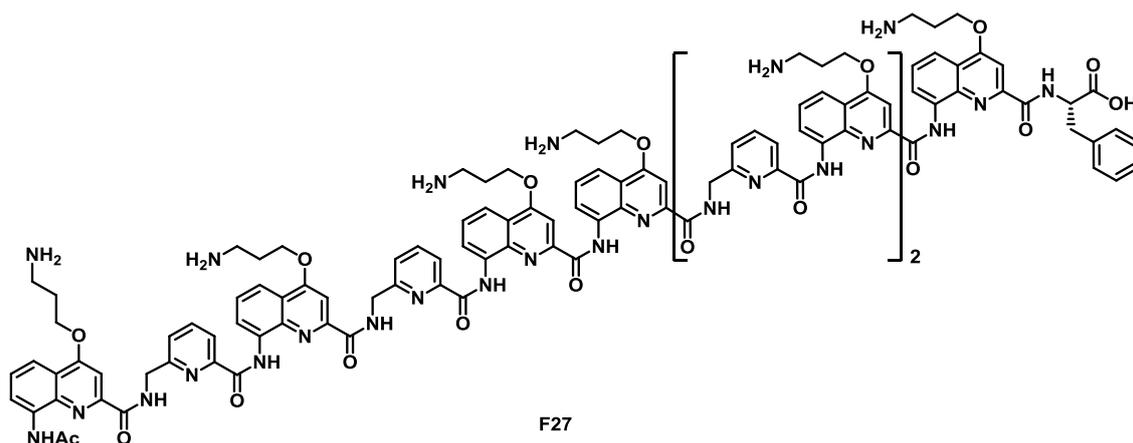
Compound F24: Crude compound was obtained in 94% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 5-50% Solvent B in 33 min ($t_r = 13.6$ min). Purified Yield = 70%. ^1H NMR (400 MHz, H $_2$ O/D $_2$ O 9:1, v/v%) δ 10.49 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 9.71 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.51 – 7.36 (m, 3H), 7.22 – 6.97 (m, 4H), 6.92 – 5.72 (m, 26H), 5.32 (s, 1H), 2.80 – 1.91 (m, 10H), 1.75 – 1.01 (m, 12H), 0.49 (d, $J = 18.1$ Hz, 2H). HRMS (ES $^+$): m/z calcd for C $_{77}$ H $_{77}$ N $_{17}$ O $_{13}$ [M+H] $^+$: 1448.59595 found 1448.59881.



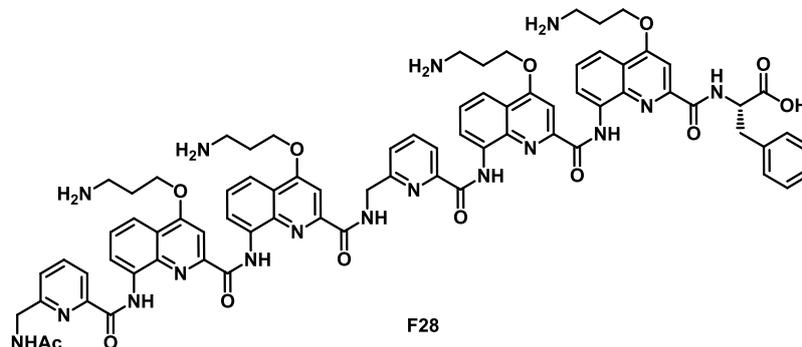
Compound F25: Crude compound was obtained in 50% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 10-40% Solvent B in 23 min ($t_r = 15.2$ min). Purified Yield = 15%. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 11.53 (s, 1H), 11.19 (s, 1H), 11.13 (s, 1H), 11.06 (s, 1H), 10.72 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.20 (s, 3H), 8.14 – 7.61 (m, 22H), 7.61 – 7.08 (m, 9H), 7.03 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.99 – 6.77 (m, 2H), 6.77 – 6.45 (m, 5H), 6.18 (s, 1H), 4.66 – 3.92 (m, 7H), 3.30 – 2.94 (m, 6H), 2.46 – 1.99 (m, 11H), 1.52 (s, 2H). HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{97}\text{H}_{96}\text{N}_{22}\text{O}_{16}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 1825.74474 found 1825.74478.



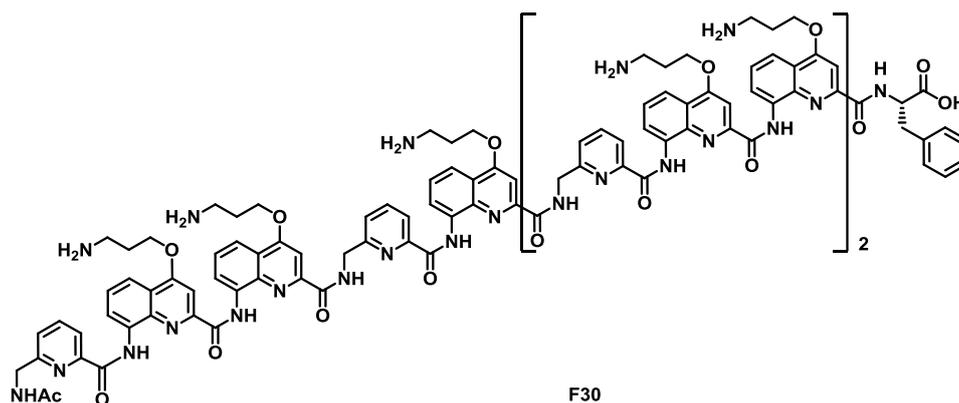
Compound F26: Crude compound was obtained in 64% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 10-40% Solvent B in 23 min ($t_r = 12.9$ min). Purified Yield = 18%. ^1H NMR of the diastereomers mixture (85/15 ratio). When possible the minor diastereomer is described in italic (300 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, $v/v\%$) δ 11.21 (s, 1H), *11.12* (s, 1H), *11.00* (s, 1H), *10.88* (s, 1H), 10.82 (s, 1H), 10.72 (s, 1H), 10.48 (s, 1H), *10.41* (s, 1H), *10.00* (s, 1H), *9.16* (s, 1H), 8.98 (s, 1H), *8.71* (s, 1H), 8.52 (s, 1H), *8.39* (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.18 – 6.71 (m, 38H), 6.62 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 5.90 (s, $J = 41.0$ Hz, 2H), 3.88 – 2.83 (m, 17H), 2.58 – 2.13 (m, 11H), 2.04 – 1.60 (m, 3H), 1.60 – 1.19 (m, 6H). HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{117}\text{H}_{115}\text{N}_{27}\text{O}_{19}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 2202.89353 found 2202.89230.



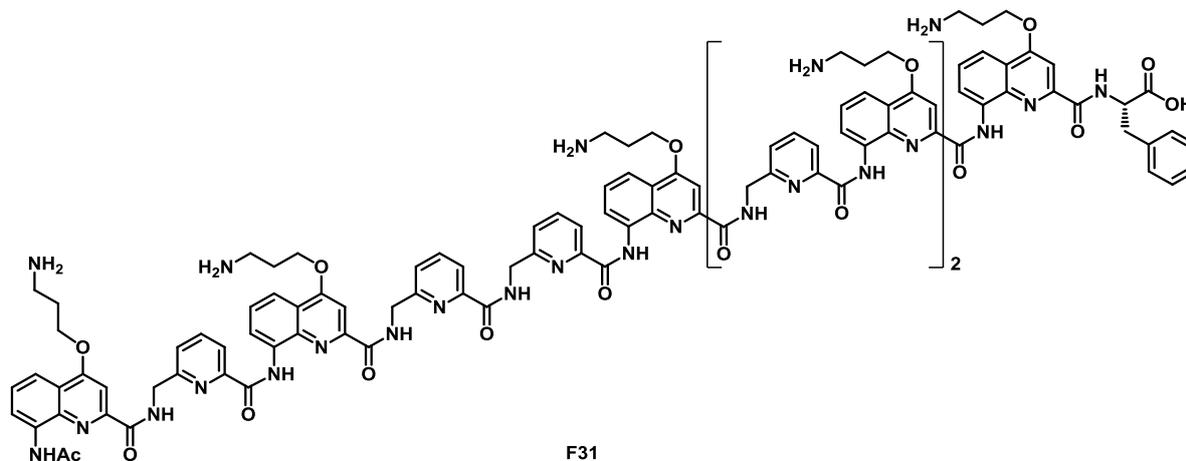
Compound F27: Crude compound was obtained in 85% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 10-35% Solvent B in 23 min ($t_r = 19.4$ min). Purified Yield = 25%. ^1H NMR (300 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, v/v%) δ 11.23 (s, 1H), 11.10 (s, 1H), 11.02 (s, 1H), 10.94 (s, 1H), 10.83 (s, 1H), 10.73 (s, 1H), 10.54 (s, 1H), 10.33 (s, 1H), 9.39 – 9.32 (m, 1H), 9.32 – 9.25 (m, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.69 – 8.58 (m, 1H), 8.58 – 8.53 (m, 1H), 8.53 – 8.39 (m, 3H), 8.18 – 8.02 (m, 8H), 8.02 – 7.76 (m, 24H), 7.76 – 7.07 (m, 25H), 6.99 (d, $J = 14.3$ Hz, 5H), 6.70 (dd, $J = 39.9, 31.8$ Hz, 10H), 6.11 (s, 1H), 6.06 – 5.67 (m, 3H), 3.71 – 3.01 (m, 10H), 2.71 – 2.06 (m, 10H), 1.32 – 1.03 (m, 3H). HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{130}\text{H}_{128}\text{N}_{30}\text{O}_{21}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 2445.99431 found 2446.02502.



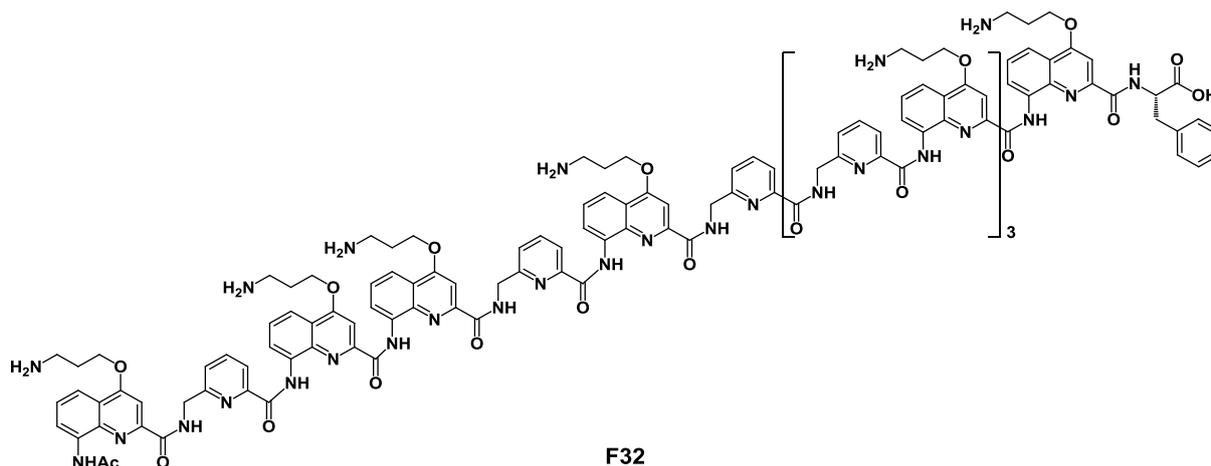
Compound F28: Crude compound was obtained in 60% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 10-50% Solvent B in 23 min ($t_r = 11.3$ min). Purified Yield = 37%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, v/v%) δ 10.10 (s, 1H), 9.69 (s, 1H), 9.59 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 7.51 – 7.16 (m, 2H), 7.16 – 6.68 (m, 8H), 6.68 – 5.83 (m, 25H), 5.83 – 5.58 (m, 2H), 5.58 – 5.14 (m, 2H), 2.64 – 1.91 (m, 9H), 1.82 – 0.89 (m, 12H). HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{77}\text{H}_{77}\text{N}_{17}\text{O}_{13}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1448.59595 found 1448.60050.



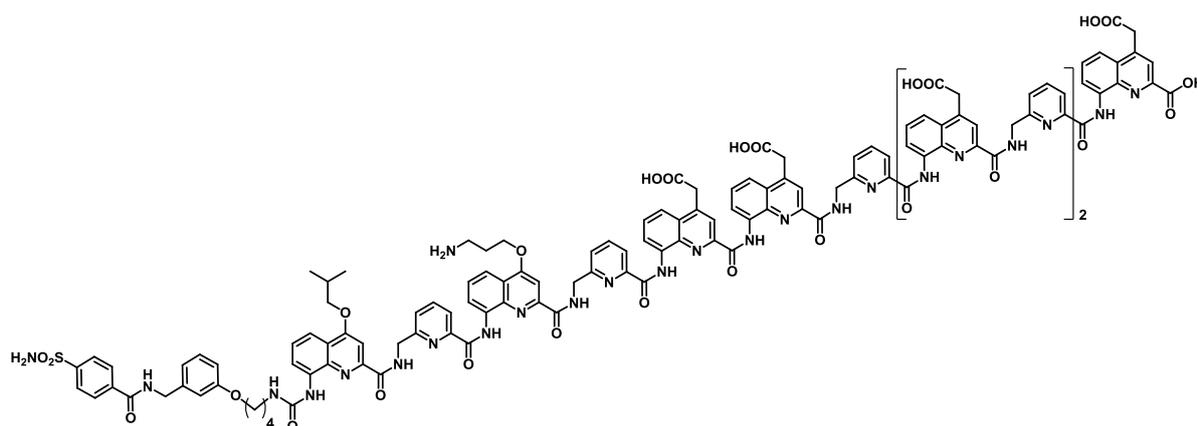
Compound F30: Crude compound was obtained in 67% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 10-40% Solvent B in 23 min (tr = 12.0 min). Purified Yield = 20%. ¹H NMR (300 MHz, H₂O/D₂O 9:1, v/v%) δ 11.28 (s, 1H), 11.16 (s, 1H), 10.99 (s, 1H), 10.71 (s, 1H), 10.68 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.24 – 7.72 (m, 22H), 7.72 – 7.59 (m, 5H), 7.59 – 7.24 (m, 10H), 7.24 – 7.03 (m, 7H), 6.95 (s, 2H), 6.91 – 6.75 (m, 3H), 6.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.61 – 6.42 (m, 3H), 6.13 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 3.84 – 3.23 (m, 18H), 3.23 – 2.84 (m, 3H), 2.77 – 2.17 (m, 14H), 2.01 – 1.72 (m, 2H), 1.69 – 1.40 (m, 2H), 1.25 (s, 3H). HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₁₃₀H₁₂₈N₃₀O₂₁ [M+H]⁺: 2445.99431 found 2446.00174.



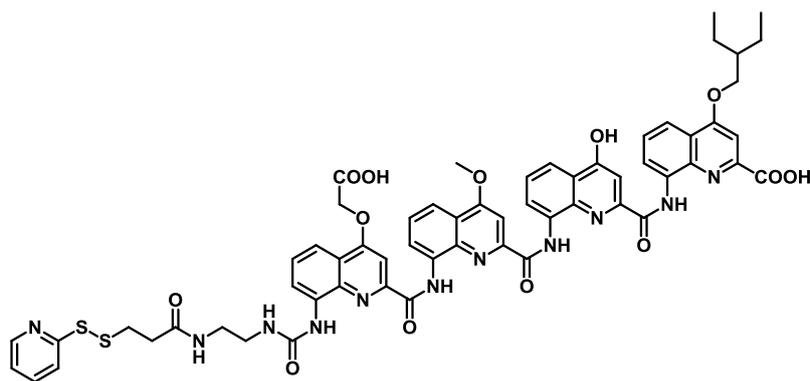
Compound F31: Crude compound was obtained in 62% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 10-40% solvent B in 30 min. Purified Yield = 17%. ¹H NMR (300 MHz, H₂O/D₂O 9:1, v/v%) δ 10.98 (s, 1H), 10.95 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 9.68 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.30 – 8.01 (m, 4H), 8.01 – 6.46 (m, 50H), 6.31 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.17 (s, 1H), 5.55 (s, 1H), 3.85 – 3.54 (m, 2H), 3.49 – 3.01 (m, 13H), 2.59 – 1.83 (m, 13H), 1.83 – 1.41 (m, 4H), 1.41 – 0.98 (m, 5H). HRMS (ES⁺): *m/z* calcd for C₁₂₄H₁₂₁N₂₉O₂₀ [M+H]⁺: 2336.94154 found 2336.94396.



Compound F32: Crude compound was obtained in 48% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 10-40% Solvent B in 30 min ($t_r = 18.2$ min). Purified Yield = 8%. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.26 (s, 2H), 10.93 (s, 2H), 10.36 (s, 2H), 9.89 (s, 1H), 9.35 (s, 2H), 9.11 (s, 4H), 8.35 – 8.15 (m, 13H), 8.12 – 7.85 (m, 25H), 7.80 – 7.67 (m, 8H), 7.62 – 7.54 (m, 4H), 7.52 – 7.25 (m, 15H), 7.24 – 7.13 (m, 6H), 7.08 – 6.92 (m, 8H), 6.89 – 6.76 (m, 4H), 6.75 – 6.52 (m, 8H), 6.41 (s, 3H), 4.64 – 3.87 (m, 10H), 2.38 – 2.03 (m, 23H), 1.58 (s, 4H).

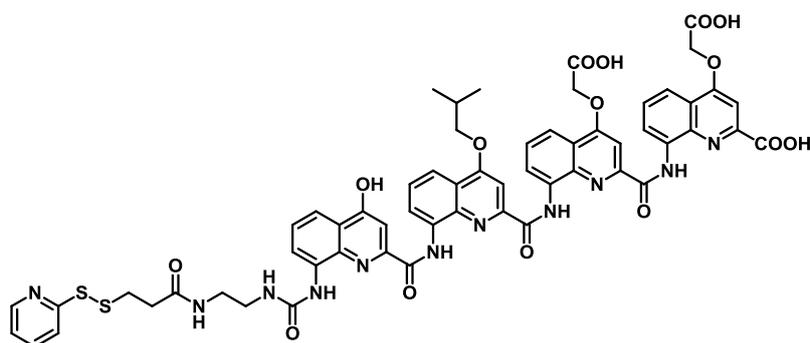


Compound F33: Crude compound was obtained in 40% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 10-40% Solvent B in 30 min ($t_r = 16.1$ min). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11.27 (s, 1H), 11.18 (s, 1H), 10.91 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 10.60 (s, 1H), 10.24 (s, 1H), 9.13 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 9.03 – 8.88 (m, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.25 – 8.07 (m, 3H), 8.07 – 7.95 (m, 3H), 7.85 (dd, $J = 20.6, 9.6$ Hz, 8H), 7.77 – 7.51 (m, 9H), 7.51 – 7.22 (m, 13H), 7.22 – 7.04 (m, 5H), 7.04 – 6.97 (m, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.82 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.77 – 6.68 (m, 2H), 6.68 – 6.56 (m, 2H), 6.50 (s, 1H), 6.42 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.36 – 6.21 (m, 1H), 4.39 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.96 – 3.83 (m, 4H), 3.83 – 3.60 (m, 4H), 2.33 – 1.93 (m, 6H), 1.77 – 1.41 (m, 9H), 1.32 – 1.08 (m, 11H), 1.01 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H), 0.94 – 0.72 (m, 2H).



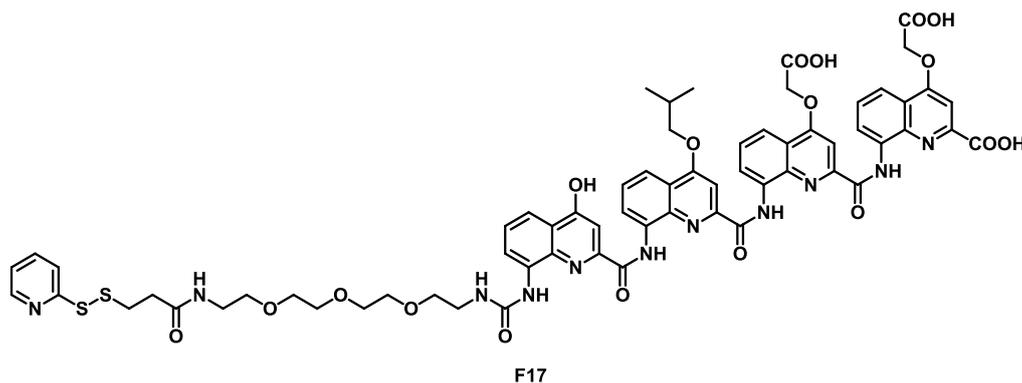
F15

Compound F15: Crude compound was obtained in 60% purity. The compound was purified by precipitation in DMSO/MeOH. Purified Yield = 46%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.37 (s, 1H), 12.22 (s, 1H), 11.71 (s, 1H), 11.68 (s, 1H), 8.84 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.33 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.99 – 7.53 (m, 10H), 7.35 – 7.24 (m, 2H), 7.24 – 7.18 (m, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.73 – 6.66 (m, 1H), 6.62 (s, 1H), 5.32 – 5.00 (m, 2H), 4.28 (s, 3H), 4.06 (s, 1H), 3.95 (s, 1H), 3.08 – 2.84 (m, 6H), 2.74 (s, 2H), 2.46 – 2.34 (m, 2H), 1.92 – 1.79 (m, 2H), 1.71 – 1.54 (m, 4H), 1.33 – 1.23 (m, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.06 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). HRMS (ES $^+$): m/z calcd for C₆₀H₅₅N₁₁O₁₃S₂ [M+H] $^+$: 1020.34950 found 1202.35525.

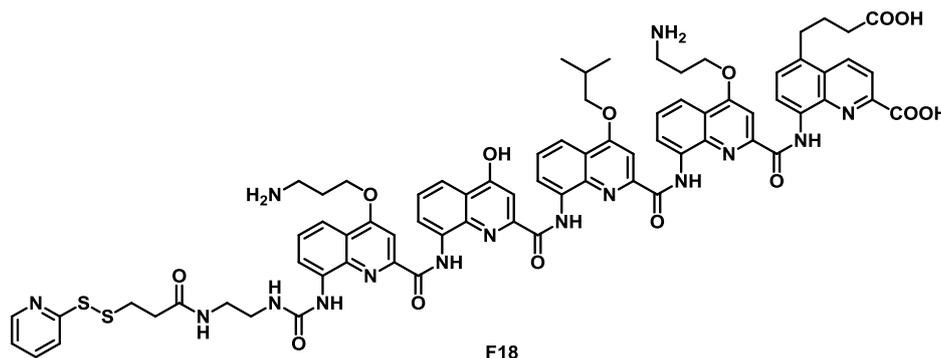


F16

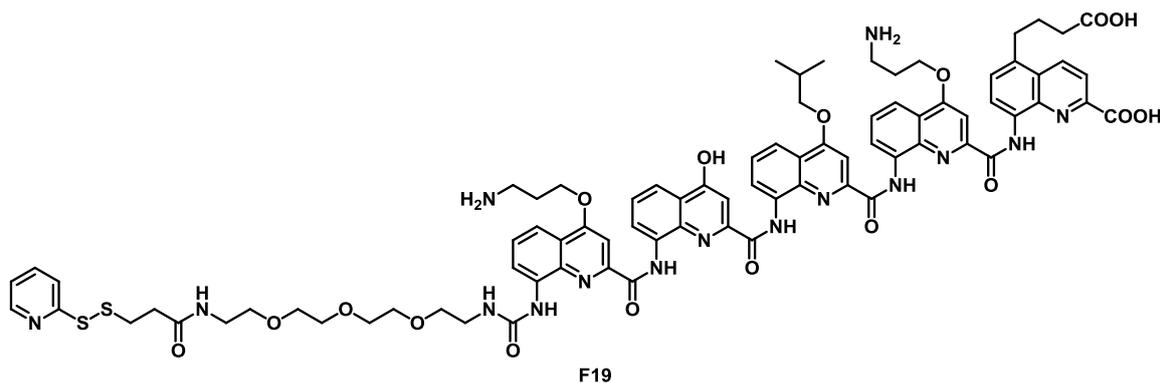
Compound F16: Crude compound was obtained in 86% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 10-50% Solvent C in 23 min ($t_r = 9.0$ min). Purified Yield = 62%. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.21 (s, 1H), 11.68 (s, 1H), 11.62 (s, 1H), 8.87 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.49 – 8.28 (m, 3H), 7.98 – 7.54 (m, 10H), 7.45 – 7.29 (m, 1H), 7.30 – 7.11 (m, 2H), 6.68 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.04 – 4.65 (m, 2H), 4.48 – 4.19 (m, 2H), 3.80 – 3.35 (m, 3H), 3.21 – 3.05 (m, 2H), 2.94 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.36 – 1.06 (m, 17H). HRMS (ES $^+$): m/z calcd for C₅₉H₅₁N₁₁O₁₅S₂ [M+H] $^+$: 1216.29238 found 1216.29617.



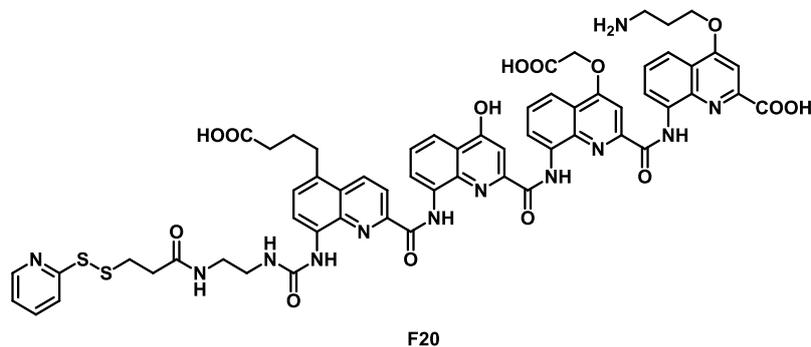
Compound F17: The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 10-50% Solvent C in 23 min ($t_r = 8.8$ min). Purified Yield = 27%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.17 (s, 1H), 11.62 (s, 1H), 11.56 (s, 1H), 8.85 – 8.71 (m, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.36 (s, 2H), 8.01 – 7.46 (m, 12H), 7.33 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.21 – 7.05 (m, 3H), 6.71 – 6.56 (m, 2H), 6.54 – 6.43 (m, 1H), 4.97 – 4.63 (m, 5H), 4.21 (d, $J = 30.7$ Hz, 3H), 3.23 (s, 1H), 3.12 – 3.00 (m, 2H), 3.00 – 2.87 (m, 3H), 2.79 (s, 1H), 2.39 (s, 2H), 2.32 – 2.16 (m, 1H), 1.33 – 0.98 (m, 12H). HRMS (ES $^+$): m/z calcd for C₆₅H₆₃N₁₁O₁₈S₂ [M+H] $^+$: 1348.37102 found 1348.37407.



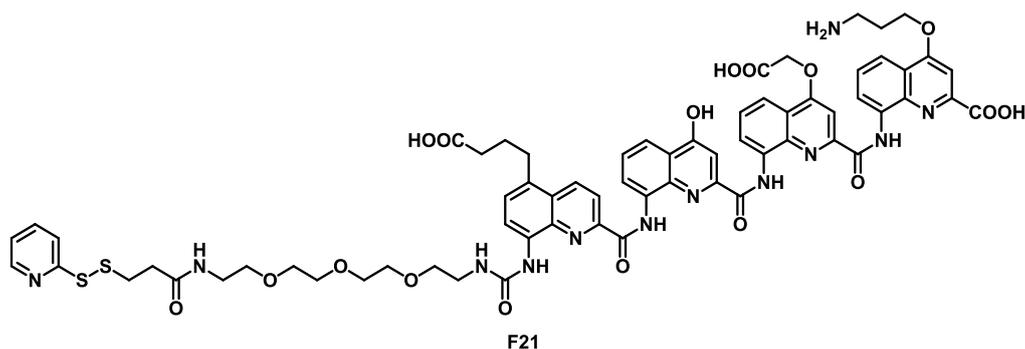
Compound F18: Crude compound was obtained in 90% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 15-50% Solvent B in 23 min ($t_r = 16.2$ min). Purified Yield = 66%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.06 (s, 1H), 11.75 (s, 1H), 11.70 (s, 1H), 11.61 (s, 1H), 11.53 (s, 1H), 8.44 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.39 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 8.31 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.08 – 7.86 (m, 5H), 7.86 – 7.71 (m, 2H), 7.71 – 7.50 (m, 6H), 7.42 – 7.31 (m, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.23 – 7.09 (m, 4H), 6.81 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.36 – 6.25 (m, 1H), 4.74 – 4.62 (m, 2H), 4.61 – 4.47 (m, 2H), 4.43 – 4.32 (m, 2H), 4.29 – 4.21 (m, 2H), 4.12 – 4.00 (m, 2H), 3.89 – 3.76 (m, 2H), 3.29 – 3.09 (m, 2H), 3.10 – 2.95 (m, 1H), 2.85 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.81 – 2.61 (m, 3H), 2.61 – 2.19 (m, 9H), 2.14 – 1.86 (m, 2H), 1.32 – 1.11 (m, 8H). HRMS (ES $^+$): m/z calcd for C₇₅H₇₃N₁₅O₁₄S₂ [M+H] $^+$: 1472.49756 found 1472.50208.



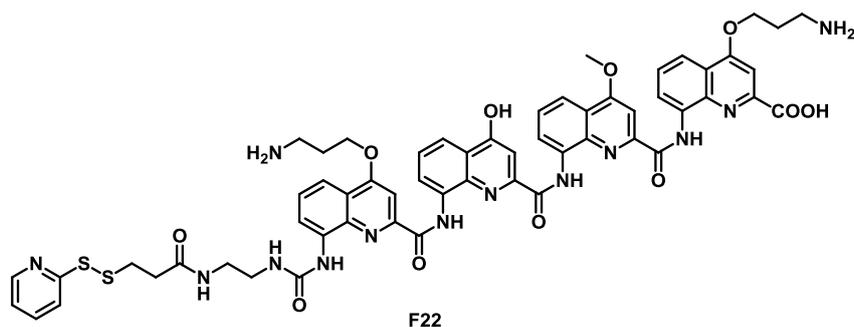
Compound F19: Crude compound was obtained in 68% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 3-50% Solvent B in 25 min ($t_r = 19.7$ min). Purified Yield = 46%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.77 (s, 1H), 11.72 (s, 1H), 11.62 (s, 1H), 11.53 (s, 1H), 8.47 – 8.39 (m, 2H), 8.39 – 8.25 (m, 2H), 8.04 – 7.86 (m, 4H), 7.85 – 7.75 (m, 2H), 7.76 – 7.66 (m, 2H), 7.66 – 7.57 (m, 3H), 7.54 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.42 – 7.32 (m, 2H), 7.27 – 7.09 (m, 5H), 6.80 (s, 1H), 6.63 – 6.57 (m, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.72 – 4.59 (m, 2H), 4.56 – 4.48 (m, 2H), 4.41 – 4.32 (m, 2H), 4.29 – 4.18 (m, 2H), 4.11 – 4.01 (m, 2H), 3.90 – 3.80 (m, 2H), 3.33 – 3.15 (m, 5H), 3.15 – 2.87 (m, 7H), 2.75 – 2.56 (m, 4H), 2.45 – 2.34 (m, 4H), 2.30 (brs, 3H), 2.13 – 1.94 (m, 4H), 1.18 (d, $J = 23.7$ Hz, 8H). HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{81}\text{H}_{85}\text{N}_{15}\text{O}_{17}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1604.7620 found 1604.24008.



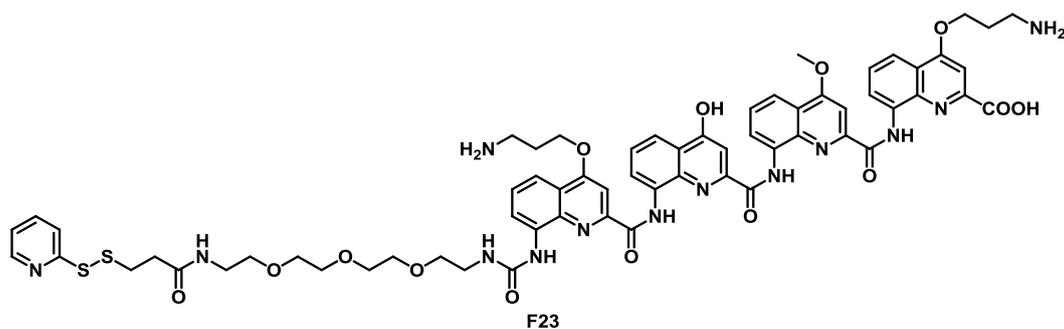
Compound F20: Crude compound was obtained in 81% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 30-70% Solvent B in 25 min ($t_r = 5$ min). Purified Yield = 34%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.19 (s, 1H), 12.03 (s, 1H), 11.63 (s, 1H), 11.62 (s, 1H), 8.91 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 8.70 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.45 – 8.37 (m, 2H), 8.28 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.13 – 7.64 (m, 9H), 7.57 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.38 – 7.31 (m, 2H), 7.24 – 7.12 (m, 4H), 7.06 (s, 2H), 6.75 – 6.52 (m, 2H), 5.06 – 4.79 (m, 2H), 4.35 – 4.05 (m, 3H), 3.16 (s, 2H), 3.04 – 2.80 (m, 4H), 2.74 (s, 2H), 2.45 – 2.34 (m, 2H), 2.25 (s, 2H), 2.19 – 1.93 (m, $J = 16.8$ Hz, 3H), 1.23 (s, 1H). HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{54}\text{N}_{12}\text{O}_{14}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1229.32401 found 1229.32590.



Compound F21: Crude compound was obtained in 68% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 30-70% Solvent B in 25 min ($t_r = 6$ min). Purified Yield = 44%. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.21 (s, 1H), 11.62 (s, 1H), 11.59 (s, 1H), 8.90 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 8.02 – 7.54 (m, 17H), 7.39 – 7.30 (m, 2H), 7.24 – 7.17 (m, 2H), 7.11 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 6.72 – 6.56 (m, 4H), 4.88 – 4.58 (m, 4H), 4.31 – 4.04 (m, 6H), 3.12 (s, 1H), 2.95 (d, $J = 5.2$ Hz, 4H), 2.35 – 1.93 (m, 9H), 1.31 – 1.18 (m, 6H). HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{66}\text{H}_{66}\text{N}_{12}\text{O}_{17}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1363.41048 found 1363.42293.



Compound F22: Crude compound was obtained in 75% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 13-50% Solvent B in 25 min ($t_r = 13$ min). Purified Yield = 37%. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12.22 (s, 1H), 11.97 (s, 1H), 11.74 (s, 1H), 11.66 (s, 1H), 8.86 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.44 – 8.34 (m, $J = 17.3, 9.8$ Hz, 3H), 8.06 – 7.58 (m, 15H), 7.33 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.30 – 7.16 (m, 3H), 6.75 (s, 1H), 6.69 – 6.59 (m, 2H), 4.74 – 4.42 (m, 4H), 4.34 – 4.09 (m, 4H), 3.26 (brs, 1H), 3.15 (brs, 2H), 3.04 – 2.80 (m, 4H), 2.78 – 2.62 (m, 2H), 2.47 – 2.29 (m, 4H), 2.24 (brs, 3H). HRMS (ES^+): m/z calcd for $\text{C}_{58}\text{H}_{55}\text{N}_{13}\text{O}_{11}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1174.36582 found 1174.36791.



Compound F23: Crude compound was obtained in 69% purity. The compound was purified through HPLC purification; Gradient: 20-70% Solvent B in 25 min (tr = 10.6 min). Purified Yield = 37%. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.24 (s, 1H), 11.73 (s, 1H), 11.65 (s, 1H), 8.85 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.50 – 8.34 (m, 2H), 8.05 – 7.92 (m, 1H), 7.92 – 7.56 (m, 9H), 7.33 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.29 – 7.13 (m, 3H), 6.75 (s, 1H), 6.67 (s, 2H), 4.77 – 4.40 (m, 4H), 4.33 – 4.08 (m, 4H), 4.02 (s, 4H), 3.32 – 3.18 (m, 2H), 3.19 – 3.07 (m, 3H), 3.02 – 2.89 (m, 3H), 2.47 – 2.40 (m, 2H), 2.40 (s, 2H), 2.24 (brs, 2H), 2.08 (s, 1H). HRMS (ES $^+$): m/z calcd for C₆₄H₆₇N₁₃O₁₄S₂ [M+H] $^+$: 1306.44446 found 1306.44969.

4 Circular dichroism

4.1 In the presence of HCA (chapter 3)

Samples were prepared by adding slowly and stirring gently 1 equiv. of the foldamer (dissolved in DMSO at a 10 mM concentration) to a solution containing HCAII (34.5 μM) in a 50 mM NaH₂PO₄ buffer at pH = 7.4. The samples were stirred gently for 2h then incubated 48 h to let the foldamers reach their equilibrium. Then CD experiments were performed to detect the interaction between foldamers and protein.

4.2 With IL-4 and CypA (chapter 4)

Samples were prepared by adding slowly and stirring gently 2 equiv. of the foldamer (dissolved in DMSO at a 10 mM concentration) to a solution containing CypA or IL-4 (20 μM) in a 10 mM Tris buffer, 50 mM NaCl, pH = 7.5. Foldamers were incubated 48 h in the presence of the protein. Then CD experiments were performed to detect the interaction of the foldamers with the protein.

4.3 For (PQ) $_n$ foldamers (chapter 5)

Foldamers were dissolved in DMSO. Samples were prepared to be at a 35 μM concentration (when 300 μL of solvent are added). DMSO was freeze dried and samples lyophilized three times with water to ensure the complete removal of DMSO. Foldamers were incubated 20 min in 50 μL of pure TFA. TFA was removed by a gentle air flow. 300 μL of buffered water (H₂O+ 12.5 mM NH₄OAc, pH = 7.2) were added and the evolution of CD spectrum was measured overtime at 22 or 37 $^\circ\text{C}$.

5 Cocrystallisation of foldamers in the presence of HCA

A stock solution of foldamer was prepared (10 mM) in DMSO. HCAII used is the recombinant enzyme expressed and purified according to Reference 1. Cocrystals were obtained by the hanging drop technique, using 0.3 mM solution of protein preincubated 3 days at 4°C with 1.2 equiv. of foldamer in 50 mM Tris buffer (pH 8). The drops consisted of 1.2 µl of complex and 1.2 µl of the precipitant solution containing 200 mM zinc acetate, 0.3 mM NaN₃, 20-25 % PEG 8000 in sodium cacodylate 100 mM (pH 6.9 for **F11**, 7.1 for **F13** and 6.0 to 7.6 for **F12**). The drops were equilibrated by vapour diffusion against the precipitant solution at room temperature.

1. Hu, P. Y.; Waheed, A.; Sly, W. S., Partial rescue of human carbonic anhydrase II frameshift mutation by ribosomal frameshift. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 2136.
2. Baptiste, B.; Douat-Casassus, C.; Laxmi-Reddy, K.; Godde, F.; Huc, I., Solid Phase Synthesis of Aromatic Oligoamides: Application to Helical Water-Soluble Foldamers. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7175.
3. Chan, W.; White, P., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. OUP Oxford: 2000.

6 Data collection and refinement statistics

	HCA-F13	HCA-F11	HCA-F12
X-ray Data	260a1a	293c2	307b2
X-ray source	Soleil - Proxima2	Soleil - Proxima2	Soleil - Proxima2
Wavelength (Å)	0.9801	0.9801	0.9801
Resolution (Å)	46.0-2.90 (3.07-2.90)	2.65 (2.79-2.65)	43.54-2.20 (2.32-2.20)
Space Group	<i>I</i> 2	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁
Cell dimension (Å)	a = 125.97 b = 75.14 c = 141.10	44.49 83.81 79.85	44.21 83.37 79.41
Angles (°)	α = 90.0 β = 100.08 γ = 90.0	90.0 99.98 90.0	90.0 99.98 90.0
Asymmetric unit	4 molecules	2 molecules	2 molecules
Unique reflexions	28671 (4415)	15030 (2254)	27767 (4021)
Multiplicity	3.1 (3.0)	2.5 (2.5)	3.2
Completeness (%)	98.1 (94.1)	89.8 (92.3)	96.4 (96.1)
R _{merg}	0.151 (0.485)	0.138 (0.412)	0.128 (0.348)
Refinement			
Resolution (Å)	46.0-2.90 (2.97-2.90)	78.64-2.65 (2.72-2.65)	57.0-2.20 (2.26-2.22)
R _{fact} (%)	0.242 (0.33)	0.221 (0.281)	0.175 (0.215)
R _{free} (%)	0.270 (0.42)	0.278 (0.388)	0.236 (0.284)
r.m.s. bonds (Å)	0.011	0.013	0.012
r.m.s. angles (°)	1.39	1.64	1.56
No. of atoms			
Total	8501	4427	4593
Ligand	381	198	198
Water	160	177	334
Zn	27	15	13
Glycerol	24	24	24
PDB code	5L9E	5L6T	5L70

References

1. Hu, P. Y.; Waheed, A.; Sly, W. S., Partial rescue of human carbonic anhydrase II frameshift mutation by ribosomal frameshift. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 2136.
2. Baptiste, B.; Douat-Casassus, C.; Laxmi-Reddy, K.; Godde, F.; Huc, I., Solid Phase Synthesis of Aromatic Oligoamides: Application to Helical Water-Soluble Foldamers. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7175.
3. Chan, W.; White, P., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. OUP Oxford: 2000.

Titre : Reconnaissance de surfaces de protéines par les foldamères d'oligoamides aromatiques

Résumé : Les protéines étant au cœur d'un grand nombre de processus biologiques, elles sont des cibles thérapeutiques largement convoitées. Les foldamères, notamment les oligoamides aromatiques, présentent une structure bien définie, prévisible, stable en solution et à l'état solide. Ajouté à cela, leur taille moyenne en fait de bons candidats pour la reconnaissance de surfaces de protéines, grâce à leurs chaînes latérales protéinogènes. Cette thèse présente les différentes étapes de leur conception, de la synthèse de la brique constitutive à l'obtention d'un foldamère fonctionnalisé grâce à la synthèse en phase supportée. La stratégie d'investigation des interactions entre un foldamère et une protéine est détaillée. L'originalité réside dans le fait que le foldamère est ancré directement à la protéine et le dichroïsme circulaire sert de méthode de screening. L'analyse structurale des hits permet de générer de nouveaux foldamères dans le but d'améliorer les interactions avec la protéine : c'est une stratégie itérative. Cette approche est appliquée premièrement à l'anhydrase carbonique humaine II, protéine modèle qui sert de preuve de principe pour cette approche ; puis à des protéines d'intérêt thérapeutique plus important : l'interleukine 4 et la cyclophiline A. Enfin, une étude concernant l'introduction de flexibilité au sein de foldamères de quinolines est présentée.

Mots clés : foldamère d'oligoamides aromatiques, reconnaissance de surface de protéine, quinoline, anhydrase carbonique humaine II (HCA), interleukine 4 (IL-4), cyclophiline A (CypA), analyse structurale, cinétique d'inversion d'hélicité.

Title: Protein surface recognition using aromatic oligoamide foldamers

Abstract: Since proteins are at the basis of many biological processes, they are widely studied as therapeutic targets. Aromatic oligoamide foldamers have a very well defined structure, predictable and stable both in solution and solid state. Because of their medium size, they appear as potent candidates for protein surface recognition thanks to their proteinogenic side chains. This manuscript presents the different steps of their design, from the scaffold's synthesis to obtaining a functionalized foldamer, thanks to solid phase synthesis. The strategy to investigate protein/foldamer interactions will be detailed. Its originality lies in the fact that the foldamer is anchored to the protein. Circular dichroism has been used as a screening method to detect foldamer/protein interactions. Structural analysis of the hits will allow the design of new foldamers with the objective of enhancing foldamer/protein interactions: it is an iterative strategy. This approach has been applied firstly to human carbonic anhydrase II (HCA). This protein is used as a model system and proof of concept before moving to more therapeutically relevant proteins; interleukin 4 and cyclophilin A. Finally, a study on introducing flexibility in quinoline foldamers is presented.

Keywords: aromatic oligoamide foldamers, protein surface recognition, quinoline, human carbonic anhydrase II (HCA), interleukin 4 (IL-4), cyclophilin A (CypA), structural analysis, kinetic of handedness inversion.

Unités de recherche

Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB) ; Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjets (CBMN) ; 2, Rue Robert Escarpit, 33607 PESSAC