



HAL
open science

Synthèses et analyses structurales d'oligomères d'ATCs : une nouvelle famille de γ -aminoacides hétérocycliques pour la conception de foldamères

Loic Mathieu

► To cite this version:

Loic Mathieu. Synthèses et analyses structurales d'oligomères d'ATCs : une nouvelle famille de γ -aminoacides hétérocycliques pour la conception de foldamères. Polymères. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT3514 . tel-01513215

HAL Id: tel-01513215

<https://theses.hal.science/tel-01513215>

Submitted on 24 Apr 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

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**UNIVERSITE DE MONTPELLIER 1**

Préparée au sein de l'école doctorale ED 459,
Sciences Chimiques Balard

Et de l'unité de recherche CNRS - UMR 5247
(Institut des Biomolécules Max Mousseron)

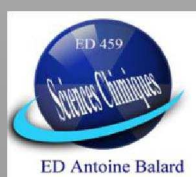
Spécialité : **Ingénierie Moléculaire**

Présentée par **Loïc MATHIEU**

**SYNTHESES ET ANALYSES STRUCTURALES D'OLIGOMERES
D'ATCs - UNE NOUVELLE FAMILLE DE γ -AMINOACIDES
HETEROCYCLIQUES POUR LA CONCEPTION DE
FOLDAMERES**

Soutenue le 15 janvier 2015 devant le jury composé de

Mme Sophie FAURE Chargée de Recherche, CNRS - Institut de Chimie de Clermont- Ferrand, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand	Rapporteur
Mr Emeric MICLET Maître de conférences, CNRS - Laboratoire des Biomolécules, Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris 6	Rapporteur
Mr Ivan HUC Directeur de Recherche, CNRS - Institut Européen de Chimie et Biologie, Université de Bordeaux	Examineur
Mr Michel VIDAL Professeur, CNRS - Unité « Synthèse et Structure de Molécules d'Intérêt Pharmacologique », Université Paris 5	Examineur
Mr Jean MARTINEZ Professeur, CNRS - Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier 1	Examineur
Mr Vincent LISOWSKI Professeur, CNRS - Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier 1	Directeur de Thèse
Mr Ludovic MAILLARD Maître de conférences, CNRS - Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier 1	Co-encadrant de Thèse



ED Antoine Balard



A mes parents Nicole et Pascal,

A mon frère Jérémy,

A mon grand-père Jules

Le temps est venu pour moi de remercier l'ensemble des personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet de thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Jean MARTINEZ, directeur de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie très sincèrement mes directeurs de thèse, le Docteur Ludovic MAILLARD et le Professeur Vincent LISOWSKI, pour leur confiance, leurs conseils ainsi que la liberté qu'ils m'ont accordée durant cette thèse. Ils m'auront permis d'acquérir non seulement de nombreuses connaissances techniques et scientifiques mais également une plus grande autonomie de travail.

Un grand merci au Docteur Baptiste LEGRAND pour sa participation et sa profonde implication dans ce projet.

J'en profite également pour remercier les Docteurs Stéphane DELBECQ et Alain CHAVANIEU qui ont su consacrer du temps à ma formation quant à la production et purification de protéines. A ce titre, je ne peux oublier la précieuse aide de mes collègues Anaïs et le Docteur Jad ROUHANA qui m'ont particulièrement épaulé lors de ce projet.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à ceux que certains ont tendance à oublier, l'ensemble de mes stagiaires qui, par leur motivation et leur dévouement, ont participé à la concrétisation de ce projet de thèse : Laetitia, Majda, Nina, Clément et Alexy.

J'adresse mes remerciements à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au sein des autres équipes et services et qui, au travers de nos discussions, formelles et informelles, m'ont renseigné et donné de nouvelles idées. Je remercie notamment le Docteur Jean-Louis BANERES qui a su m'accorder son temps et son expertise.

Je remercie sincèrement l'ensemble des membres ayant accepté de participer à mon jury de thèse.

A mes rapporteurs qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail ;

- le Docteur Sophie FAURE, Chargée de recherche CNRS à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Blaise Pascal,

- le Docteur Emeric MICLET, Maître de conférences à l'Université Pierre-et-Marie-Curie

A mes examinateurs qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail ;

- le Docteur Ivan HUC, Directeur de recherche CNRS à l'Institut Européen de Chimie et de Biologie,
- le Professeur Michel VIDAL, Professeur à l'Université Paris 5

Au Professeur Jean MARTINEZ, Professeur à l'Université Montpellier 1 et Directeur de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron.

J'ai eu la chance d'évoluer au sein d'une équipe formidable comme il en existe probablement peu. Cette ambiance chaleureuse contribue largement à la réputation du laboratoire et à la concrétisation des projets. Il me faudrait tant de pages pour citer tout ce que chacun d'entre vous m'a apporté que le propos de cette thèse s'en trouverait dilué.

Si je suis sorti grandi de cette expérience, c'est à chacun d'entre vous que je le dois.

Merci à vous Philippe et Pierrette, vous qui avez su trouver le langage idéal pour que l'on puisse échanger et évoluer.

Enfin ceux sans qui cette aventure n'aurait été possible : mes parents Nicole, Pascal et mon frère Jérémy qui m'ont toujours encouragé, épaulé et apporté tout ce qu'il fallait pour réussir. C'est grâce à vous si j'ai aujourd'hui l'opportunité de prétendre au titre de Docteur.

Merci à Priscillia qui a su m'apporter son écoute et un soutien moral indéfectible pendant toutes ces années.

Abréviations

Codes à trois lettres des acides aminés :

Ala, A : Alanine

Arg, R : Arginine

Asn, N : Asparagine

Asp, D : Acide aspartique

Cys, C : Cystéine

Gln, Q : Glutamine

Glu, E : Acide glutamique

Gly, G : Glycine

His, H : Histidine

Leu, L : Leucine

Lys, K : Lysine

Met, M : Méthionine

Phe, F : Phénylalanine

Pro, P : Proline

Ser, S : Sérine

Thr, T : Thréonine

Trp, W : Tryptophane

Tyr, Y : Tyrosine

Val, V : Valine

Groupements protecteurs :

Ac : Acétyle

Bn : Benzyle

Boc : *Tert*-butyloxycarbonyle

Fmoc : 9-Fluorénylméthylloxycarbonyl

Pbf : 2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyle

tBu : *Tert*-butyle

Trt : Trityle

Réactifs, produits, tampons, enzymes, protéines et solvants :

Ac₂O : Anhydride acétique

AcOEt : Acétate d'éthyle
AcOH : Acide acétique
ATC : Acides 4-Amino-(méthyl)-1,3-Thiazole-5-Carboxylique
 β -hAA : β -amino acide
BME : β -mercaptoéthanol
BOP : Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate
DCM : Dichlorométhane
DMAP : 4-Diméthylaminopyridine
DMF : Diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DEA : Diéthylamine
DIC : *N,N'*-Diisopropylcarbodiimide
DIEA : *N,N*-Diisopropyléthylamine
DTT : Dithiothréitol
EDCI : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
His-tag : Etiquette polyhistidine
HOBt : 1-Hydroxybenzotriazole
HBTU : *O*-Benzotriazole-*N,N,N',N'*-tétraméthyl-uronium hexafluorophosphate
IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB : Milieu de culture "Lysogeny Broth"
NCoA-1 : Nuclear receptor CoActivator 1
NMM : *N*-Méthylmorpholine
STAT6 : Signal Transducer and Activator of Transcription 6
TEV : Protéase du virus de la gravure du tabac
TFA : Acide trifluoroacétique
TFE : Trifloroéthanol
THF : Tétrahydrofurane
TIS : Triisopropylsilane
TRIS : Trishydroxyméthylaminométhane

Techniques d'analyses et termes associés :

δ : Déplacement chimique (en ppm)

λ : Longueur d'onde (en nm)
COSY: COrrrelation SpectroscopY
DC : Dichroïsme circulaire
DRX : Diffraction des rayons X
ESI : Electrospray Ionisation
HiPrep : Colonne d'exclusion stérique pour le dessalage et changement de tampon
HisTrap : Colonne de chromatographie d'affinité (ions métalliques immobilisés), i.e Ni-NTA
HPLC : Chromatographie liquide haute performance
LC-MS : Chromatographie liquide - spectrométrie de masse
Ni-NTA : voir HisTrap
NOE : Nuclear Overhauser Effect
NOESY : Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD : Root Mean Squared Deviation
ROE : Rotating-frame Overhauser Effect
ROESY : Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY
SDS Page : Electrophorèse sur gel d'acrylamide
TOCSY : TOtal Correlated SpectroscopY

Abréviations diverses :

C-ter : Extrémité terminale carboxy-
Coll. : Collaborateurs
eq. : Equivalents
MW : Masse molaire
N-ter : Extrémité terminale amino-
pH : Potentiel hydrogène
ppm : Partie par million
Rdt : Rendement
Res : Résidu
Rf : Rapport frontal
TA/RT : Température ambiante
tr : Temps de rétention
Tp : Tampon

Table des matières

Remerciements.....	3
Abréviations.....	5
Table des matières.....	8
Table des illustrations.....	12
Introduction générale.....	19

CHAPITRE I, Introduction Bibliographique

I Peptides et protéines.....	23
I.1 Les 4 niveaux de structuration protéique	23
I.2 Angles dièdres et diagramme de Ramachandran	24
I.3 Description des structures secondaires.....	26
I.3.a Les chaînes linéaires.....	26
I.3.b Les feuilletts β	27
I.3.c Les coudes	28
I.3.d Les hélices	30
I.3.e Les structures aléatoires (« random coil »)	34
II Techniques d'analyse structurale.....	35
II.1 Détermination de la structure en solution	35
II.1.a Le dichroïsme circulaire (DC) ³⁶	35
II.1.b La résonance magnétique nucléaire (RMN) ³⁷	38
II.1.b.1 Les déplacements chimiques.....	38
II.1.b.2 Le couplage scalaire.....	38
II.1.b.3 Le couplage dipolaire.....	39
II.1.b.4 La RMN bidimensionnelle (2D) homo- et hétéronucléaire	39
II.1.b.5 L'étude conformationnelle des peptides et protéines par RMN	39
II.1.b.5.1 Attribution séquentielle.....	40
II.1.b.5.2 Paramètres conformationnels.....	41
II.1.b.5.3 Les liaisons hydrogènes	41
II.1.b.5.4 Coefficients de température et titration DMSO-d ₆ / CDCl ₃ ⁵²	41
II.1.b.5.5 Vitesse d'échange isotopique hydrogène/deutérium ^{53,54}	42
II.1.b.5.6 Expérience HNCO longue distance	42
II.1.b.5.7 Contraintes diédrales.....	42
II.1.b.5.8 Les contraintes de distances : l'effet NOE.....	44
II.1.b.6 La modélisation sous contraintes RMN	45
II.1.c Détermination de la structure à l'état solide.....	46
III Foldamères.....	48

III.1 Définitions et Intérêts	48
III.2 Eléments de contrôle conformationnel	48
III.2.a Contrôle local de la conformation des monomères : répulsions stériques et rigidité des monomères	48
III.2.a.1 Le cas des hélicènes	49
III.2.a.2 Le cas de l'hélice de para-terphenylophane	49
III.2.a.3 Le cas des oligopipéridines	50
III.2.b Contrôle conformationnel par réseaux d'interactions non-covalentes entre monomères successifs	50
III.2.b.1 La liaison de coordination	51
III.2.b.2 La liaison hydrogène	53
III.2.b.3 L'interaction π - π aromatique	55
III.2.b.4 L'interaction ionique	56
III.2.c Les effets solvophobes	57
III.3 Les Grandes Familles de foldamères pseudo-peptidiques	59
III.3.a Les Peptoïdes	60
III.3.a.1 Définition / Nature du monomère	60
III.3.a.2 Principes gouvernant le repliement des peptoïdes	61
III.3.a.2.1 Principaux éléments de structuration	61
III.3.a.2.2 Optimisation de la stabilité	63
III.3.a.3 Applications en chimie médicinale	65
III.3.b β -peptides	67
III.3.b.1 Définition / Natures des monomères	67
III.3.b.2 Historique	68
III.3.b.3 Principes gouvernant le repliement des β -peptides et topologies associées	70
III.3.b.3.1 Eléments principaux de structuration	70
III.3.b.3.2 Introduction de contraintes cycliques au sein de β -amino acides	72
III.3.b.3.2.1 Cas de l'acide trans-2-aminocyclohexanecarboxylique (<i>trans</i> -ACHC) : la stabilisation de l'hélice 14	72
III.3.b.3.2.2 Cas de l'acide trans-2-aminocyclopentanecarboxylique (<i>trans</i> -ACPC) et découverte de l'hélice 12	74
III.3.b.3.2.3 Le cas de l'oxétane et la découverte de l'hélice 10	75
III.3.b.3.2.4 La quatrième structure secondaire des β -peptides : l'hélice 8	76
III.3.b.3.3 Séquences alternant β^2 - et β^3 -amino acides homochiraux; identification de l'hélice 10/12	77
III.3.b.3.4 Les β^3 -amino acides comme promoteurs de coudes	78
III.3.b.3.4.1 Optimisation de la stabilité	81

III.3.c γ -peptides	83
III.3.c.1 Définition / Nature des monomères	83
III.3.c.2 Principes gouvernant le repliement.....	84
III.3.c.2.1 Principaux éléments de structuration	84
III.3.c.2.1.1 Les γ^2 - et γ^3 -peptides ; une absence de structuration	84
III.3.c.2.1.2 Les γ^4 -peptides	85
III.3.c.2.1.3 Les $\gamma^{2,4}$ - et $\gamma^{2,3,4}$ -peptides.....	88
III.3.c.2.1.4 Les $\gamma^{3,3}$ -peptides	90
III.3.c.2.2 Eléments de structuration secondaire	90
III.3.c.2.2.1 Oligomères de cis- γ -amino-L-proline.....	91
III.3.c.2.2.2 Oligomères de trans-cyclopropane γ -amino acide.....	92
III.3.c.2.2.3 Oligomères d'acide 4-aminométhyl-tétrahydrofuran-2-carboxylique	93
III.3.d Les oligourées	94
III.3.d.1 Définition / Nature du monomère	94
III.3.d.2 Structure des oligourées	95
III.3.d.3 Principes gouvernant le repliement.....	97
III.3.d.3.1 Eléments principaux de structuration	97
III.3.d.3.2 Optimisation de la stabilité	99
III.3.d.3.3 Applications en chimie médicinale.....	100
III.3.e Séquences hybrides et topologies associées.....	101

CHAPITRE II, RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV Voies de synthèse du monomère ATC.....	105
IV.1 Rétrosynthèse	105
IV.2 Travaux réalisés	106
IV.2.a Première voie de synthèse des ATCs	106
IV.2.b Seconde voie de synthèse des ATCs	107
IV.3 Conclusion	110
IV.4 Publication	110
V Synthèse et étude structurale d'oligomères d'ATCs.....	119
V.1 Descriptions des séquences	119
V.2 Synthèse	119
V.3 Caractérisation structurale	122
V.3.a Etude structurale en solution	122
V.3.a.1 Analyses par Spectroscopie RMN	122
V.3.a.2 Modélisation sous contraintes RMN.....	125
V.3.a.3 Mesure du dichroïsme circulaire.....	127

V.3.b Etude structurale à l'état solide	128
V.4 Conclusion	130
V.5 Publication	131
VI L'ATC comme mime de coude: conception d'un analogue de la Gramicidine S	138
VI.1 Intérêt du développement de mimes de coudes.....	138
VI.2 Etude structurale de tétrapeptides hybrides $\alpha\alpha$.....	138
VI.2.a Les travaux de Mann et Kessler	138
VI.2.b Influence de la chiralité de l'ATC sur la conformation du tétrapeptide.....	139
VI.2.c Données expérimentales.....	141
VI.2.c.1 Dichroïsme circulaire.....	141
VI.2.c.2 Résonance magnétique nucléaire.....	142
VI.2.d Modélisation sous contraintes RMN	143
VI.2.e Simulations de dynamique moléculaire et calculs de densité fonctionnelle	145
VI.2.f Conclusion de l'étude structurale des séquences hybrides α -ATC- $\alpha\alpha$	146
VI.3 Synthèse, étude structurale et évaluation biologique d'un analogue de la	147
gramicidine S	147
VI.3.a Introduction	147
VI.3.b Synthèse de l'analogue 23 de la gramicidine S.....	148
VI.3.c Etude structurale par RMN	149
VI.3.d Evaluation de l'activité biologique	151
VI.4 Conclusion sur la synthèse, la conformation et l'activité biologique de l'analogue	152
de la gramicidine S.....	152
VI.5 Publication	152
VII Intérêt des hélices d'ATCs dans le développement d'inhibiteurs	161
d'interactions protéine-protéine	161
VII.1 Contexte.....	161
VII.2 Production de la protéine.....	163
VII.3 Conception d'un analogue de STAT6	164
VII.3.a Design d'un oligomère d'ATCs	164
VII.4 Evaluation de l'interaction par mesure de polarisation de fluorescence	167
VII.5 Conclusions et perspectives sur le développement d'inhibiteurs d'interactions	169
protéine-protéine	169
Conclusions et perspectives.....	171
Partie expérimentale.....	174
Synthèse et étude structurale d'oligomères d'ATCs.....	175
L'ATC comme mime de coude: conception d'un analogue de la Gramicidine S....	233
Production de NCoA-1, synthèse des séquences 25 et 26 et tests d'activité.....	262
Annexes.....	270
Références bibliographiques.....	275

Table des illustrations

Figure 1 Les 4 niveaux de structuration protéique	24
Figure 2 Attribution des angles dièdres	25
Figure 3 Diagramme de Ramachandran	26
Figure 4 Chaîne peptidique linéaire	27
Figure 5 Feuillet antiparallèles	28
Figure 6 Feuillet parallèles	28
Figure 7 Deux types de coudes β	29
Figure 8 Structure d'une hélice α	31
Figure 9 Comparaison des structures des hélices α et 3_{10}	32
Figure 10 Influence d'une hélice π introduite au sein d'une hélice α	32
Figure 11 Comparaison des hélices de polyprolines de type : a) I et b) II	33
Figure 12 Représentation schématique des composantes de la lumière polarisée : a) avant et b) après la traversée d'une solution contenant un composé optiquement actif	35
Figure 13 Superposition des spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques d'une hélice α , d'un feuillet β et d'une structure aléatoire	37
Figure 14 Attribution séquentielle d'un peptide : corrélations scalaires (bleu) et dipolaires (orange)	40
Figure 15 Valeurs de la constante 3J en fonction de l'angle Φ et structure secondaire associée	43
Figure 16 Structure d'un nonahélicène	49
Figure 17 Conformation d'une hélice « geländer »	50
Figure 18 Structure linéaire des oligopéridines ; a) composé 3, b) Structure issue de la simulation de dynamique moléculaire (le segment [AB] indique le caractère linéaire de l'édifice)	50
Figure 19 Structure tridimensionnelle obtenue en fonction de la géométrie du complexe : a) Mode de coordination du ligand 4, b) Structures cristallines correspondant aux deux complexes formés	52
Figure 20 Structure tridimensionnelle du polymère 7 (le cation Ag^+ étant représenté sous la forme d'une boule grise)	52
Figure 21 Intérêt de la liaison hydrogène dans le maintien de la conformation des structures à 7 résidus par tour d'hélice (8) et à 21 résidus (9), construites à partir de monomères différents	54
Figure 22 Oligoquinolines développées par le groupe de Huc : a) séquence, b) et c) structure cristalline représentée perpendiculairement et parallèlement à l'axe hélicoïdal	55
Figure 23 a) Formule des oligomères 1,5-diuréidonaphthalène 11 et b) Structures cristallines ; la conformation est dépendante de la nature du substituant, méthyle ou benzyle (les substituants ne sont pas représentés pour plus de clarté)	56
Figure 24 a) Liaisons ioniques (en bleu) et hydrogène (en rouge) au sein de la 5,15,25-tris-nor-hexapyrrine 12, b) structure cristalline	57
Figure 25 a) Structure du phénylène éthylène bis-hexamérique 13 étudié, b) équilibre entre les conformations modélisées aléatoire et hélicoïdale (les chaînes latérales ont été retirées pour plus de clarté)	58
Figure 26 Classification des différentes familles de mimes de peptides	59
Figure 27 Comparaison entre les peptoïdes et les α -peptides	61
Figure 28 Géométries envisageables pour les peptoïdes	61
Figure 29 Structure hélicoïdale d'un pentamère 14. a) Séquence. Structure cristalline en projection : b) perpendiculaire et c) parallèle à l'axe de l'hélice	62
Figure 30 Substituants utilisés pour la synthèse des peptoïdes de Zuckermann	63

Figure 31 Peptoïde 15 analysé par Blackwell ; détermination de la constante thermodynamique $K_{cis/trans}$	64
Figure 32 Stabilisation des géométries cis et trans via une interaction $n \rightarrow \pi^*$ dépendant du substituant	65
Figure 33 Structure de l'ampeptoïde 16 développé par Chongsiriwatana (forme ionisée, le contre-ion n'apparaît pas)	66
Figure 34 Les diverses substitutions possibles des β -peptides	68
Figure 35 Attribution des angles dièdres d'un β -peptide	68
Figure 36 Différents pseudo-cycles formés par liaisons hydrogène au sein d'un β -peptide	70
Figure 37 Séquences du β^3 -tripeptide 17 et β^3 -hexapeptide 18 développés par le groupe de Seebach et a) Structure cristalline avec tracé des liaisons hydrogènes du β^3 -tripeptide 17, b) structures de moindre énergie du β -hexapeptide 18 calculées dans le méthanol (vert) et la pyridine (rouge), c) spectre dichroïque du β -hexapeptide 18 dans le méthanol	71
Figure 38 Propriétés structurales du trans-ACHC. a) Séquence 19, b) restriction autour de l'angle θ , c) et d) structure cristalline, projections perpendiculaire et parallèle à l'axe hélicoïdal, e) signal dichroïque	73
Figure 39 Propriétés structurales du trans-ACPC. a) Séquence 20, b) restriction autour de l'angle θ , c) et d) structure cristalline, projections perpendiculaire et parallèle à l'axe hélicoïdal, e) signal dichroïque	74
Figure 40 Barrières rotationnelles de l'ACPC	75
Figure 41 Hexamère 21 contraint par l'introduction de cis-oxétane : a) réseaux de liaisons hydrogène à 10 chaînons, b) et c) superposition des 10 structures de moindre énergie, vues perpendiculaire et parallèle à l'axe hélicoïdal	76
Figure 42 Hélice 2_8 : a) séquence 22, b) structure modélisée de moindre énergie, c) structure cristalline	77
Figure 43 Arrangement du β -peptide 23 constitué par l'alternance de résidus β^2 - et β^3 -. a) structures de moindre énergie. Conformère le plus stable en : b) vue perpendiculaire à l'axe hélicoïdal, c) selon l'axe	78
Figure 44 Trimère 24 d'acide 1-(aminométhyl)cyclohexanecarboxylique ; a) séquence, b) structure cristalline	79
Figure 45 Contrainte bicyclique du $\beta^{2,3,3}$ -amino acide (S)-ABOC 25, a) formule semi-développée, b) projection de Newman, c) structure cristalline	79
Figure 46 Influence du (S)-ABOC sur la conformation du tripeptide 26: a) superposition des structures cristalline (jaune) et modélisée (verte), b) réseaux de liaisons hydrogène, c) structure cristalline	80
Figure 47 Oligomère 27 : a) séquence à l'état ionisé (les contre-ions ne sont pas indiqués pour plus de clarté), b) et c) hélice 3_{14} , vues perpendiculaire et parallèle à l'axe, avec en rouge la chaîne latérale du hGlu et en bleu celle de la hLys (une seule face des hélices est représentée pour plus de clarté)	82
Figure 48 β^3 -peptide 28, un modèle utilisé pour le criblage de chaînes latérales (les points de diversification apparaissent en rouge)	82
Figure 49 Les diverses substitutions possibles des γ -peptides (les groupements R et R' peuvent être engagés tous deux dans un cycle)	83
Figure 50 Attribution des angles dièdres d'un γ -peptide	83
Figure 51 Types de pseudo-cycles les plus fréquemment rencontrés au sein des γ -peptides	84
Figure 52 γ^2 - et γ^3 -hexapeptides 29 et 30 synthétisés par Seebach	85
Figure 53 Hélice $2,6_{14}$ adoptée par le γ^4 -peptide 31 en solution : a) séquence et réseau de liaisons hydrogène, structures de moindre énergie projetées. Vues b) latérale et c) axiale du composé 31	86
Figure 54 Comparaison des paramètres d'hélices α , β (3_{14}) et γ ($2,6_{14}$) (la flèche indique le sens du macropôle)	87

Figure 55 Famille de γ -peptides alternés développée par le groupe de Kunwar (dimère 32, tétramère 33 et hexamère 34) -----	87
Figure 56 $\gamma^{2,4}$ -peptides anti 35 et syn 36 développés par Hanessian -----	88
Figure 57 Conformation préférentielle des $\gamma^{2,4}$ -amino acides suivant la configuration des 2 carbones asymétriques -----	89
Figure 58 $\gamma^{2,3,4}$ -peptides développés par Seebach : a) séquences (tétramère 37 et hexamère 38), b) structure cristalline de 37, c) les 20 structures de moindre énergie de 38, d) superposition des squelettes résolus par RX (37, vert) et RMN (38, rose) -----	89
Figure 59 Structure des dimère 39 et tétramère 40 de gabapentine : a) séquence, b) structure cristalline (les liaisons hydrogène apparaissent en pointillés) -----	90
Figure 60 Hexamère 41 composé de cis- γ -amino-L-proline : a) séquence, b) structure obtenue par RMN (les flèches indiquent les corrélations NOEs), c) structure schématisée (les liaisons H apparaissent en pointillés) -----	91
Figure 61 Trimère γ -peptidique 42 contraint par un cyclopropane : a) schéma d'interactions entre les deux séquences, b) structure cristalline (les liaisons H apparaissent en pointillés) -----	92
Figure 62 Epingle à cheveux 43 développée par Smith (les flèches indiquent les corrélations NOEs observées et les pointillés matérialisent les liaisons hydrogène) -----	93
Figure 63 γ -amino acides dérivés du furanose : a) dimère 44 et tétramère 45 développés, b) structure cristalline de 44 sur laquelle les liaisons hydrogènes sont représentées en pointillés (les groupements protecteurs TBDPS sur les oxygènes O2 et O17 ont été ôtés pour plus de clarté) -----	94
Figure 64 Définition des angles et positions des oligourées comparée à celle des γ^4 -amino acides	95
Figure 65 Heptaurée de Semetey -----	95
Figure 66 Les 20 structures de moindre énergie de l'heptaurée 46: a) vue perpendiculaire à l'axe de l'hélice, b) vue selon l'axe hélicoïdal -----	96
Figure 67 Nomenclature et comparaison des angles dièdres entre les urées N,N'-disubstituées et les γ^4 -amino acides -----	97
Figure 68 Configurations de la fonction urée suivant le degré de substitution : a) N,N'-disubstituées, b) N,N'-tétrasubstituées -----	98
Figure 69 Structure tridimensionnelle de l'heptaurée 46 : a) les 2 pseudo-cycles formés, b) schéma représentant les liaisons hydrogène bifides, c) conformation du squelette en solution ^{165,166}	99
Figure 70 Renforcement du caractère hélicoïdal d'une oligourée par introduction d'une contrainte cyclique entre les positions α et β -----	100
Figure 71 Séquence antimicrobienne optimisée : a) composé 47 ionisé, b) répartition des différentes chaînes latérales suivant l'axe hélicoïdal (« + » : groupements cationiques $-\text{NH}_3^+$, cercles gris : groupements hydrophobes aliphatiques, cercle noir : groupement hydrophobe aromatique, cadre noir : extrémité N-terminale) -----	101
Figure 72 Etude conformationnelle théorique de γ -peptides Z-vinylogues : a) séquence modèle 1, b) structure en hélice 7 et c) structure en hélice 9 -----	104
Figure 73 Le motif ATC : définition des positions (2) et angles (3) -----	105
Figure 74 ATCs obtenus via la première voie de synthèse (le rendement global figure entre parenthèses) -----	107
Figure 75 ATCs obtenus via la seconde voie de synthèse (le rendement global figure entre parenthèses) -----	109
Figure 76 Les six séquences développées -----	119
Figure 77 Synthèse des séquences 15a-c de la série A -----	120
Figure 78 Synthèse des séquences 16a-c de la série B -----	121
Figure 79 Corrélations NOEs relatives à l'analyse de 15c (flèches noires). Données extraites des spectres : ROESY (en bleu), TOCSY (en rouge) -----	123
Figure 80 Protocole de détermination structurale -----	125

Figure 81 Superposition des 20 structures de moindre énergie pour les séquences 15a-c (en orange, CDCl ₃) et 16a-c (en bleu, H ₂ O/D ₂ O). Les groupements protecteurs en N- et C-ter ont été retirés pour plus de clarté.	126
Figure 82 Spectres de dichroïsme circulaire correspondant aux oligomères 16a-c : dans le méthanol (vert) et dans l'eau à pH 6,5 (bleu)	128
Figure 83 Séquence utilisée pour l'analyse par diffraction X	128
Figure 84 Comparaison des structures en solution et à l'état solide : a) structure cristalline de 17, projetée perpendiculairement et parallèlement à l'axe hélicoïdal, b) superposition des 20 structures de moindre énergie de 15b (en orange) avec la structure RX de 17 (en violet), c) projection schématisée des oligomères d'ATCs selon l'axe hélicoïdal indiquant la répartition des chaînes -R ₁ et -R ₂	129
Figure 85 Séquence peptidique linéaire 19 contenant le γ -aminoacide 18 construit autour d'un noyau oxazole.....	139
Figure 86 Tétrapeptides modèles : Ac-Val-(S)ATC-Ile-Ala-NH ₂ 20 et Ac-Val-(R)ATC-Ile-Ala-NH ₂ 21	140
Figure 87 Spectres dichroïques de 20 et 21 (20°C, MeOH), b) rappel de la structure du dimère 16a	142
Figure 88 a) Corrélations NOEs stabilisant le pseudo-cycle C ₉ (en noir) et engendrant l'arrangement tridimensionnel (en rouge), b) superposition des 20 structures de moindre énergie (avec indication des différents types de liaison hydrogène observés) pour les composés 20 (en vert) et 21 (en cyan), c) superposition des structures des composés 20 (en vert) et 21 (en cyan)	144
Figure 89 Occurrence des liaisons hydrogène au sein des structures de 20 et 21, déterminée par simulations de dynamique moléculaire	145
Figure 90 Gramicidine S.....	147
Figure 91 Analogue de la gramicidine S	148
Figure 92 Superposition des 20 structures de moindre énergie de l'analogue 23	150
Figure 93 a) squelette de l'analogue 23 et b) superposition des squelettes de 23 (en blanc) avec le mime de « reverse-turn » 21 (en bleu). Les liaisons hydrogène apparaissent en pointillés -	150
Figure 94 a) Superposition des squelettes de la gramicidine S (en jaune) et de son analogue 23 (en bleu), b) répartition des chaînes latérales portées par ces deux composés.....	151
Figure 95 Description de l'organisation de la protéine STAT-6. CC : domaine « coiled-coil », DBD : domaine de liaison à l'ADN, SH2 (SRC-homology 2) : domaine de dimérisation, TAD : domaine de trans-activation impliqué dans le recrutement de NCoA-1	162
Figure 96 Structuration hélicoïdale de la séquence STAT6 794-814 lors de son interaction avec NCoA-1 (structure cristallographique pdb 1OJ5)	162
Figure 97 Gel d'électrophorèse ; étapes de purification de NCoA-1 His-tag, clivage du His-tag et suivi de la purification finale de NCoA-1	164
Figure 98 a) et b) Répartition des chaînes latérales le long d'un oligomère d'ATCs. Les chaînes latérales d'une même couleur se trouvent sur la même face de l'hélice. c) Conception de l'oligomère 25 analogue de la séquence STAT6 794-808. Les chaînes en bleu miment les chaînes latérales des résidus Leu 794, 802 et 806 et Pro 797.....	165
Figure 99 Séquence hybride 26 $\alpha\gamma$	165

Tableau 1 Valeurs moyennes des angles dièdres ϕ et ψ pour les 9 types de coudes β (en $^\circ$)-----	30
Tableau 2 Paramètres des hélices décrites (n : nombre de résidus par tour d'hélice, h : pas de l'hélice, C : taille du pseudo-cycle) -----	34
Tableau 3 Contrainte sur l'angle Φ en fonction de la constante de couplage $^3J_{\text{NHC}\alpha\text{H}}$ -----	43
Tableau 4 Valeurs des angles Φ et des constantes 3J suivant la nature de la structure secondaire-----	44
Tableau 5 Distances inter-protons suivant le type de structure secondaire considéré-----	45
Tableau 6 : Intensités relatives de la liaison hydrogène en fonction de la nature et de la distance des groupements donneurs et accepteurs -----	53
Tableau 7 Caractéristiques des 2 principales interactions π - π -----	55
Tableau 8 Comparaison des valeurs d'angles dièdres du pentamère 14 et une polyproline de type I -----	63
Tableau 9 Activité antimicrobienne de l'ampeptoïde 16 de Chongsiriwatana comparée à celle du pexiganan -----	67
Tableau 10 Les différentes nomenclatures utilisées pour la description de structures hélicoïdales (les notations en italique ont été déduites de données théoriques) -----	70
Tableau 11 Comparaison des paramètres hélicoïdaux et des valeurs d'angles pour les hélices 14, 12 et α -----	75
Tableau 12 Valeurs des angles dièdres déterminées en solution pour chacun des résidus du tripeptide 26, (entre parenthèses figurent les valeurs mesurées à l'état solide)-----	81
Tableau 13 Comparaison des valeurs d'angles dièdres prédites et mesurées -----	88
Tableau 14 Résumé des caractéristiques hélicoïdales des oligourées et des γ^4 -peptides-----	97
Tableau 15 Activité antimicrobienne de l'octaurée de Guichard déterminée dans le milieu Mueller-Hinton (entre parenthèses, résultats obtenus dans le bouillon « cœur-cervelle ») -----	101
Tableau 16 Intensités des corrélations NOEs pour les séquences 15a-c et 16a-c observées dans le CDCl_3 (en noir), le méthanol (en vert) et l'eau à pH 6,5 (en bleu). Abréviations : forte « s » < 2,7 Å, moyenne « m » < 3,3 Å et faible « w » < 5,0 Å. -----	124
Tableau 17 Valeurs moyennes des angles de torsion des oligomères d'ATCs 15a-c, 16a-c et 17 comparés aux exemples décrits dans la littérature -----	130
Tableau 18 Comparaison des valeurs d'angles de torsion entre les séquences 17, 20 et 21-----	145
Tableau 19 Evaluation des activités antibactérienne et hémolytique de l'analogue 23 (la gramicidine S 22 fait office de référence) -----	151
Schéma 1 Rétrosynthèse du monomère ATC 4 -----	105
Schéma 2 Première voie d'accès aux ATCs via la réaction de Büchner-Curtius-Schlotterbeck-----	106
Schéma 3 Seconde voie d'accès aux ATCs via la condensation croisée de Claisen -----	109
Schéma 4 Synthèse des séquences 20 et 21 sur phase solide (illustration avec le composé 20) --	141
Schéma 5 Synthèse de l'analogue 23-----	149
Schéma 6 Synthèse des séquences candidates 25 et 26 (illustration avec le composé 26)-----	166
Graphique 1 Titration de FluoSTAT6 (1 μM) par des concentrations croissantes de NCoA-1 (56 nM-24,6 μM). L'affinité de l'interaction K_D est de 476 nM -----	168
Graphique 2 Expérience de déplacement de FluoSTAT6 (1 μM) par des concentrations croissantes de STAT6 794-814 (0-100 μM). La concentration de NCoA-1 a été fixée à 5 μM . La constante d'inhibition K_I est de 616 nM. -----	168

Equation 1	Expression de l'ellipticité molaire par résidu	36
Equation 2	Détermination des valeurs d'angles dièdres à partir des constantes de couplages 3J	42
Equation 3	Détermination de la distance inter-protons r_{ij}	44
Equation 4	Expression du RMSD	46
Equation 5	Relation de Bragg	46
Equation 6	Ajustement de la constante K_D	167

INTRODUCTION GENERALE

Historiquement, les petites molécules définies selon la « règle des 5 » proposée par Lipinski^{1,2} constituent la majeure partie des principes actifs disponibles sur le marché. Cette règle régit les critères importants pour une biodisponibilité optimale après administration par voie orale. Pour remplir ces conditions, le composé doit contenir moins de 5 donneurs et 10 accepteurs de liaisons hydrogènes (liaisons H), avoir une masse inférieure à 500 Da et son log P (définissant la lipophilie de la molécule) doit être inférieur à 5. Leur mécanisme d'action résulte le plus souvent d'une interaction avec une poche bien délimitée de quelques dizaines d'Å³ au sein d'une protéine. Cette poche peut correspondre 1/ au site d'interaction d'un récepteur membranaire ou soluble pour un ligand endogène, 2/ à un site catalytique dans le cas d'une enzyme voir 3/ à un site de régulation allostérique. Bien que les petites molécules restent aujourd'hui encore au centre d'innombrables projets de recherche, elles n'ont permis à l'heure actuelle de ne cibler qu'environ 1% du protéome humain : en effet, l'ensemble des principes actifs mis sur le marché interagit avec 207 cibles protéiques³ alors que 20 687 gènes codant pour des protéines ont d'ores et déjà été recensés.^{4,5}

Il est apparu depuis quelques années que de nombreux processus biologiques résultaient non pas de la liaison d'un ligand de petite taille avec une protéine, mais de l'interaction entre plusieurs protéines ou entre protéines et oligonucléotides. Ces interactions sont souvent des points de contrôle et de régulation pour une majorité de processus cellulaires notamment à travers la formation de complexes protéiques plus ou moins transitoires au niveau de zones régulatrices et de domaines fonctionnels. Ainsi, la capacité à contrôler et/ou moduler les interactions entre protéines représente un axe de recherche majeur pour 1/ mieux comprendre certains processus biologiques finement régulés, 2/ établir de nouvelles approches de diagnostiques et finalement 3/ proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les interactions protéine-protéine (PPIs) ont longtemps été considérées comme difficiles voire impossible à cibler par de petites molécules. A l'opposé des ligands conventionnels interagissant avec des cavités restreintes et bien définies de protéines, l'inhibition compétitive de PPIs nécessite des molécules capables de former une série de contacts sur une large surface discontinue, diffuse et souvent supérieure à 1000 Å².⁶ Une PPI comporte habituellement quelques résidus-clés, connus sous le nom de "hot-spots" qui contribuent à l'essentiel de l'énergie d'interaction. Même si cibler l'ensemble de la surface d'interaction reste souhaitable, se concentrer sur les "hot-spots" permet dans un premier temps de simplifier la problématique et d'espérer identifier une première génération d'inhibiteurs. Deux approches ont émergé au cours des dernières années pour répondre à cette problématique. La première stratégie consiste à transposer sur une courte chaîne peptidique la séquence d'interaction d'un des deux

partenaires protéiques. Les chaînes latérales des amino acides, éléments clés de reconnaissance, sont alors réparties le long du squelette peptidique et présentées séquentiellement pour reproduire le plus fidèlement possible la topologie de l'interaction. Outre le fait qu'ils ne soient généralement pas considérés comme de bons candidats médicaments en raison de leur faible biodisponibilité et de leur sensibilité aux enzymes protéolytiques, les peptides synthétiques sont souvent beaucoup moins organisés en solution qu'au contact de leur protéine-cible. En conséquence, mimer une topologie précise à l'aide de courtes séquences peptidiques reste délicat. Il est cependant possible de limiter l'espace conformationnel en introduisant des contraintes de rigidifications, tels des ponts salins, des chélates métalliques, des liens covalents au sein de la chaîne peptidique, des ponts disulfures.^{7,8}

La seconde stratégie pour cibler des PPIs repose sur le développement de foldamères.⁹⁻¹³ Les foldamères sont des oligomères non-naturels auto-structurants, c'est-à-dire capables d'adopter un état ordonné en solution et/ou à l'état solide. Ces structures tridimensionnelles sont souvent stabilisées par un réseau d'interactions non-covalentes s'établissant entre monomères adjacents (liaisons hydrogène, ponts salins...). Un des objectifs de la chimie des foldamères consiste à concevoir des architectures mimant les éléments de structure secondaires des protéines que sont les **hélices α** , **hélices 3_{10}** , **hélices π** , **hélices de polyprolines** et les feuilletts β . Parce qu'ils présentent des structures stables, bien définies et prévisibles, de tels foldamères constituent des structures privilégiées pour présenter de manière contrôlée en trois dimensions des éléments de reconnaissance pour les interfaces de protéines.

Dans le cadre de ce manuscrit, après avoir rapidement rappelé les différents niveaux organisationnels des peptides et protéines, nous nous intéresserons plus particulièrement aux architectures des éléments de structure secondaires que sont les hélices α , les feuilletts β et les coudes. Nous passerons ensuite en revue les principales familles de foldamères pseudo-peptidiques, pouvant être considérés comme mimes de ces éléments de structure secondaires. Nous tenterons de préciser les principes gouvernant leurs repliement et leur stabilité, les ressemblances et dissemblances avec les hélices α et feuilletts β . Nous verrons que parmi les différentes classes de foldamères décrites dans la littérature, les β -peptides,^{9,14-18} molécules obtenues par oligomérisation de β -amino acides, et les oligo-urées,¹⁹ analogues azotés de γ -peptides, ont une forte propension à adopter en solution des structures hélicoïdales pouvant être considérées comme des mimes d'hélice α . Nous verrons également que les γ -peptides²⁰ peuvent adopter, malgré un nombre supérieur de degrés de liberté, des

conformations stables ressemblant à certains éléments de structures secondaires (rubans,²¹ feuillets,²² coudes²³ ou hélices²⁴). Dans la suite de ce document nous détaillerons enfin le travail réalisé autour d'une nouvelle famille de foldamères construits à partir d'un γ -amino acide hétérocyclique appelé ATC (acide 4-amino(méthyl)-1,3-thiazole-5-carboxylique). Lorsque nous avons démarré ce programme, seules quelques sous-unités γ -amino acides avaient été rapportées dans la littérature. Par ailleurs, leur champ d'application était limité : 1/ par les difficultés pour accéder à des γ -amino acides stéréochimiquement purs présentant une large diversité de chaînes latérales, 2/ par des problèmes de solubilité des oligomères en phase aqueuse. Nous verrons dans quelle mesure les oligomères d'ATCs permettent de lever certaines de ces limitations.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I Peptides et protéines

La très grande variété de protéines et leur abondance (environ 60% de la masse sèche des cellules) permet d'assurer l'immense majorité des nombreuses fonctions indispensables à l'organisme. Elles participent au métabolisme (enzymes), jouent un rôle structural (collagène, actine), transportent des molécules (hémoglobine), en stockent d'autres (ferritine), interviennent dans la cascade de coagulation (thrombine, prothrombine), protègent des pathogènes (anticorps), compactent l'ADN (histones), régulent l'expression génétique (facteurs de transcription)... A partir des 20 acides aminés naturels et protéinogènes, le nombre des combinaisons, les tailles et les conformations possibles des protéines sont quasiment illimitées. Les repliements des chaînes polypeptidiques constituent la clé de l'information à l'origine de la fonction biologique.

Dans les paragraphes suivants nous détaillerons les principaux niveaux d'organisation tridimensionnelle des protéines. Nous nous focaliserons essentiellement sur la description de structures locales appelées structures secondaires. Nous verrons ensuite au travers d'une étude de la bibliographie des foldamères comment il est possible de concevoir des architectures pseudopeptidiques dont la topologie est proche de celles des éléments de structures secondaires des protéines.

1.1 Les 4 niveaux de structuration protéique

Quelques soient leurs natures (fibreuses, globulaires ou membranaires), les protéines s'organisent de manière tridimensionnelle principalement grâce à l'établissement d'interactions non-covalentes. Leur structure a été hiérarchisée en quatre niveaux d'organisation distincts :²⁵ (*Figure 1*)

- la **structure primaire** concerne la séquence peptidique en elle-même, c'est-à-dire l'enchaînement des acides aminés les uns par rapport aux autres. C'est à partir de cet enchaînement spécifique que vont découler les autres niveaux organisationnels,

- la **structure secondaire** quant à elle résulte de l'établissement d'interactions non-covalentes entre les résidus d'une même chaîne polypeptidique. Parmi ces interactions, on retrouve les liaisons hydrogènes, de coordination, les interactions hydrophobes, ioniques et de Van der Waals qui vont engendrer des structures de types hélicoïdales (hélice- α , 3_{10} , π et de polyprolines) ou plissées (feuillet- β). Ces structures peuvent être assemblées pour atteindre un niveau de structuration dit super secondaire, avec la génération d' α - ou de β -hairpin.

- le repliement des chaînes polypeptidiques va permettre au système d'adopter une structure globale plus compacte. Ce repliement des chaînes peptidiques réduit le rapport surface/volume de manière à isoler la plus grande partie de la protéine des interactions avec le milieu extérieur. Ce niveau supérieur d'organisation constitue la **structure tertiaire**,

- enfin, l'association de deux ou plusieurs chaînes polypeptidiques grâce à la création de liaisons covalentes ou non-covalentes, va constituer le dernier niveau de structuration protéique, la **structure quaternaire**.

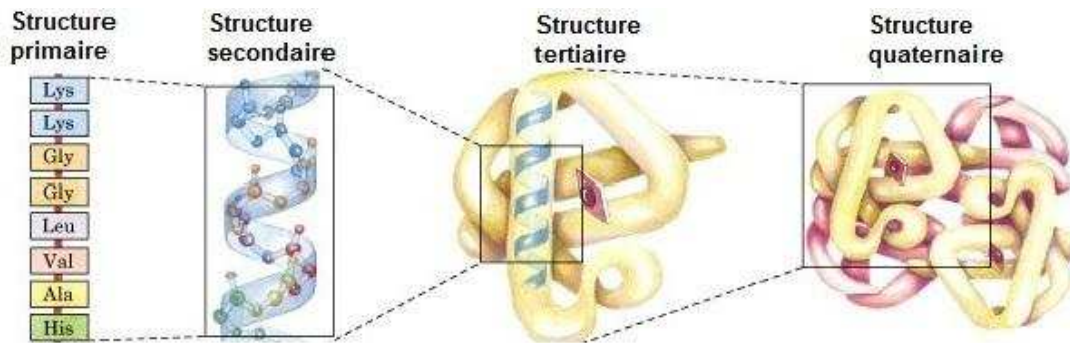


Figure 1 Les 4 niveaux de structuration protéique²⁶

Dans le cadre de ce manuscrit, nous nous intéresserons principalement au niveau de structuration secondaire.

1.2 Angles dièdres et diagramme de Ramachandran

Les structures tertiaires et quaternaires peuvent être ramenées à une succession d'éléments de structures secondaires.²⁷ Il en existe 5 types : les **chaînes linéaires**, les **feuillettes**, les **coudes**, les **hélices** et les **structures non-organisées** (« random coil »).

Le squelette peptidique peut-être décrit au travers de la succession des angles dièdres. Chaque angle est défini par 3 liaisons consécutives, pouvant être assimilées à des vecteurs, et impliquant donc 4 atomes. (**Figure 2**)

Dans un peptide, les angles dièdres sont au nombre de trois :

- Φ (*phi*), impliquant l'enchaînement d'atomes $C_{n-1}-N-C\alpha-C$,
- ψ (*psi*), impliquant les atomes $N-C\alpha-C-N_{n+1}$,
- ω (*omega*), impliquant les atomes $C\alpha_{n-1}-C_{n-1}-N-C\alpha$.

Une valeur d'angle nulle indique une disposition éclipsée des atomes du squelette, une valeur positive correspond à une rotation vers la droite du groupement C-terminal en considérant l'axe d'observation de N-*ter* vers C-*ter*.

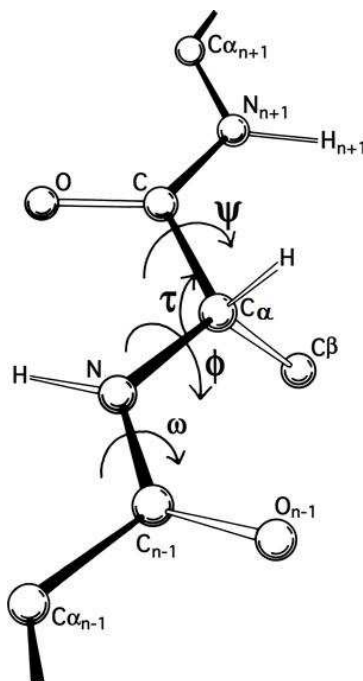


Figure 2 Attribution des angles dièdres²⁸

La délocalisation du doublet non liant de l'azote vers le carbonyle confère une structure plane de la liaison peptidique : les atomes C_{α} , C, N_{n+1} et $C_{\alpha+1}$ se retrouvent dans un même plan. Cette observation nous renseigne sur l'ouverture de l'angle ω , qui adopte des valeurs proches de 0° ou de 180° . La configuration de la liaison peptidique est alors respectivement soit *cis* soit *trans*. Les liaisons *trans* sont les plus fréquentes étant donné que la conformation résultante s'avère être de moindre énergie grâce à l'optimisation des effets stéréoelectroniques entre les atomes portés par les résidus voisins. Ce sont donc essentiellement les angles Φ et ψ qui régissent la conformation du peptide et par conséquent, imposent sa structure secondaire.

Ainsi, au sein d'une séquence peptidique, le nombre de conformations possibles va augmenter de façon exponentielle en fonction du nombre de résidus. Les conformations stables sont en nombre limité et seuls certains couples de valeurs des angles Φ et ψ sont favorisés. Dans ces îlots de stabilité, les contraintes stériques sont minimisées tandis que peuvent s'établir des réseaux de liaisons hydrogène entre des sites donneurs (NH) et accepteurs (C=O) de liaisons hydrogène. Il existe toutefois quelques contraintes d'angles et de distances pour que la formation d'une liaison hydrogène soit possible :

- la distance entre le donneur et l'accepteur de liaison hydrogène doit être comprise entre 2,8 et 3,2 Å,
- les 3 atomes N, H et O doivent être colinéaires ou tout au moins l'angle (N, H, O) formé par la liaison hydrogène doit avoir une valeur comprise entre -20° et $+20^{\circ}$.

La liaison hydrogène pourra ainsi s'établir en formant un pseudo-cycle à X chaînons (C_X), caractérisant le type de structure secondaire.

Le diagramme de Ramachandran identifie les zones énergétiquement favorables en fonction des valeurs de Φ et ψ . (**Figure 3**) Les zones en bleu traduisent les régions dites « permises » pour lesquelles la structuration est possible du fait d'une énergie potentielle minimisée.²⁹

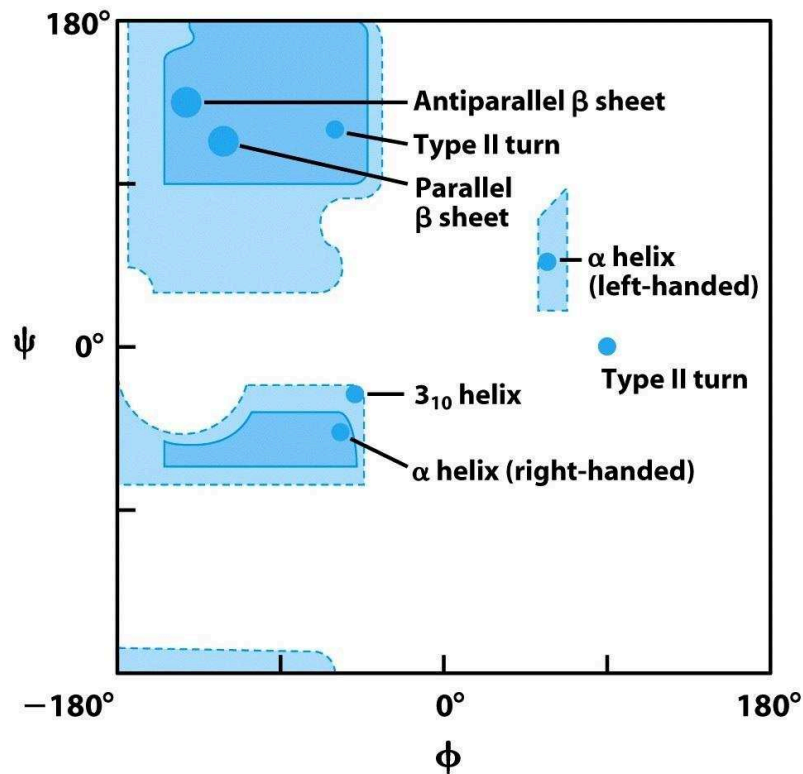


Figure 3 Diagramme de Ramachandran³⁰

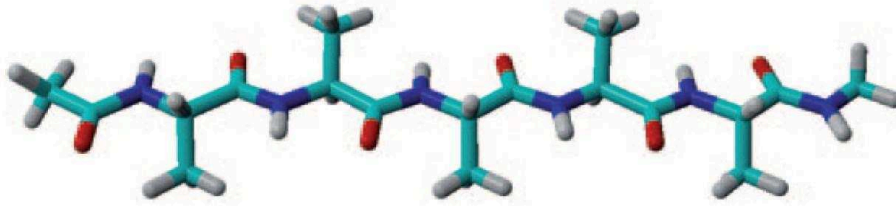
Par exemple, l'hélice α droite est la structure favorisée lorsque Φ est environ égale à -60° et ψ avoisine -50° . Au contraire, lorsque ces valeurs sont du signe opposé, la structure résultante sera une hélice α gauche. Les valeurs prises par les angles dièdres Φ et ψ vont ainsi définir chacune des 4 structures secondaires rencontrées au sein des protéines.

1.3 Description des structures secondaires

1.3.a Les chaînes linéaires

La plus simple des structures secondaires rencontrées au sein des protéines est la chaîne linéaire consistant en un enchaînement rectiligne des acides aminés. (**Figure 4**) En conséquence, les 4 atomes formant les groupements amide (C, O, N, H) se retrouvent dans le

même plan tout le long de la chaîne tandis que les liaisons peptidiques adoptent une conformation *trans*. Les angles Φ et ψ sont de $+180^\circ$.



*Figure 4 Chaîne peptidique linéaire*²⁹

1.3.b Les feuillets β

Les feuillets β (ou feuillets β plissés) se caractérisent par une chaîne peptidique étirée constituant une succession de plis réguliers formés par deux résidus dont les angles Φ et ψ sont autour de -120° et de $+120^\circ$ respectivement. Dans ce type d'arrangement, les chaînes latérales des amino acides sont orientées perpendiculairement par rapport à l'axe du feuillet. Des liaisons hydrogènes entre brins conduisent à l'émergence de feuillets dits **parallèles** ou **antiparallèles** en fonctions de l'orientation des 2 brins considérés.

Les feuillets antiparallèles sont construits à partir de 2 brins orientés dans une même direction spatiale mais en sens opposé permettant un parfait alignement des carbonyles et des protons amidiques des deux chaînes peptidiques qui dès lors pourront établir un réseau plan très régulier de deux liaisons hydrogènes tous les deux résidus : le résidu i est à la fois donneur par le NH et accepteur par le carbonyle. L'établissement de la liaison hydrogène est favorisé par le positionnement face à face des carbonyles accepteurs de liaison hydrogène et des protons amidiques. Les valeurs des angles Φ et ψ sont respectivement de -139° et $+135^\circ$ pour de telles structures. (*Figure 5*)

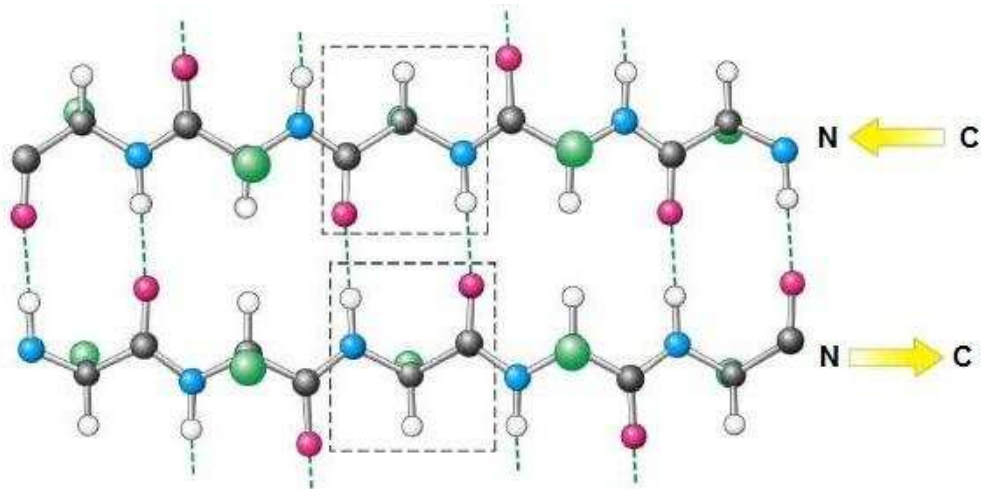


Figure 5 Feuilletes antiparallèles

Les feuilletes parallèles sont formés quant à eux par l'interaction de deux brins orientés dans la même direction et dans le même sens (du N initial au C terminal). Cet arrangement ne permet pas un alignement optimal des donneurs et accepteurs de liaisons hydrogènes. En conséquence, les feuilletes parallèles seront moins stables que les feuilletes antiparallèles du fait d'une distance N-H - O=C légèrement en dehors de l'intervalle optimal de 2,8 à 3,2 Å. Les valeurs des angles Φ et ψ sont respectivement de -119° et de $+113^\circ$. (*Figure 6*)

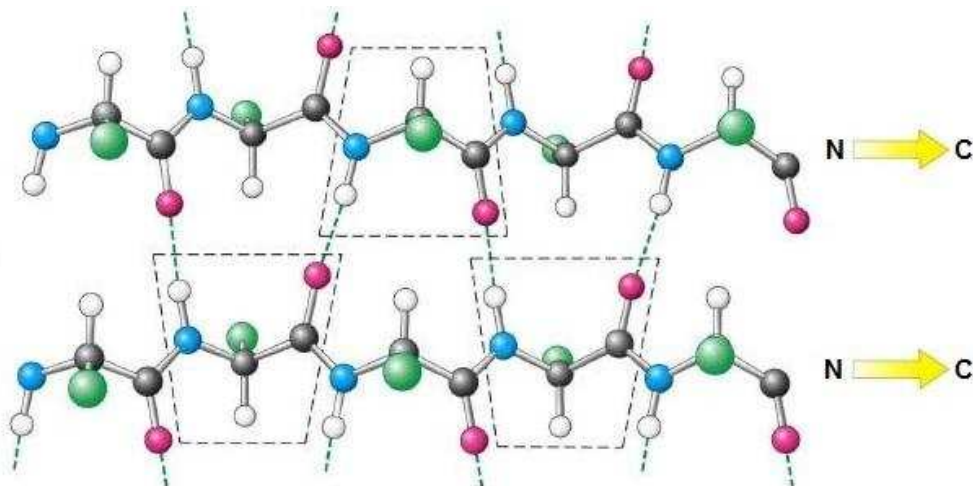


Figure 6 Feuilletes parallèles

1.3.c Les coudes

Ces éléments de structuration ont pour rôle de modifier la direction de la chaîne peptidique en incurvant son axe d'élongation. Ils sont souvent constitués par l'enchaînement de résidus polaires et chargés. Une ou plusieurs liaisons hydrogènes sont généralement requises pour

maintenir la conformation du coude bien qu'elles ne soient pas indispensables à sa formation. Ces éléments de structures secondaires sont classés en fonction du nombre de résidus les constituants :

- les **coudes α** , dont les extrémités sont séparées par 4 résidus,
- les **coudes β** , contenant 3 résidus,
- les **coudes γ** , longs de 2 acides aminés,
- les **coudes δ** , peu favorisés d'un point de vue stérique car ne contenant qu'un seul résidu,
- les **coudes π** , dont les extrémités sont séparées par 5 acides aminés.

Parmi ces cinq familles, les coudes β sont les plus fréquemment rencontrés. Leur longueur modérée est en effet idéale pour l'établissement d'une liaison hydrogène de type $NH(i+3)\dots CO(i)$, formant ainsi un pseudo-cycle à 10 chaînons (C_{10}). (**Figure 7**) Ils jouent notamment un rôle primordial dans le repliement des protéines globulaires. Leur implication dans l'architecture protéique s'élève à hauteur de 30% de l'ensemble des structures secondaires.³¹

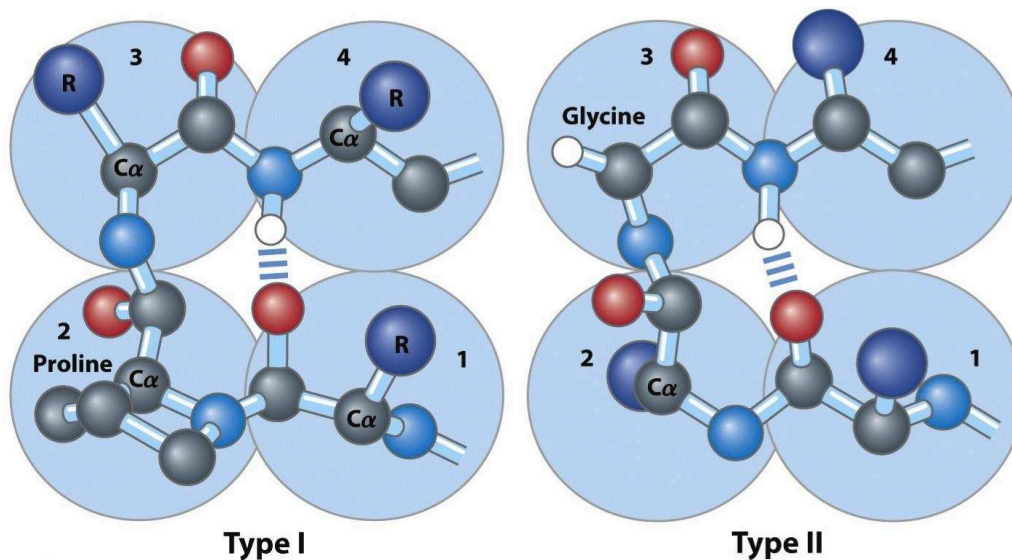


Figure 7 Deux types de coudes β

Les coudes β sont classés en plusieurs sous-types en fonction de l'orientation des chaînes latérales des résidus. Sur la base des valeurs prises par les angles Φ et ψ ,³² 9 familles de coudes β ont été répertoriées. Pour chacune d'entre elles, les valeurs moyennes des angles dièdres ont été calculées à l'aide d'un panel de 426 structures cristallines extraites de la Protein Data Bank.³³ (**Tableau 1**) Parmi toutes les familles de coudes, les types I et II sont

fréquemment rencontrés. Ils ne diffèrent que par l'orientation de la liaison peptidique centrale sur une face ou l'autre du coude.

Type de coude β	$\Phi (i+1)$	$\Psi (i+1)$	$\Phi (i+2)$	$\Psi (i+2)$
I	-60	-30	-90	0
II	-60	+120	+80	0
VIII	-60	-30	-120	+120
I'	+60	+30	+90	0
II'	+60	-120	-80	0
VIa1	-60	+120	-90	0
VIa2	-120	+120	-60	0
VIb	-135	+135	-75	+160
IV	-61	+10	-53	+17

Tableau 1 Valeurs moyennes des angles dièdres ϕ et ψ pour les 9 types de coudes β (en $^\circ$)³³

1.3.d Les hélices

Les structures secondaires hélicoïdales interviennent également largement dans la structure tridimensionnelle des protéines. Elles sont construites par un repliement hélicoïdal périodique du squelette peptidique autour d'un axe virtuel. Les hélices se définissent par la présence ou l'absence d'un réseau régulier de liaisons hydrogènes, la taille des pseudo-cycles formés par les liaisons hydrogènes lorsqu'elles existent, par le nombre de résidus impliqués par tour (n) d'hélice et par le pas (h), mesuré en Å, représentant la distance parcourue le long de l'axe par la chaîne peptidique pour boucler un tour complet. L'enroulement hélicoïdal peut se faire soit dans le sens des aiguilles d'une montre, l'hélice est dite **droite**, soit dans le sens contraire, l'hélice est alors qualifiée de **gauche**. Existantes dans ces deux types de configuration, elles forment intrinsèquement des objets chiraux. Par conséquent, les résidus de la séquence doivent exclusivement être homochiraux. En effet, les enchaînements entre résidus L (naturels) et D (non-naturels) sont difficilement envisageables car ils pourront entraîner une cassure de la forme hélicoïdale. Enfin, une séquence d'au moins 15 amino acides est souvent requise pour former une hélice isolée stable.^{11,34}

Plusieurs types d'hélices sont rencontrés dans l'architecture des protéines: **hélices α** , **hélices 3_{10}** , **hélices π** , **hélices de polyprolines**.

La plus répandue est l'**hélice α** , initialement décrite par Pauling et Corey.³⁵ C'est une hélice droite construite et stabilisée par des liaisons hydrogènes $\text{NH}(i+4)\dots\text{CO}(i)$ (formant un pseudo-cycle à 13 chaînons ou C_{13}) présentant 3,6 résidus par tour et un pas de 5,4 Å. Ces liaisons non-covalentes sont orientées dans le sens de l'axe hélicoïdal induisant l'existence d'un axe de polarisation dans la direction Nter-Cter. Les angles dièdres Φ et ψ prennent les valeurs respectives de -57° et -47° . Ces propriétés géométriques vont imposer une orientation des chaînes résiduelles vers l'extérieur de la structure, perpendiculairement à l'axe de l'hélice afin de limiter la gêne stérique. La structure de l'hélice demeure ainsi compacte. (**Figure 8**)

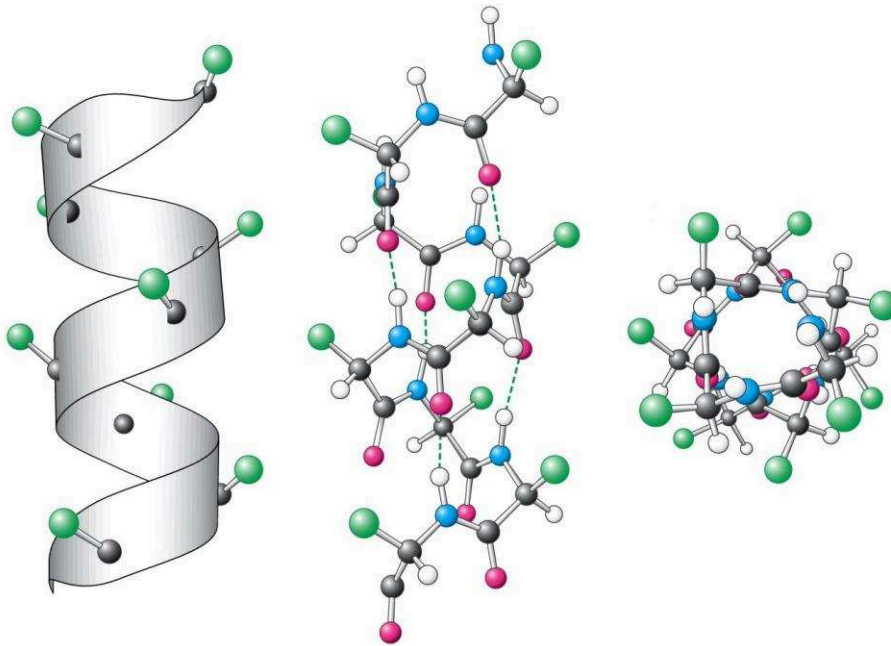


Figure 8 Structure d'une hélice α

L'**hélice 3_{10}** est une variante de la précédente. Elle est stabilisée par des liaisons hydrogènes de type $\text{NH}(i+3)\dots\text{CO}(i)$, comprend 3 résidus par tour et un pas de 6,0 Å (C_{10}). Due à sa conformation irrégulière, les angles dièdres Φ et ψ fluctuent. Les valeurs moyennes observées au sein de protéines sont de -70° pour Φ et de -18° pour ψ . Ces propriétés, et particulièrement un diamètre d'hélice relativement étroit, vont la rendre plus compacte et contrainte qu'une hélice α : sa longueur excèdera rarement 1 ou 2 tours. L'hélice 3_{10} est rencontrée bien moins fréquemment que l'hélice α . (**Figure 9**)

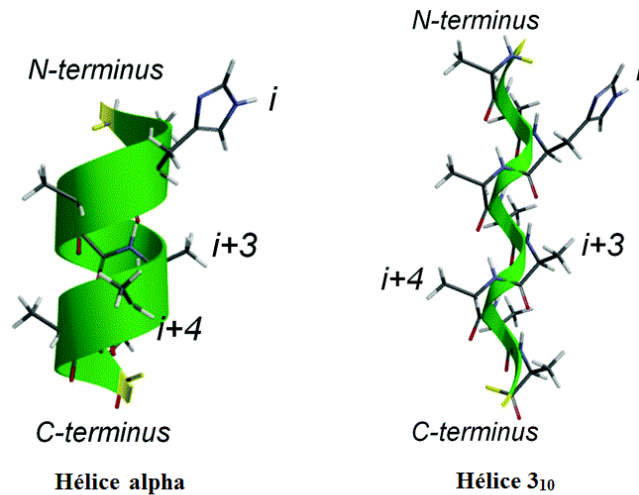


Figure 9 Comparaison des structures des hélices α et 3_{10}

Les **hélices π** sont relativement rares ; moins de 1% des protéines en contiennent une. Elles sont construites par un réseau de liaisons hydrogènes $\text{NH}(i+5)\dots\text{CO}(i)$, (C_{16}). Ces interactions à longue distance vont imposer un pas d'hélice de 5,0 Å et un nombre de 4,4 résidus par tour. Les angles dièdres Φ et ψ sont respectivement de -57° et -70° . C'est l'hélice la plus large de toutes les structures hélicoïdales et elle s'insère souvent au milieu d'une hélice α . Sa présence va induire une cassure de l'axe hélicoïdal α et modifier l'orientation de l'hélice α (**Figure 10**).

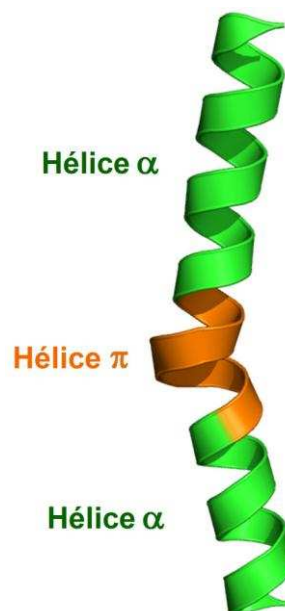


Figure 10 Influence d'une hélice π introduite au sein d'une hélice α

Les **polyprolines** adoptent également une conformation hélicoïdale. Le peptide peut être comparé à un oligomère constitué d'amides tertiaires qui, de ce fait, sera incapable de former

des liaisons hydrogènes intramoléculaires. Ainsi, la structuration de tels édifices repose sur la contrainte cyclique naturelle du monomère proline qui va limiter le nombre de conformations possibles. Cependant, même en l'absence d'interactions intramoléculaires fortes, les polyprolines s'arrangent en hélices extrêmement stables. Bien qu'étant constituées d' α -amino acides, les polyprolines n'adoptent pas les paramètres des α -hélices. Il existe deux types de polyprolines (type I et type II) :

Les **polyprolines de type I** (ou PPI) s'arrangent en hélice droite relativement compacte présentant 3,3 résidus par tour. Les valeurs des angles dièdres Φ et ψ sont respectivement de -75° et 160° . Le pas d'hélice quant à lui s'élève à $5,6 \text{ \AA}$ tandis que l'angle ω prend la valeur de 0° , imposant une configuration *cis* pour la liaison peptidique.

Les **polyprolines de type II** (ou PPII) se structurent en hélice de type gauche disposant de 3 résidus par tour. Elles sont plus allongées que les PPI toutefois les valeurs des angles dièdres Φ et ψ sont à peu près similaires (respectivement de -75° et 145°). Le pas de ce type d'hélice est de $9,3 \text{ \AA}$ alors que l'angle ω prend la valeur de 180° , imposant une configuration *trans* pour la liaison peptidique (**Figure 11**). Il est à noter que les **polyglycines** adoptent un type de structure analogue aux PPII. Les polyglycines et polyprolines de type I et II apparaissent dans environ 2% des protéines recensées par la Protein Data Bank (PDB).³⁶

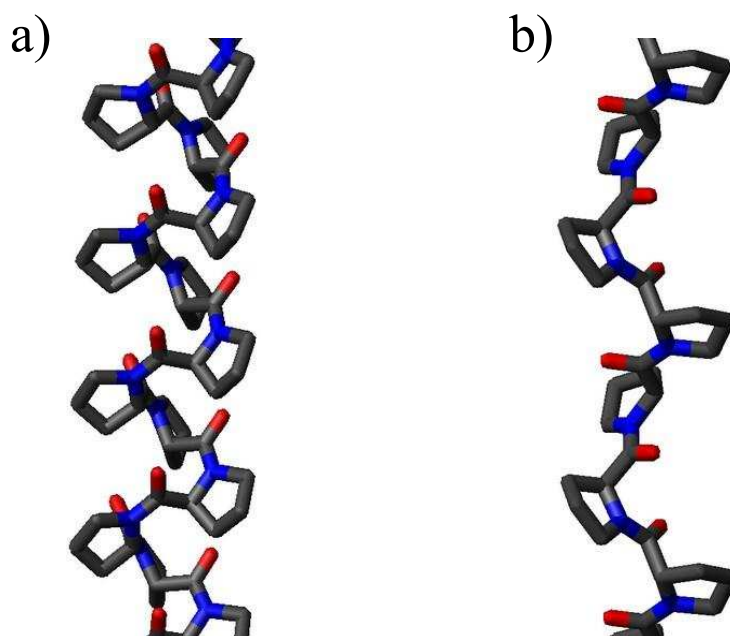


Figure 11 Comparaison des hélices de polyprolines de type : a) I et b) II

Les paramètres des hélices décrites précédemment sont résumés ci-dessous. (**Tableau 2**)

Type d'hélice	Φ (°)	ψ (°)	ω (°)	n	h (Å)	Type de liaison H	C
α	-57	-47	+180	3,6	5,4	$i+4\dots i$	13
3_{10}	-70	-18	+180	3,0	6,0	$i+3\dots i$	10
π	-57	-70	+180	4,4	5,0	$i+5\dots i$	16
PPI	-75	+160	0	3,3	6,4	-	-
PPII	-75	+145	+180	3,0	9,3	-	-

Tableau 2 Paramètres des hélices décrites (n : nombre de résidus par tour d'hélice, h : pas de l'hélice, C : taille du pseudo-cycle)

La nature et la stabilité de l'hélice sont régies par la séquence primaire. Par exemple, les résidus tels que l'alanine, la valine, la leucine, la phenylalanine, le tryptophane sont fortement compatibles avec un arrangement en structure hélicoïdale contrairement à la proline par exemple. D'autres critères importants, issus par exemple de l'environnement membranaire, vont influencer la stabilité des hélices :

- 1) l'encombrement stérique généré par les chaînes latérales,
- 2) les interactions électrostatiques entre chaînes fonctionnalisées,
- 3) la présence de résidus proline ou glycine,
- 4) la nature des résidus aux extrémités de l'hélice.

1.3.e Les structures aléatoires (« random coil »)

Elles sont constituées d'une séquence peptidique s'arrangeant dans l'espace d'une manière aléatoire en suivant une répartition purement statistique. Les acides aminés impliqués peuvent toutefois établir des liaisons hydrogènes mais celles-ci ne suffisent pas à maintenir la séquence dans une conformation définie.

Avant de s'intéresser aux architectures pseudopeptidiques mimes d'éléments de structure secondaire, il nous a semblé essentiel de faire un point sur les méthodes d'analyses structurales. Initialement développées pour accéder à la conformation des peptides, ces techniques sont également mises à profit pour étudier la topologie d'oligomères synthétiques tels que les foldamères.

II Techniques d'analyse structurale

L'étude structurale des macromolécules (synthétiques ou issues du vivant) en solution repose principalement sur le dichroïsme circulaire (DC) et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). La diffraction des rayons X (DRX) et la RMN du solide dans une moindre mesure, sont utilisées afin d'obtenir des informations structurales à l'état solide.

La RMN et la DRX permettent de déterminer des structures tridimensionnelles à l'échelle atomique. Lors de mes travaux nous avons utilisé le dichroïsme circulaire, la RMN et la DRX, je vais donc décrire ces trois techniques. Il faut néanmoins noter que d'autres spectroscopies peuvent être utilisées comme la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, la spectroscopie Raman et les méthodes d'analyses par fluorescence toutefois celles-ci sont moins utilisées dans le domaine des foldamères.

II.1 Détermination de la structure en solution

Le DC, la RMN et la DRX sont très utilisés pour l'étude de la conformation des macromolécules biologiques comme les peptides et les protéines. Les avancées techniques et instrumentales durant ces dernières décades ont participé à la popularisation de ces méthodes qui s'avèrent également adaptées pour l'étude des molécules non-peptidiques comme les foldamères.

II.1.a Le dichroïsme circulaire (DC)³⁷

Cette méthode est basée sur le fait qu'une molécule chirale va absorber différemment les composantes gauche et droite d'une lumière polarisée plane incidente selon sa conformation. Cette différence d'absorption est appelée dichroïsme circulaire et peut être observée pour toute molécule chirale. (*Figure 12*)

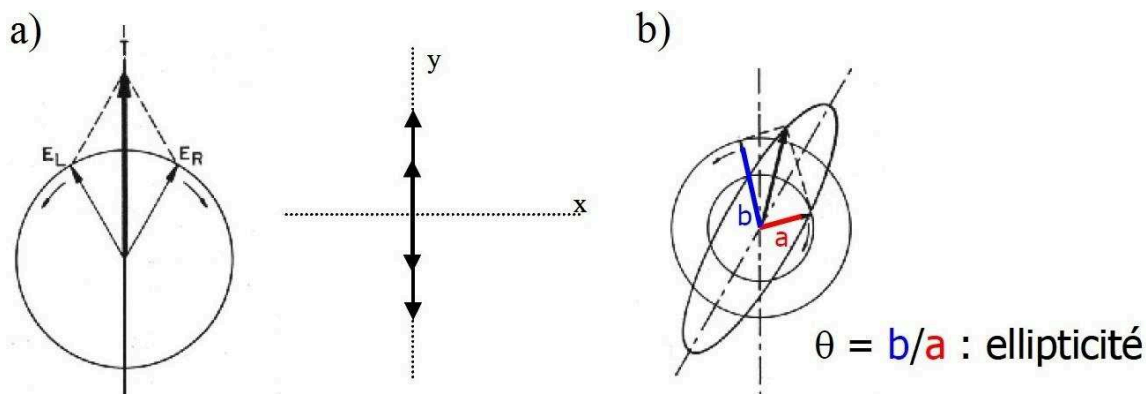


Figure 12 Représentation schématique des composantes de la lumière polarisée : a) avant et b) après la traversée d'une solution contenant un composé optiquement actif³⁸

E_L et E_R représentent les magnitudes du champ électrique correspondant respectivement aux composantes gauche et droite de la lumière polarisée. L'angle (θ) traduit l'aplatissement de l'ellipse de la lumière polarisée après son passage à travers un échantillon optiquement actif (sa valeur est de 0° si la polarisation est rectiligne et de 45° si elle est circulaire). La mesure de cette grandeur permettra, après transformation en ellipticité molaire, de tracer le spectre dichroïque en fonction des longueurs d'ondes analysées (domaine des ultraviolets).

La différence d'absorption (ΔA) des composantes gauche (G) et droite (D) de la lumière s'exprime ainsi :

$$\Delta A = \Delta A_G - \Delta A_D = (\epsilon_G - \epsilon_D).C.l$$

Où ϵ_G et ϵ_D représentent respectivement les absorptivités molaires des composantes gauche et droite (valeurs exprimées en $L.mol^{-1}.m^{-1}$)

C et l représente respectivement la concentration en solution (en $mol.L^{-1}$) et longueur du trajet optique (en m)

Le dichroïsme circulaire est donc défini ainsi :

$$\Delta \epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D$$

Toutefois, ce dichroïsme n'est pas directement déterminable. Seul l'angle θ (en $^\circ$) est mesurable. Le dichroïsme s'avère proportionnel à l'angle θ , à la concentration C et à la longueur du trajet optique l :

$$\Delta \epsilon \propto \theta / (C.l)$$

En définissant l'ellipticité molaire $[\theta]$ par :

$$[\theta] = (100.\theta) / C.l$$

On obtient la relation suivante reliant la valeur mesurée et le dichroïsme circulaire :

$$[\theta] = \alpha.\Delta \epsilon$$

Où α est une constante

L'ellipticité molaire par résidu (exprimée en $deg.cm^2.dmol^{-1}.résidu^{-1}$) est définie par :

$$[\theta] = \theta / (10.C.l.n)$$

Où n est le nombre de résidu(s) composant la séquence analysée

Equation 1 Expression de l'ellipticité molaire par résidu

La mesure du dichroïsme circulaire est une technique spectroscopique utilisée pour caractériser les structures secondaires de peptides, protéines et oligonucléotides avec une grande sensibilité. Dans le cas de peptides et de protéines, la liaison peptidique est le chromophore dont la contribution est la plus importante dans la région spectrale d'étude, généralement comprise entre 190 et 250 nm. Dans cette gamme spectrale, les spectres de

dichroïsme circulaire sont caractéristiques des structures secondaires adoptées par les protéines ou les peptides.³⁸ Ainsi, une structure en hélice α se caractérise par un maximum vers 190 nm et deux minima vers 205 et 220 nm tandis que dans un feuillet β , le spectre comportera un maximum à 195 nm et un minimum à 215 nm. Une structure aléatoire induira un minimum à 195-200 nm et un petit maximum vers 210-220 nm. (*Figure 13*)

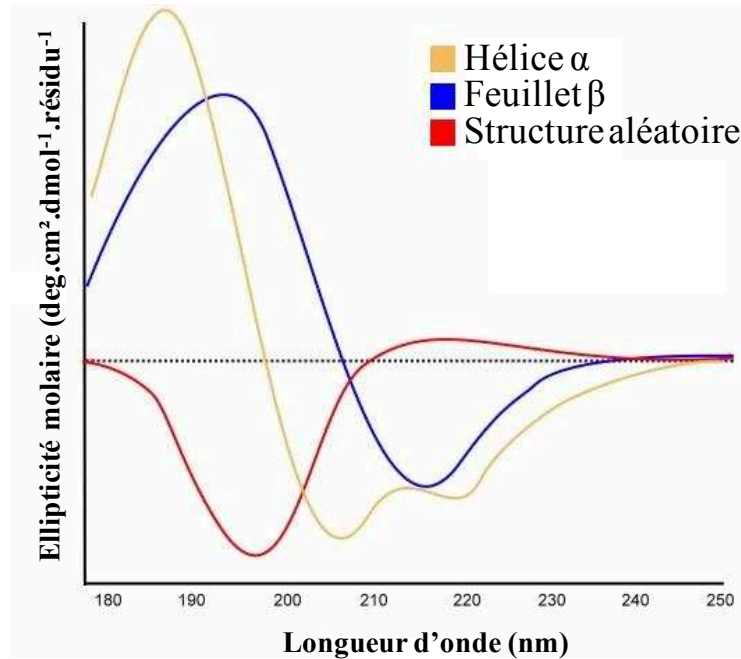


Figure 13 Superposition des spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques d'une hélice α , d'un feuillet β et d'une structure aléatoire

Pour une protéine, l'ellipticité à une longueur d'onde donnée résulte de la somme des contributions de ses différents types de structures secondaires. Il est possible de déconvoluer les spectres de dichroïsme circulaire des protéines afin de déterminer les proportions d'hélice α , de feuillets β et de coudes composant leurs structures tridimensionnelles. Inversement, des algorithmes permettent de prédire la signature dichroïque d'une protéine à partir de sa structure 3D. Le DC est une technique simple et rapide pour suivre les modifications conformationnelles globales d'un peptide ou d'une protéine en fonction des conditions expérimentales (température, pH, salinité, concentration etc.).

On peut également obtenir des informations en enregistrant des signatures dichroïques de molécules synthétiques comme les foldamères. Toutefois, le signal des transitions électroniques des liaisons peptidiques peut être masqué par des chromophores intrinsèques aux monomères non naturels. De plus, on observe dans la littérature qu'une signature n'est pas propre à un type de structure secondaire donnée. Ainsi, différentes familles d'oligomères adoptant des structures secondaires similaires pourront avoir des spectres différents et au

contraire, des spectres semblables peuvent être enregistrés pour des conformations différentes. Par conséquent, on utilise le plus souvent le DC pour comparer la proportion et la stabilité des structures secondaires formées pour des oligomères de même famille. L'équipe de Seebach a réalisé plusieurs études discutant de la relation entre la conformation des β -peptides et leurs spectres dichroïques associés.³⁹

II.1.b La résonance magnétique nucléaire (RMN)³⁸

La RMN, malgré sa faible sensibilité comparé aux autres spectroscopies (DC, fluorescence, IR etc.), est une technique d'analyse puissante pour l'étude conformationnelle de molécules biologiques ou synthétiques de tailles raisonnables en solution et à l'état solide. Dans le cadre de ce manuscrit, je vais me focaliser sur l'étude de la structure de peptides et pseudo-peptides en solution.

II.1.b.1 Les déplacements chimiques

L'environnement électronique des noyaux analysés constitue un écran magnétique pour le champ \vec{B}_0 . De ce fait, les noyaux, par exemple des protons ne résonnent pas tous à la même fréquence ω_0 mais à une fréquence ω_i définie par $\omega_i = \omega_0 \cdot \gamma \cdot \vec{B}_0 \cdot (1 - \sigma_i)$ où σ_i est la constante d'écran et γ le rapport gyromagnétique propre à chaque type de noyau. Cette relation permet de définir le déplacement chimique : $\delta_i = (\omega_i - \omega_{\text{réf}}) / \omega_0$, exprimé en parties par million (ppm), où $\omega_{\text{réf}}$ représente la valeur d'une fréquence de résonance arbitrairement choisie (généralement celle du tétraméthylsilane, TMS). Ainsi, le déplacement du noyau considéré est uniquement fonction de la densité électronique locale autour du noyau considéré.

II.1.b.2 Le couplage scalaire

Il existe des interactions entre les moments magnétiques de noyaux voisins. Ces interactions se traduisent par des phénomènes de couplage qui peuvent être de deux types, **scalaire** et **dipolaire**.

Le couplage scalaire aussi appelé couplage spin-spin s'établit *via* les spins des électrons des liaisons. Deux protons voisins H_a et H_b ayant des déplacements chimiques différents vont l'un et l'autre créer un champ local s'ajoutant ou s'opposant à \vec{B}_0 autour du proton voisin. Il en résulte un léger déplacement de la fréquence de résonance de part et d'autre de la valeur initiale. De cette façon, le signal initialement sous la forme d'un pic unique, un singulet est dédoublé se traduisant sur le spectre par deux pics que l'on appelle un doublet. L'écart de fréquence entre les deux composantes de ce doublet est appelé constante de couplage, notée

$^xJ_{AB}$ et exprimée en Hz et représente l'énergie d'interaction entre les deux noyaux. x indique le nombre de liaisons séparant les deux noyaux A et B couplés.

II.1.b.3 Le couplage dipolaire

Le champ magnétique local généré par un spin nucléaire peut être perçu, à travers l'espace, par les spins voisins. La force d'interaction dipôle-dipôle dépend de la distance internucléaire entre deux noyaux A et B interagissant (r_{AB}) ainsi que de l'orientation relative de leur spin par rapport à la direction du champ magnétique \vec{B}_0 . L'intensité du couplage entre les noyaux A et B est inversement proportionnelle à la distance (r_{AB})⁶; cette interaction, également appelée effet nucléaire Overhauser (NOE) est cependant limitée à 5-6 Å.

II.1.b.4 La RMN bidimensionnelle (2D) homo- et hétéronucléaire

La RMN à une dimension, très utilisée pour les petites molécules organiques, s'avère rapidement limitée pour des systèmes plus importants. La multitude de signaux présents sur une gamme réduite de déplacements chimiques conduit à de nombreuses superpositions de pics de corrélations qui rendent complexe l'analyse des spectres. Le développement de la RMN multidimensionnelle homonucléaire (^1H - ^1H) et hétéronucléaire (^1H - ^{13}C , ^1H - ^{15}N etc.) permet actuellement l'étude conformationnelle de molécules de poids moléculaire jusqu'à quelques dizaines de kDa. Nous ne détaillerons pas ici les séquences RMN 2D mais uniquement leur utilité pour l'attribution des déplacements chimiques et la détermination de structures tridimensionnelles de peptides.

II.1.b.5 L'étude conformationnelle des peptides et protéines par RMN

La RMN est actuellement la seule technique permettant de déterminer la structure tridimensionnelle de peptides et petites protéines en solution (jusqu'à environ 30 KDa). La première structure 3D de protéine en solution est l'inhibiteur de trypsine de taureau de 53 résidus publiée en 1985 par l'équipe de Kurt Wüthrich⁴⁰ qui a décrit une méthodologie permettant l'étude structurale de peptides/protéines basé sur l'effet NOE.⁴¹ L'attribution des déplacements chimiques du peptide permet d'extraire des contraintes conformationnelles qui sont ensuite introduites lors de calculs de modélisation moléculaire afin d'obtenir un ensemble de structures tridimensionnelles.

II.1.b.5.1 Attribution séquentielle

L'attribution séquentielle des protons d'un polypeptide est réalisée en combinant les expériences multidimensionnelles mettant en évidence les couplages scalaires homonucléaires $^1\text{H}/^1\text{H}$:

- 1) l'expérience de type COSY (COrelated SpectroscopY)⁴² permet d'observer les couplages 2J et 3J correspondant respectivement aux couplages entre protons géminés et vicinaux. L'attribution des systèmes de spins de certains résidus à longue chaîne (Leu, Ile, Gln, Lys...) devient délicate en raison de l'enchevêtrement des signaux.
- 2) l'expérience de type TOCSY (TOtal COrelated SpectroscopY) ou HOHAHA (HOmonuclear HARTmann-HAHn)^{43,44} corrèle par couplage scalaire chaque proton amide avec les protons de la chaîne latérale de chaque résidu. Il est ainsi possible d'identifier les systèmes de spins caractéristiques de chaque résidu.
- 3) les expériences bidimensionnelles de type NOESY / ROESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY / Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY)^{45,46} mettent en évidence les interactions dipolaires à travers l'espace. Ainsi, les protons séparés par moins de 5 Å donnent lieu à des corrélations dipolaires. L'observation de corrélations dipolaires entre les protons α des résidus i et les protons amidiques $i+1$, noté $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$, permet l'attribution séquentielle de la chaîne peptidique c'est-à-dire de reconstituer l'enchaînement des systèmes de spins. (**Figure 14**)

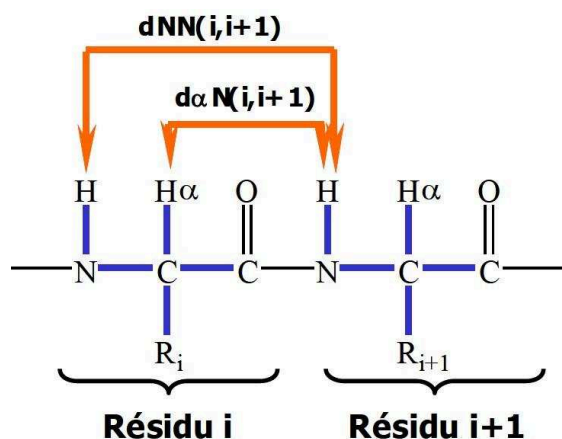


Figure 14 Attribution séquentielle d'un peptide : corrélations scalaires (bleu) et dipolaires (orange)

L'attribution séquentielle ^1H peut également être complétée par des expériences hétéronucléaires $^1\text{H}-^{13}\text{C}$. Deux étapes sont là encore nécessaires :

- 1) les déplacements chimiques des carbones primaires, secondaires et tertiaires sont d'abord déterminés par l'observation des couplages scalaires $^1J_{\text{CH}}$ mis en évidence au

cours d'expériences HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)⁴⁷⁻⁴⁹ ou HSQC ¹H-¹³C (Heteronuclear Single Quantum Coherence)⁵⁰

- 2) l'attribution des carbones quaternaires est obtenue à partir d'un spectre HMBC ¹H-¹³C (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) qui met en évidence les couplages à longue distance ${}^2J_{CH}$ et ${}^3J_{CH}$.^{51,52} L'attribution séquentielle s'effectue alors à l'aide des corrélations ${}^2J_{C_iHN_{i+1}}$ entre le carbone d'un carbonyle du résidu i et le proton amide du résidu suivant $i+1$ ainsi que des corrélations ${}^3J_{C_iH\alpha_{i+1}}$ entre le carbone du carbonyle du résidu i et le proton α du résidu $i+1$.

II.1.b.5.2 Paramètres conformationnels

Une fois l'attribution des résonances du peptide effectuée, la RMN permet d'extraire différents paramètres conformationnels qui pourront être ensuite utilisés dans des calculs de modélisation moléculaire comme les liaisons hydrogènes, les angles de torsion et les distances inter-protons.

II.1.b.5.3 Les liaisons hydrogènes

On peut obtenir des informations sur la présence de liaisons hydrogène *via* différentes expériences qu'il est préférable de combiner. La plupart révèle l'implication d'un proton amide donnée dans une liaison hydrogène, tandis que l'expérience HNCO longue distance permet de connaître directement le donneur et l'accepteur impliqués dans les liaisons hydrogène. Nous allons maintenant décrire l'ensemble des expériences permettant la mise en évidence de ces liaisons hydrogène.

II.1.b.5.4 Coefficients de température et titration DMSO-d₆ / CDCl₃⁵³

La présence de liaisons hydrogène intramoléculaires peut être évaluée en mesurant la variation du déplacement chimique des protons amides en fonction de la température. Les coefficients de température sont déterminés à partir de courbes $\Delta\delta = f(T)$. Cette variation est linéaire et la pente de la droite obtenue donne le coefficient de température $\Delta\delta_{HN} / \Delta T$ du proton amide étudié, à condition que le peptide ne soit pas agrégé et qu'il conserve sa conformation globale dans la gamme de températures étudiée. Les coefficients de température sont souvent négatifs. Dans l'eau par exemple, une valeur absolue inférieure à 4,5 ppb/K associée à une vitesse d'échange H/D lente d'un proton amide, indique son implication dans une liaison hydrogène. De même, la mise en évidence de liaisons H peut être réalisée en

ajoutant une quantité croissante de DMSO-d₆ dans une solution de l'échantillon dans le chloroforme. Une variation importante des $\delta(\text{NH})$ traduit l'absence de liaisons hydrogène.

II.1.b.5.5 Vitesse d'échange isotopique hydrogène/deutérium^{54,55}

La mesure de cinétique d'échange H/D permet de mettre en évidence des liaisons hydrogènes intramoléculaires et d'en déterminer la stabilité. Ces expériences consistent à mesurer les vitesses d'échange de protons amidiques par des deutérons apportés par le solvant, souvent D₂O ou CD₃OD. Un proton amide non engagé dans une liaison hydrogène et exposé au solvant s'échangera très rapidement, en quelques minutes avec un deutéron. A l'inverse, un proton amide engagé dans une liaison hydrogène ou inaccessible au solvant car enfoui au cœur de la molécule aura une vitesse d'échange lente, de plusieurs dizaines de minutes voire de plusieurs heures.

II.1.b.5.6 Expérience HNCO longue distance

Il est possible de mesurer des constantes de couplages scalaires à travers les liaisons hydrogène entre un proton amide et un carbonyle ou un carboxyle. Elles sont globalement très faibles et corrélées avec la longueur de la liaison H.⁵⁶ En principe, sur les spectres 2D HNCO longue distance, on observe seulement les corrélations entre HN et CO impliquées dans des liaisons hydrogènes. Néanmoins, cette séquence est très peu sensible et nécessite un double marquage ¹⁵N et ¹³C. Une séquence a été récemment développée avec une sensibilité optimisée pour la détection de liaisons hydrogène en abondance isotopique naturelle. Cette expérience a été utilisée pour l'étude d'oligomères d'acides *trans*-2-aminocyclobutanecarboxyliques.⁵⁷ On remarque néanmoins que les concentrations en produit sont relativement élevées, de l'ordre de 50 mM (spectromètre 950 MHz).

II.1.b.5.7 Contraintes diédrales

Les valeurs des constantes de couplage peuvent être obtenues à partir du spectre 1D 1H ou COSY.^{58,59} Les constantes de couplage scalaire vicinales ³JNHC _{α} H _{α} sont utilisées pour déduire la valeur de l'angle de torsion Φ entre les liaisons H-N-C α -H α en utilisant la relation de Karplus : (*Equation 2*)

$${}^3J = A \cdot \cos^2(\theta) - B \cdot \cos(\theta) + C$$

où $\theta = |\Phi - 60|$ pour les acides aminés de configuration *L*

et *A*, *B* et *C* sont des constantes empiriques dont les valeurs varient selon les auteurs⁶⁰⁻⁶³

Equation 2 Détermination des valeurs d'angles dièdres à partir des constantes de couplages ³J

La courbe relative à cette équation a été tracée en prenant en compte les valeurs de coefficients de Pardi.⁶³ (*Figure 15*)

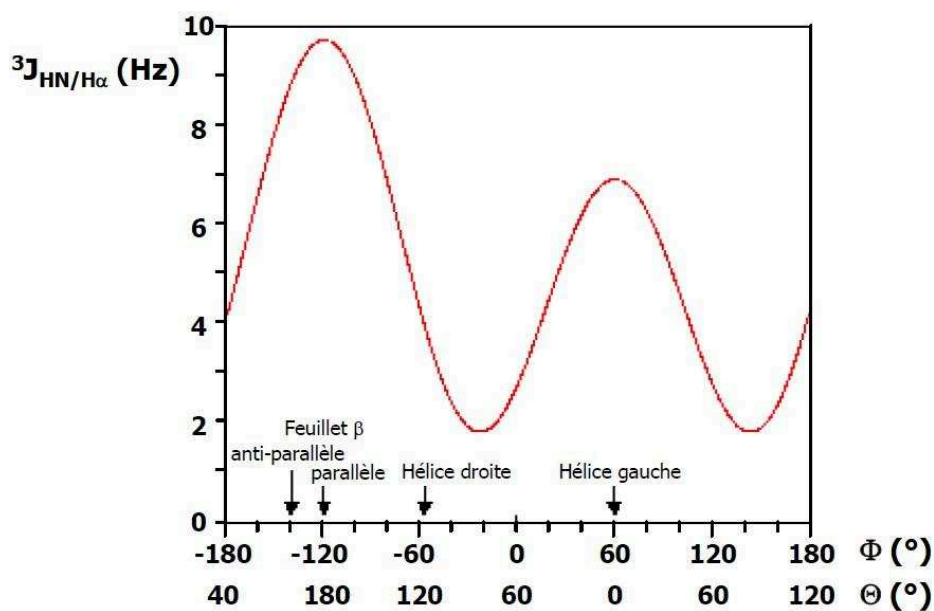


Figure 15 Valeurs de la constante 3J en fonction de l'angle Φ et structure secondaire associée⁴¹

La mesure des constantes de couplage $^3J_{\text{NHC}\alpha\text{H}\alpha}$ au travers de l'équation de Karplus permet de fixer les intervalles d'angles Φ possibles : (*Tableau 3*)

$^3J_{\text{NHC}\alpha\text{H}}$ (en Hz)	Contrainte sur l'angle (en °)
> 9,5	-120 ± 25
9,0	-120 ± 35
8,5	-120 ± 45
$]6,0;8,0[$	-120 ± 50
6,0	-70 ± 30
4,0	-60 ± 30

Tableau 3 Contrainte sur l'angle Φ en fonction de la constante de couplage $^3J_{\text{NHC}\alpha\text{H}}$

Dans le cas des peptides, les valeurs de constantes de couplage renseignent directement sur le type de structure secondaire. (*Tableau 4*)

	Hélice		Feuillet β	
	α	3_{10}	antiparallèle	parallèle
Φ	-57	-70	-139	-119
$^3J_{\text{NHC}\alpha\text{H}}$ (en Hz)	3,9	4,2	8,9	9,7

Tableau 4 Valeurs des angles Φ et des constantes 3J suivant la nature de la structure secondaire⁶³

II.1.b.5.8 Les contraintes de distances : l'effet NOE.

Les interactions dipolaires vont engendrer des transferts d'aimantation entre noyaux, donnant naissance à des taches de corrélation entre protons sur les spectres NOESY. Les valeurs d'intensité, notées η_{ij} , sont reliées aux distances inter-protoniques r_{ij} . Ces distances sont ainsi calculées à partir de l'*Equation 3*.

$$r_{ij} = [(\eta_{ij} / \eta_{\text{réf}})^{1/6}] \cdot r_{\text{réf}}$$

Equation 3 Détermination de la distance inter-protons r_{ij}

où $\eta_{\text{réf}}$ représente l'intensité de la tache de corrélation NOE relative à deux protons de référence dont la distance $r_{\text{réf}}$ est connue. Seuls les protons distants de moins de 5 Å seront susceptibles de donner des taches de corrélation NOE.

Pour chaque carte, il est nécessaire de calibrer les intensités des pics NOE par rapport à des pics de référence correspondant à des distances inter-protons connues. Les pics des corrélations entre protons des méthylènes non équivalents sont classiquement utilisés et correspondent à des distances de 1,8 Å. Les contraintes de distances sont ensuite définies *via* des intervalles de distances dont la limite basse est fixée à 1,8 Å et les limites hautes à 2,7, 3,3 et 5,0 Å pour les NOE forts, moyens et faibles, respectivement.

Appliquée aux peptides, (**Tableau 5**) l'analyse qualitative et quantitative des cartes RMN 2D NOESY permet de déterminer les conformations présentes en solution. Chaque type de structure secondaire sera défini par des distances caractéristiques entre protons appartenant à des résidus différents.

	Hélice		Feuillet β		Coude β	
	α	3_{10}	antiparallèle	parallèle	type I	type II
$d\alpha N(i, i+1)$	3,5	3,4	2,2	2,2	3,4	2,2
$d\alpha N(i, i+2)$	4,4	3,8	-	-	3,2	3,2
$d\alpha N(i, i+3)$	3,4	3,3	-	-	3,6	3,3
$d\alpha N(i, i+4)$	4,2	-	-	-	3,1-4,2	3,8-4,7
$dNN(i, i+1)$	2,8	2,6	4,3	4,2	2,6	4,5
$dNN(i, i+2)$	4,2	4,1	-	-	2,4	2,4
$d\beta N(i, i+1)$	2,5-4,1	2,9-4,4	3,2-4,5	3,7-4,7	3,8	4,3
$d\alpha\beta(i, i+3)$	2,5-4,4	3,1-5,1	-	-	2,9-4,4	3,6-4,6

Tableau 5 Distances inter-protons suivant le type de structure secondaire considéré⁴¹

II.1.b.6 La modélisation sous contraintes RMN

Les analyses RMN permettent d'extraire un jeu de contraintes géométriques composé de distances et d'angles dièdres pour une macromolécule donnée. Ces contraintes vont être ensuite introduites dans un logiciel de modélisation moléculaire afin de déterminer un ensemble de conformations de basses énergies par recuit simulé. La méthode utilisée met en œuvre une succession d'étapes. Dans le cas de foldamères, il est tout d'abord nécessaire de déterminer les paramètres du champ de force manquant pour les monomères synthétiques composant les oligomères par des calculs quantiques ou semi-empiriques. L'oligomère est ensuite construit puis minimisé pour diminuer l'encombrement stérique avant une étape de chauffage à haute température (typiquement 1000 K) afin d'échantillonner une centaine de conformations initiales. Chaque conformation subit ensuite deux étapes de recuit simulé sous contraintes consécutives : la température du système est augmentée à 1000 K avant d'être graduellement diminuée jusqu'à 0 K. Les 20 structures de plus basses énergies et qui ne possèdent pas de violations de distances ($> 0,3 \text{ \AA}$) et d'angles dièdres ($> 10^\circ$) sont sélectionnées pour être raffinées dans une boîte de solvant.

On peut ensuite apprécier la convergence du calcul en superposant les structures et en calculant l'écart quadratique moyen ou RMSD (« Root Mean Square Deviation »). (**Equation 4**)

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}{n}}$$

Où x_i est la position de l'atome i et y_i la moyenne des positions de i pour l'ensemble des structures calculées

Equation 4 Expression du RMSD

Le RMSD est défini comme la somme des carrés des écarts de position de chaque atome par rapport à la moyenne des positions obtenues pour l'ensemble des structures calculées. Plus les valeurs de RMSD sont faibles et plus le calcul a convergé vers des conformations similaires. Un ensemble de conformations dissemblables traduit le plus souvent un manque de données expérimentales que peut refléter un désordre mais également des spectres difficiles à interpréter de part des chevauchements de pics ou le nombre limité de protons sur la molécule étudiée. Dans le cas de peptides ou protéines, des outils permettent de vérifier la géométrie du système en particulier via le diagramme de Ramachandran.

Si des violations subsistent, il est nécessaire de vérifier l'attribution des déplacements chimiques, des NOE et l'intégration des pics de corrélation. Il n'est pas rare que des superpositions de pics augmentent artificiellement les intégrations, conduisant à des contraintes trop strictes.

II.1.c Détermination de la structure à l'état solide

La diffractométrie des rayons X est l'une des plus anciennes techniques d'analyse structurale, offrant une résolution à l'échelle atomique (il est possible de distinguer 2 points séparés par seulement 1 Å). La méthode consiste à bombarder un composé cristallin avec un rayonnement X afin d'obtenir un cliché de diffraction. Les figures de diffraction détectées sont ensuite transformées en distances interatomiques *via* la loi de Bragg : (**Equation 5**)

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin(\theta)$$

où n est un entier, λ la longueur d'onde des rayons X (en Å), d la distance inter-réticulaire (Å), θ le demi-angle de diffraction (en °)

Equation 5 Relation de Bragg

L'analyse par diffraction des rayons X renseigne sur :

- 1) Les paramètres géométriques (longueurs et angles de liaisons)
- 2) Les forces d'interactions intra- et intermoléculaires gouvernant la conformation (liaisons hydrogène, interactions π - π aromatiques) grâce à l'espacement des atomes potentiellement interagissants.

Il est à noter que la structure observée à l'état solide n'est pas obligatoirement identique à la conformation adoptée en solution ; il peut arriver que les conformations d'une même molécule soient différentes en solution et à l'état solide.⁶⁴

Avant d'étudier en détail les grandes familles de foldamères pseudo-peptidiques, nous détaillerons les éléments de contrôle conformationnel sous-tendant la structure de ces objets.

III Foldamères

III.1 Définitions et Intérêts

Les foldamères sont définis comme étant des oligomères synthétiques différents des polymères biologiques, oligonucléotides, peptides, glycanes,⁶⁵ et ayant la capacité d'adopter un état ordonné et stable en solution. Le nombre de degrés de liberté du squelette est souvent important si bien que l'oligomère pourrait en principe adopter un grand nombre de conformations distinctes. Cependant, dans le cas des foldamères, l'espace conformationnel se réduit à un seul conformère.¹² Nous verrons que cette auto-organisation est spontanée et dépend à la fois de contraintes d'angles imposées par les monomères et par l'établissement de réseaux périodiques d'interactions non-covalentes s'établissant le long du squelette de l'oligomère.^{10,11} Par ailleurs, le caractère solvophobe d'une séquence peut également favoriser un repliement compact permettant de stabiliser une structure secondaire.⁶⁶

Le domaine des foldamères s'est imposé au fil des années comme une branche à part entière de la chimie.^{11,65,67} Parmi les architectures considérées comme mimant des structures secondaires adoptées par les peptides (hélices, coudes, feuillets...), certaines ont montré un fort potentiel applicatif en tant qu'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine,⁶⁸ antibactériens⁶⁹ ou vecteurs de pénétration cellulaire⁷⁰... Dans tous les cas, l'activité biologique s'est avérée dépendante de la capacité à introduire des chaînes latérales fonctionnalisables à des positions clés du squelette de l'oligomère.

III.2 Eléments de contrôle conformationnel

Le contrôle de la conformation d'un oligomère synthétique est obtenu par l'application d'un ensemble de forces destinées à imposer une contrainte suffisante au squelette afin qu'il adopte une structure tridimensionnelle définie. Nous verrons que la topologie peut être guidée par un contrôle local de la conformation des monomères, par la création de réseaux d'interactions non-covalentes, liaisons de coordination, d'interactions ioniques ou de liaisons hydrogène entre monomères successifs...

III.2.a Contrôle local de la conformation des monomères : répulsions stériques et rigidité des monomères

L'utilisation de monomères rigides pour lesquels les liaisons et les angles dièdres sont bloqués permet d'obtenir des architectures stables et définies. Pour l'illustrer nous traiterons

dans ce paragraphe, de trois exemples : la topologie des hélicènes, des hélices de *para*-terphenylophane et des oligomères de pipéridines.

III.2.a.1 Le cas des hélicènes

Newman⁷¹ proposa qu'un enchaînement de noyaux aromatiques ortho-condensés devait conduire à des séquences capables d'adopter une structure hélicoïdale : à partir de six résidus, la répulsion stérique des noyaux benzéniques forçant les molécules à adopter une structure hélicoïdale (composé **1**). Le maintien de cette conformation repose sur les contraintes d'angles (60°) imposées par la fusion des cycles aromatiques accompagnée d'une répulsion stérique à partir d'un tour d'hélice bouclé après l'assemblage d'au moins 6 noyaux benzéniques.

Il est à noter que ces molécules possèdent une chiralité hélicoïdale droite ou gauche et peuvent être racémisées par traitement thermique.^{71,72} (**Figure 16**)

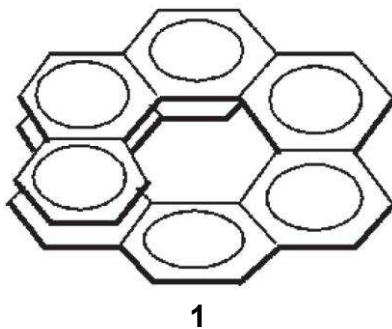


Figure 16 Structure d'un nonahélicène¹²

III.2.a.2 Le cas de l'hélice de *para*-terphenylophane

D'autres exemples de molécules structurées par contraintes d'angles, comme les oligomères de *para*-terphenylophane **2**, ont été étudiées par Kiupel et coll.⁷³ Ces édifices adoptent une conformation dite en « colimaçon » (hélice *geländer*). D'un point de vue formel, ils sont construits par oligomérisation benzénique en position *-para*. Dans ce type d'enchaînement, les cycles aromatiques s'orientent de manière perpendiculaire les uns par rapport aux autres. Une chiralité hélicoïdale va être obtenue en contraignant la rotation du squelette aromatique par l'introduction de liens thioéthers entre les positions *-ortho* des unités successives : la fusion périodique de noyaux benzéniques et de dihydrothiépines garantit la conformation en colimaçon de l'édifice. (**Figure 17**)

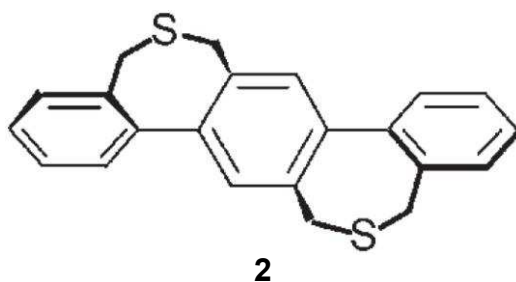


Figure 17 Conformation d'une hélice « geländer »¹²

III.2.a.3 Le cas des oligopipéridines

Semetey et coll.⁷⁴ ont rapporté la structure de l'oligo-1,4-pipéridine **3**: l'azote du monomère $i+1$ est directement relié à la position 4 du monomère i . Afin de minimiser les répulsions stériques, chaque monomère adopte une conformation de type chaise contraignant le monomère suivant en position équatoriale. Les oligopipéridines s'arrangent ainsi, en solution aqueuse, en une structure linéaire rigide malgré des degrés de liberté résiduels. (**Figure 18**)

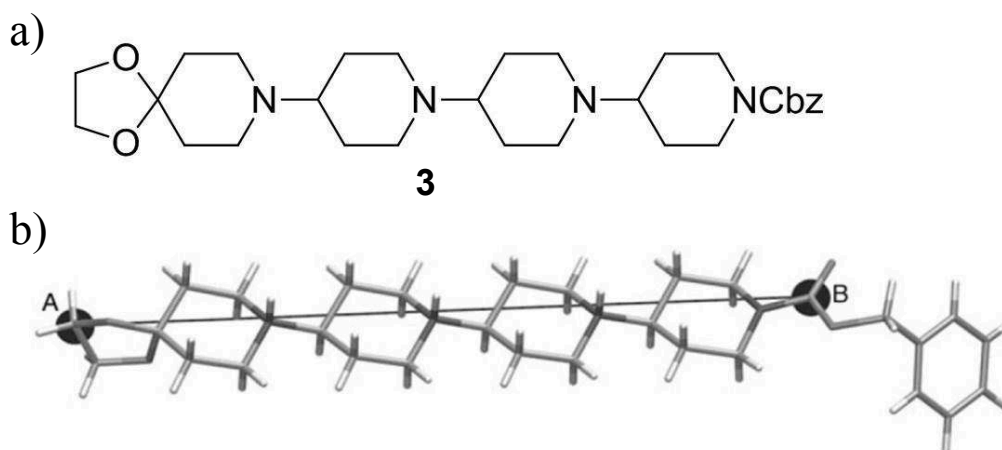


Figure 18 Structure linéaire des oligopipéridines ; a) composé **3**, b) Structure issue de la simulation de dynamique moléculaire (le segment [AB] indique le caractère linéaire de l'édifice)⁷⁴

Cette structure a été confirmée par RMN (expérience NOESY) et par résolution de la structure cristalline obtenue par diffraction X.

III.2.b Contrôle conformationnel par réseaux d'interactions non-covalentes entre monomères successifs

Outre un contrôle local de la géométrie des monomères, le repliement d'un oligomère peut être induit par la création d'un réseau régulier d'interactions non-covalentes (liaisons de

coordination, interactions ioniques, liaisons hydrogène...) au sein de la séquence. L'établissement d'un macrodipôle favorise la stabilisation des édifices.

III.2.b.1 La liaison de coordination

La création d'un réseau de liaisons de coordination entre des sels métalliques et un oligomère organique peut constituer la force motrice principale permettant d'expliquer un état conformationnel. L'énergie d'une liaison de coordination est comparable à celle des liaisons ioniques ou covalentes (de 20 à 200 kcal/mol selon la nature du métal et du ligand considérés). Localement, le repliement du squelette de l'oligomère, jouant le rôle de ligand pour le métal, est gouverné par la coordinence du centre métallique. C'est ce nombre de coordination (NC) qui fixe la géométrie du complexe formé. Il dépend de la charge et de la configuration électronique du métal (par exemple, si NC = 4, le complexe sera soit tétraédrique soit plan carré, si NC = 6, il sera octaédrique). Pour complexer les cations métalliques, l'oligomère est souvent polydente c'est-à-dire qu'il comporte plusieurs fonctions basiques au sens de base de Lewis.

C'est sur ce principe que Kwok-Keung et coll.⁷⁵ ont développé la séquence **4** constituée de 5 pyridines oligomérisées en position *ortho*-. Cette séquence n'adopte pas une structure bien définie en solution. Cependant en présence d'un sel de rhénium(I) (le $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$) chacune des 2 bipyridines de la séquence complexe un cation Re(I) octaédrique contraignant l'oligomère à effectuer une rotation à 180° autour du noyau aromatique situé au centre de la séquence pour atteindre une conformation en hélice (**Figure 19, molécule 5**). Les autres sites de coordination du métal sont occupés par 3 ligands carbonyles et une molécule de pyridine.

La modification du degré d'oxydation du métal et donc du nombre de sites de coordination, ici l'utilisation d'un sel de rhénium(III) (le $[\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2]$) impose une autre conformation au système, à savoir une géométrie bipyramidale à base pentagonale, où chacune des 5 pyridines de la séquence **6** établit une liaison de coordination avec le métal. Les 2 autres sites sont occupés par les 2 atomes de chlore amenés par le sel de Re(III). Ils sont situés en position *trans* l'un de l'autre. (**Figure 19**) Les structures des 2 complexes ont été déterminées par diffraction X.

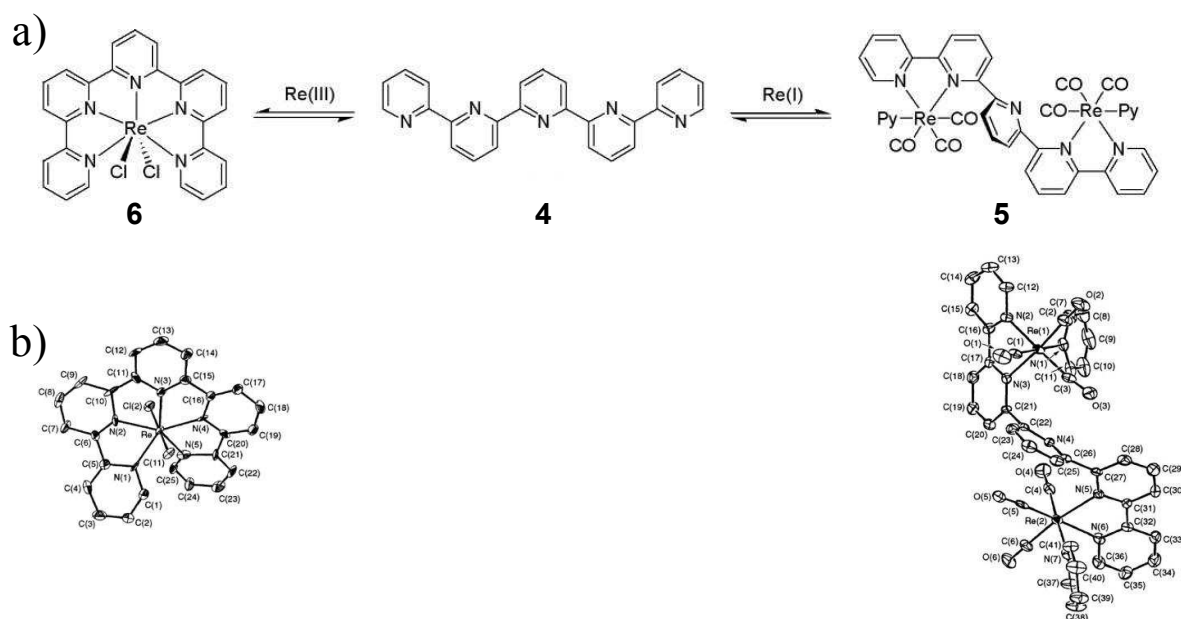


Figure 19 Structure tridimensionnelle obtenue en fonction de la géométrie du complexe : a) Mode de coordination du ligand 4, b) Structures cristallines correspondant aux deux complexes formés^{11,75}

Ce type d'approche a été reprise par Kim et coll.⁷⁶ pour le développement de polymères contraints. Leur protocole repose sur la polymérisation de monomères divalents possédant deux pyridines, chacune capable de complexer un cation divalent. L'édifice se construit alors par auto-assemblage dès la mise en contact du monomère et d'un sel métallique. Cette stratégie a été appliquée à la synthèse d'un polymère supramoléculaire hélicoïdal obtenu par complexation de fluoroborate d'argent avec un monomère de type *m*-pyridinylène éthylnylène engendrant la séquence 7. La chaîne latérale du résidu contient des groupements de type polyéthylène glycol (PEG) permettant d'améliorer la solubilité de l'objet dans des solvants polaires comme le méthanol, l'éthanol ou l'acétonitrile. (**Figure 20**)

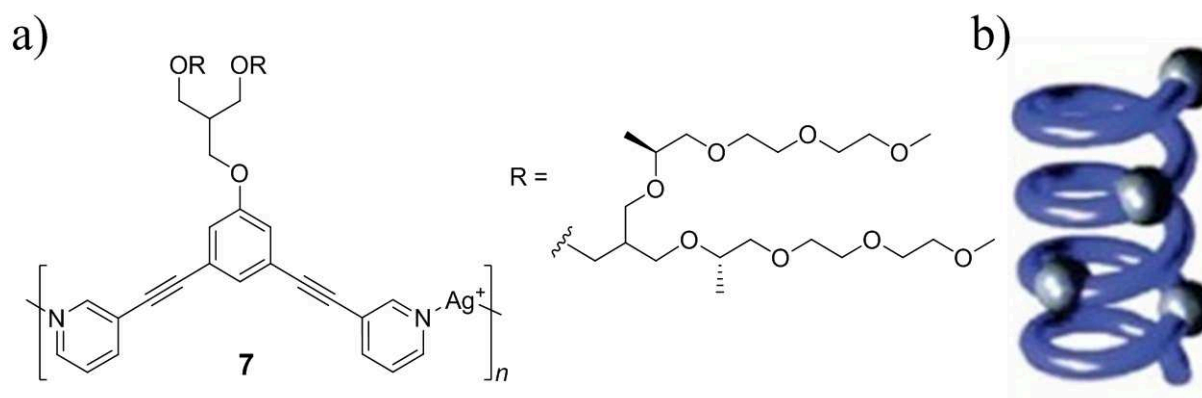


Figure 20 Structure tridimensionnelle du polymère 7 (le cation Ag^+ étant représenté sous la forme d'une boule grise)⁷⁷

III.2.b.2 La liaison hydrogène

La liaison hydrogène est une force non-covalente s'établissant entre un atome d'hydrogène acide et un hétéroatome d'azote, oxygène, soufre ou fluor situé entre 1 et 4 Å. L'intensité de la force de liaison est directement reliée à cette distance et à la nature des groupements donneurs et/ou accepteurs de liaison hydrogène.^{78,79} (**Tableau 6**)

	Type de liaison hydrogène		
	Faible	Modérée	Forte
Energie (kcal/mol)	1 à 4	4 à 15	15 à 40
Exemple de couple X-H...Y	C-H...O	NH...O=C	[F-H...F] ⁻
Distance [X-Y], (Å)	3 à 4	2 à 3	1 à 2

Tableau 6 : Intensités relatives de la liaison hydrogène en fonction de la nature et de la distance des groupements donneurs et accepteurs

Dans les peptides et les protéines les liaisons hydrogène s'établissent entre carbonyles et protons amidiques. Elles sont donc d'intensité modérée, chaque liaison contribuant pour environ 8 kcal/mol à la stabilité de l'édifice. Cependant, la contribution d'un nombre suffisant de liaisons hydrogène formant un réseau régulier le long du squelette peptidique permet de contraindre et de maintenir une conformation définie en solution. L'établissement de tels réseaux d'interaction peut constituer une force motrice de choix pour le développement de foldamères. Les conformations peuvent être modulées par la répartition des groupements accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène le long de la séquence : par analogie avec la nomenclature utilisée pour les peptides, le réseau de liaisons hydrogène dans un foldamère est défini en fonction du nombre de résidus n séparant le donneur de l'accepteur (ex : $\text{NH}(i+n)\cdots\text{O}=\text{C}(i)$) et la taille du pseudo-cycle ainsi formé.

L'établissement d'un réseau de liaisons hydrogène très dense est essentiel pour comprendre les processus gouvernant le repliement de certains foldamères. Gong et coll.⁸⁰ ont par exemple étudié par RMN l'arrangement des oligoamides aromatiques **8** et **9** en solution dans le chloroforme. (**Figure 21**)

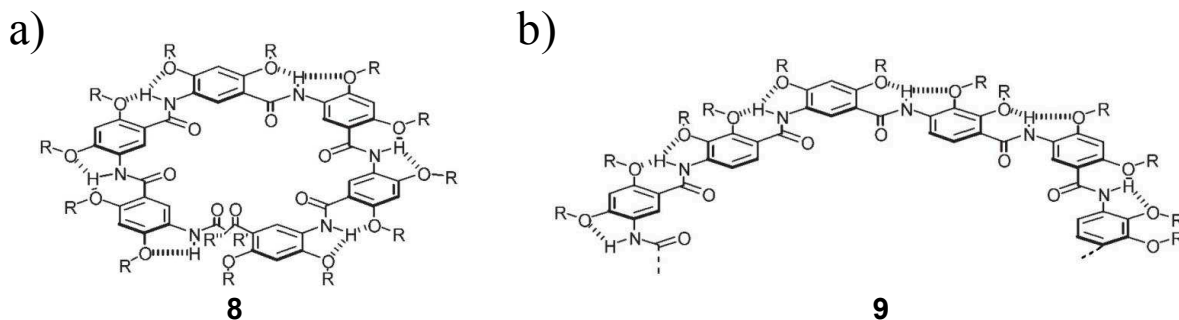


Figure 21 Intérêt de la liaison hydrogène dans le maintien de la conformation des structures à 7 résidus par tour d'hélice (**8**) et à 21 résidus (**9**), construites à partir de monomères différents¹²

Le squelette de l'oligoamide **8** est construit par oligomérisation d'acide 5-amino-2,4-dialkoxybenzoïque. Cette séquence présente un nombre de degrés de liberté important mais sa conformation en solution est gouvernée par 3 types de forces :

- un contrôle conformationnel local imposé par l'utilisation de monomères rigides et plans,
- la configuration *trans* préférée par la fonction amide limitant l'orientation conformationnelle des monomères les uns par rapport aux autres ,
- l'établissement d'un réseau de liaisons hydrogène entre les protons amidiques et les 2 fonctions éthers situées en position *ortho*- permettant de maintenir dans un même plan les noyaux aromatiques. En l'absence de fonctions éthers, les noyaux aromatiques subiraient une rotation périodique à l'image de ce qui est observé dans les oligobenzamides de Wilson⁸¹ et les oligo-trispyridylamides de Hamilton⁸².

Grâce à la combinaison de ces 3 paramètres, l'oligomère **8** adopte une structure hélicoïdale présentant 7 résidus par tour.

Dans une approche analogue, les mêmes auteurs ont synthétisé la séquence **9** et ont étudié son comportement en solution. Cet oligomère est construit par alternance des acides 5-amino-2,4-dialkoxybenzoïque et 4-amino-2,3-dialkoxybenzoïque. Ce changement dans la nature du squelette va imposer à l'hélice un élargissement de son diamètre atteignant le nombre de 21 résidus par tour. Cette conformation résulte de la contribution des 3 forces décrites précédemment.

Le même type d'approche a été étudié par le groupe d'Ivan Huc lors du développement de δ -peptides comme l'oligoquinoline **10**.^{83,84} (**Figure 22**) L'oligoquinoline **10** adopte une conformation hélicoïdale extrêmement stable grâce à l'utilisation de monomères contraints par l'introduction d'un motif quinoline. Ces hétérocycles substitués en positions -2 et -8 par un lien amide vont favoriser l'établissement de liaisons hydrogène entre le proton amidique et

l'azote de l'hétérocycle. Celles-ci vont compacter fortement la structure hélicoïdale en augmentant le degré de courbure du système.

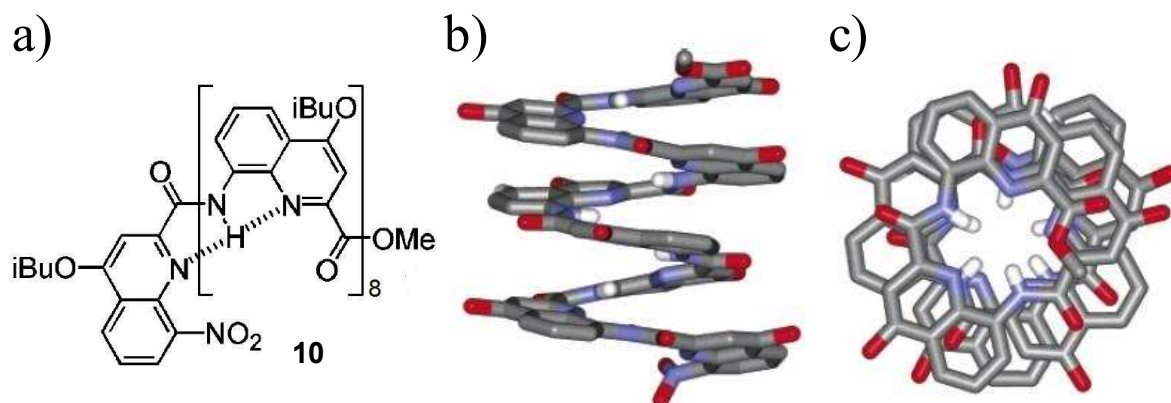


Figure 22 Oligoquinolines développées par le groupe de Huc : a) séquence, b) et c) structure cristalline représentée perpendiculairement et parallèlement à l'axe hélicoïdal⁸³

III.2.b.3 L'interaction π - π aromatique

Les interactions π - π aromatiques jouent un rôle crucial dans la formation de nombreux édifices structurés.^{80,85} Elles sont rarement l'unique force motrice gouvernant la structuration mais peuvent être associées à d'autres éléments de structuration pour accroître la stabilité des édifices.

Il existe principalement deux types d'interactions π - π aromatiques : l'une où les plans des noyaux aromatiques sont parallèles (configuration « sandwich ») et l'autre où les plans des cycles sont perpendiculaires (configuration « forme T »). Des études théoriques par calcul *ab initio* en utilisant la théorie de la perturbation de Møller-Plesset (MP) ont permis pour chacun des types d'interactions π - π aromatiques d'estimer la distance optimale.⁸⁶ (**Tableau 7**)

Configuration de l'interaction	« Sandwich »	« Forme T »
Distance optimale, (Å)	3,7	4,9
Energie d'interaction, (kcal/mol)	3,2	3,4

Tableau 7 Caractéristiques des 2 principales interactions π - π

A titre d'exemple, Krebs et coll.⁸⁷ ont développé des séquences oligomériques de 1,5-diuréidonaphthalènes **11** et ont étudié leur comportement en solution par RMN et à l'état solide par diffraction des rayons X. (**Figure 23**)

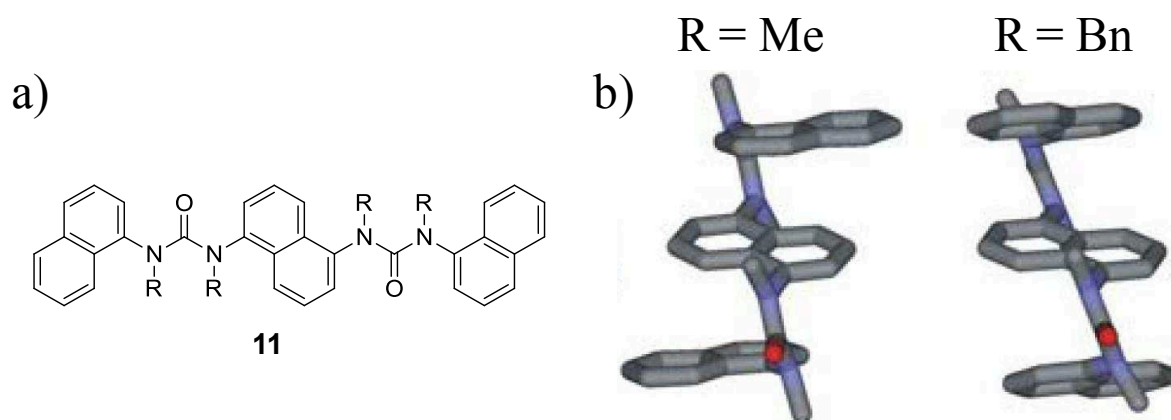


Figure 23 a) Formule des oligomères 1,5-diuréidonaphthalène **11** et b) Structures cristallines ; la conformation est dépendante de la nature du substituant, méthyle ou benzyle (les substituants ne sont pas représentés pour plus de clarté)¹²

Dans ces édifices, les unités monomériques sont particulièrement rigides ce qui permet une pré-organisation de l'oligomère. Les noyaux naphthyles se positionnent de manière parallèle : le réseau d'interactions π - π parallèles qui s'établit va stabiliser l'édifice et empêcher la rotation du squelette autour de la fonction urée.

III.2.b.4 L'interaction ionique

L'interaction ionique est une force électrostatique se manifestant entre deux espèces chargées et de signe opposé, c'est-à-dire, entre un cation et un anion, l'ensemble formant un sel. Elle diffère de la liaison de coordination d'un point de vue orbitalaire car la paire d'ions considérée ne partage pas d'électron au sein d'une même orbitale. La contribution des liaisons ioniques dans la structuration d'un squelette oligomérique est beaucoup moins fréquente que les autres interactions comme la liaison hydrogène ou l'interaction π - π aromatique.¹¹ Toutefois, la création locale d'une interaction ionique peut apporter un surcroît de stabilité (quelques exemples seront abordés dans la partie consacrée aux β -peptides).

Néanmoins, il existe quelques rares cas pour lesquels la formation d'un réseau à la fois de liaisons hydrogène et d'interactions ioniques participe au maintien d'une structure tridimensionnelle définie. C'est notamment le cas dans l'hexapyrrine **12** développée par Sessler et coll.⁸⁸ (**Figure 24**) Le composé **12** est en première approximation un oligomère de pyrroles.

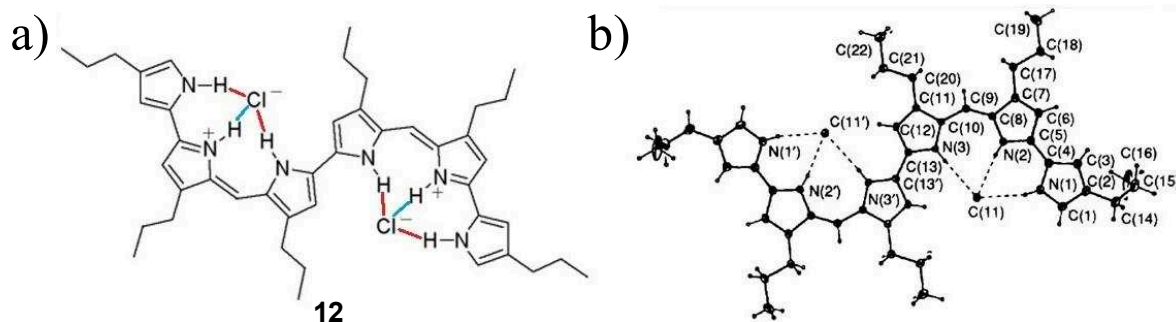


Figure 24 a) Liaisons ioniques (en bleu) et hydrogène (en rouge) au sein de la 5,15,25-tris-nor-hexapyrrine 12, b) structure cristalline

Il a été montré que l'hexapyrrine, sous forme de dichlorhydrate, s'arrangeait en ruban dans une conformation dite « en S » à la fois en solution et à l'état solide. La structure cristalline met en évidence les forces contribuant à la structuration : l'arrangement tridimensionnel est dû à la présence de 2 ions chlorures établissant des ponts salins avec les noyaux pyrrolium.

III.2.c Les effets solvophobes

Enfin, les interactions solvant-soluté jouent un rôle majeur dans la modulation de l'intensité des forces intramoléculaires qui déterminent *in fine* la structure compacte d'un oligomère.¹² Les effets solvophobes sont difficiles à appréhender car ils impliquent plusieurs phénomènes dépendant à la fois de propriétés macroscopiques du solvant, (*i.e.* constante diélectrique, polarisabilité...) et de capacités d'interaction locale entre les molécules du solvant et/ou entre solvant et soluté, comme la formation, la rupture de liaisons hydrogène ou d'interactions de Van-der-Waals. La minimisation de l'énergie d'interaction solvant-soluté peut conduire à des repliements compacts permettant de limiter les surfaces d'exposition de l'oligomère au solvant, renforçant par la même occasion les contacts intramoléculaires au cœur de l'objet. Une étude systématique de l'influence du solvant sur la structure d'un oligomère mixte d'oligo(*m*-phénylène éthynylène) **13** réalisée par Hill et Moore⁸⁹ a souligné l'importance de l'amphiphilie d'une molécule dans sa dynamique de repliement. (Figure 25)

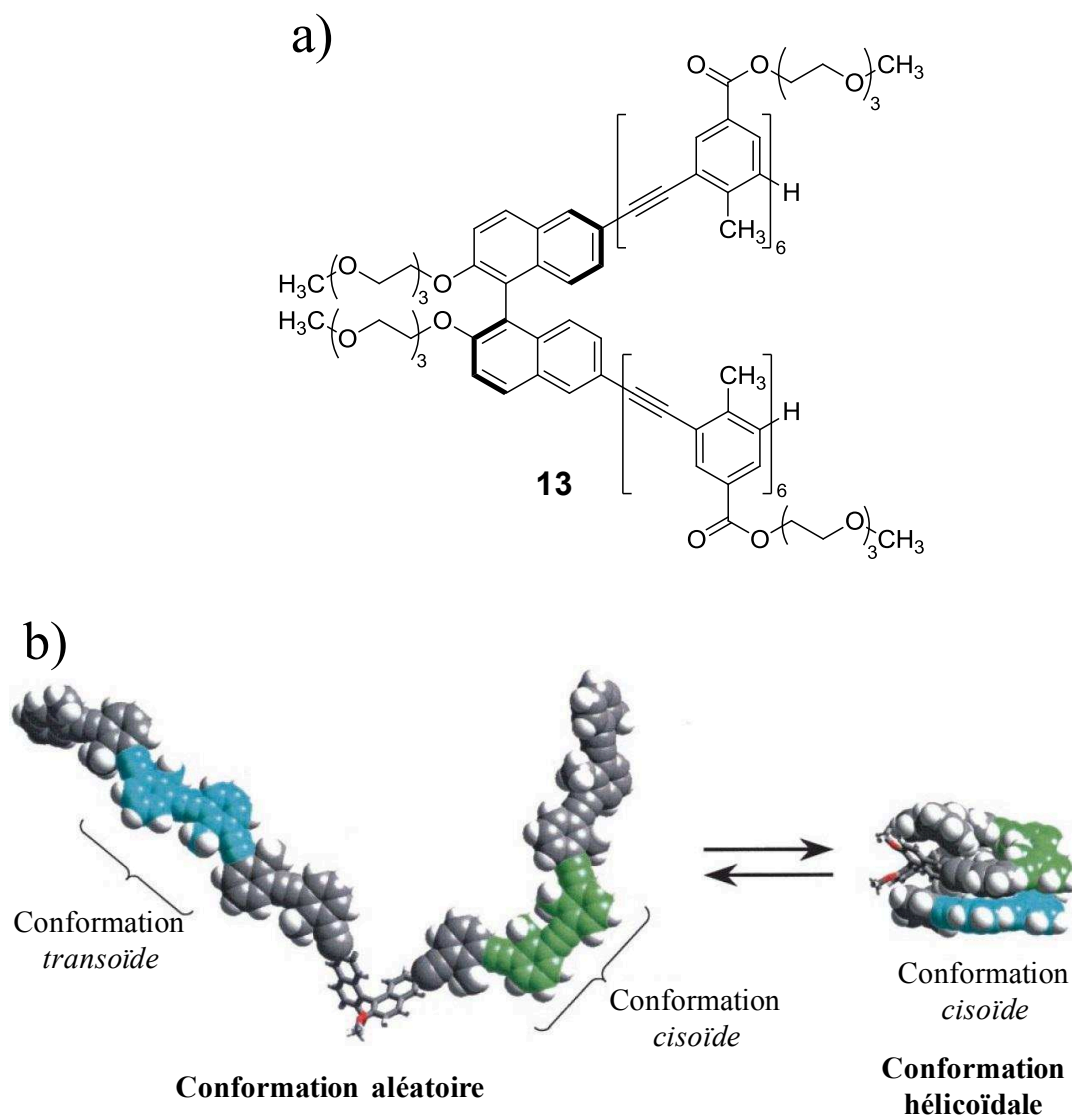


Figure 25 a) Structure du phénylène éthylène bis-hexamérique **13** étudié, b) équilibre entre les conformations modélisées aléatoire et hélicoïdale (les chaînes latérales ont été retirées pour plus de clarté)⁸⁹

Les chaînes latérales doivent favoriser la solvatisation de l'oligomère **13**, par exemple être polaire dans un solvant polaire, tandis que le squelette doit être conçu de telle manière à favoriser la formation d'interactions intramoléculaires. Concernant l'oligo(*m*-phénylène éthynylène) **13**, son arrangement aléatoire se traduit par la présence de deux conformations *cisoïde* et *transoïde* au sein du squelette. A l'inverse, seule la forme *cisoïde* est observée dans l'arrangement hélicoïdal ; ce type de structure est stabilisé par des interactions π - π aromatiques intramoléculaires dont la formation et la force dépendent de la nature du solvant. 20 solvants sur les 30 testés ont été en mesure de solubiliser la séquence. Les solutions ont été analysées par UV et dichroïsme circulaire afin d'évaluer la conformation favorisée dans chaque solvant. Les milieux polaires protiques et aprotiques déplacent l'équilibre en faveur de

la forme *cis*oïde promouvant la conformation hélicoïdale. A l'inverse, les solvants apolaires (en particulier les hydrocarbures chlorés) ont plutôt tendance à engendrer une conformation aléatoire.

Après cette description des principaux éléments gouvernant le contrôle conformationnel, nous allons aborder et étudier les grandes familles de foldamères pseudo-peptidiques.

III.3 Les Grandes Familles de foldamères pseudo-peptidiques

Les foldamères pseudo-peptidiques ont fait l'objet d'une classification tenant compte non pas du type de structure tridimensionnelle adoptée, mais de la nature du monomère utilisé pour construire la séquence. Leur nom peut être soit en rapport avec la fonction chimique portée par l'unité de base (oligourée), soit créé par analogie avec les α -peptides naturels (β - et γ -peptide).

La **Figure 26** présente une classification possible des différentes familles des foldamères peptidomimétiques.

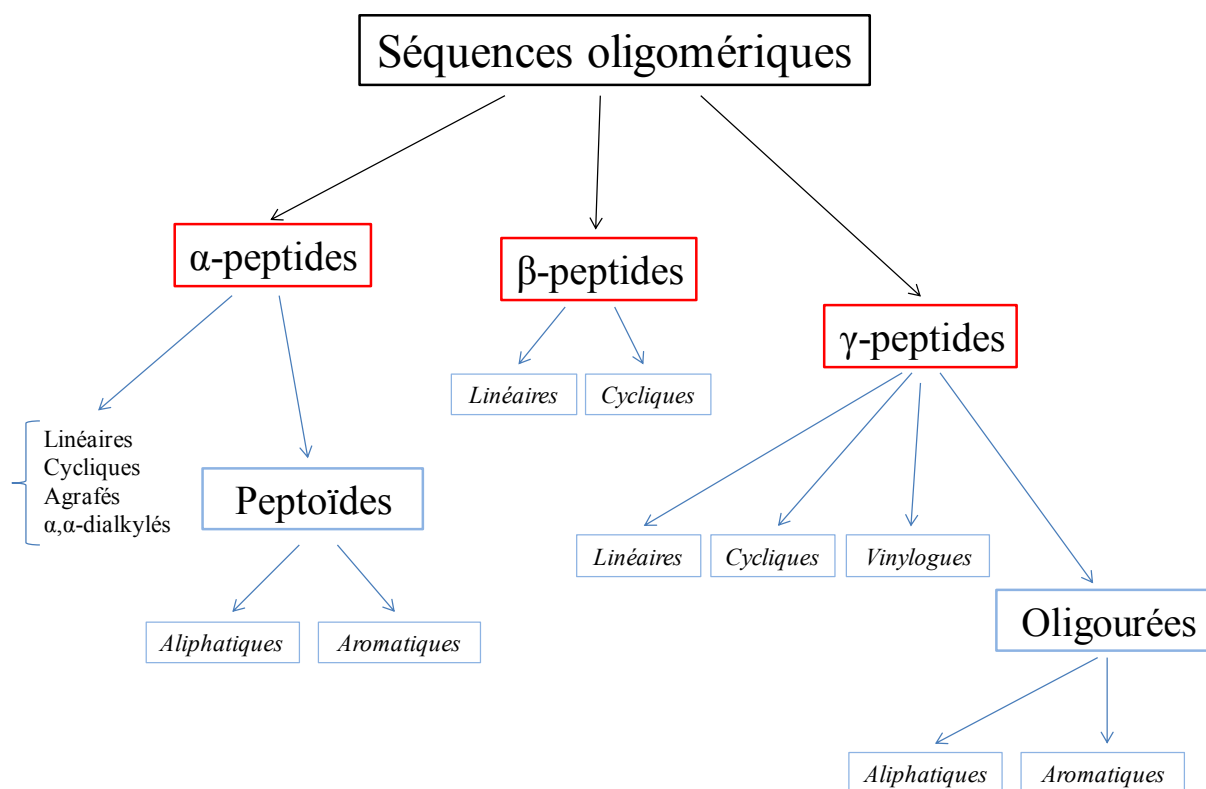


Figure 26 Classification des différentes familles de mimes de peptides

Nous avons pris le parti de classer les peptides et peptidomimétiques en trois grandes familles :

- 1) les **α -peptides** (linéaires, cycliques, agrafés...) et les **peptoïdes**
- 2) les **β -peptides** construits à partir de β -amino acides linéaires ou cycliques
- 3) les **γ -peptides** rassemblant les oligomères constitués de γ -amino acides linéaires, cycliques, vinylogues et les **oligourées** pouvant être aliphatiques ou aromatiques.

Nous avons choisi de ne pas aborder les δ -peptides en tant que mimes de peptides dans ce manuscrit pour les raisons suivantes : la plupart des monomères les composant s'éloignent de la structure des α -amino acides par l'utilisation de composés cycliques, mono- ou polyaromatiques contraignant fortement les angles de torsion. Cette restriction conformationnelle est en opposition avec la flexibilité des α -peptides et de ce fait, empêche les δ -peptides d'être considérés comme des peptidomimétiques.

Nous limiterons notre propos à l'étude des **peptoïdes**, des **β -** et **γ -peptides** pour terminer avec les **oligourées**, en passant sous silence les α -peptides naturels contraints par transformation (peptides cycliques, agrafés...) et les δ -peptides.

III.3.a Les Peptoïdes

III.3.a.1 Définition / Nature du monomère

Les **peptoïdes** sont des oligomères de *N*-(alkyl) ou *N*-(aryl)glycines, la *N*-(méthyl)glycine étant l'unité de répétition la plus fréquemment rencontrée. Ils peuvent être considérés comme mimes des α -peptides au sein desquels la chaîne latérale aurait migré du carbone α vers l'azote de la liaison amide causant une perte de la chiralité portée par le monomère. De par leur similarité avec les α -peptides, les angles dièdres des peptoïdes sont définis de la même manière : l'angle Φ (*phi*) implique l'enchaînement $C_{n-1}-N-C\alpha-C$, l'angle ψ (*psi*), les atomes $N-C\alpha-C-N_{n+1}$ et l'angle ω (*omega*), les atomes $C\alpha_{n-1}-C_{n-1}-N-C\alpha$. (**Figure 27**)

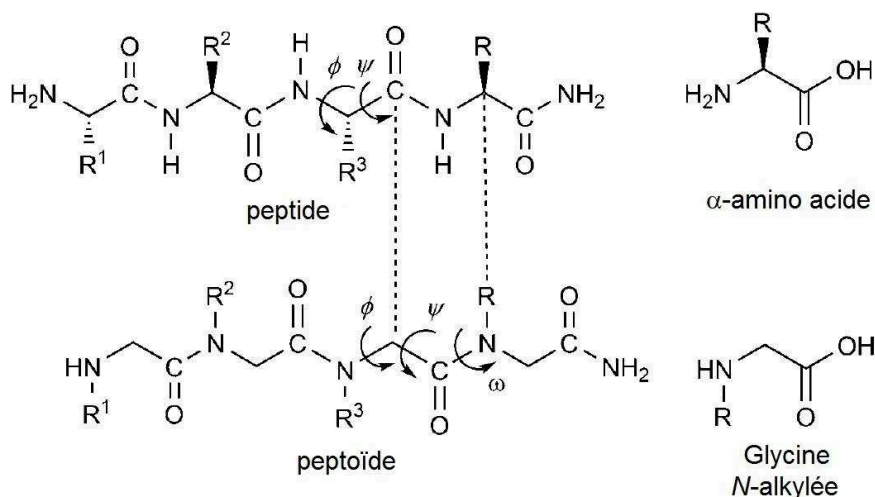


Figure 27 Comparaison entre les peptoïdes et les α -peptides²⁹

III.3.a.2 Principes gouvernant le repliement des peptoïdes

III.3.a.2.1 Principaux éléments de structuration

La substitution de l'azote implique qu'aucun réseau de liaisons hydrogène ne peut s'établir le long du peptoïde. Par ailleurs, cette substitution par un groupement alkyle conduit à la formation d'un amide tertiaire imposant une modification de l'équilibre *cis/trans*. (Figure 28)

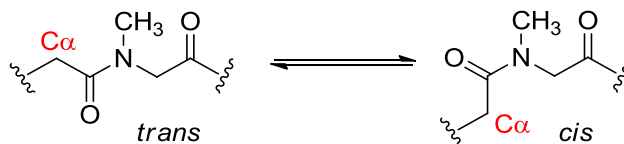


Figure 28 Géométries envisageables pour les peptoïdes

Cette substitution va favoriser la géométrie *cis*. En effet, des calculs quantiques *ab initio*, menés sur un peptoïde (*N,N*-diméthyl-2-(*N*-méthylacétamido)acétamide) ont démontré que le groupement méthyle porté par l'azote induisait une gêne stérique avec le méthylène $C\alpha$ dans le cas où le peptoïde était de configuration *trans*. (Figure 28) Les mêmes calculs réalisés sur deux α -amino acides protégés (Ac-Ala-NH-CH₃ et Ac-Gly-NH-CH₃) ont montré que ces phénomènes de répulsion stérique n'existaient pas.⁹⁰ Dans les peptoïdes, cette contrainte favorise la géométrie *cis*. Cependant, cette modification de l'équilibre *cis/trans* bien que nécessaire n'est généralement pas suffisante pour expliquer à elle-seule la formation de structures stables.

Des calculs de dynamique moléculaire menés par Armand et coll.⁹¹ sur un octamère de (*S*)-*N*-(1-phényléthyl)glycines avaient prédit que la présence d'un substituant portant un centre

stéréogène en α de l'azote pouvait accroître la stabilité de l'édifice et favoriser une structuration hélicoïdale semblable à celles des polyprolines de type I. La présence d'une chaîne ramifiée devait permettre en effet de restreindre l'espace conformationnel du squelette peptidoïde en exerçant des contraintes stériques locales. La présence d'un centre stéréogène devait favoriser un des deux sens de rotation de l'axe de l'hélice. Ces prédictions théoriques ont été complétées en enregistrant les spectres dichroïques en solution aqueuse (96% d'eau et 4% de méthanol vv) d'oligomères de (S)-N-(1-phényléthyl)glycines, les fonctions amides du squelette faisant office de chromophores. Les spectres étaient similaires à ceux obtenus pour une hélice α ($\lambda_{\text{maxima}} = 190$ nm et $\lambda_{\text{minima}} = 200$ et 220 nm). Cette organisation a par la suite été également confirmée par Wu et coll.⁹² qui ont publié la première structure cristalline de peptidoïde, un pentamère de (R)-N-(1-cyclohexyléthyl)glycine **14**. (**Figure 29**)

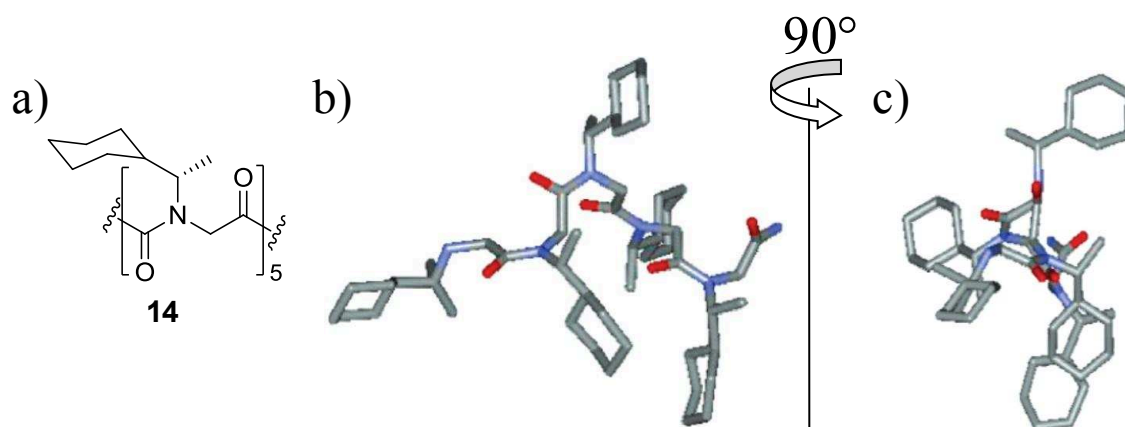


Figure 29 Structure hélicoïdale d'un pentamère **14**. a) Séquence. Structure cristalline en projection : b) perpendiculaire et c) parallèle à l'axe de l'hélice⁹²

La conformation adoptée par la séquence **14** est une hélice gauche présentant un pas de 6,7 Å et comportant 3 résidus par tour répartis sur 3 faces distinctes. Les liaisons amides adoptent une configuration *cis*. Les valeurs d'angles dièdres mesurés confirment l'analogie avec les hélices de polyprolines de type I. (**Tableau 8**) L'hélicité en solution (acétonitrile) a également été mise en évidence par dichroïsme circulaire et RMN.

Résidu	ω (°)	Φ (°)	ψ (°)	n	h (Å)
1	-	-	+173,9		
2	+0,1	-86,3	-151,7		
3	+3,4	-67,6	+177,4	3	6,7
4	-3,0	-82,9	-141,7		
5	+0,1	-64,1	+162,5		
Polyproline de type I	0	-83	+158	3,3	6,4

Tableau 8 Comparaison des valeurs d'angles dièdres du pentamère 14 et une polyproline de type I⁹²

III.3.a.2.2 Optimisation de la stabilité

Dans une de ses études,⁹³ le groupe de Zuckermann a synthétisé 14 peptoïdes dont la longueur allait de 1 à 36 résidus et a étudié leur conformation et leur stabilité dans des solvants organiques et en phase aqueuse. Les monomères étaient substitués par des groupements achiraux ou portant un centre stéréogène en position N α . Les substituants pouvaient être des chaînes aliphatiques, linéaires ou cycliques ou bien des chaînes benzyliques. (**Figure 30**)

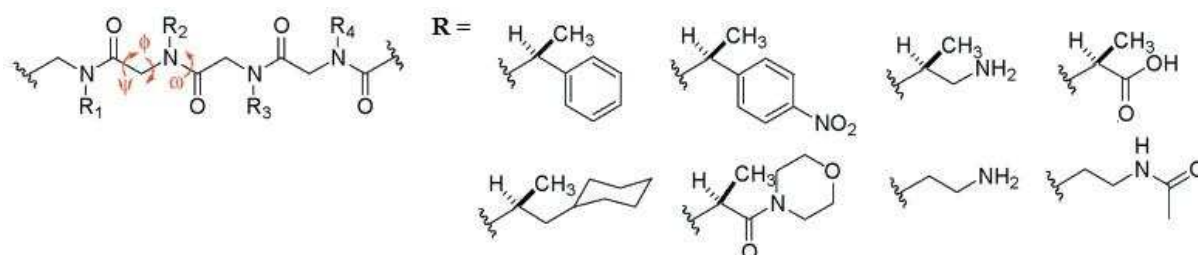


Figure 30 Substituants utilisés pour la synthèse des peptoïdes de Zuckermann⁹³

Les mesures de dichroïsme circulaire ont confirmé que les peptoïdes adoptaient une structure hélicoïdale à la fois dans l'eau et l'acétonitrile dès l'enchaînement de 5 résidus. La capacité de structuration pouvait être renforcée par l'introduction de substituants aromatiques suggérant une stabilisation par contribution d'effets électroniques. L'accroissement de stabilité lié à la présence de substituants benzyliques a été étudié en détail par le groupe de Blackwell⁹⁴ qui a évalué par RMN ¹H l'équilibre thermodynamique *cis/trans* de la liaison amide dans un modèle simplifié de peptoïde (séquence 15). (**Figure 31**)

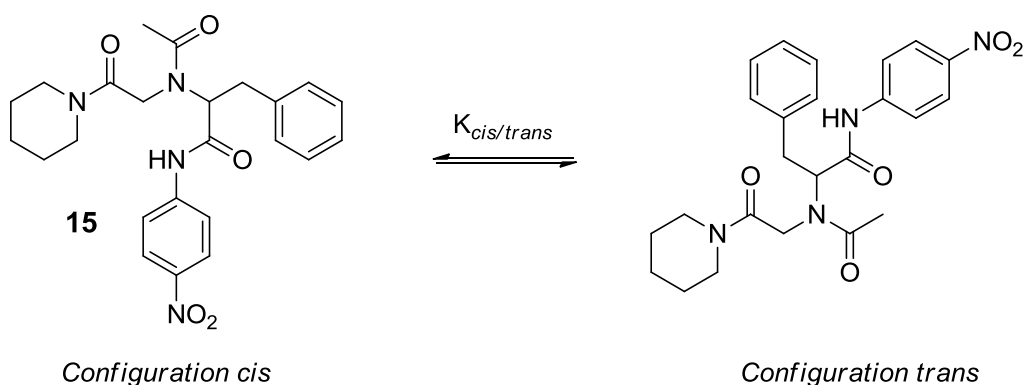


Figure 31 Peptide 15 analysé par Blackwell ; détermination de la constante thermodynamique $K_{cis/trans}$

La détermination de la constante thermodynamique K a permis aux auteurs de calculer les enthalpies de Gibbs (ΔG) : les valeurs des paramètres $K_{cis/trans}$ et de ΔG renseignent sur la configuration favorisée de la fonction amide. Il a été observé que la présence d'un substituant α -methylbenzyl en position $N\alpha$ favorisait la géométrie *cis* au détriment de la *trans* dans un rapport d'environ 60 : 40 (les valeurs oscillent sensiblement selon la nature du solvant (**Figure 31**)).⁹⁵ Ainsi, l'équilibre *cis/trans* dépend également d'effets électroniques locaux occasionnés par la nature du substituant porté par l'azote. Ils s'expliquent par la capacité de l'oxygène de la liaison amide à partager un doublet électronique non-liant avec un groupement accepteur adjacent. Le recouvrement orbitalaire dépendra de la distance et de l'angle séparant l'atome donneur du groupement accepteur fixant ainsi la configuration de l'amide.

Deux types de donations sont possibles⁹⁶ : (**Figure 32**)

- $n_{amide} \rightarrow \pi^*_{aromatique}$: en cas de substitution de l'azote amidique par un groupement α -methylbenzyl, le doublet non liant de l'oxygène (résidu i) ira remplir l'orbitale π^* du noyau aromatique (résidu $i+1$), favorisant la position *cis*.
- $n_{amide} \rightarrow \pi^*_{amide}$: en cas de substitution de l'azote amidique par un groupement alkyle (ex : méthyle), il s'établit une interaction $n \rightarrow \pi^*$ entre une paire d'électrons de l'oxygène du carbonyle du résidu i et l'orbitale π^* du carbonyle porté par l'amide adjacent du résidu $i+1$. Cette interaction favorise la forme *trans*-amide.

Ainsi, dans le cas d'oligomères de (*R*)-*N*-(1-phényléthyl)glycine,^{97,98} ce phénomène de donation engendre une différence d'énergie entre la configuration *cis* et *trans* : $E_{trans} - E_{cis} > 1,4$ Kcal/mol.

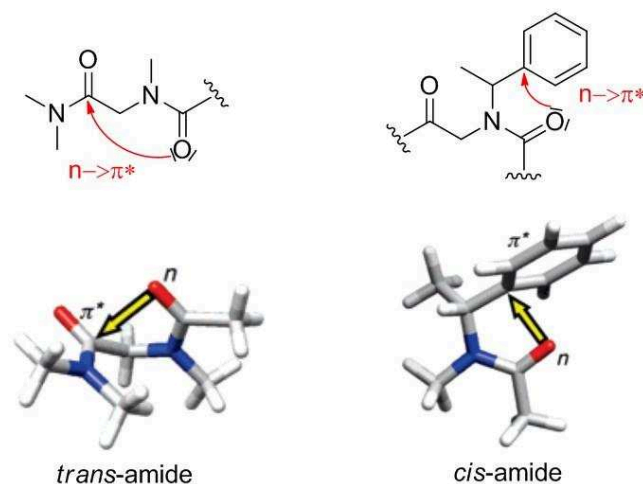


Figure 32 Stabilisation des géométries cis et trans via une interaction $n \rightarrow \pi^*$ dépendant du substituant ⁹⁴

Par ailleurs, la mesure du dichroïsme circulaire de séquences allant de 3 à 20 résidus a montré que la stabilité de l'édifice augmentait avec la longueur de chaîne. Elle atteint un maximum à partir du dodécamère.^{97,98} Les travaux de Zuckermann ont ainsi permis de définir des règles précises permettant de favoriser l'arrangement hélicoïdal de courtes séquences (contenant moins de 12 monomères) :^{92,99-101}

- 1) la présence d'au moins 50% de résidus portant un centre stéréogène (tous de même configuration) et un cycle aromatique sur la chaîne latérale permet de favoriser les interactions $n_{\text{amide}} \rightarrow \pi^*_{\text{aromatique}}$
- 2) l'introduction d'un groupement chiral en position C-terminale de la séquence permet de prévenir la déstructuration de l'hélice
- 3) une large proportion de substituants aromatiques permet de favoriser des interactions π - π le long de l'axe hélicoïdal.

Une récente revue publiée par Faure et Taillefumier rassemble les principales voies de synthèses et études conformationnelles menées sur les peptoïdes et composés apparentés.¹⁰²

III.3.a.3 Applications en chimie médicinale

L'absence d'un réseau de liaisons hydrogène limite la dénaturation de la structure des peptoïdes causée dans les solvants protiques polaires, notamment l'eau et par un accroissement de la température.¹⁰³ De plus, leur résistance envers la protéolyse fait des peptoïdes des candidats de choix pour le développement d'agents thérapeutiques.^{29,104,105}

Les peptoïdes ont une biodisponibilité par voie orale du même ordre de grandeur que celle des peptides. En revanche celle-ci augmente fortement lors d'une administration par voie

péritonéale ou intraveineuse.¹⁰⁶

Parmi les applications des peptoïdes, on peut citer des tentatives pour développer des inhibiteurs de l'interaction Mdm2/p53 ou des ligands de la GST (*Glutathion S-transférase*), cibles pertinentes dans le traitement de certains cancers.^{107,108} Des peptoïdes cationiques amphipathiques possédant un potentiel antibactérien intéressant ont également été rapportés. De la même manière que leurs analogues α peptidiques,¹⁰⁹⁻¹¹¹ il induisent la perméabilisation de la membrane bactérienne à l'origine de la mort de la cellule.

A titre d'exemple, l'« ampeptoïde » **16** (pour oligomère peptoïdique antimicrobien) a été développé par le groupe de Barron.¹¹² : (**Figure 33**)

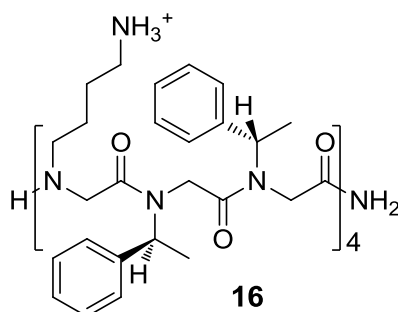


Figure 33 Structure de l'ampeptoïde **16** développé par le groupe de Barron (forme ionisée, le contre-ion n'apparaît pas)

Construit par répétition d'un même motif (X-Y-Y)₄, où X et Y sont respectivement la *N*-(4-aminobutyl)glycine et la (*S*)-*N*-(1-phényléthyl)glycine, le composé **16** s'arrange en une hélice amphipatique : chacune des trois faces de l'édifice est composée d'un seul type de résidus X ou Y. Les chaînes cationiques $-(CH_2)_4-NH_3^+$ sont ainsi orientées dans le même plan. Son activité a été testée sur 6 souches bactériennes pathogènes de classe 2 parmi lesquelles des Gram positifs et négatifs. Certaines d'entre elles avaient développé une multirésistance vis-à-vis des antibiotiques courants, tels que la vancomycine et la méticilline (ce dernier antibiotique n'est pas commercialisé mais sert de référence pour l'évaluation biologique de candidat médicament). L'activité antimicrobienne du peptoïde a été comparée à celle du pexiganan, un peptide de référence qui a été conçu et optimisé en tant qu'agent antibactérien actif sur de nombreuses souches Gram + et -. (**Tableau 9**)¹¹³ L'ampeptoïde **16** a montré une activité antibactérienne sur chacune des 6 souches testées. Il s'est révélé plus efficace que le pexiganan sur les bactéries à Gram + (jusqu'à 4 fois plus efficace dans le cas du *Streptococcus pneumoniae*). En revanche, il est apparu moins efficace que la référence sur les Gram -. L'activité antibactérienne de l'ampeptoïde **16** a été comparée à celle de 14 autres séquences. Des études de relation structure-activité ont permis de montrer une corrélation

entre l'activité biologique et les caractéristiques de la séquence d'interaction comme sa longueur, la nature de ses substituants ainsi que le sens d'hélicité. L'activité antibactérienne s'est avérée optimale pour les séquences courtes (allant de 6 à 9 résidus), s'arrangeant en hélice gauche et présentant des chaînes cationiques sur une même face de l'édifice. La présence de substituants anioniques diminue au contraire le pouvoir antibactérien. Les mêmes paramètres avaient été mis en évidence lors de l'analyse et l'optimisation de peptides antibactériens¹¹⁴⁻¹¹⁸ et semblent pouvoir être extrapolés aux ampeptoïdes.

Bactérie	Coloration Gram	Concentration minimale inhibitrice (µM)	
		Ampeptoïde	Pexiganan
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	1,7-3,4	13
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	6,9	3,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	3,4	6,5-13
<i>Escherichia coli</i>	-	14-28	3,2-6,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	3,4-6,9	26
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	28	3,2-6,5

Tableau 9 *Activité antimicrobienne de l'ampeptoïde 16 de Barron comparée à celle du pexiganan*

III.3.b β -peptides

III.3.b.1 Définition / Natures des monomères

Les β -peptides sont des séquences préparées par oligomérisation de β -amino acides. Les résidus sont reliés les uns aux autres grâce à des liaisons amides. Ce type de monomères s'apparente à des α -amino acides au sein desquels un carbone aurait été ajouté par homologation. L'introduction d'un groupement méthylène offre deux points de diversification en α et en β de la fonction acide carboxylique. Les β -amino acides sont ainsi différenciés en 5 familles selon la(es) position(s) occupée(s) par la(es) chaîne(s) latérale(s)^{14,119} : (**Figure 34**)

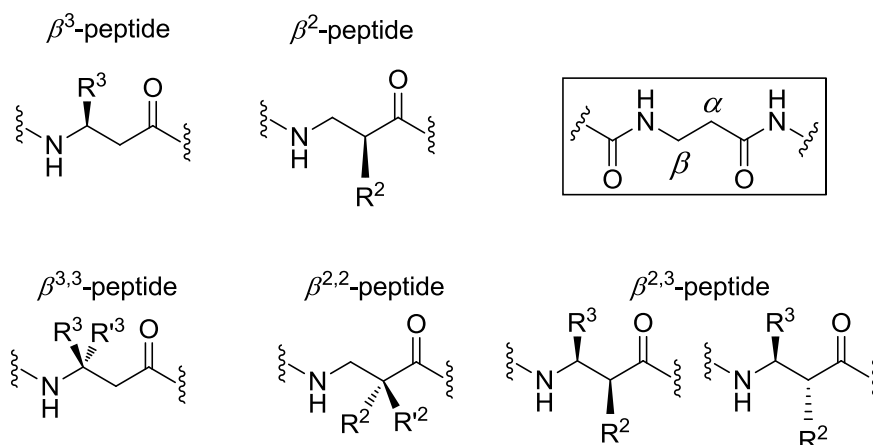


Figure 34 Les diverses substitutions possibles des β -peptides

La nomenclature des angles dièdres proposée par Balaram¹²⁰ est similaire à celle utilisée pour les α -peptides : en effet, les angles ω , Φ et ψ sont conservés. Mais la présence d'un carbone supplémentaire impose la définition d'un nouvel angle désigné sous la lettre θ . (Figure 35) L'angle ω (omega) est défini par le groupe d'atomes $C_{\alpha_{n-1}}-C_{n-1}-N-C_{\beta}$, l'angle Φ (phi) implique l'enchaînement $C_{n-1}-N-C_{\beta}-C_{\alpha}$, l'angle θ (teta), les atomes $N-C_{\beta}-C_{\alpha}-C$, et l'angle ψ (psi) est défini par les atomes $C_{\beta}-C_{\alpha}-C-N_{n+1}$.

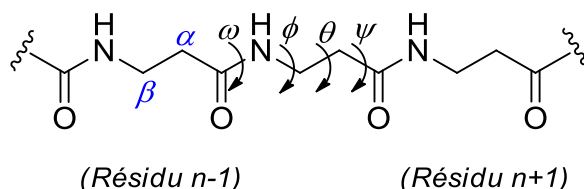


Figure 35 Attribution des angles dièdres d'un β -peptide

III.3.b.2 Historique

La forte analogie structurale avec les α -peptides a initié de nombreux projets de recherche dans le but de comprendre le comportement de β -peptides en solution. L'arrangement tridimensionnel de β -peptides a été pour la première fois annoncé par Kovacs et ses collaborateurs en 1965.¹²¹ En observant le comportement de polymères composés d'acide β -L-aspartique en solution, le groupe a proposé une structuration en hélice. Ces résultats ont toutefois été réfutés par Bestian¹²² et Chen¹²³ qui ont pour leur part avancé une structure en solution se rapprochant plus d'un feuillet β . La première preuve que les β -peptides pouvaient adopter une conformation hélicoïdale a été apportée en 1984 par Fernández-Santín et coll.¹²⁴ qui avaient étudié la structure d'un poly(*S*- β AspOiBu) décrit 12 ans plus tôt par Yuki et

coll.¹²⁵ Le développement et l'étude systématique des capacités de structuration des β -peptidiques ne démarra réellement qu'au cours des années 1990 avec les travaux menés indépendamment par les groupes de Gellman et de Seebach.^{17,126} Les β -peptides présentent un plus grand nombre de degrés de liberté que leurs homologues α . Cependant, malgré une liberté conformationnelle accrue, il a été montré qu'ils adoptaient des topologies hélicoïdales stables à partir d'un nombre limité d'unités monomériques.^{14,16}

Plusieurs nomenclatures ont été utilisées pour décrire les paramètres d'hélicité ; leurs correspondances sont indiquées dans le **Tableau 10**. La notation d'Applequist indique le sens de l'hélice par les lettres « L » et « R », correspondant respectivement à « left » (gauche) et « right » (droit), et par un chiffre en indice indiquant le nombre de résidus séparant le proton amidique NH_i et le carbonyle $\text{CO}_{i\pm n}$ impliqués dans la formation d'une liaison hydrogène. Subirana a proposé la désignation du sens d'hélicité (R ou L) associé à un chiffre schématisant le type de liaison hydrogène observé. Gellman décrit les structures hélicoïdales par le nombre d'atomes engagés dans les pseudo-cycles. Seebach utilise une nomenclature cristallographique¹²⁶ où le sens d'hélicité est donné par les lettres « M » et « P » (respectivement « minus » et « plus » pour gauche et droit). La notation X_1 précise que X résidus sont nécessaires pour boucler un tour d'hélice. Dans la suite du manuscrit, nous avons choisi d'adopter la notation utilisée pour la description des peptides hélicoïdaux. Par exemple, dans la nomenclature retenue, une hélice $3,6_{13}$ correspond à une hélice pour laquelle 3,6 résidus sont nécessaires pour boucler un tour et dont la structure est stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène formant des pseudo-cycles à 13 chaînons. Le sens de l'édifice sera quant à lui indiqué par la mention « gauche » ou « droite ». Toutefois, sur les schémas et lors de certaines comparaisons, notamment concernant les valeurs d'angles dièdres, la nomenclature de Gellman a été préférée par souci de simplification.

Applequist ¹²⁷	Subirana ¹²⁸	Gellman ^{10,129}	Seebach ⁶⁷	Nomenclature adoptée dans le manuscrit
R ₊₂	2R	14	(P) 3 ₁	3 ₁₄
R ₊₃	4R	18	(P) 4 ₁	4 ₁₈
R ₋₃	-	12	(P) 2,5 ₁	2,5 ₁₂
R ₋₄	1R	16	(P) 3,5 ₁	3,5 ₁₆
R ₋₅	3R	20	(P) 4,5 ₁	4,5 ₂₀
L ₊₂	2L	14	(M) 3 ₁	3 ₁₄
L ₊₃	4L	18	(M) 4 ₁	4 ₁₈
L ₋₃	-	12	(M) 2,5 ₁	2,5 ₁₂
L ₋₄	1L	16	(P) 3,5 ₁	3,5 ₁₆
L ₋₅	3L	20	(P) 4,5 ₁	4,5 ₂₀

Tableau 10 Les différentes nomenclatures utilisées pour la description de structures hélicoïdales (les notations en italique ont été déduites de données théoriques)¹⁷

III.3.b.3 Principes gouvernant le repliement des β -peptides et topologies associées

III.3.b.3.1 Eléments principaux de structuration

La force motrice majeure de l'arrangement tridimensionnel des β -peptides est la formation d'un réseau régulier de liaisons hydrogène s'établissant tout le long de l'oligomère. Des études théoriques portant sur la capacité de structuration d'oligomères de β^3 -alanine menées par le groupe de Gellman ont en effet montré que les β^3 -peptides peuvent potentiellement adopter six topologies hélicoïdales stabilisées par des réseaux de liaisons hydrogènes formant des pseudo-cycles à 10, 12, 14, 16, 18 voire à 20 chaînons.¹¹ (**Figure 36**)

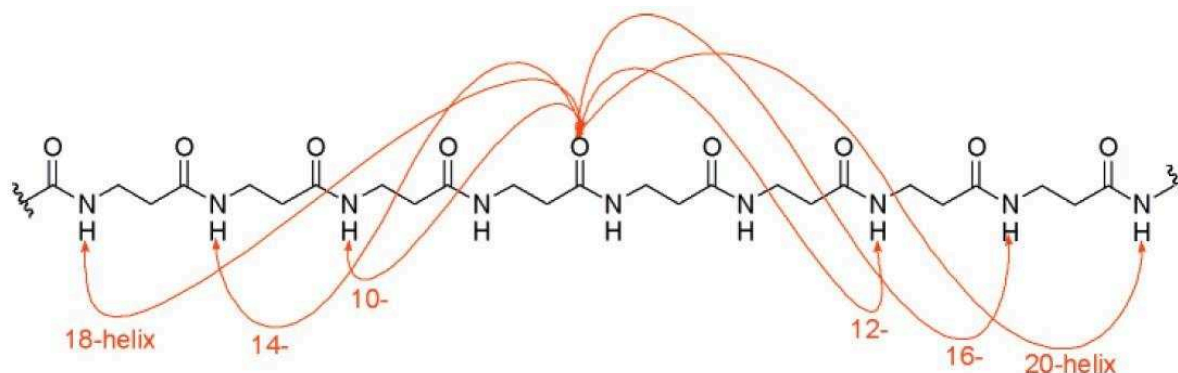


Figure 36 Différents pseudo-cycles formés par liaisons hydrogène au sein d'un β -peptide¹¹

La première topologie identifiée a été l'hélice 14. Seebach et coll.¹⁵ avaient étudié le comportement du β^3 -tripeptide **17** et du β^3 -hexapeptide **18** par dichroïsme circulaire et spectroscopie RMN 1D et 2D et diffraction des rayons X. (**Figure 37**)

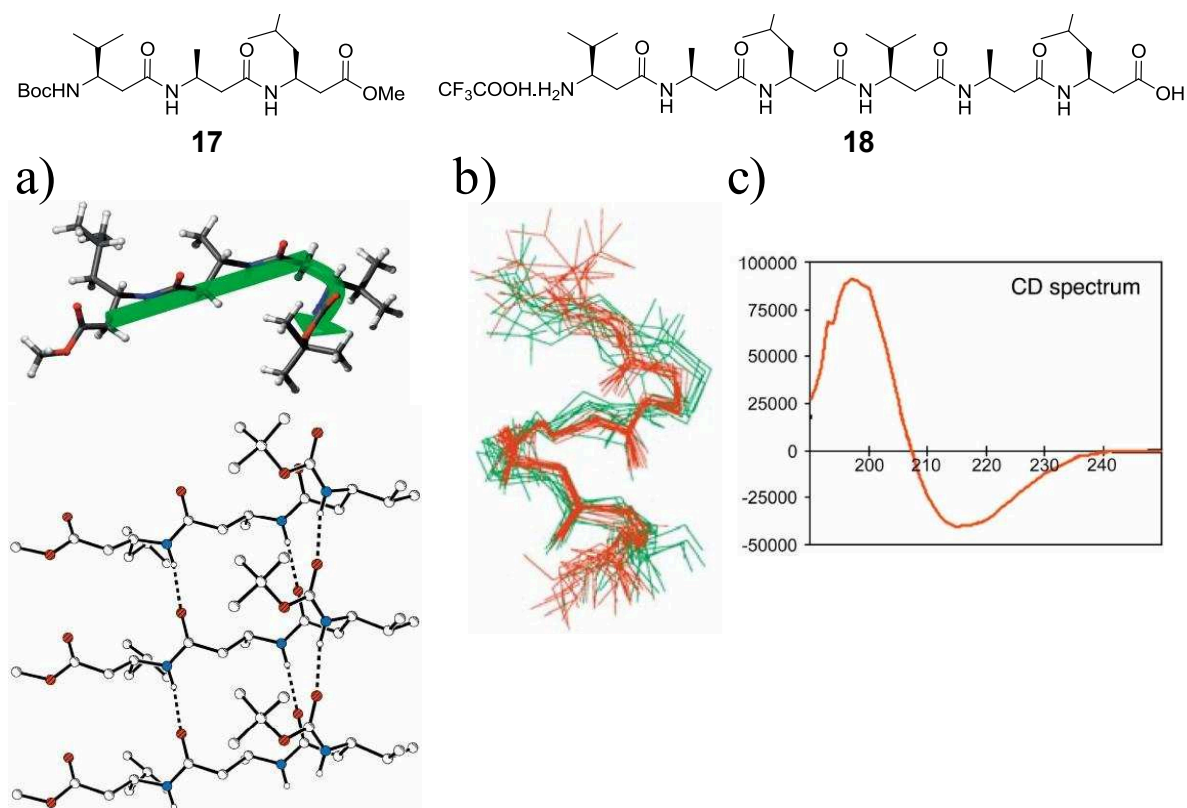


Figure 37 Séquences du β^3 -tripeptide **17** et β^3 -hexapeptide **18** développés par le groupe de Seebach et a) Structure cristalline avec tracé des liaisons hydrogènes du β^3 -tripeptide **17**, b) structures de moindre énergie du β^3 -hexapeptide **18** calculées dans le méthanol (vert) et la pyridine (rouge), c) spectre dichroïque du β^3 -hexapeptide **18** dans le méthanol¹²⁶

L'analyse par diffraction des rayons X du trimère **17** avait révélé une conformation de type feuillet β dans laquelle le résidu β^3 -HVal jouait le rôle de coude stabilisé par une liaison hydrogène formant un pseudo-cycle à 14 chaînons. Un tel coude a été considéré par les auteurs comme un site potentiel de nucléation pour la formation d'une structure hélicoïdale, ce qui les a poussé à préparer une séquence plus longue. Le comportement de la séquence hexamérique **18** a été étudié par RMN dans la pyridine deutérée. Les auteurs ont rapportés trois arguments en faveur d'une structuration de l'oligomère :

- un grand éclatement entre 8,5 et 9,5 ppm des signaux correspondants aux protons amidiques
- des constantes de couplages très différentes entre les protons H-C(β) et chacun des deux protons H-C(α) de chaque résidu suggérant une restriction de la rotation autour de l'angle θ

- des corrélations NOEs s'établissant tout au long de la séquence entre le NH du résidu i et H-C(β) des résidus $i+2$ et $i+3$.

Les calculs de modélisation intégrant les contraintes d'angles et de distances ont permis de déterminer 14 structures de moindre énergie convergeant vers un arrangement hélicoïdal : le squelette adopte une conformation en hélice 3_{14} de type gauche avec un pas de 5 Å (**Figure 37, b**). Dans l'hélice 3_{14} , les valeurs d'angles dièdres Φ , θ , ψ sont respectivement de -134° , $+60^\circ$ et -140° . Les liaisons hydrogène sont du type NH(i)...CO($i+2$) et toutes les liaisons C=O pointent dans la même direction, de C vers N, définissant un macrodipôle orienté dans le sens C-ter vers N-ter. Le spectre dichroïque de la séquence **18** indique un minimum à 215 nm qui, selon les auteurs, correspond à la signature hélicoïdale de l'édifice. (**Figure 37, c**)

D'autres β^3 -peptides s'arrangeant en hélice 3_{14} ont par la suite été étudiés.^{67,130,131} Les séquences impliquant une restriction conformationnelle des β^3 -amino acides ou une stabilisation accrue par l'introduction de chaînes secondaires, seront présentés dans les parties **III.3.b.3.2.1** et **III.3.b.3.4.1**. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les β^2 -peptides pouvaient également s'organiser en hélice 3_{14} .^{119,131,132} Toutefois, les mesures de dichroïsme circulaire ont indiqué que les structures des β^2 -peptides étaient moins stables que celles des β^3 -peptides.^{131,132} Ces résultats ont été confirmés par les calculs de mécanique quantique menés par Wu et Wang sur des β^2 - et β^3 -dipeptides.¹³³

Des règles concernant la stabilité des hélices 3_{14} ont pu être déduites des analyses structurales de β^2 - et β^3 -peptides :¹³⁴

- 1) la présence de β -HGly déstabilise la conformation hélicoïdale
- 2) les β^2 - et β^3 -peptides ont un sens d'hélicité opposé (droite pour les β^2 - et gauche pour les β^3 -)
- 3) les hélices de β^3 - sont plus stables que celles des β^2 -peptides

III.3.b.3.2 Introduction de contraintes cycliques au sein de β -amino acides

III.3.b.3.2.1 Cas de l'acide trans-2-aminocyclohexanecarboxylique (trans-ACHC) : la stabilisation de l'hélice 14

En 1996, le groupe de Gellman a étudié la possibilité de moduler la topologie des architectures hélicoïdales en intégrant dans les séquences des β -amino acides cycliques pour lesquels les valeurs d'angles dièdres sont imposées. Des études théoriques de modélisation moléculaires ont permis de proposer d'utiliser l'acide *trans*-2-aminocyclohexanecarboxylique

(*trans*-ACHC) comme élément de rigidification. Le *trans*-ACHC présente une valeur d'angle dièdre θ d'environ $+55^\circ$ proche de la valeur optimale de $+60^\circ$ nécessaire à la formation de l'hélice 14. Wu et Wang¹³³ ont également proposé qu'une interaction électrostatique (dipôles) entre le carbonyle et l'azote amidique d'un même résidu stabilisait préférentiellement la conformation gauche des substituants autour de la liaison $C\alpha-C\beta$ ce qui contribuerait à la stabilisation de l'édifice. (*Figure 38, b*)

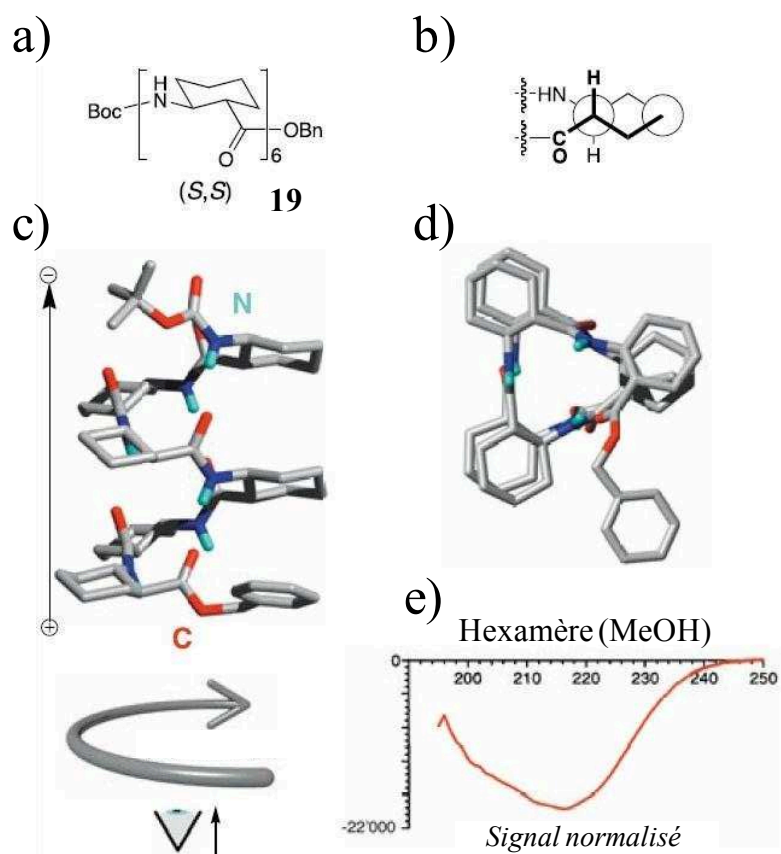


Figure 38 Propriétés structurales du *trans*-ACHC. a) Séquence 19, b) restriction autour de l'angle θ , c) et d) structure cristalline, projections perpendiculaire et parallèle à l'axe hélicoïdal, e) signal dichroïque¹²⁶

Expérimentalement, l'analyse par diffraction des rayons X de l'hexamère 19 de *trans*-ACHC indique que la séquence s'arrange en une hélice 3_{14} de type gauche. (*Figure 38, a, c et d*)

Des expériences d'échange NH/ND dans le CD_3OD par RMN, ont par ailleurs démontré un temps d'échange proton/deutérium très élevé (compris entre 24 et 48 heures) à comparer à des vitesses d'échange de 6 minutes observées dans le cas d'un hexamère de β^3 -alanine. De tels résultats suggéraient que les liaisons hydrogène intramoléculaires étaient d'une stabilité remarquable même dans les solvants polaires protiques permettant ainsi d'envisager des structurations pour de très courtes séquences telles que des tétramères.¹³⁵ A l'image de l'hélice 3_{14} décrite pour les β^3 -peptides les carbonyles $C=O$ pointent tous dans la même

direction, de C vers N, définissant un macrodipôle orienté dans le sens $C^+ \rightarrow N^-$. (**Figure 38, c**) La signature dichroïque de l'hexamère **19** diffère cependant de celle du β^3 -peptide **18**. (**Figure 38, e**)

III.3.b.3.2.2 Cas de l'acide *trans*-2-aminocyclopentanecarboxylique (*trans*-ACPC) et découverte de l'hélice 12

Dans une démarche analogue, l'équipe de Gellman a par la suite proposé d'utiliser un autre β -amino acide cyclique, l'acide *trans*-2-aminocyclopentanecarboxylique (*trans*-ACPC) comme élément de rigidification pour générer des hélices 12.¹²⁹ L'analyse structurale par RMN et diffraction des rayons X de l'octamère **20** a montré que le *trans*-ACPC s'arrangeait en une hélice 12 droite. (**Figure 39, c et d**)

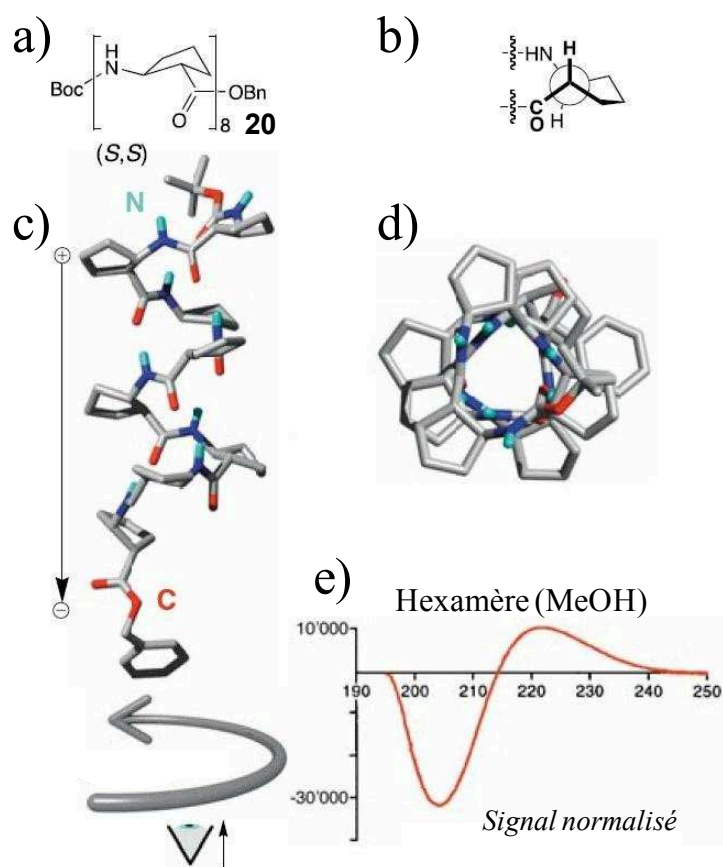


Figure 39 Propriétés structurales du *trans*-ACPC. a) Séquence **20**, b) restriction autour de l'angle θ , c) et d) structure cristalline, projections perpendiculaire et parallèle à l'axe hélicoïdal, e) signal dichroïque¹²⁶

Les auteurs ont montré que le *trans*-ACPC peut adopter trois conformations de moindre énergie dans lesquelles l'angle θ peut prendre les valeurs de $+90^\circ$, $+120^\circ$ et $+150^\circ$ incompatibles avec la géométrie de l'hélice 3_{14} , où les valeurs des angles θ sont d'environ $+60^\circ$. (**Figure 40**) En dépit d'une stabilité normalement supérieure à la topologie hélice 3_{14} ,

ces restrictions conformationnelles vont favoriser un arrangement de la séquence en hélice $2,5_{12}$. Les carbonyles pointent alors de N vers C, générant un macrodipôle inverse de type $N^+ \rightarrow C^-$. (*Figure 39, c*)

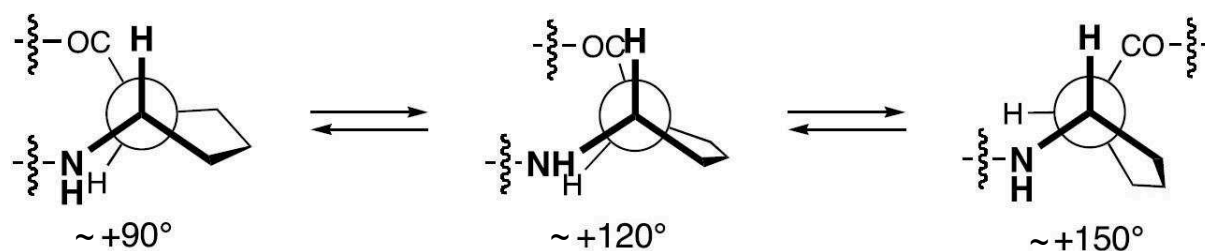


Figure 40 Barrières rotationnelles de l'ACPC¹²⁶

Les paramètres géométriques des hélices 3_{14} et $2,5_{12}$ sont résumés et comparés avec ceux des hélices α dans le *Tableau 11*.

Caractéristiques	Hélice 14 ¹²⁷	Hélice 12 ¹³⁶	Hélice α
Φ (en °)	-134,3	+95,0	-57
θ (en °)	+60	-94,3	-
ψ (en °)	-139,9	+103,0	-47
ω (en °)	+180,0	-180,0	+180
Rayon (en Å)	2,7	2,3	2,2
Résidus par tour	3,0	2,5	3,6

Tableau 11 Comparaison des paramètres hélicoïdaux et des valeurs d'angles pour les hélices 14, 12 et α

III.3.b.3.2.3 Le cas de l'oxétane et la découverte de l'hélice 10

La découverte de l'hélice 12 a incité plusieurs groupes à tester l'influence que pouvaient induire de nouveaux β -amino acides contraints sur la conformation d'oligomères en solution. Claridge et coll.¹³⁷ ont développé une séquence de β -amino acides construits autour d'un cycle oxétane à 4 chaînons *cis*-disubstitué imposant une importante contrainte conformationnelle. La titration de l'hexamère **21** en RMN (C_6D_6 et $CDCl_3$) par le DMSO- d_6 , a permis d'identifier les protons amidiques engagés dans des liaisons hydrogène ; l'ensemble de ces observations a montré que le proton du NH du C-terminal était le plus exposé au solvant. Les autres protons étaient plus difficilement échangeables, prouvant leur engagement dans des liaisons hydrogène intramoléculaires. Les expériences 2D ROESY ont révélé un ensemble de corrélations NOE entre les résidus i et $i+2$ indiquant une population majoritaire

en solution. Ces corrélations ont été ensuite utilisées comme contraintes de distances pour le calcul des 10 structures de moindre énergie montrant que l'hexamère **21** s'arrangeait en une hélice gauche stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène à 10 chaînons. (**Figure 41**)

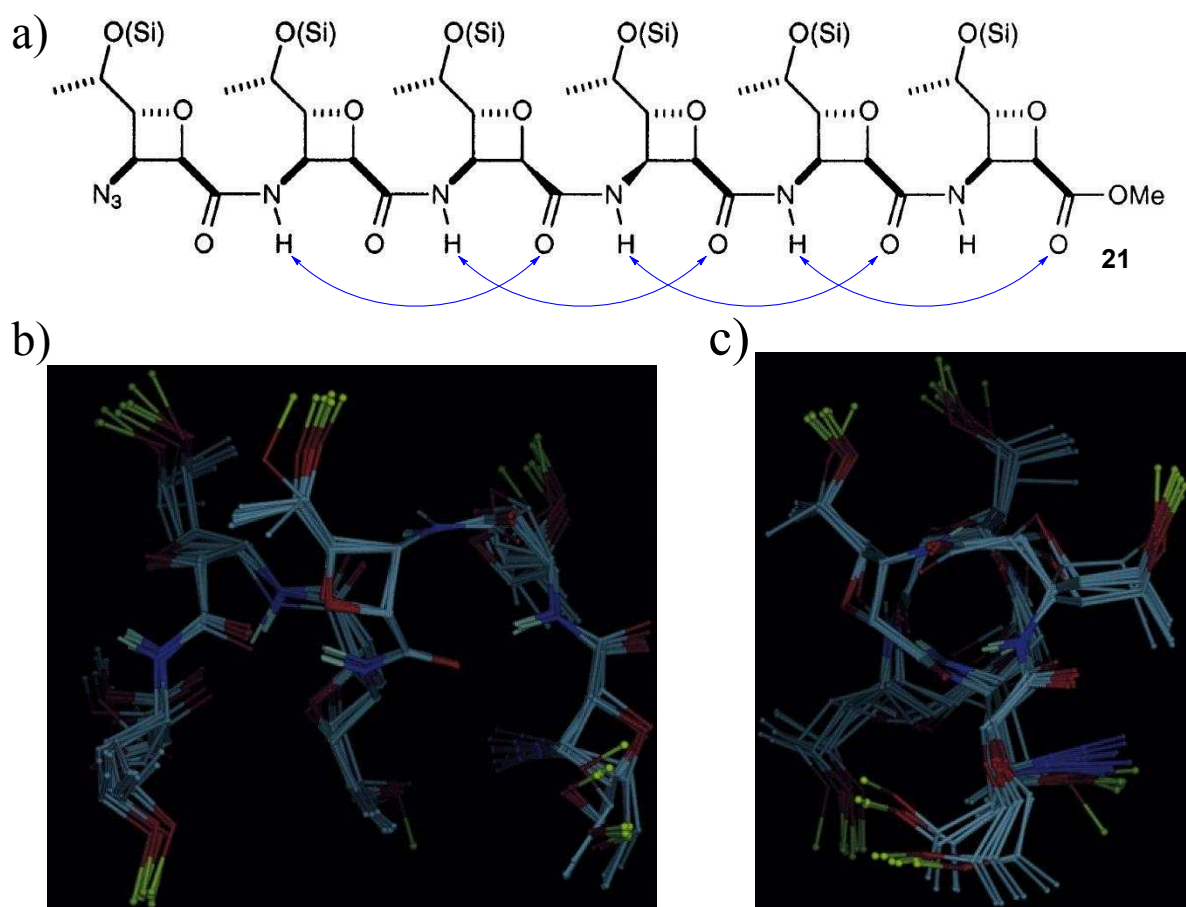


Figure 41 Hexamère **21** contraint par l'introduction de *cis*-oxétane : a) réseaux de liaisons hydrogène à 10 chaînons, b) et c) superposition des 10 structures de moindre énergie, vues perpendiculaire et parallèle à l'axe hélicoïdal¹³⁷

III.3.b.3.2.4 La quatrième structure secondaire des β -peptides : l'hélice 8

Gademann et coll. ont rapporté la structure du β -hexapeptide **22** obtenu par oligomérisation de β^2 -hydroxy- β^3 -alkylamino acides (l'acide (2R,3S)-3-amino-2-hydroxybutanoïque).¹³⁸ (**Figure 42, a**) La configuration *anti* des substituants alkyles et hydroxyles a été choisie afin de prévenir l'arrangement de la séquence en une hélice 3_{14} . L'analyse en RMN ^1H a montré une dispersion des signaux correspondant aux protons du squelette carboné indiquant l'existence d'une conformation préférentielle. L'interprétation des spectres ROESY a permis l'extraction de 40 corrélations NOE dont des corrélations entre $\text{NH}_{(i)}$ et $\text{NH}_{(i+1)}$ et entre $\text{NH}_{(i)}$ et $\text{HC}\beta_{(i-1)}$ et $\text{HC}\alpha_{(i-1)}$ suggérant une structure secondaire compacte. La modélisation sous contraintes RMN a montré que la séquence était stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène formant des

pseudo-cycles à 8 chaînons. La structure secondaire correspond à une hélice 2_8 droite avec un pas compris entre 4,7 et 4,9 Å. (**Figure 42, b et c**) D'autres travaux ont montré que des séquences composées de 3-aza-¹³⁹ et 3-oxa- β -amino acides¹⁴⁰ s'arrangeaient également en hélice 1,8₈.

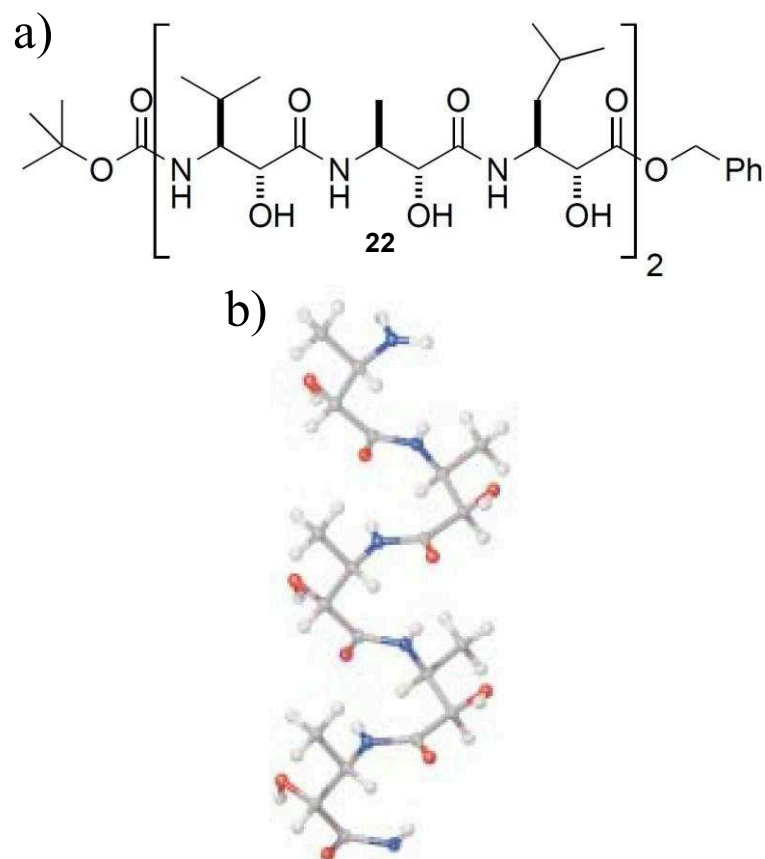


Figure 42 Hélice 2_8 : a) séquence 22, b) structure modélisée de moindre énergie¹³⁸

III.3.b.3.3 Séquences alternant β^2 - et β^3 -amino acides homochiraux; identification de l'hélice 10/12

Le groupe de Seebach a également étudié la conformation adoptée par une séquence constituée d'une alternance de monomères β^2 - et β^3 -.¹⁴¹ L'analyse RMN de l'hexapeptide **23** (**Figure 43**), dans la pyridine deutérée, a mis en évidence des corrélations NOEs entre les résidus 2 et 4 et entre les monomères 4 et 6. Aucune corrélation NOE entre résidus i et $i+3$ n'a été mise en évidence. Les calculs sous contraintes RMN ont montré que le peptide adoptait une conformation type hélice droite $2,7_{10,12}$ où coexistent 2 réseaux différents de liaisons hydrogène formant des pseudo-cycles à 10 chaînons entre les positions $\text{NH}(i)$ et $\text{CO}(i+2)$ et à 12 chaînons entre les positions $\text{CO}(i)$ et $\text{NH}(i+3)$. Les carbonyles pointent alternativement

dans le sens N vers C et C vers N si bien qu'aucun macrodipôle ne s'établit. La signature dichroïque dans le méthanol de cette topologie diffère de celle des hélices 3_{14} par un décalage du maximum vers le bleu (de 200 à 210 nm) et une disparition du minimum initialement situé à environ 215 nm. Des structures analogues ont également été rapportées pour d'autres séquences alternées.^{132,142}

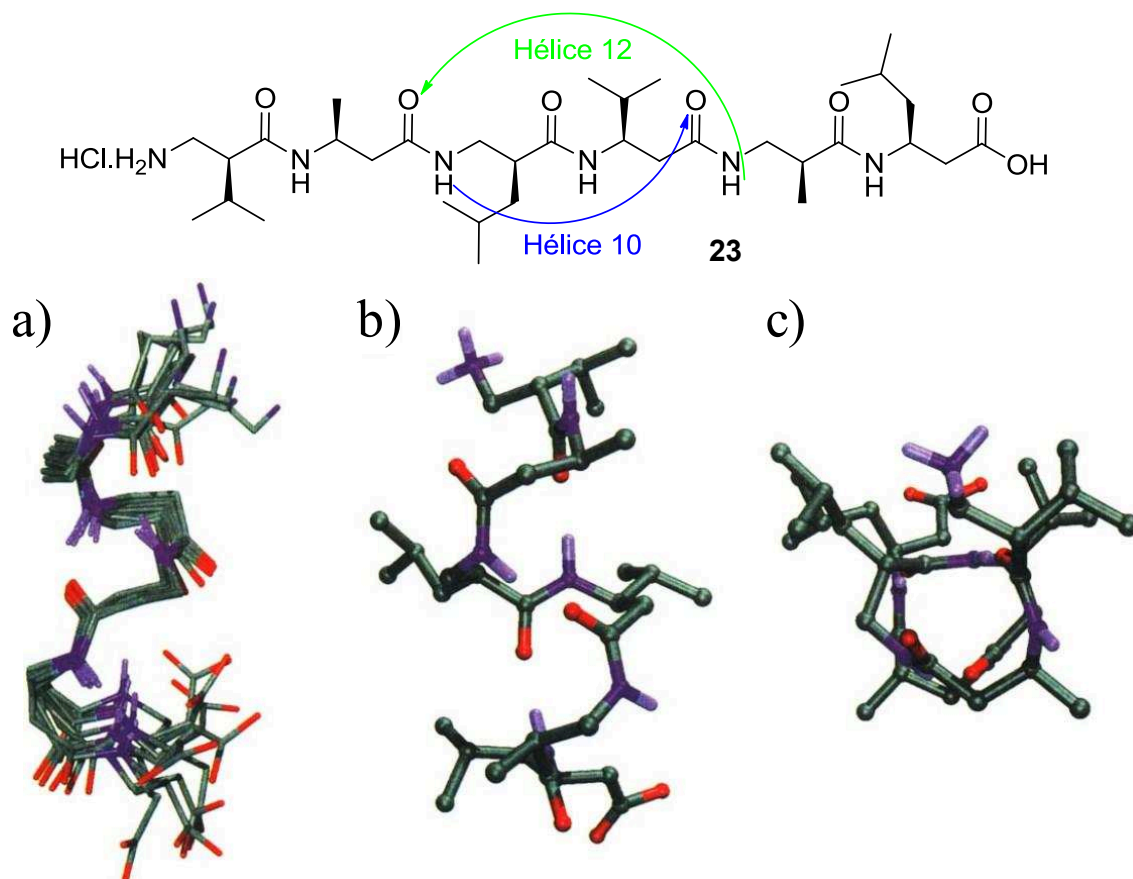


Figure 43 Arrangement du β -peptide 23 constitué par l'alternance de résidus β^2 - et β^3 -. a) structures de moindre énergie. Conformère le plus stable en : b) vue perpendiculaire à l'axe hélicoïdal, c) selon l'axe¹⁴¹

III.3.b.3.4 Les β^3 -amino acides comme promoteurs de coudes

Outre la formation de structures hélicoïdales, plusieurs séquences β -peptidiques ont été décrites pour s'arranger en coudes. Parmi elles, Seebach et coll. ont démontré que certaines séquences, comme le composé **24**, notamment contraintes par un cycle introduit en position β -2,2 adoptaient une conformation similaire à celle d'un coude.¹⁴³ Ce dernier n'a toutefois pu être observé qu'à l'état solide. (**Figure 44**)

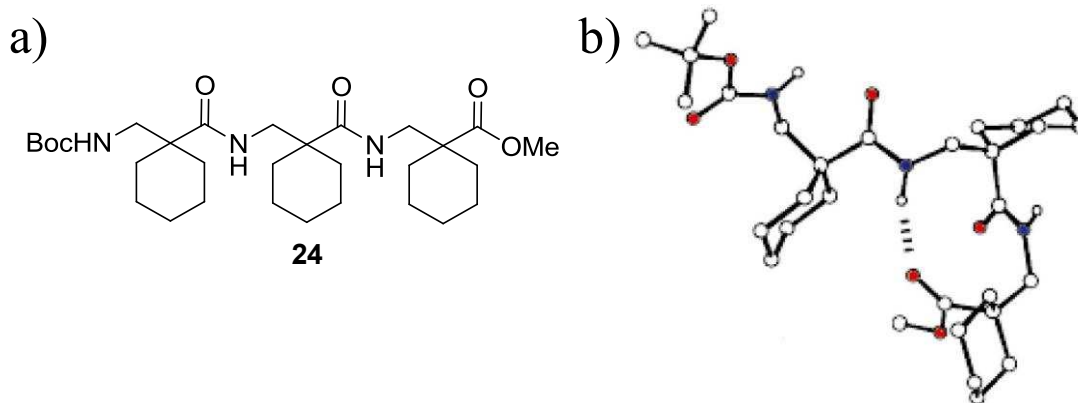


Figure 44 Trimère **24** d'acide 1-(aminométhyl)cyclohexanecarboxylique ; a) séquence, b) structure cristalline¹⁴³

Un inducteur de coude original a été développé par André et coll.¹⁴⁴ Le monomère consiste en un β -amino acide contraint par un système bicyclique introduit au niveau des carbones α et β , engendrant un résidu $\beta^{2,3,3}$ -trisubstitué, l'acide (*S*)-aminobicyclo[2,2,2]octane-2-carboxylique (H-(*S*)-ABOC-OH) **25**. (**Figure 45**)

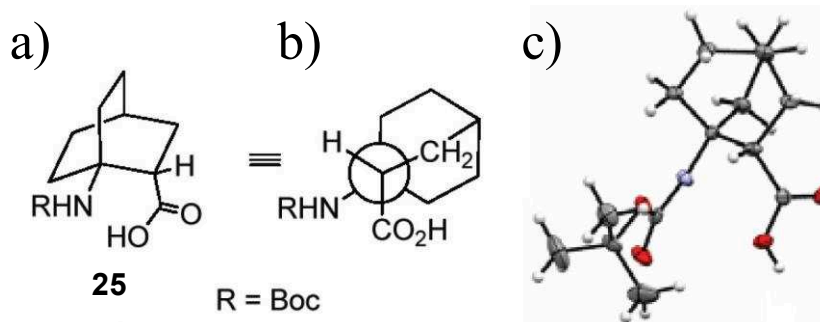


Figure 45 Contrainte bicyclique du $\beta^{2,3,3}$ -amino acide (*S*)-ABOC **25**, a) formule semi-développée, b) projection de Newman, c) structure cristalline¹⁴⁴

Le tripeptide **26** comportant un résidu (*S*)-ABOC en milieu de séquence (Z-Ala-(*S*)-ABOC-Phe-NHiPr) a été étudié en solution par RMN (CDCl₃) et à l'état solide par diffraction X. En solution, les titrations par le DMSO-d₆ ont révélé la présence de liaisons hydrogène stables impliquant les protons amidiques de l'ABOC et de la phénylalanine. Les expériences ROESY ont fourni des corrélations qui ont pu être utilisées comme contraintes de distances pour le calcul des structures de moindre énergie. (**Figure 46, a**)

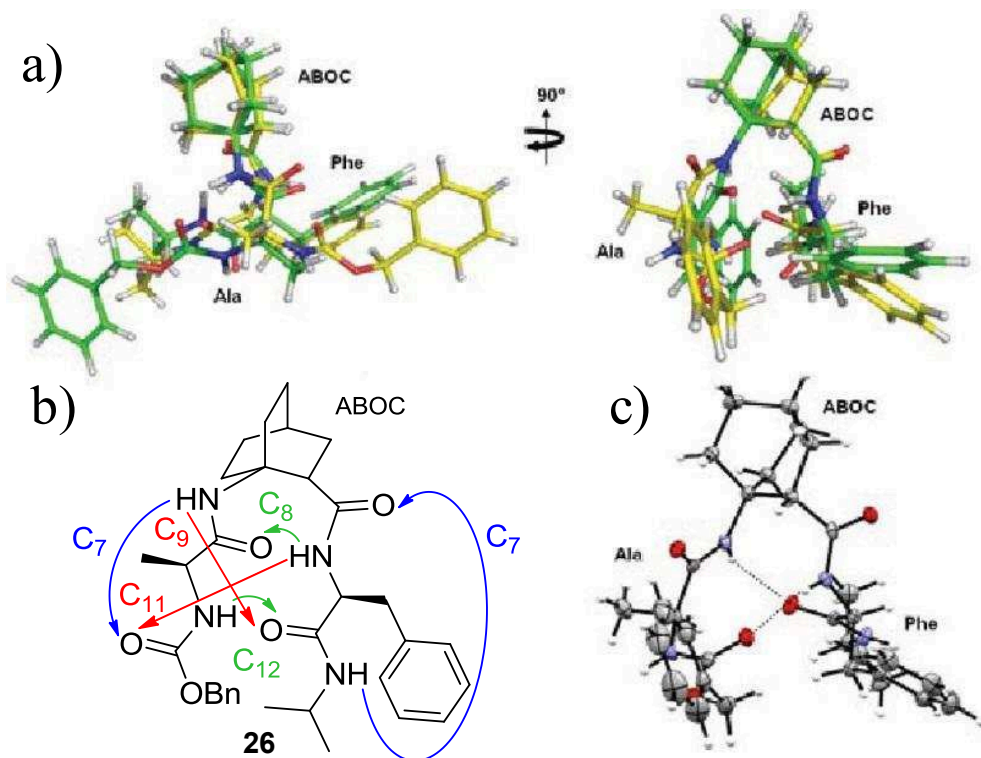


Figure 46 Influence du (S)-ABOC sur la conformation du tripeptide 26: a) superposition des structures cristalline (jaune) et modélisée (verte), b) réseaux de liaisons hydrogène, c) structure cristalline¹⁴⁴

Le tripeptide **26** est stabilisé en solution par des réseaux de liaisons hydrogène entre NH(*Phe*) et CO(*Ala*) ainsi qu'entre NH(*Ala*) et CO(*Phe*) formant respectivement des pseudo-cycles à 8 et 12 chaînons (C₈ et C₁₂) (**Figure 46, b, en vert**). 2 autres réseaux latéraux à 7 chaînons ont été observés entre NH(*ABOC*) et CO(*N-ter*) ainsi qu'entre NH(*iPr*) et CO(*ABOC*) (**Figure 46, b, en bleu**). La structure cristalline révèle une conformation de type coude similaire à celle obtenue par modélisation. (**Figure 46, a et c**) Enfin, 2 autres types de liaisons H ont été mis en évidence, à l'état solide seulement ; des pseudo-cycles à 9 et 11 chaînons s'établissent respectivement entre NH(*ABOC*) et CO(*Phe*) ainsi qu'entre NH(*Phe*) et CO(*Z*) (**Figure 46, b, en rouge**).

Valeurs des angles dièdres (en °)

Résidu	Φ	θ	Ψ
Alanine	$-88,7 \pm 19,2$	-	$+31,1 \pm 7,8$
	(-48,9)	-	(+142,2)
ABOC	$+50,6 \pm 9,6$	$+47,7 \pm 7,6$	$-90,1 \pm 9,1$
	(+76,2)	(+62,4)	(-82,5)
Phénylalanine	$-68,1 \pm 10,4$	-	$+73,3 \pm 16,0$
	(-70,0)	-	(+74,7)

Tableau 12 Valeurs des angles dièdres déterminées en solution pour chacun des résidus du tripeptide 26, (entre parenthèses figurent les valeurs mesurées à l'état solide)

Les angles dièdres Φ , θ et ψ ont été déterminés pour la séquence cristallisée et en solution ; les valeurs obtenues sont similaires pour les résidus ABOC et phénylalanine, mais diffèrent largement pour l'alanine. (**Tableau 12**)

III.3.b.3.4.1 Optimisation de la stabilité

Interactions électrostatiques entre chaînes latérales ; formation de ponts salins

Plusieurs travaux ont montré que la stabilité des hélices α dans l'eau pouvait être augmentée en favorisant la formation de ponts salins entre des chaînes latérales de résidus en positions i et $i+4$.^{145,146} Ce concept a été mis à profit pour tenter d'accroître la stabilité en phase aqueuse des architectures hélices 3_{14} . En effet, les β^3 -peptides, à l'exception de ceux comportant des éléments de structuration tels que le *trans*-ACHC au sein de leur séquence, sont généralement peu structurés dans l'eau.¹⁴⁷ Le groupe de DeGrado a ainsi proposé la séquence **27** portant de manière régulière en positions i et $i+3$ des résidus acides et basiques, β^3 -hGlu et β^3 -hLys : dans cette configuration, les chaînes latérales cationiques et anioniques, situées à 4,8 Å l'une de l'autre, permettent la formation d'une série de ponts salins répartis le long de la séquence. (**Figure 47**) La stabilité des édifices a été évaluée par dichroïsme circulaire à pH égal à 2, 7 et 12. Le pourcentage d'hélicité maximale a été observé à pH = 7 tandis qu'aux valeurs extrêmes de pH, conditions dans lesquelles des fonctions ammonium ou carboxylate sont neutralisées, la séquence était déstructurée. De même, à forte concentration de sel (supérieure à 400 mM), l'architecture hélicoïdale était déstabilisée. Il est à noter que des travaux équivalents ont également été décrits par l'équipe de Seebach.¹⁴⁸

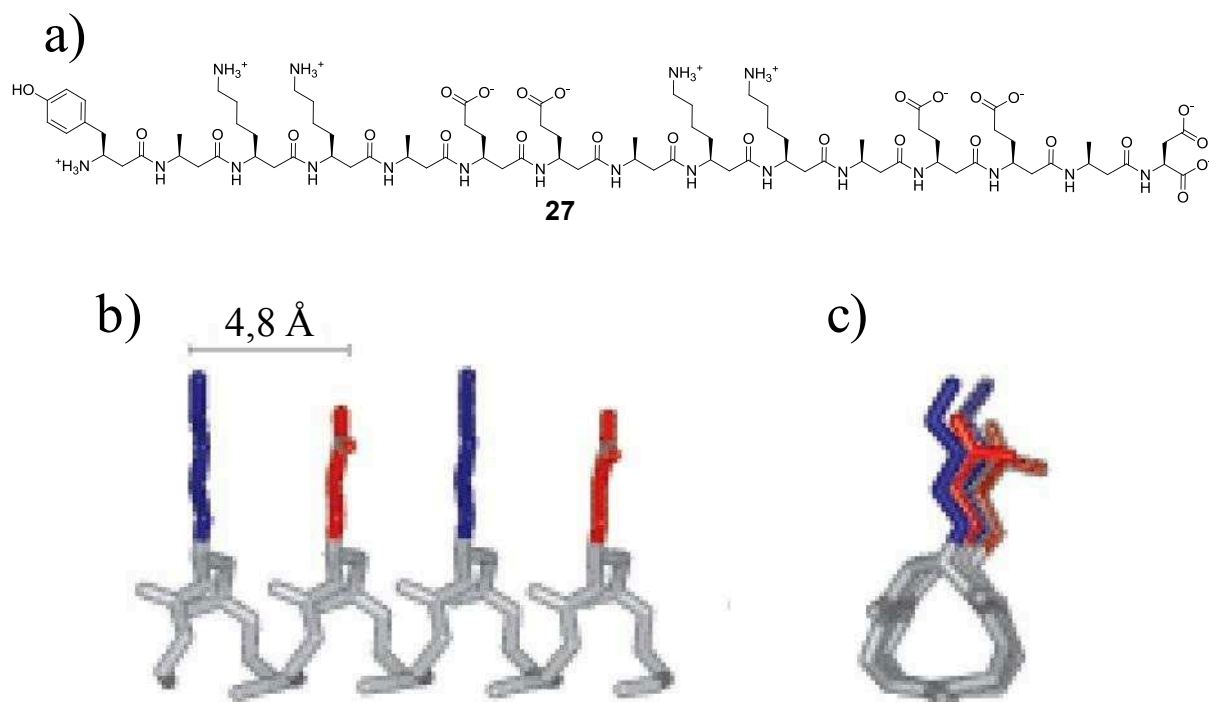


Figure 47 Oligomère 27 : a) séquence à l'état ionisé (les contre-ions ne sont pas indiqués pour plus de clarté), b) et c) hélice 3_{14} , vues perpendiculaire et parallèle à l'axe, avec en rouge la chaîne latérale du hGlu et en bleu celle de la hLys (une seule face des hélices est représentée pour plus de clarté)¹⁴⁷

Contrôle du macrodipôle via la nature des chaînes latérales

Le groupe de Schepartz¹⁴⁹ a rapporté une analyse complète de l'influence des chaînes latérales sur la stabilisation des hélices 3_{14} dans l'eau. L'étude a consisté en la synthèse du peptide **28** utilisé comme séquence de référence. (**Figure 48**) 27 variantes ont été obtenues en modifiant la nature des chaînes latérales en trois positions différentes, celles correspondant aux trois β^3 -hAla (en rouge sur la **Figure 48**). Des résidus chargés, des résidus aliphatiques et aromatiques ont été systématiquement introduits.

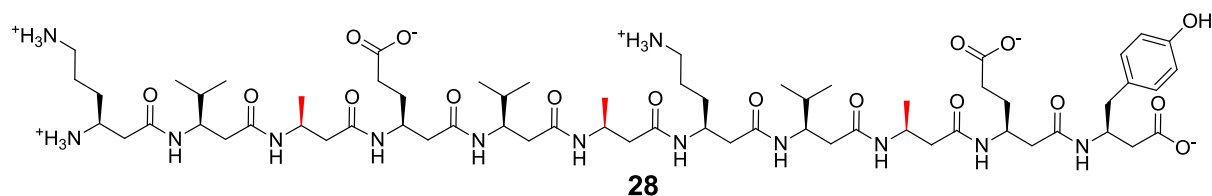


Figure 48 β^3 -peptide 28, un modèle utilisé pour le criblage de chaînes latérales (les points de diversification apparaissent en rouge)

Les auteurs ont montré que la présence de chaînes chargées pouvait influencer fortement la stabilité de l'architecture hélicoïdale au travers d'interactions avec le macrodipôle $C^+ \rightarrow N^-$.

Ainsi, les résidus cationiques placés du côté N-ter et les anioniques du côté C-ter contribuent à la stabilisation de l'édifice. Un schéma inverse aura tendance à s'opposer à l'établissement du macrodipôle et tendra à stabiliser la structure. Enfin la substitution au centre de la séquence n'induit quant à elle que des effets modérés.

III.3.c γ -peptides

III.3.c.1 Définition / Nature des monomères

Les γ -peptides sont construits par oligomérisation de γ -amino acides. Malgré le fait que l'introduction d'un carbone supplémentaire augmente le nombre de degrés de liberté tout en réduisant la capacité de l'oligomère à former un réseau dense de liaisons hydrogène, les γ -peptides ont montré des capacités de structuration tant en solution qu'à l'état solide.²⁰ Les γ -amino acides linéaires peuvent présenter jusqu'à trois chaînes latérales, en position 2, 3 ou 4 et jusqu'à 3 carbones asymétriques sur le squelette. (**Figure 49**)

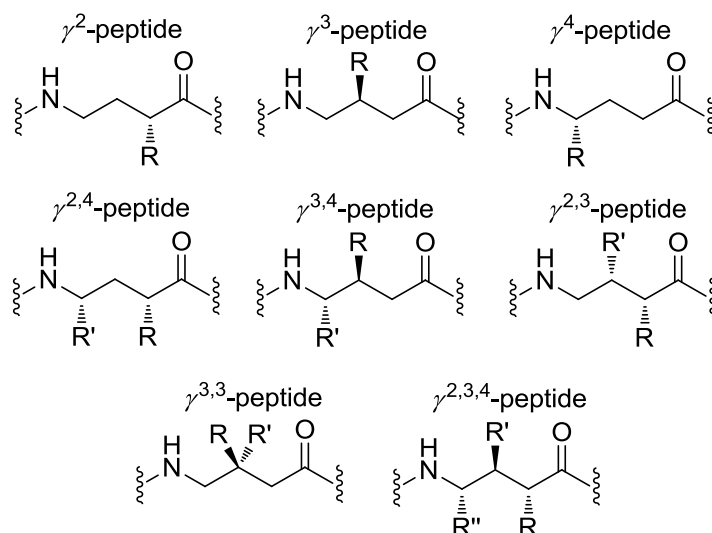


Figure 49 Les diverses substitutions possibles des γ -peptides (les groupements R et R' peuvent être engagés tous deux dans un cycle)

Dans la nomenclature proposée par Balaram,¹²⁰ l'angle dièdre ω est défini par le groupe d'atomes $C_{\alpha_{n-1}}-C_{n-1}-N-C_{\gamma}$, l'angle Φ implique l'enchaînement $C_{n-1}-N-C_{\gamma}-C_{\beta}$, les angles θ et ζ ($z\grave{e}ta$) sont construits respectivement par $N-C_{\gamma}-C_{\beta}-C_{\alpha}$ et $C_{\gamma}-C_{\beta}-C_{\alpha}-C$. Enfin, l'angle ψ est défini par les atomes $C_{\beta}-C_{\alpha}-C-N_{n+1}$. (**Figure 50**)

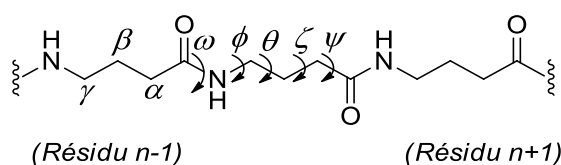


Figure 50 Attribution des angles dièdres d'un γ -peptide

III.3.c.2 Principes gouvernant le repliement

L'étude structurale des γ -peptides a débuté dès 1964 avec l'étude d'un polymère de l'acide γ -D-glutamique par Rydon.¹⁵⁰ Ce γ^4 -polypeptide, isolé de la souche *Bacillus anthracis*, a été analysé par mesure de la dispersion du pouvoir rotatoire en fonction de la longueur d'onde appliquée : les valeurs d'angles obtenues ont permis de proposer une structuration hélicoïdale de l'analyte.¹⁵¹ Ne disposant pas des techniques d'analyses structurales actuelles, l'auteur suggéra deux modèles différents pouvant définir l'arrangement en solution ; deux hélices gauches de types 3_{17} et 3_{19} .

III.3.c.2.1 Principaux éléments de structuration

Comme dans les β -peptides, l'établissement d'un réseau de liaisons hydrogène constitue la force majeure gouvernant l'arrangement tridimensionnel des séquences. Possédant un carbone de plus que les β -amino acides, les γ -peptides vont présenter de nouveaux types de réseaux de liaisons hydrogène. Baldauf et coll. ont ainsi cherché à prédire les conformations les plus stables accessibles pour les γ -peptides.¹⁵² Leur stratégie a consisté à utiliser une méthode *ab initio* de chimie quantique afin de hiérarchiser les types de liaisons hydrogène les plus favorables dans l'arrangement d'un hexamère d'acide γ -aminobutyrique (GABA). Cette étude a montré que les γ -peptides avaient tendance à adopter des conformations hélicoïdales stabilisées par des réseaux de liaisons hydrogène formant des pseudo-cycles allant de 7 à 24 chaînons. Les auteurs ont par ailleurs conclu que les hélices contraintes par des réseaux de liaisons hydrogène à 14 et 9 chaînons étaient les plus stables. (**Figure 51**)

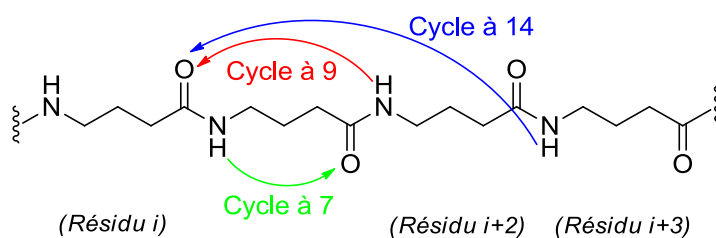


Figure 51 Types de pseudo-cycles les plus fréquemment rencontrés au sein des γ -peptides

III.3.c.2.1.1 Les γ^2 - et γ^3 -peptides ; une absence de structuration

Le comportement structural de γ^2 - et γ^3 -peptides a été étudié par le groupe de Seebach.¹⁵³ Ils ont synthétisé deux hexamères γ^2 - et γ^3 -peptidiques homochiraux.¹⁵⁴ (**Figure 52**)

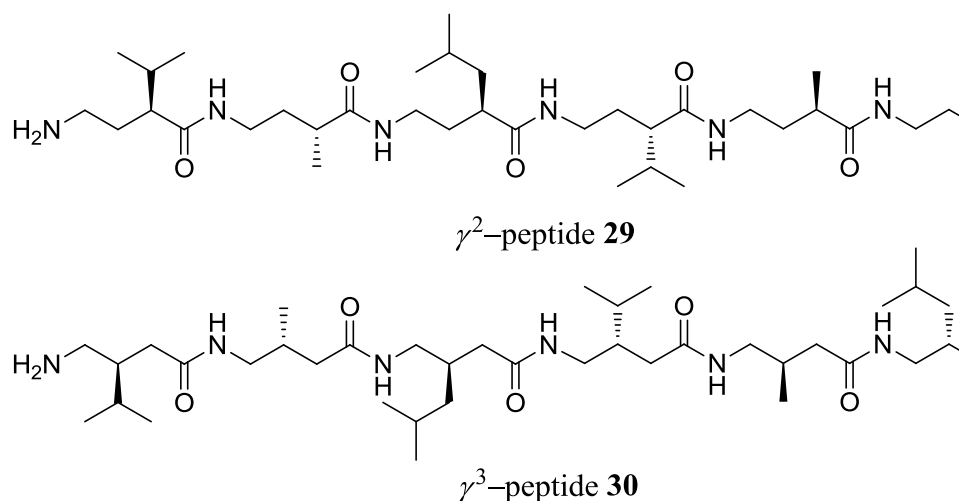


Figure 52 γ^2 - et γ^3 -hexapeptides 29 et 30 synthétisés par Seebach

Les corrélations NOEs observées lors des expériences ROESY (CD_3OH et pyridine- d_5) n'ont pas pu être attribuées en raison d'un chevauchement important des signaux. Ainsi, les structures correspondant aux hexamères **29** et **30** n'ont pu être déterminées. L'enregistrement de faibles signaux dichroïques semble confirmer une absence de structuration.

III.3.c.2.1.2 Les γ^4 -peptides

L'hélice 14

Les γ^4 - ont été les premiers γ -peptides étudiés du fait d'une accessibilité plus aisée : les γ^4 -amino acides peuvent en effet être préparés par double homologation d'Arndt-Eistert d' α -amino acides avec conservation de la chiralité.¹⁵⁵

Le groupe de Seebach a rapporté la structure de l'hexapeptide **31** (*Figure 53, a*). La détermination structurale a été réalisée par RMN en solution dans la pyridine- d_5 . 42 corrélations NOEs ont été extraites des spectres ROESY : 20 intra-résiduelles, 13 séquentielles, 6 observées entre résidus i , $i+2$ et i , $i+3$. Ces données ont été ensuite renseignées comme contraintes de distance permettant de générer 20 structures de moindre énergie (*Figure 53, b et c*). La structure secondaire du γ^4 -peptide **31** est une hélice $2,6_{14}$ droite, présentant un pas de 5,0 Å. La conformation est stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène formant des pseudo-cycles à 14 chaînons entre le carbonyle du résidu i et le proton amidique du résidu $i+3$. La projection des structures selon l'axe hélicoïdal (*Figure 53, c*) montre que la proximité entre chaînes latérales peut générer des interactions hydrophobes participant à la stabilisation de l'édifice.

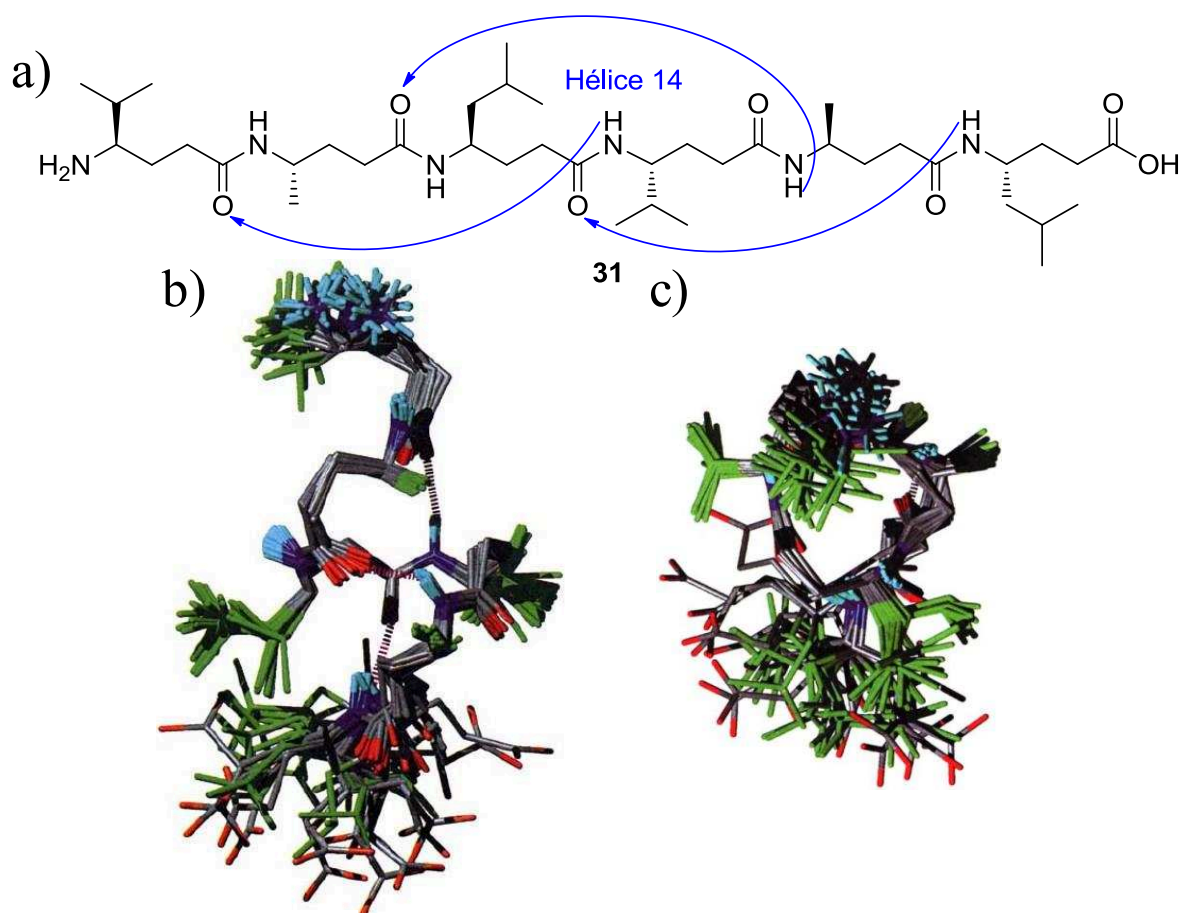


Figure 53 Hélice $2,6_{14}$ adoptée par le γ^4 -peptide 31 en solution : a) séquence et réseau de liaisons hydrogène, structures de moindre énergie projetées. Vues b) latérale et c) axiale du composé 31¹⁵⁵

Les analyses RMN dans CD_3OH ont été plus difficiles à interpréter à cause du chevauchement des signaux relatifs aux protons $^{\alpha}\text{CH}_2$. Toutefois, la meilleure résolution de la région NH, H-C(γ) dans le spectre ROESY a permis l'observation de corrélations NOEs caractéristiques entre le H-C(γ) du résidu i et le NH du résidu $i+2$ confirmant les résultats obtenus dans la pyridine deutérée. De manière indépendante, Hanessian et coll. ont également rapporté les structures d'un tétramère, hexamère et octamère γ^4 -peptidiques s'arrangeant en hélice $2,6_{14}$ droite.²⁴ Leurs résultats ont montré que les γ^4 -peptides pouvaient adopter une conformation stable et définie à partir de séquences aussi courtes qu'un tétramère, une première pour un pseudo-peptide ne comportant pas d'acide aminé contraint cyclique.

Il est à noter que si l'on compare les hélices 3_{14} (β -peptides) et $2,6_{14}$ (γ^4 -peptides), on observe que la présence d'un méthylène supplémentaire par rapport aux β -amino acides conduit à une inversion du sens de l'hélice ainsi que du macrodipôle. La **Figure 54** résume les différences entre hélices α , β 3_{14} et γ $2,6_{14}$.

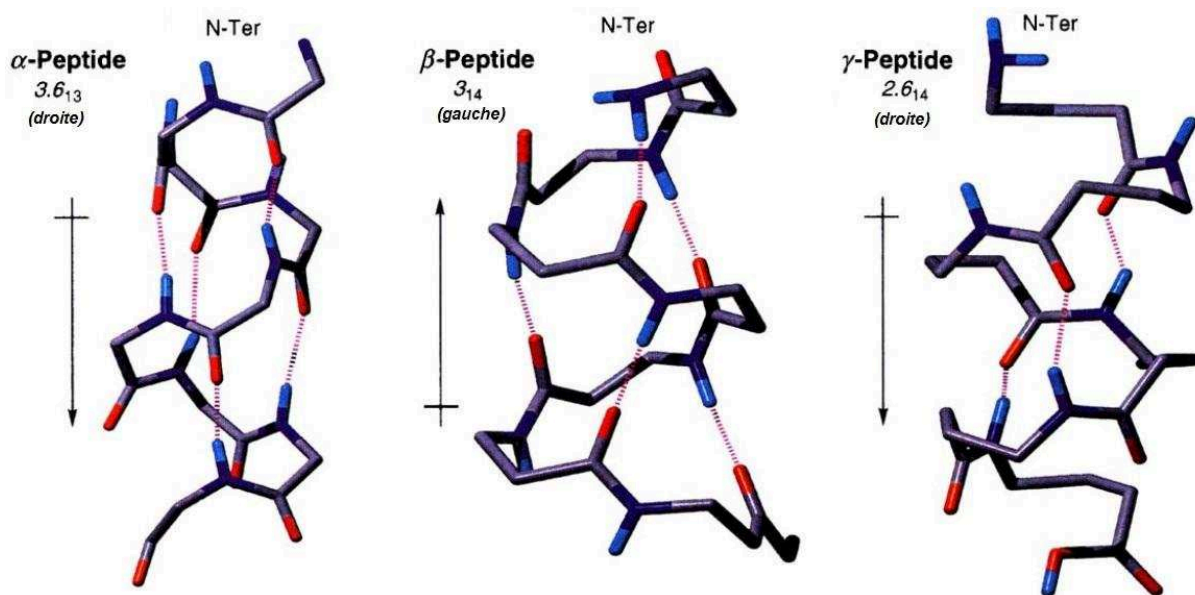


Figure 54 Comparaison des paramètres d'hélices α , β (3_{14}) et γ ($2,6_{14}$) (la flèche indique le sens du macrodipôle)¹⁵⁵

L'hélice 9

S'appuyant sur les prédictions de Baldauf, le groupe de Kunwar a développé une famille de trois oligomères γ -peptidiques (**32**, **33** et **34**) alternant l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et un carbohydrate- γ^4 -amino acide (γ -Caa).¹⁵⁶ (Figure 55) La chaîne latérale du γ -Caa induisait des contraintes stériques incompatibles avec une structuration en hélice 2.6_{14} .

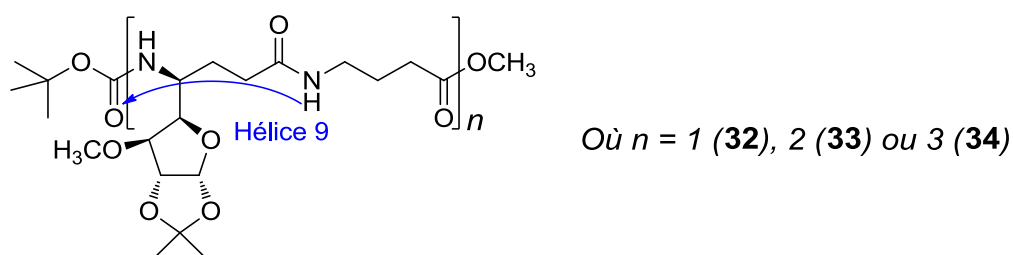


Figure 55 Famille de γ -peptides alternés développée par le groupe de Kunwar (dimère **32**, tétramère **33** et hexamère **34**)

L'analyse RMN des tétramère et hexamère **33** et **34** dans le chloroforme deutéré a révélé une bonne dispersion des protons amidiques indiquant une structuration en solution. Une titration au DMSO- d_6 a montré que ceux-ci étaient engagés dans des liaisons hydrogène. Les expériences NOESY et ROESY ont mis en évidence de nombreuses corrélations inter-résidus entre $NH(i+1)$ et $CaH(i)$ et à plus longue distance entre $NH(i+1)/C\gamma H(i)$, $C\gamma H(i)/CaH(i+1)$, $NH(i+1)/CaH(i)$, $NH(i)/C\beta H(i)$, $NH(i)/CaH(i)$, et $C\gamma H(i)/CaH(i)$. La modélisation sous

contraintes RMN indique un arrangement de l'édifice en une hélice 2,3₉, gauche ayant un pas de 3,3 Å. Cette conformation est stabilisée par la présence d'un réseau de liaisons hydrogène de type NH(i)...CO(i-2) formant des pseudo-cycles à 9 chaînons. Les valeurs d'angles dièdres sont comparables à celles prédites par Baldauf.¹⁵² (**Tableau 13**)

Valeurs moyennes des angles (en °)	Φ	θ	ζ	Ψ
Prédites ¹⁵²	+97	-70	-75	+97
Mesurées ¹⁵⁶	+125±20	-68±5	-65±4	+97±10

Tableau 13 Comparaison des valeurs d'angles dièdres prédites¹⁵² et mesurées¹⁵⁶

III.3.c.2.1.3 Les $\gamma^{2,4}$ - et $\gamma^{2,3,4}$ -peptides

Les chaînes latérales des $\gamma^{2,4}$ -amino acides peuvent être de configuration relative *syn* ou *anti*. Hanessian et coll. ont étudié le comportement des $\gamma^{2,4}$ -peptides constitués de $\gamma^{2,4}$ -amino acide de configuration soit *syn* soit *anti*.²⁴ Deux séquences **35** et **36** ont été préparées et étudiées par RMN dans le chloroforme, la pyridine et le méthanol. (**Figure 56**)

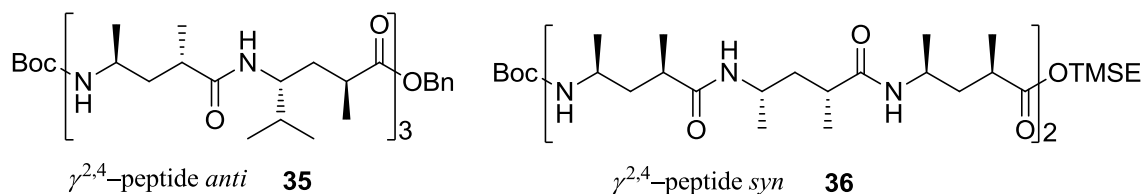


Figure 56 $\gamma^{2,4}$ -peptides *anti* **35** et *syn* **36** développés par Hanessian

Les études structurales ont montré que, quelque soit le solvant utilisé, le $\gamma^{2,4}$ -peptide de configuration *anti* **35** s'arrangeait en une hélice 2,6₁₄ droite analogue à celle observée pour les γ^4 -peptides. Les chaînes latérales étaient orientées en positions pseudo-équatoriales autour de l'axe de l'hélice. Au contraire le $\gamma^{2,4}$ -peptides de configuration *syn* **36** n'a montré aucune capacité de structuration. Il semblerait qu'une répulsion stérique entre la chaîne en position 2 et l'amine terminale empêche un repliement du squelette dans une orientation pré-hélicoïdale.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ (**Figure 57**)

III.3.c.2.1.4 Les $\gamma^{3,3}$ -peptides

De manière analogue à l'acide α -aminoisobutyrique (Aib), la présence de substituants géminaux en position 3 du GABA limite le nombre de conformations accessibles autour des liaisons $C\gamma-C\beta$ et de $C\beta-C\alpha$, et restreint les valeurs des angles θ et ζ autour de 60° .^{158,159}

La restriction autour des angles θ et ζ impose que les $\gamma^{3,3}$ -peptides adoptent une conformation de type hélice 2,7₉ stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène $CO(i)\dots NH(i+2)$ formant des pseudo-cycles en C9. Le pas est alors de 3,4 Å. Les oligomères **39** et **40** de gabapentine décrits par Vasudev et coll. représentent les premiers exemples de ce type d'hélice.¹⁶⁰ (**Figure 59**) La conformation des oligomères a été élucidée par la diffraction des rayons X mais aucune structure en solution n'a encore été rapportée.

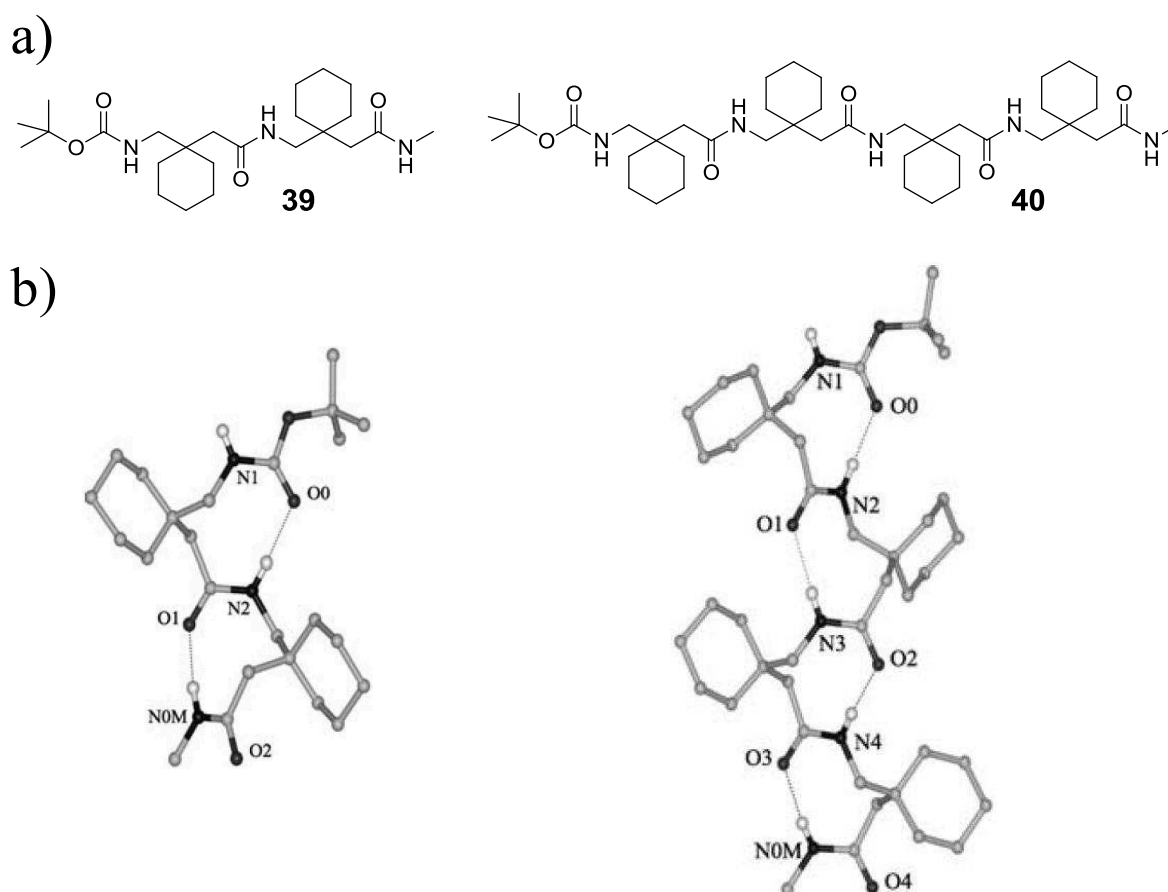


Figure 59 Structure des dimère **39** et tétramère **40** de gabapentine : a) séquence, b) structure cristalline (les liaisons hydrogène apparaissent en pointillés)¹⁶⁰

III.3.c.2.2 Eléments de structuration secondaire

Les travaux de Gellman ont montré que l'introduction d'une contrainte cyclique au sein de β -amino acides pouvait permettre, soit de stabiliser une topologie particulière, i.e. l'hélice 3₁₄ gauche avec l'ACHC, soit d'obtenir une architecture nouvelle, i.e. l'hélice 2,5₁₂ droite avec

l'ACPC. De manière analogue, des éléments de rigidification ont été introduits au sein de γ -peptides afin d'étudier leur influence sur la conformation des édifices.

III.3.c.2.2.1 Oligomères de *cis*- γ -amino-L-proline

L'équipe de Royo a développé des γ -peptides construits par oligomérisation de *cis*- γ -amino-L-proline.¹⁶¹ Parmi eux, le composé **41** a été étudié à la fois par dichroïsme circulaire dans divers solvants ainsi que par RMN. (**Figure 60, a**) Le signal dichroïque de **41** s'est avéré différent dans chacun des trois solvants testés (H₂O, MeOH et TFE). Les auteurs ont avancé l'hypothèse que la nature du solvant influençait l'arrangement de la séquence. L'analyse RMN du composé a permis d'élucider la structure secondaire favorisée en solution aqueuse. La présence de plusieurs corrélations NOEs inter-résiduelles *i* et *i*+2 a suggéré une conformation préférentielle du γ -peptide. (**Figure 60, b**) L'oligomère adopte une structure en ruban issue d'une succession de coudes stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène entre CO(*i*) et NH(*i*+2).

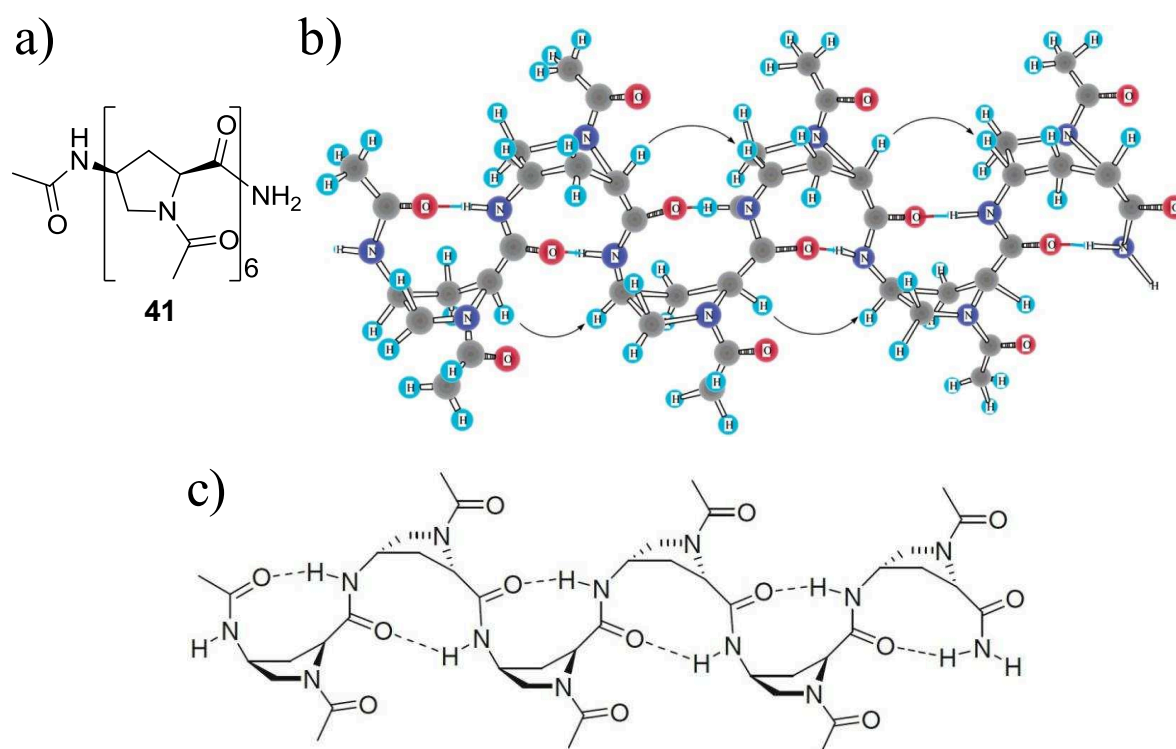


Figure 60 Hexamère **41** composé de *cis*- γ -amino-L-proline : a) séquence, b) structure obtenue par RMN (les flèches indiquent les corrélations NOEs), c) structure schématisée (les liaisons H apparaissent en pointillés)

III.3.c.2.2.2 Oligomères de *trans*-cyclopropane γ -amino acide

Le groupe de Smith a conçu des séquences γ -peptidiques contraintes par l'oligomérisation de γ -amino acides construits autour d'un cyclopropane situé en positions α , β .²² L'étude de la conformation du trimère **42** à l'état solide a révélé un arrangement en feuillets parallèles. (*Figure 61, a et b*)

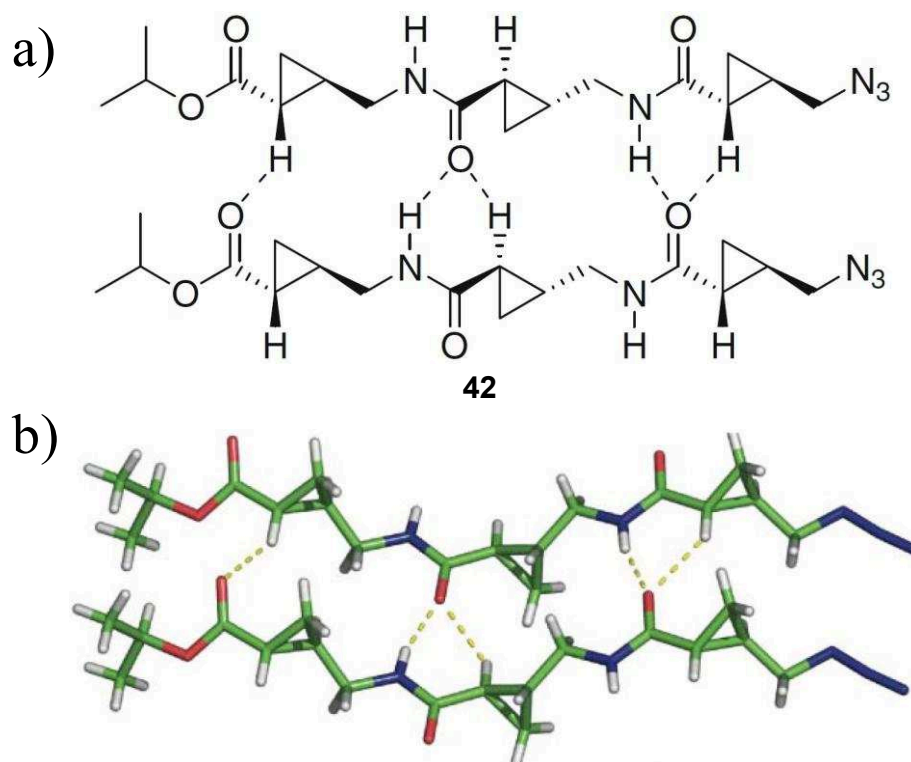


Figure 61 Trimère γ -peptidique 42 contraint par un cyclopropane : a) schéma d'interactions entre les deux séquences, b) structure cristalline (les liaisons H apparaissent en pointillés)²²

La conformation est assurée par l'établissement d'un réseau de liaisons hydrogène intermoléculaires entre carbonyles et protons amidiques. Il a également été proposé que l'architecture pouvait être stabilisée par une seconde série de liaisons hydrogène impliquant les protons des positions α . Ces résultats ont permis de concevoir la séquence **43** constituée de deux chaînes γ -peptidiques parallèles séparées par un « reverse-turn ». Ce mime de coude est composé de l'alcool dérivé de la valine couplé à une amine aromatique. La séquence formée s'arrange en une épingle à cheveux.¹⁶² (*Figure 62*)

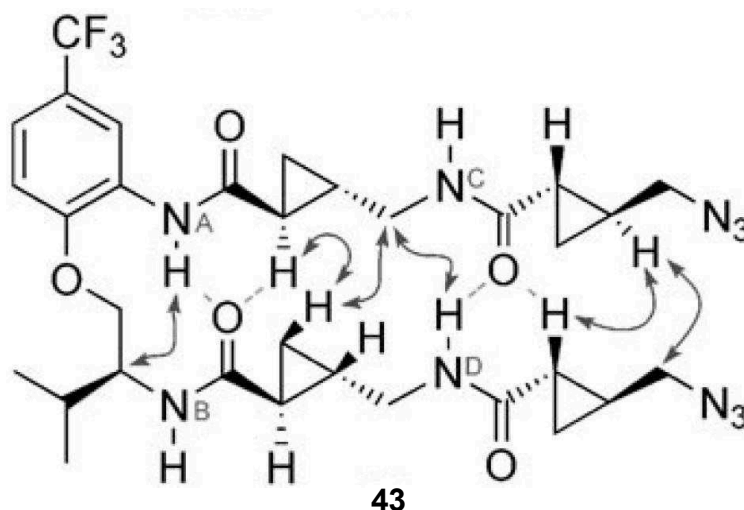


Figure 62 Epingle à cheveux 43 développée par Smith (les flèches indiquent les corrélations NOEs observées et les pointillés matérialisent les liaisons hydrogène)¹⁶²

En RMN 2D (CDCl₃), plusieurs corrélations NOEs à très longues distances entre protons cyclopropaniques d'une part et entre H-C(γ) et protons amidiques d'autre part ont été observées. Ces observations suggéraient un positionnement face à face des deux chaînes composant l'épingle. Des expériences en température et de titration par le DMSO-d₆ ont indiqué que les protons amidiques NH^A et NH^D étaient protégés du solvant titrant comparés à NH^B et NH^C. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence l'engagement des protons NH^A et NH^D dans des liaisons hydrogène avec le carbonyle leur faisant face.

III.3.c.2.2.3 Oligomères d'acide 4-aminométhyl-tétrahydrofuran-2-carboxylique

L'équipe de Fleet a développé un γ-amino acide, dérivé construit autour d'un tétrahydrofurane, le 4-aminométhyl-tétrahydrofuran-2-carboxylate avec une stéréochimie 2,4-*cis*.^{163,164} Deux séquences ont été synthétisées : un dimère **44**, qui a été analysé par diffraction X et un tétramère **45** dont le comportement en solution a été déterminé par RMN.¹⁶⁵ (**Figure 63, a**) La structure cristalline du dimère **44** a révélé une conformation s'apparentant à un coude γ. (**Figure 63, b**) L'analyse RMN de la séquence **45** (C₆D₆) a mis en lumière un fort déblindage des protons amidiques des résidus 2 et 3 indiquant un possible engagement dans des liaisons hydrogène. Toutefois, aucune structure n'a été calculée à partir des données RMN. Enfin, le dérivé γ-peptidique de stéréochimie opposée (2,4-*trans*) n'adopte pas de structure secondaire définie.

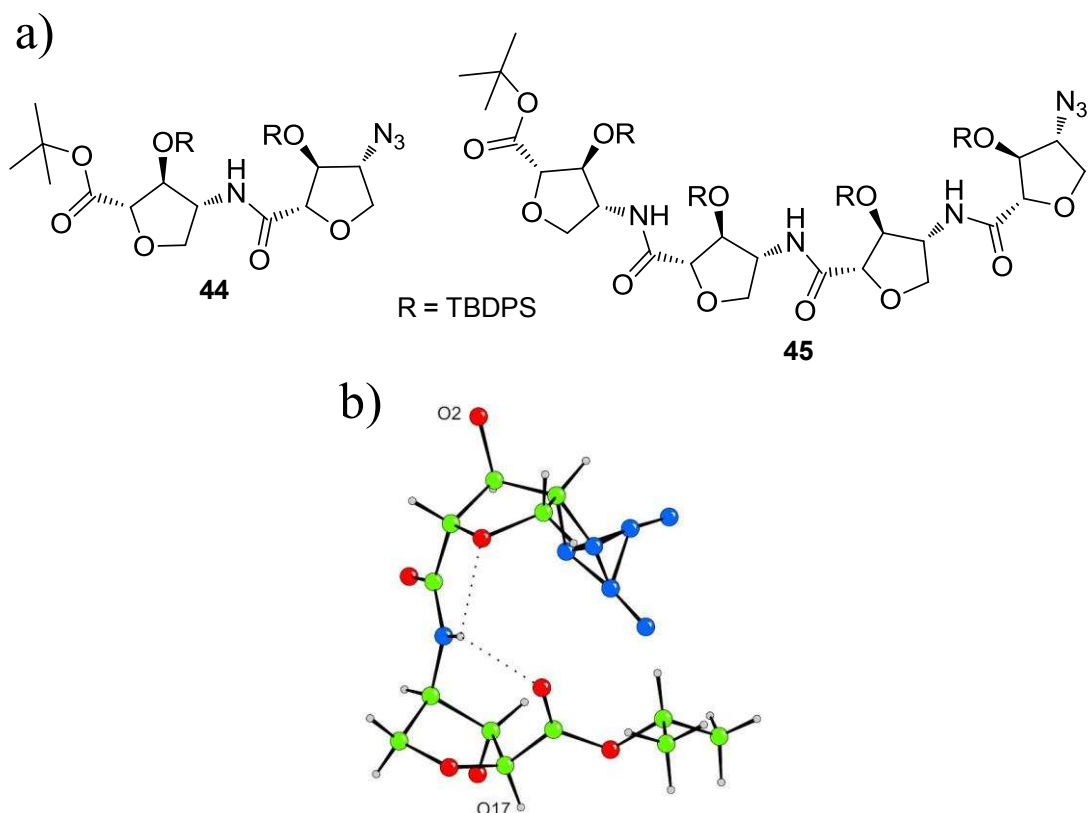


Figure 63 γ -amino acides dérivés du furanose : a) dimère 44 et tétramère 45 développés, b) structure cristalline de 44 sur laquelle les liaisons hydrogènes sont représentées en pointillés (les groupements protecteurs TBDPS sur les oxygènes O2 et O17 ont été ôtés pour plus de clarté)¹⁶⁵

III.3.d Les oligourées

III.3.d.1 Définition / Nature du monomère

Les **oligourées** sont des mimes de peptides dont les séquences sont obtenues par oligomérisation d'urées N,N' -disubstituées. Au niveau structural, le monomère peut être apparenté à un γ^4 -amino acide au sein duquel le carbone α aurait été remplacé par un atome d'azote noté « N' ». Les deux carbones constituant le squelette sont notés α et β . (**Figure 64**) Le motif urée est rigide, plan et capable d'établir des liaisons hydrogène : chacun des deux -NH peut donner une liaison hydrogène tandis que le carbonyle peut en accepter deux.

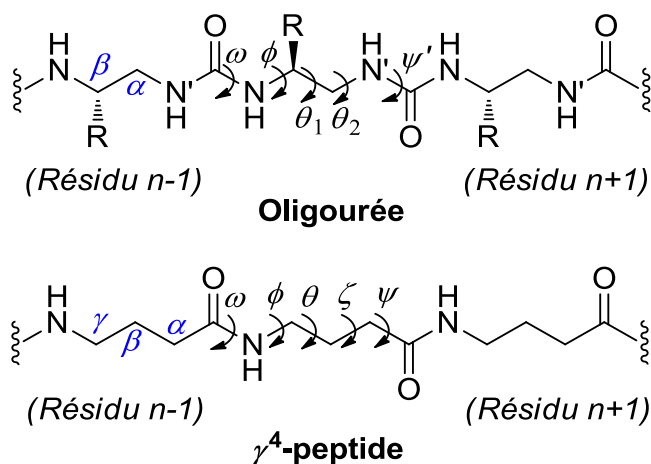


Figure 64 Définition des angles et positions des oligourées comparée à celle des γ⁴-amino acides

De part leurs similarité structurale, les urées *N,N'*-disubstituées et les γ⁴-amino acides possèdent le même nombre de degrés de liberté. La nomenclature des angles dièdres est similaire à celle des γ-amino acides : l'angle ω est défini par le groupe d'atomes $N'_{n-1}-C_{n-1}-N-C\beta$, l'angle ϕ implique l'enchaînement $C_{n-1}-N-C\beta-C\alpha$, les angles θ_1 et θ_2 sont construits respectivement par $N-C\beta-C\alpha-N'$ et $C\beta-C\alpha-N'-C_{n+1}$, et l'angle ψ est défini par les atomes $C\alpha-N'-C-N_{n+1}$.

III.3.d.2 Structure des oligourées

Les premières études structurales d'oligo-urées ont été réalisées par le groupe de Guichard.¹⁶⁶ qui ont décrit le comportement d'une heptaurée en solution (composé **46**). (Figure 65)

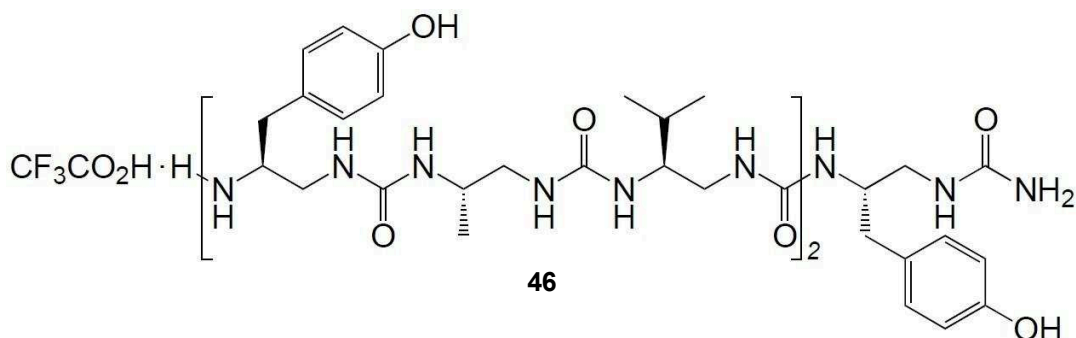


Figure 65 Heptaurée de Guichard¹⁶⁶

Les expériences RMN 2D (COSY, TOCSY et ROESY) réalisées dans la pyridine-d₅ ont mis en évidence des corrélations NOE $N'H_i-NH_{i+1}$ et ${}^\beta CH_i-N'H_{i+2}$ intenses tout le long du squelette de l'oligo-urée **46**. Des constantes de couplage $J(NH, {}^\beta CH)$ supérieures à 9 Hz indiquaient une restriction de rotation autour de la liaison $N-{}^\beta C$ conduisant à un arrangement presque antipériplanaire des deux protons. En outre, les déplacements chimiques des protons

géminaux $^{\alpha}\text{CH}_2$ de chacun des résidus étaient très différents, ce qui suggérait des environnements distincts. La mesure de constantes de couplage $J(^{\alpha}\text{CH}, \text{N}'\text{H})$ autour de 10 Hz indiquait un arrangement antipériplanaire entre les $^{\alpha}\text{CH}$ et les $\text{N}'\text{H}$ tandis que des valeurs de 2,5 Hz pour les constantes de couplage $J(\text{N}'\text{H}, ^{\beta}\text{CH})$ suggéraient une conformation synclinale entre les $\text{N}'\text{H}$ et les $^{\beta}\text{CH}$. Les expériences de modélisation intégrant les contraintes d'angles et de distances déterminées par RMN ont permis de démontrer que l'oligourée s'arrangeait en une hélice droite constituée de 2,5 résidus par tour et ayant un pas de 5,1 Å. La **Figure 66** représente les superpositions des conformations obtenues.

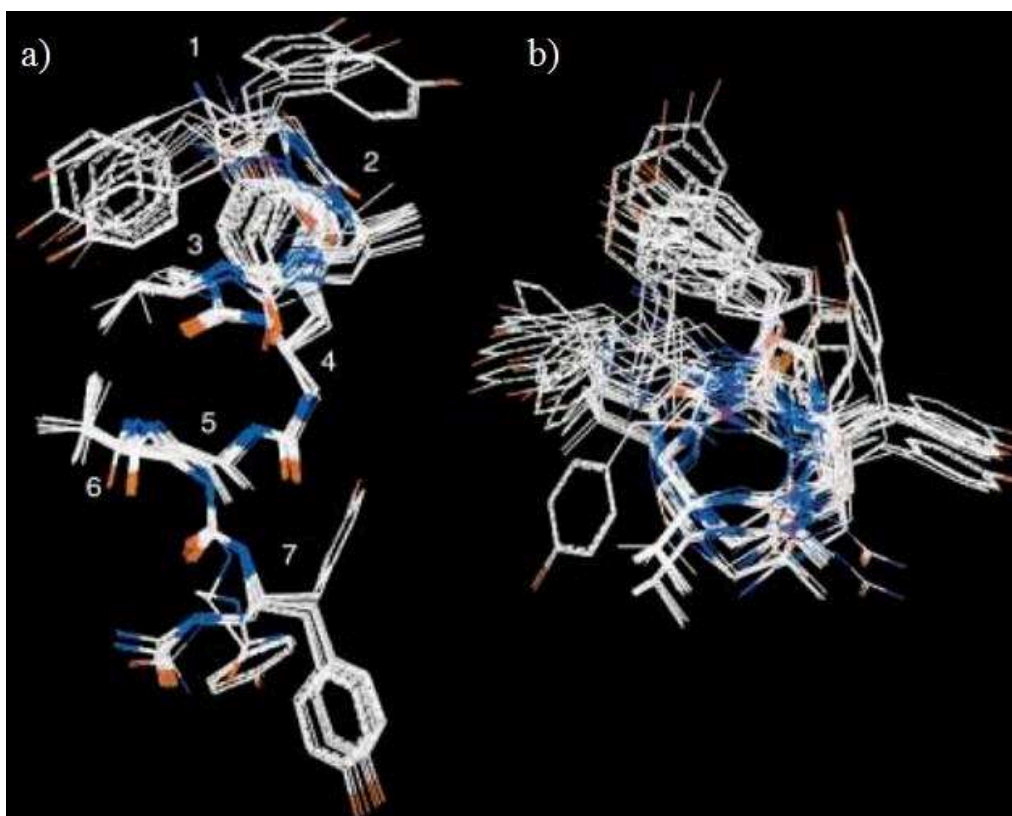


Figure 66 Les 20 structures de moindre énergie de l'heptaurée 46: a) vue perpendiculaire à l'axe de l'hélice, b) vue selon l'axe hélicoïdal¹⁶⁶

Les structures hélicoïdales des oligourées se rapprochent fortement des structures en hélices 2,6₁₄ qu'adoptent les γ^4 -peptides.¹⁶⁷ (**Tableau 14**)

Familles d'oligomères	n	h (Å)	Type de liaison H	Taille du pseudo-cycle (nombre de chaînons)
Oligourée	2,5	5,1	$i+2\dots i$	12
			$i+3\dots i$	14
γ^4 -peptides	2,6	5	$i+3\dots i$	14

Tableau 14 Résumé des caractéristiques hélicoïdales des oligourées et des γ^4 -peptides

Les valeurs des angles dièdres des oligourées restent proches de celles des γ^4 -peptides.^{24,153,155} Cependant la présence d'un azote supplémentaire au sein du monomère intervient comme un élément de structuration supplémentaire qui impose une valeur d'angle ψ supérieure à celle observée pour les γ^4 -peptides (-170° contre -140° respectivement). (**Figure 67**)

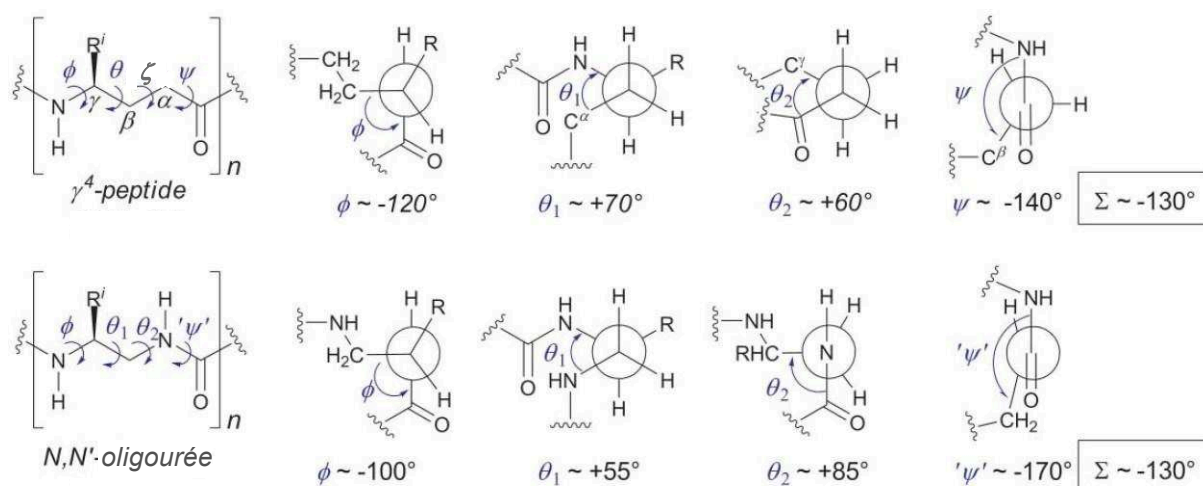


Figure 67 Nomenclature et comparaison des angles dièdres entre les urées N,N' -disubstituées et les γ^4 -amino acides¹⁶⁸

III.3.d.3 Principes gouvernant le repliement

III.3.d.3.1 Éléments principaux de structuration

Par analogie avec les groupements amide,^{169,170} imide,¹⁷¹ guanidine,^{172,173} la fonction urée peut adopter une configuration *trans, trans* ou *cis, cis*. Les équilibres sont modulés en fonction de la nature de ses substituants. Par exemple, des analyses par diffraction X ont montré que les N,N' -diarylurées adoptaient préférentiellement une configuration *trans, trans* de manière à minimiser la gêne stérique liée à la présence des deux groupements aromatiques.¹⁷⁴ En revanche, l'introduction d'un groupement -méthyle sur les deux azotes modifie l'équilibre et favorise la configuration *cis, cis*. Les groupements alkyles se

positionnent en position *cis* de l'atome d'oxygène forçant les noyaux aromatiques à adopter une conformation de type « sandwich ». ¹⁷⁵ (**Figure 68**)

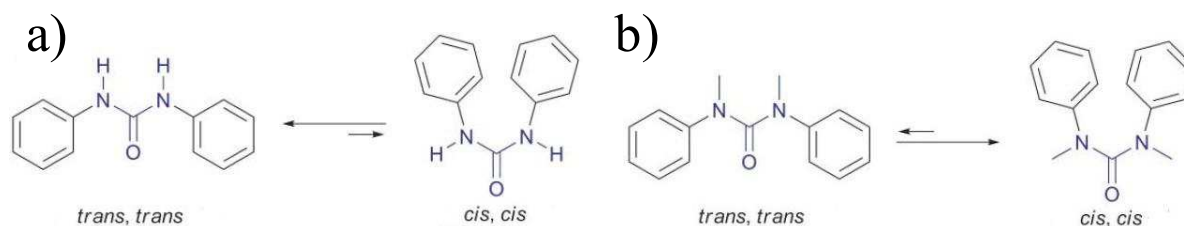


Figure 68 Configurations de la fonction urée suivant le degré de substitution : a) *N,N'*-disubstituées, b) *N,N'*-tétrasubstituées ¹⁶⁸

Dans les *N,N'*-dialkyl oligourées, les différents motifs urée adoptent préférentiellement une configuration *trans, trans*. Cependant l'enchaînement *trans, trans* ne constitue pas à lui seul un élément de structuration suffisant pour expliquer la formation de structures définies. L'établissement d'un réseau de liaisons hydrogène contribue également à la structuration des oligourées. Il a notamment été montré que les protons portés par chacun des azotes d'un motif urée étaient capable de former deux liaisons hydrogène avec un même carbonyle selon le schéma $N'H(i+2)\dots CO(i)$ et $NH(i+3)\dots CO(i)$ formant deux pseudo-cycles de respectivement 12 et 14 chaînons. L'hélice résultante est notée hélice 12,14. (**Figure 69**) Une analyse statistique menée sur les 20 structures de moindre énergie de l'oligomère **46** a révélé que les groupements carbonyles $CO(i)$ n'étaient pas équidistants des deux protons $N'H_{i+2}$ et NH_{i+3} . Les mesures d'angles $(\widehat{N,H,O})$ et de distances $d(N-O)$ ont montré que les pseudo-cycles à 14 chaînons étaient plus nombreux que ceux à 12. ¹⁶⁶

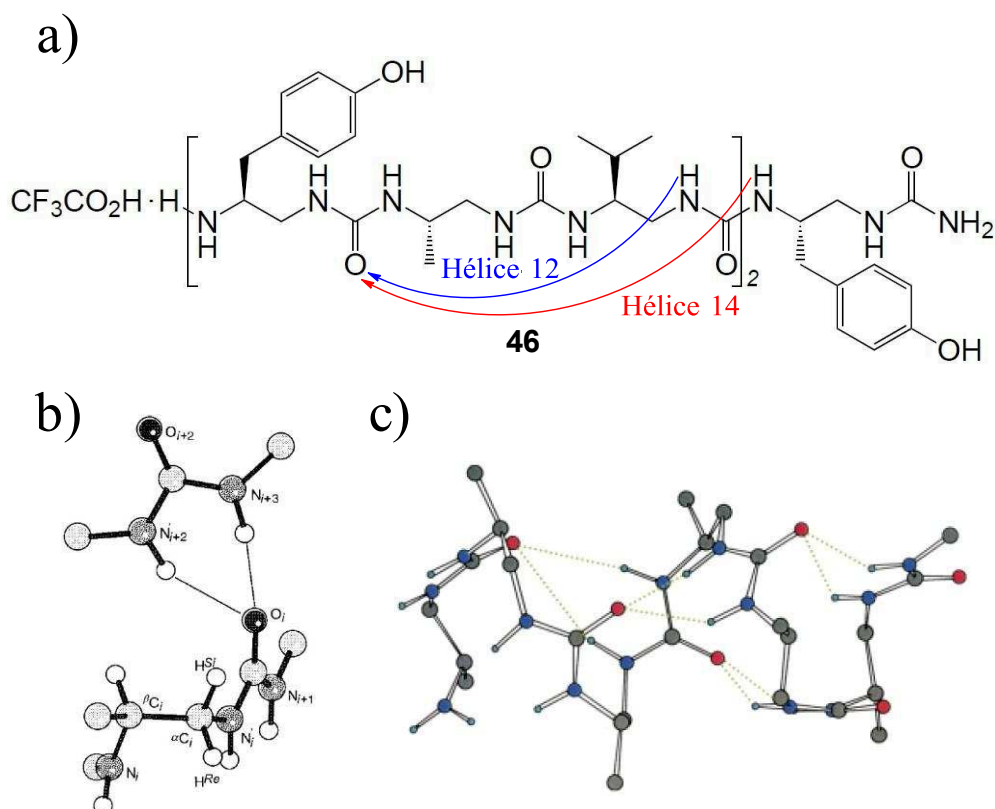


Figure 69 Structure tridimensionnelle de l'heptaurée 46 : a) les 2 pseudo-cycles formés, b) schéma représentant les liaisons hydrogène bifides, c) conformation du squelette en solution^{166,167}

III.3.d.3.2 Optimisation de la stabilité

La stabilité de l'hélice 2,5_{12,14} peut être augmentée en modulant divers paramètres. Ces derniers ont été déterminés à la suite d'analyses structurales par RMN (1D, 2D), RMN du solide et dichroïsme circulaire :¹⁶⁸

- 1) l'arrangement hélicoïdal est conservé dans les milieux polaires protiques et aprotiques mais avec des stabilités différentes selon le solvant (ordre de stabilité : MeCN > MeOH > DMSO > H₂O).¹⁷⁶ La stabilité des hélices atteint toutefois un maximum lors de l'utilisation de solvants peu polaires comme la pyridine permettant d'obtenir une structure stable à partir de l'enchaînement de seulement 4 à 5 monomères.¹⁷⁷
- 2) l'introduction, au centre d'une séquence, d'un monomère urée contenant un élément de contrainte cyclique en position α et β comme un *cis*-1,2-diaminocyclohexane accroît la stabilité de l'hélice 2,5. (**Figure 70**) Le renforcement de la conformation est mis en évidence par une augmentation nette de l'ellipticité molaire par résidu.¹⁷⁸ Ce dérivé cyclique joue le rôle d'élément de rigidification au même titre que pour les résidus *trans*-ACHC pour les β -peptides.¹⁷⁹⁻¹⁸¹

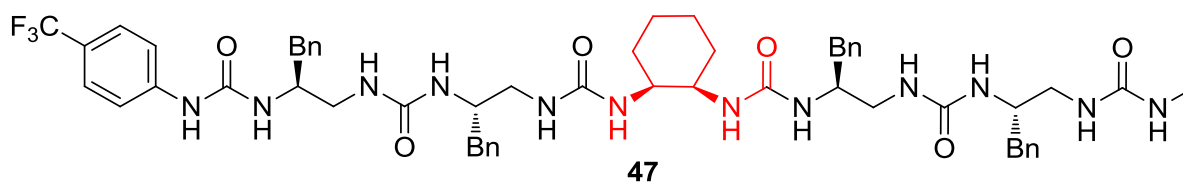


Figure 70 Renforcement du caractère hélicoïdale d'une oligourée par introduction d'une contrainte cyclique entre les positions α et β

III.3.d.3.3 Applications en chimie médicinale

La mise en évidence de la structure hélicoïdale des oligourées en 2002 a permis le développement de mimes d'hélices α . Parmi les applications biologiques, les oligourées ont servies de plateforme pour concevoir des mimes de peptides amphipatiques. L'équipe de Gilles Guichard a ainsi développé une série d'oligourées présentant des activités antimicrobiennes dirigées tant contre des bactéries Gram + (*Staphylococcus aureus*) que Gram - (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*).¹⁷⁶ La régularité de l'architecture hélicoïdale 2,5_{12,14} a permis de positionner de manière contrôlée sur une face de l'hélice une série de chaînes cationiques aminoalkyles tandis que les autres faces étaient décorées par des fonctions hydrophobes (**Figure 71**). La meilleure séquence a montré des activités antibiotiques comparables à la mélittine, peptide amphipathique naturel isolé du miel d'abeille (**Tableau 15**). Par ailleurs La toxicité hémolytique était réduite d'un facteur 5 (Concentration hémolytique 50 : 30 $\mu\text{g/ml}$ pour la mélittine ; 150 $\mu\text{g/ml}$ pour l'oligourée).

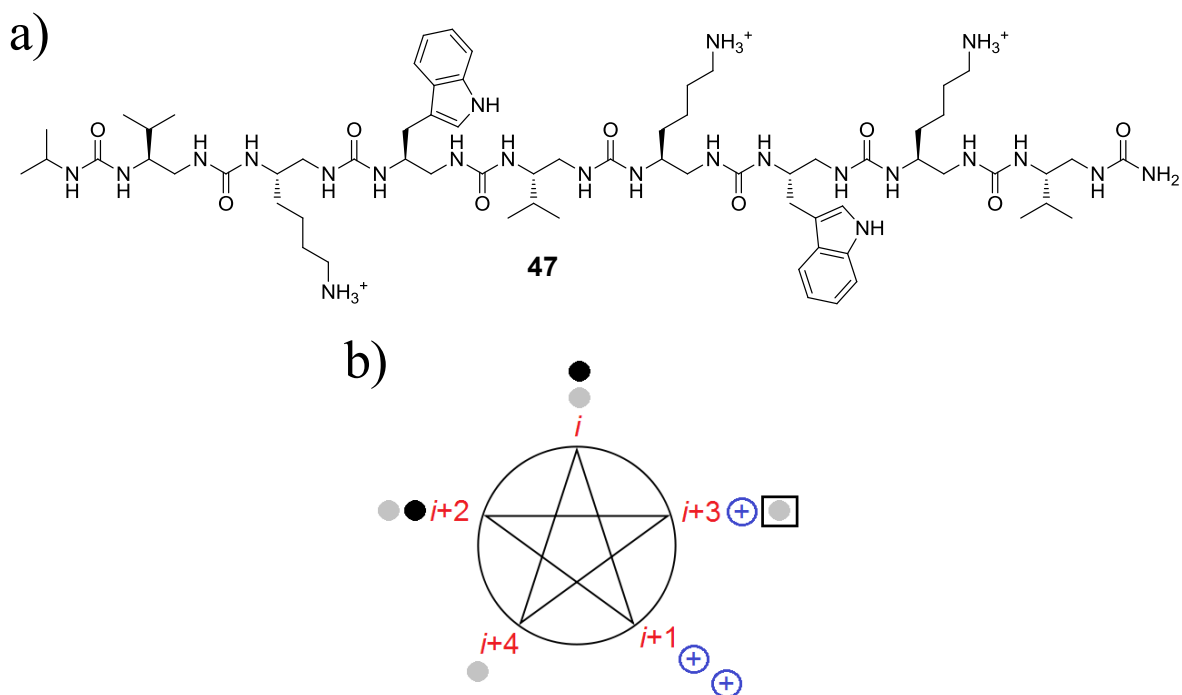


Figure 71 Séquence antimicrobienne optimisée : a) composé 47 ionisé, b) répartition des différentes chaînes latérales suivant l'axe hélicoïdal (« + » : groupements cationiques -NH_3^+ , cercles gris : groupements hydrophobes aliphatiques, cercle noir : groupement hydrophobe aromatique, cadre noir : extrémité N-terminale)

Bactérie	Coloration Gram	Concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g/mL}$)		Concentration minimale bactéricide ($\mu\text{g/mL}$)	
		Octaurée	Méllittine	Octaurée	Méllittine
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	16 (32)	8 (32)	32 (32)	32 (64)
<i>Staphylococcus aureus</i> (résistant à la méticilline)	+	16	8	32	64
<i>Escherichia coli</i>	-	16 (32)	32 (> 256)	64 (256)	64 (> 256)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	16 (64)	64 (> 256)	128 (> 256)	256 (> 256)

Tableau 15 Activité antimicrobienne de l'octaurée de Guichard déterminée dans le milieu Mueller-Hinton (entre parenthèses, résultats obtenus dans le bouillon « cœur-cervelle »)

III.3.e Séquences hybrides et topologies associées

Pour chaque famille de foldamères, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude structurale de séquences hybrides (par exemple, α/β , α/γ , β/γ ...). Pour une description en

détails de ces architectures, nous renvoyons le lecteur aux revues et articles de Vasudev,¹⁸² Martinek,⁶⁶ Guichard,¹³ Goodman,¹⁸³ Bouillère²⁰ et James.¹⁸⁴

CHAPITRE II

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Introduction, le motif ATC

La diversité de structures tridimensionnelles présentées par les β - et γ -peptides a fortement contribué au développement de mimes de peptides. L'introduction de contraintes cycliques au sein des monomères a permis de restreindre l'espace conformationnel des séquences. Ainsi, il a été possible de stabiliser une architecture et d'accéder à d'autres types d'arrangements. Concernant les γ -peptides, plusieurs topologies de coudes,¹⁶¹ de feuillettes^{22,162} et d'hélices (2_{14} ,²⁴ $2_{6,14}$,^{24,155,157} $2_{3,9}$,¹⁵⁶ $2_{7,9}$ ¹⁶⁰) ont été décrites. Cependant, les γ -peptides ont fait l'objet de moins d'applications que leurs homologues β - du fait de la difficulté d'accéder à des monomères stéréo-chimiquement purs possédant une large diversité de chaînes latérales.

Par ailleurs, lorsque nous avons démarré ce projet aucune structure de γ -peptides aromatiques n'avait été décrite dans la littérature. Cependant nous pensions que le fait de bloquer l'angle dièdre ζ à 0° pouvait permettre d'accéder à des structures originales. En effet, au niveau théorique, les travaux menés par Baldauf et coll. avaient prédit de nouvelles conformations accessibles par les γ -peptides.¹⁵² A partir de calculs *ab initio* menés sur des séquences de γ -amino acides *Z*-vinylogues (composé **1**), le groupe a identifié deux structures préférentielles ; deux hélices stabilisées par des liaisons hydrogène formant des pseudo-cycles à 7 et 9 chaîons.¹⁸⁵ (**Figure 72**) La configuration *cis* de la double liaison exerce un contrôle strict sur la structuration en limitant la flexibilité de l'angle ζ autour de 0° . Les oligomères de γ -amino acides *E*-vinylogues, quant à eux, adoptent théoriquement des conformations hélicoïdales plus larges avec des liaisons hydrogène allant de 14 à 27 chaîons.

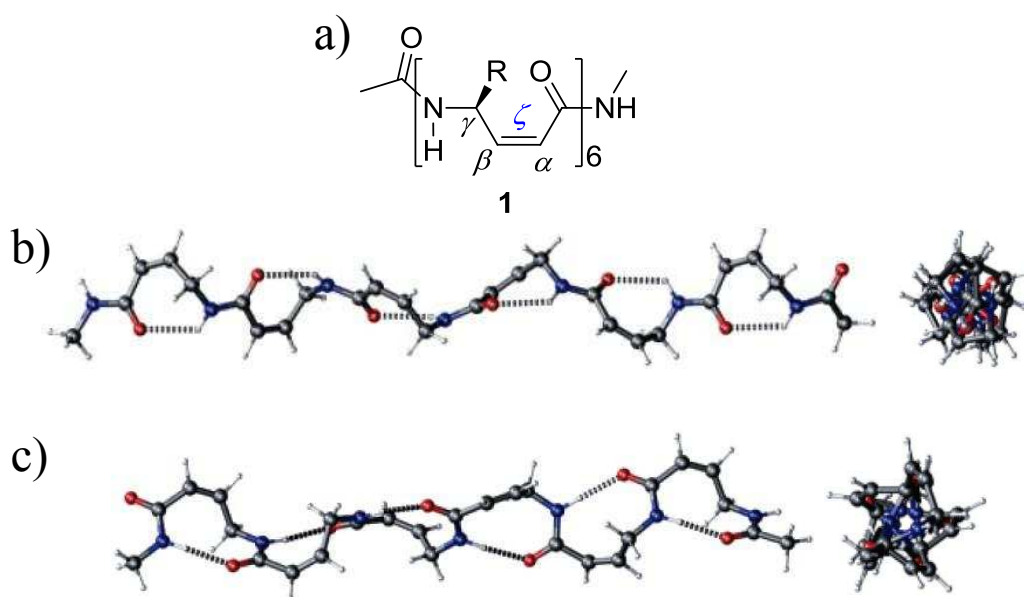


Figure 72 Etude conformationnelle théorique de γ -peptides *Z*-vinylogues : a) séquence modèle **1**, b) structure en hélice 7 et c) structure en hélice 9¹⁸⁵

Cette étude théorique nous a servi de point de départ pour développer une nouvelle classe de γ -amino acides : les **acides 4-Amino-(méthyl)-1,3-Thiazole-5-Carboxyliques (ATCs)**. (*Figure 73*)

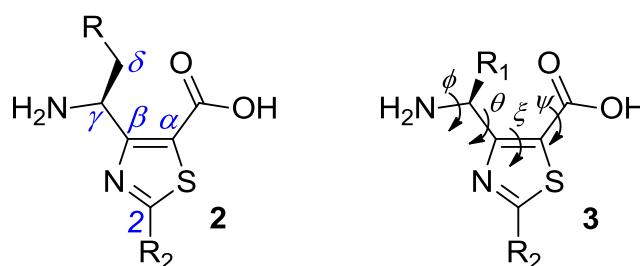


Figure 73 Le motif ATC : définition des positions (2) et angles (3)

Ces monomères **2** et **3** sont construits autour d'un noyau thiazole. Ils présentent deux points de diversification chimique, l'une au niveau du carbone asymétrique γ ($-R_1$) et l'autre en position 2 du thiazole ($-R_2$). L'aromaticité du cycle garantit une répartition plane des substituants situés en positions α , β et 2 du thiazole.

IV Voies de synthèse du monomère ATC

Le cahier des charges établi au début du projet imposait le développement d'une méthodologie de synthèse rapide, à l'échelle de plusieurs grammes, stéréo-sélective et permettant l'introduction de chaînes latérales $-R_1$ et $-R_2$ fonctionnalisées. Par ailleurs, les groupements protégeant les positions $-R_1$, $-R_2$ et les groupes protecteurs du squelette aminoacide devaient être orthogonaux.

IV.1 Rétrosynthèse

D'après le schéma rétrosynthétique (*Schéma 1*), le noyau thiazole de l'ATC **4** peut être obtenu par cyclisation de Hantzsch entre un thioamide primaire ou une thiourée et un α -halo- β -cétoester **5**. Ce dérivé halogéné **5** peut être produit par halogénéation sélective du β -cétoester **6** en position malonique. Enfin, le composé **6** peut être formé par homologation de l' α -amino acide **7** commercial correspondant.

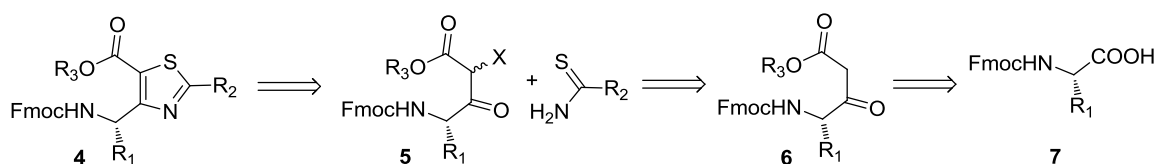


Schéma 1 Rétrosynthèse du monomère ATC 4

La synthèse des ATCs repose donc sur deux étapes clés :

- 1) la formation du β -cétoester **6**
- 2) la cyclisation du composé **5** dans les conditions de Hantzsch.

IV.2 Travaux réalisés

IV.2.a Première voie de synthèse des ATCs

Dans une première voie d'accès au motif ATC, nous avons envisagé d'accéder aux β -cétoesters selon une **réaction de Büchner-Curtius-Schlotterbeck** (parfois nommée **réaction de Roskamp**).¹⁸⁶ Cette réaction catalysée par un acide de Lewis consiste à condenser un α -diazocétate sur un aldéhyde. L'aldol engendré subit alors une migration 1,2-H libérant une molécule d'azote aboutissant à la formation du β -cétoester correspondant.

Selon cette stratégie, l'acide aminé **7** protégé en position N-ter sous forme Fmoc a été converti en un amide de Weinreb *via* un couplage peptidique avec le réactif de Castro (BOP). Cet amide a ensuite été réduit, à -25°C , en aminoaldéhyde à l'aide d'hydrure de lithium aluminium puis rapidement condensé avec le diazoacétate de benzyle en présence d'une quantité catalytique de SnCl_2 pour obtenir le β -cétoester **8**. Le composé **8** a été ensuite halogéné régiosélectivement en position malonique à l'aide du chlorure de sulfuryle. Le dérivé α -chloré **9** a finalement été converti en ATC **10** grâce à une cyclisation de Hantzsch en présence d'un thioamide primaire ou d'une thiourée.

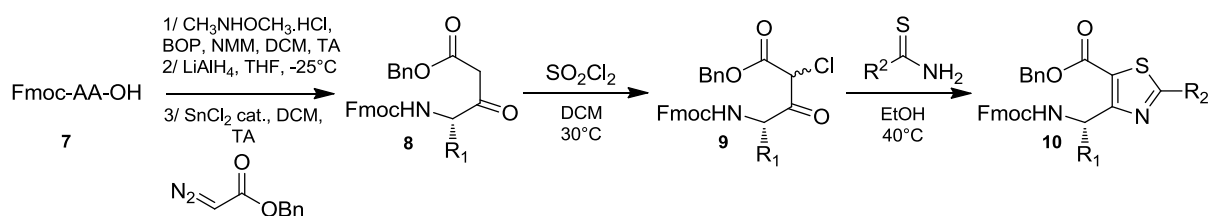


Schéma 2 Première voie d'accès aux ATCs via la réaction de Büchner-Curtius-Schlotterbeck

Les conditions douces permettent de travailler avec tous les acides aminés protéogéniques dont les chaînes étaient protégées par des groupements acido- ou baso-labiles à l'échelle de plusieurs grammes. Les rendements globaux oscillaient entre 19 et 51 % et les purifications restaient classiques (chromatographies sur silice). L'intérêt de cette stratégie de synthèse a été prouvé *via* la production de huit ATCs (de **10a** à **10h**) comportant divers groupements aliphatiques, aromatiques et polaires en positions $-R_1$ et $-R_2$. (**Figure 74**)

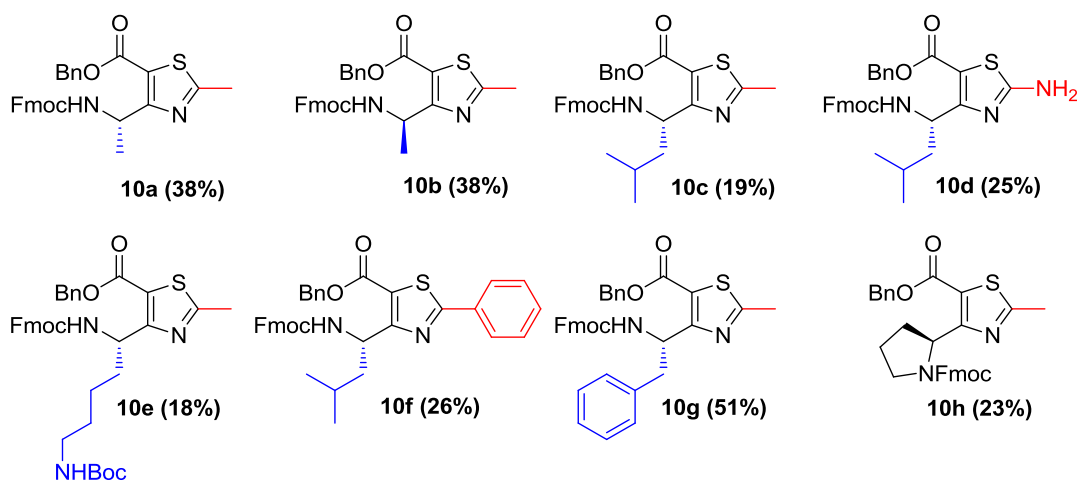


Figure 74 ATCs obtenus via la première voie de synthèse (le rendement global figure entre parenthèses)

Toutefois, le passage par l'aminoaldéhyde pouvait engendrer des problèmes de racémisation via le passage par la forme énol. Celle-ci a été évaluée entre 2 et 8 % par HPLC sur phase stationnaire chirale par l'analyse des composés **10a** (stéréochimie S) et **10b** (stéréochimie R) ; la vitesse de racémisation diminue lorsque l'aminoaldéhyde est engagé rapidement.

IV.2.b Seconde voie de synthèse des ATCs

Afin d'éviter cette racémisation potentielle, une seconde voie de synthèse évitant le passage par un aminoaldéhyde a été développée. (*Schéma 3*)

Une des réactions les plus utilisées pour accéder aux β -cétoesters est la **condensation croisée de Claisen**. Classiquement, cette réaction consiste en la formation d'une liaison carbone-carbone entre un ester et une cétone énolisable dans des conditions basiques. Plusieurs travaux ont décrit la synthèse de β -cétoesters de Boc-¹⁸⁷ et Cbz-acides aminés.¹⁸⁸⁻¹⁹¹ La réaction croisée de Claisen entre un acide aminé activé et un énolate de lithium a permis de former des β -cétoesters protégés en N-ter par les groupements -Boc, -Cbz, et -Fmoc. Nous n'avons trouvé qu'un seul exemple dans la littérature d'une réaction croisée de Claisen avec un Fmoc-amino acide.¹⁹² Une variante de la réaction croisée de Claisen consistant en la condensation d'un acyle imidazole avec un énolate de magnésium en présence de chlorure de magnésium a été décrite par Rich,¹⁹³ Eskola¹⁹⁴ et Zercher.¹⁹⁵ La réaction offre une bonne conversion des α -amino acides protégés en N-ter par un -Cbz, -Boc ou -Bz. A l'inverse, les Fmoc-AA-OH conduisent souvent à des produits de dégradation au cours de la réaction.

Nous avons dans le cadre de cette stratégie chercher à optimiser les conditions de la réaction croisée de Claisen pour les Fmoc-amino acides. Les meilleures conditions identifiées

consistent à activer le Fmoc-amino acide **7** par le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) en présence d'une quantité catalytique de 4-diméthylaminopyridine (DMAP). En parallèle, l'acétate de 1,1-diméthylallyle est déprotoné par le bis(triméthylsilyl)amidure de lithium (LiHMDS) à -80°C. L'énolate de lithium résultant est ensuite condensé avec l'acide activé à température ambiante pour former le β -cétoster **11**. Un travail d'optimisation, sur - les températures, - les natures et équivalents de réactifs ainsi que sur - les temps de condensation et - la présence d'un catalyseur (DMAP), a permis d'obtenir 10 β -cétosters avec des rendements allant de 34 à 80%, dont 7 avec un rendement supérieur à 50% :

- 1) la déprotonation à -80°C ainsi que le choix d'un ester encombré (l'acétate de 1,1-diméthylallyle) ont permis de limiter la réaction secondaire d'autocondensation de Claisen de l'énolate,
- 2) la combinaison CDI / DMAP cat. s'est avérée plus efficace que le PyBOP et le *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) probablement en imposant une conversion plus élevée de l'acide aminé **7**,
- 3) le temps de condensation abaissé à 15 minutes associé au choix d'une base encombrée comme le LiHMDS permet de limiter la déprotection du β -cétoster **11** en N-ter au cours de la réaction. En effet, les conditions basiques imposées ont tendance à conduire à une déprotection partielle de l'amine.

La monobromation du β -cétoster **11** par le *N*-bromosuccinimide (NBS) en présence de $Mg(ClO_4)_2$ conduit ensuite au composé α -halogéné **12**. Par rapport à la première voie de synthèse, le remplacement d'un benzyle par un groupement diméthylallyle en C-ter a également nécessité une optimisation des conditions d'halogénéation. En effet, l'utilisation du chlorure de sulfuryle s'accompagnait de la formation d'un produit de dichloration dans des proportions de 33%. Le remplacement du chlorure de sulfuryle par le NBS associé à l'utilisation d'un acide de Lewis tel que le perchlorate de magnésium a fourni en proportions 86% de produit monobromé contre 14% de dibromé. En abaissant la température de réaction à -45°C, la proportion de monobromé a atteint 97%. Dans une dernière étape, la cyclisation de Hantzsch en présence d'un thioamide primaire ou d'une thiourée fournit l'ATC **14**.

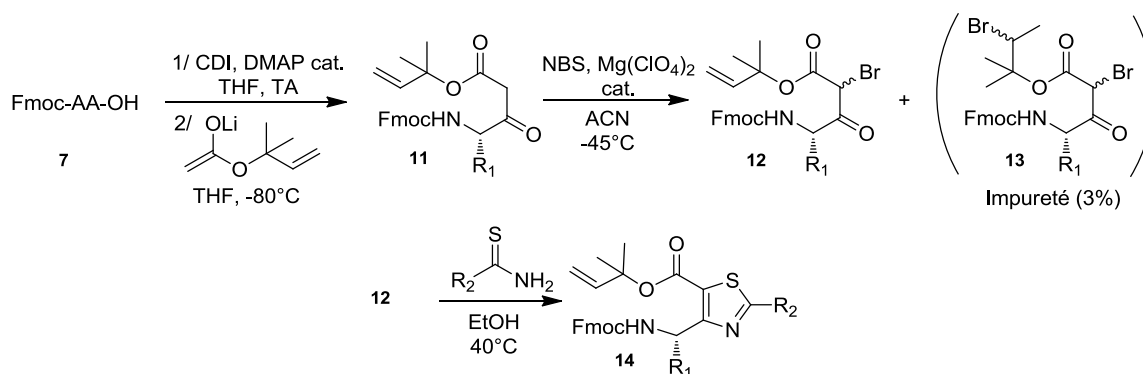


Schéma 3 Seconde voie d'accès aux ATCs via la condensation croisée de Claisen

La seconde voie de synthèse permet de travailler à l'échelle de plusieurs grammes tout en réduisant le nombre d'étapes de synthèse et de purification. Les conditions de réaction optimisées se sont avérées compatibles avec des chaînes fonctionnalisées aliphatiques, aromatiques, acides et basiques. 15 ATCs (de **14a** à **14o**) ont été produits en utilisant cette méthodologie. (**Figure 75**)

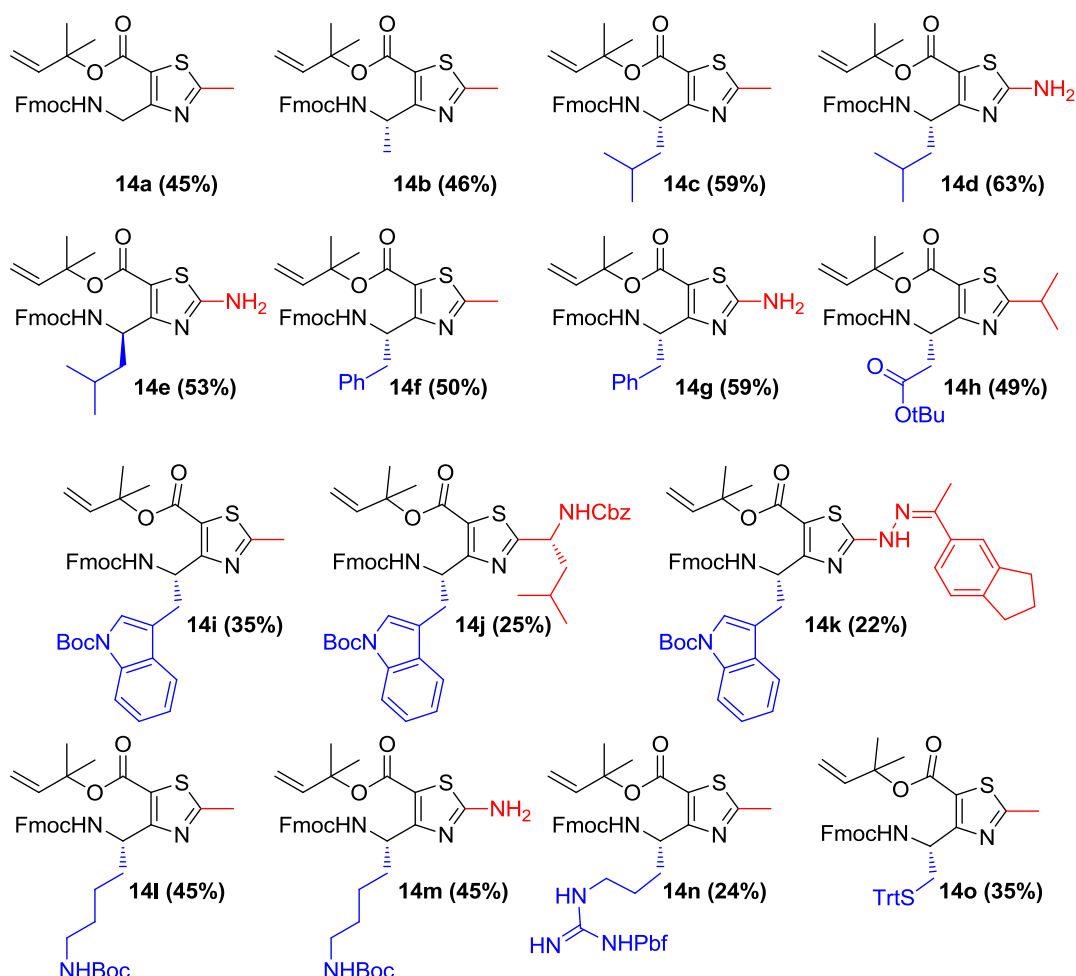


Figure 75 ATCs obtenus via la seconde voie de synthèse (le rendement global figure entre parenthèses)

IV.3 Conclusion

L'étude structurale théorique de γ -amino acides *Z*-vinylogues par Baldaulf et coll. a servi de point de départ pour concevoir le monomère ATC. L'introduction d'un noyau thiazole entre les liaisons C α -C β permet d'imposer une contrainte cyclique aromatique limitant la valeur de l'angle ζ à 0°. La présence de deux points de diversification, sur le carbone γ asymétrique et en position 2 du thiazole, autorise une diversification structurale des ATCs. La voie de synthèse originale mettant en œuvre la réaction de Büchner-Curtius-Schlotterbeck a par la suite été optimisée en introduisant notamment la condensation croisée de Claisen. 23 ATCs comportant diverses chaînes latérales ont finalement été synthétisés *via* les deux méthodologies. Cette bibliothèque de monomères a été utilisée pour la synthèse de séquences oligomériques.

IV.4 Publication

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *European Journal of Organic Chemistry*.

Cross-Claisen Condensation of *N*-Fmoc-Amino Acids – A Short Route to Heterocyclic γ -Amino Acids

Loïc Mathieu,^{[a]†} Clément Bonnel,^{[a]†} Nicolas Masurier,^[a] Ludovic T. Maillard,^{*[a]}
Jean Martinez,^[a] and Vincent Lisowski^[a]

Keywords: Peptidomimetics / Amino acids / Heterocycles / Cross-Claisen reactions

4-Amino(methyl)-1,3-thiazole-5-carboxylic acids (ATCs) are a new class of constrained heterocyclic γ -amino acids built around a thiazole ring; these compounds are valuable as design mimics of the secondary structures of proteins such as helices, β -sheets, turns, and β -hairpins. We report herein a short and versatile chemical route to orthogonally protected ATCs. The synthesis is centered on cross-Claisen condensations between *N*-Fmoc-amino acids and sterically hindered

1,1-dimethylallyl acetate. The optimized conditions are compatible with aliphatic, aromatic, acidic, and basic amino acids. The resulting *N*-Fmoc- β -keto ester intermediates were engaged in a two-step process to give ATCs in 45–90% yields. The synthetic protocol provides a highly flexible method for the introduction of a wide variety of lateral chains either on the γ -carbon atom or on the thiazole core of the γ -amino acids.

Introduction

Over recent decades, peptidomimetic oligomers have been pursued to identify potent therapeutic agents, because they might overcome the poor pharmacokinetic profiles often attributed to peptides with their potency and selectivity toward biological targets maintained. In consequence, synthetic oligomers that adopt stable and predictable conformations in solution and are able to mimic the secondary structures of proteins such as helices, β -sheets, turns, and β -hairpins have been extensively described.^[1–3] A wide range of scaffolds derived from β -amino acids have been characterized,^[4–11] whereas homo- or heterogeneous sequences incorporating γ -amino acids have received far less attention, in part because of the difficulty to access stereochemically pure γ building blocks.^[8,9,12–23] In this context, we recently described a new class of constrained heterocyclic γ -amino acids named 4-amino(methyl)-1,3-thiazole-5-carboxylic acids or ATCs (**1**), which are built around a thiazole ring.^[24,25] Owing to the low conformational flexibility of the γ -amino acids, ATC-containing oligomers adopt predictable secondary structures that are stabilized by C₅ intramolecular hydrogen-bonding networks.

To modulate the physicochemical properties of the oligomers and to drive molecular recognition, the designed ATC

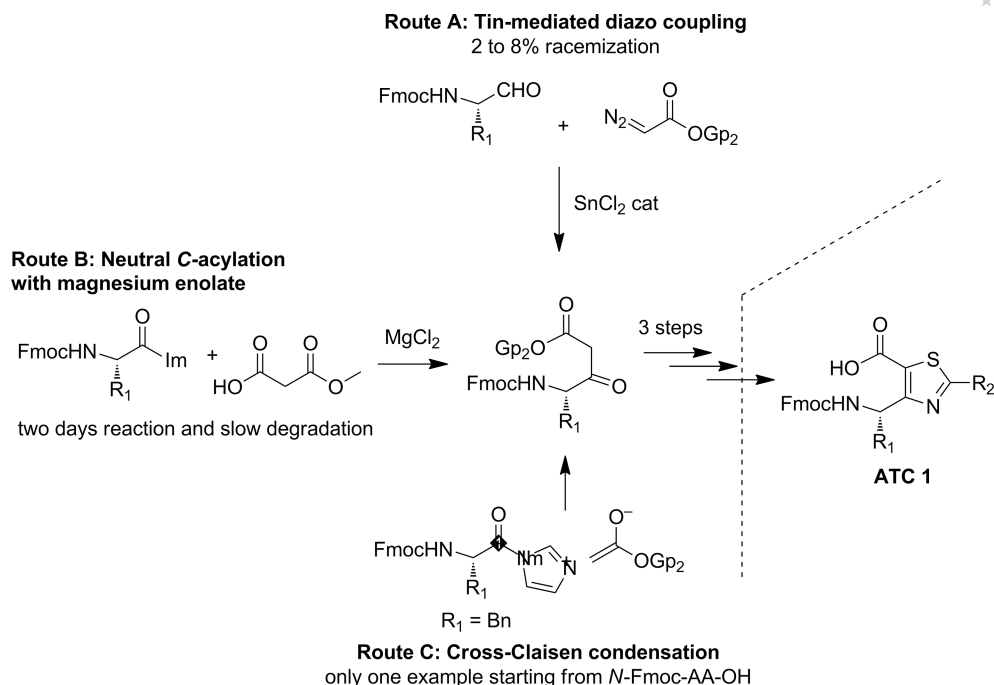
chemical route has to be versatile for the deployment of a wide variety of side chains. In addition, a judicious choice of orthogonal protecting groups is required for peptide elongation. In our previous work, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) was chosen as the transient protecting group of the N-terminal position, as it has become the preferred method for most solid- and solution-phase peptide synthetic processes. The lateral chains were protected with acid-labile groups [e.g., *t*Bu, *tert*-butyloxycarbonyl (Boc), trityl (Trt), and 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf)]. The chemical route for the ATC motif consisted of a six-step synthesis starting from *N*-Fmoc-protected α -amino acids to take advantage of their ready availability, low cost, and high enantiomeric purity (Scheme 1). However, the major issue of the process was the preparation of the key *N*-Fmoc-amino- β -keto ester intermediates, which were obtained in three steps with 25 to 56% overall yields.^[24–26] Furthermore, a partial racemization of the γ stereocenter occurred, because the key tin-mediated diazo coupling reaction involved a *N*-Fmoc-aminoaldehyde intermediate (Scheme 1, Route A).

To speed up the overall synthesis and avoid racemization, we reconsidered the chemical route to N-protected γ -amino- β -keto esters. The most commonly used route involves a neutral C-acylation of acyl imidazoles with a magnesium enolate that is generated in situ from a monoalkyl malonate and magnesium chloride (Scheme 1, Route B).^[27–29] Although amino acids protected with carboxybenzyl (Cbz), Boc, and Bz groups are readily converted, Fmoc-protected amino acids degrade slowly during the acylation. Additionally, the reactions are relatively slow and usually require 1–2 d of stirring. Reducing the reaction time by increasing the temperature results in racemiza-

[a] Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, CNRS Universités Montpellier I et II and ENSCM, 15 Avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5, France
E-mail: ludovic.maillard@univ-montpl.fr
<http://www.ibmm.univ-montpl.fr>

† These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201500012>.

Scheme 1. Strategies to access *N*-Fmoc-protected γ -amino- β -keto ester intermediates as precursors for ATCs.

tion.^[29] Another classical strategy for the chain extension of amino acid skeletons consists of cross-Claisen condensations between activated carboxylic acids and a lithium enolate prepared from an alkyl acetate (Scheme 1, Route C). Whereas positive results have been obtained for *N*-Boc-^[30] or *N*-Cbz-amino acids,^[31–34] only one example of a cross-Claisen reaction has been reported to date for *N*-Fmoc-protected amino acids.^[35] The success of this method highly depends on functional-group compatibility, harsh reaction conditions, and longer reaction durations. As a consequence, to the best of our knowledge, effective cross-Claisen condensations with amino acids with functionalized lateral chains are exceptional.

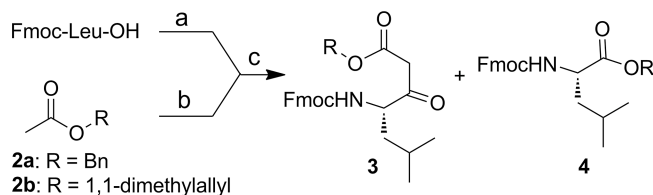
As we considered that cross-Claisen condensations between *N*-Fmoc-amino acids and alkyl acetates might be worthy of investigation, we report herein our efforts to develop compatible conditions for cross-Claisen reactions of *N*-Fmoc-amino acids. The optimized methodology was applied for the preparation of ten *N*-Fmoc-amino- β -keto esters with diverse lateral chains, including acidic and basic amino acids. In a second part, these β -keto esters were used as precursors to prepare a representative set of highly diverse orthogonally protected ATC building blocks.

Results and Discussion

To study the cross-Claisen condensation, *N*-Fmoc-Leu-OH was selected as a model amino acid. Considering the previous work in β -keto ester preparation,^[36] *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI) was first chosen for the carbonyl activation. The *N*-Fmoc-Leu-imidazolide was condensed with the lithium enolate **2a**, which was prepared from benzyl acetate and lithium bis(trimethylsilyl)amide (LiHMDS) in

tetrahydrofuran (THF) at -78 °C. The reaction gave the desired β -keto ester **3** in only 33% yield (Table 1, Entry 1). The major product was the *N*-Fmoc-leucine benzyl ester **4**, probably resulting from the reaction of the imidazolide and

Table 1. Optimization of the cross-Claisen condensation.



Entry	a: Amino acid activation (equiv.) ^[a]	b: Enolate formation ^[b]		c: Condensation time [min]	Ratio 3/4	Yield [%] ^[c]
		Acetate	Base			
1	CDI (1.05)	2a	LiHMDS	45	1:3	33
2	CDI (1.05)	2b	LiHMDS	45	1:0	55
3	PyBOP (1.1) / DIEA (1.1)	2b	LiHMDS	30	1:0	6
4	DIC (1.1) / HOBt (1.1)	2b	LiHMDS	30	1:0	9
5	CDI (1.05)	2b	LDA	45	1:0	57
6	CDI (1.05)	2b	LiTMP	45	1:0	dec.
7	CDI (1.2)	2b	LiHMDS	90	1:0	47
8	CDI (1.05) / DMAP (0.03)	2b	LiHMDS	15	1:0	73

[a] The activation of Fmoc-Leu-OH (1.0 equiv., 28 mmol) was performed at room temp. in anhydrous THF (50 mL) for 1 h. [b] The enolate formation was performed at -78 °C for 10 min, then at r.t. for 10 min, and at -78 °C for 20 min starting from 1,1-dimethylallyl acetate (4.0 equiv., 112 mmol) and base (3.5 equiv.) in anhydrous THF (190 mL). The activated amino acid was added dropwise to the enolate at -78 °C. [c] Determined for the isolated β -keto ester **3**; dec. = decomposition.

the benzyl alcoholate, which was released because of acetate autocondensation. Usually, the autocondensation side reaction can be avoided by using the sterically hindered *tert*-butyl acetate.^[32,37,38] However, as the resulting *tert*-butyl ester is sensitive to acidic conditions, the orthogonality of the protections would not be preserved. Thus, we considered the use of another sterically hindered acetate, that is, 1,1-dimethylallyl acetate (**2b**); the resulting 1,1-dimethylallyl ester could be selectively deprotected under mild conditions with a palladium catalyst.

Compound **2b** was synthesized from 2-methyl-3-buten-2-ol by the procedure of Watson et al.^[39] The 1,1-dimethylallyl acetate was isolated by distillation in 71% yield. After the generation of the enolate and subsequent condensation with the Fmoc-Leu-imidazolide, the *N*-Fmoc-amino- β -keto ester **3** was recovered in 55% yield. Despite the use of a large excess of reagent, we did not detect the formation of *N*-Fmoc-Leucine ester **4**.

To optimize the cross-Claisen reaction, we explored some other conditions for amino acid activation, that is, (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate/*N,N*-diisopropylethylamine (PyBOP/DIEA) and diisopropylcarbodiimide/1-hydroxybenzotriazole (DIC/HOBt), but these conditions led to drastic decreases in the yield (Table 1, Entries 3–4). Therefore, CDI was kept as the best activation reagent. We also tested the influence of the base used for the enolate formation. Although lithium diisopropylamide (LDA) and LiHMDS gave similar results, lithium 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (LiTMP) yielded a complex mixture (Table 1, Entries 2, 5, and 6). Finally, the best-identified conditions consisted of activation of the *N*-Fmoc-protected amino acid with CDI (1.10 equiv.) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP; 3 mol-%) at room temp. in anhydrous THF. At the same time, the enolate was generated from 1,1-dimethylallyl acetate and LiHMDS. The activated amino acid was then added dropwise to the enolate solution. A strict control of the temperature and the reaction time was essential to avoid any Fmoc deprotection. After 15 min of stirring, the reaction mixture was quenched with an aqueous citric acid solution to afford the *N*-Fmoc-amino- β -keto ester **3**, which was isolated in 73% yield by chromatography. The scope of the reaction was extended to nine other *N*-Fmoc-amino acids, namely, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Glu(*t*Bu)-OH, Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, and Fmoc-Arg(Pbf)-OH, to afford the *N*-Fmoc-amino- β -keto esters **3b–3j** in overall yields of 34–80% (Table 2). The conditions were compatible with aliphatic and aromatic as well as acidic and basic amino acids. Finally, the reaction was scaled up to almost 10 g for **3a** without the yield decreasing.

Monohalogenation of the malonic position of the *N*-Fmoc-amino- β -keto esters **3a–3j** was another important issue for accessing ATCs. As supported by Honda et al.^[32] and by our previous studies on ATC synthesis, sulfuryl chloride was first considered as the halogenating reagent. The desired α -chloro- β -keto ester **5a** was isolated in 67% yield, but we also observed 33% overchlorination (Table 3).

Table 2. Scope of the cross-Claisen condensation between *N*-Fmoc-protected α -amino acids and 1,1-dimethylallyl acetate.^[a]

Fmoc-AA-OH	β -Keto ester	Yield [%] ^[b]
Fmoc-(L)-Leu-OH	3a	73
Fmoc-Gly-OH	3b	59
Fmoc-(L)-Ala-OH	3c	80
Fmoc-(L)-Phe-OH	3d	66
Fmoc-(L)-Lys(Boc)-OH	3e	55
Fmoc-(L)-Glu(<i>t</i> Bu)-OH	3f	53
Fmoc-(L)-Asp(<i>t</i> Bu)-OH	3g	72
Fmoc-(L)-Cys(Trt)-OH	3h	45
Fmoc-(L)-Trp(Boc)-OH	3i	49
Fmoc-(L)-Arg(Pbf)-OH	3j	34

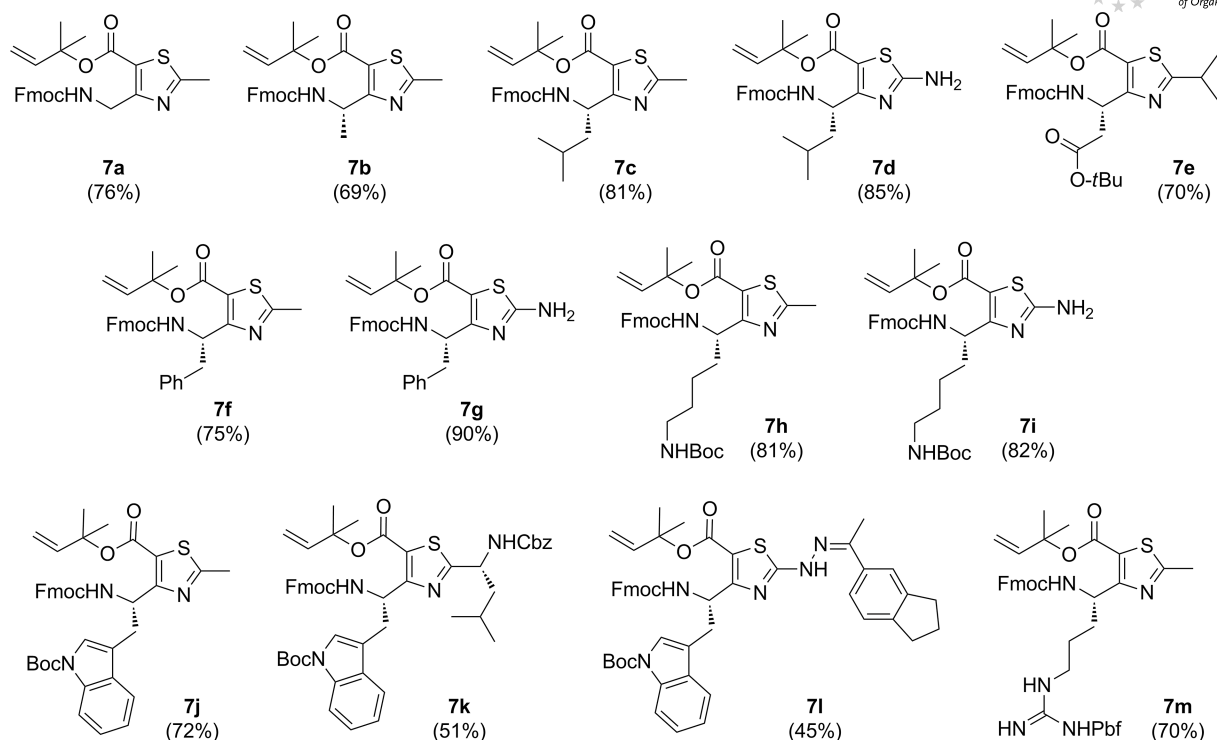
[a] Experimental conditions: the activation of Fmoc-AA-OH (1.0 equiv.) was performed at room temp. in anhydrous THF (50 mL) for 1 h. The enolate was prepared from 1,1-dimethylallyl acetate (4.0 equiv.) and base (3.5 equiv.) in anhydrous THF at -78 °C for 10 min, then at 20 °C for 10 min, and at -78 °C for 20 min. The cross-Claisen condensation was performed at -78 °C. [b] Determined for isolated compound.

Such a result was surprising as no dichlorinated compound was detected for the reaction of a benzyl β -keto ester. This suggested that overchlorination did not occur at the malonic position. Consequently, we reinvestigated the conditions for selective monohalogenation (Table 3). Confirmation that the dimethylallyl protecting group was very sensitive to halogenation was achieved by isolation of the byproduct **6a** (see Supporting Information). Bromodimethylsulfonium bromide (BDMS) was tested according to the procedure described by Khan et al.^[40] but did not give any reaction. We found that the bromination conditions reported by Yang et al.^[41] that is Mg(ClO₄)₂ Lewis acid catalysis combined with *N*-bromosuccinimide (NBS) afforded mild, fast monohalogenation of the β -keto ester. An improvement of the selectivity was obtained by decreasing the temperature to -45 °C.

Table 3. Results of halogenation of the *N*-Fmoc-amino- β -keto ester **3a**.^[a]

X	Reagent (equiv.)	Conditions	Ratio 5a/6
Cl	SO ₂ Cl ₂ (1.1)	CH ₂ Cl ₂ , 0–20 °C	67:33
Br	BDMS (1.25)	CH ₂ Cl ₂ , 0–20 °C	–
Br	NBS (1.05)/Mg(ClO ₄) ₂ (1.05)	CH ₃ CN, 20 °C	86:14
Br	NBS (1.05)/Mg(ClO ₄) ₂ (0.5)	CH ₃ CN, 20 °C	85:15
Br	NBS (1.05)/Mg(ClO ₄) ₂ (0.3)	CH ₃ CN, 20 °C	85:15
Br	NBS (1.05)/Mg(ClO ₄) ₂ (0.3)	CH ₃ CN, -35 °C	89:11
Br	NBS (1.05)/Mg(ClO ₄) ₂ (0.3)	<i>i</i> BuCN, -65 °C	93:7
Br	NBS (1.05)/Mg(ClO ₄) ₂ (0.3)	CH ₃ CN, -45 °C	97:3 ^[b]

[a] Yields determined by HPLC. [b] Determined for isolated compound.



Scheme 2. Scope of the ATC synthesis (yields determined for isolated compounds).

Finally, the optimized bromination conditions were used to convert the *N*-Fmoc-amino- β -keto esters **3** into α -bromo- β -keto esters **5**, which were engaged without any purification in Hantzsch heterocyclizations. Thiazole rings were formed after 2 h in ethanol at 40 °C. Starting from a representative set of primary thioamides, thiourea, and thiosemicarbazones, the ATCs **7a–7m** were isolated in 45–86% yields over the last two steps (Scheme 2). The enantioselectivity of the overall synthesis was ascertained by chiral HPLC. The compounds are usually stocked as fully protected ATC **7**. The removal of the dimethylallyl ester is classically done under Tsuji–Trost conditions with palladium tetrakis(triphenylphosphine) (3 mol-%) and phenylsilane (1.2 equiv.) just before ATC oligomerization (see Supporting Information).

Conclusions

We have developed an efficient and stereoselective method for the preparation of ATCs in 34 to 52% overall yield starting from *N*-Fmoc-amino acids. The three-step synthesis is based on a cross-Claisen condensation between *N*-Fmoc-amino acids and 1,1-dimethylallyl acetate to provide *N*-Fmoc- γ -amino- β -keto ester intermediates. We demonstrated that the choice of the sterically hindered 1,1-dimethylallyl acetate was crucial to improve the condensation yield and maintain orthogonal protection. The synthetic protocol provides a highly versatile and flexible method for the introduction of a wide variety of lateral chains either on the γ -carbon atom or on the thiazole core of the ATC.

Experimental Section

General: Commercially available reagents and solvents were used without any further purification. Reactions were monitored by HPLC with an analytical Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm column (50 \times 4.6 mm, 5 μ m) and 100:0 to 0:100 A/B gradient elution over 3 (conditions A) or 5 min (conditions B) at a flow rate of 5.0 mL/min; eluent A is H₂O/trifluoroacetic acid 0.1% (H₂O/TFA 0.1%) and eluent B is CH₃CN/TFA 0.1%. Detection was performed at $\lambda = 214$ and 254 nm with a photodiode array detector. The retention times are reported as follows: LC: $t_R = [\text{min}]$. The ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at room temperature with samples in deuterated solvents. The chemical shifts (δ) are given in parts per million relative to tetramethylsilane (TMS) or relative to the solvent [¹H: δ (CDCl₃) = 7.24 ppm; ¹³C: δ (CDCl₃) = 77.2 ppm]. The following abbreviations are used to designate the signal multiplicities: s (singlet), d (doublet), dd (doublet doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), and br. (broad). Analytical TLC was performed with aluminium-backed silica gel plates coated with a 0.2 mm thickness of silica gel or with aluminium oxide 60 F254, neutral. LC–MS spectra (ESI) were recorded with an HPLC instrument with an analytical Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm column (50 \times 4.6 mm, 5 μ m) and 100:0 to 0:100 A/B gradient elution over 2.5 min at a flow rate of 3.0 mL/min; eluent A is H₂O/HCOOH 0.1% and eluent B is CH₃CN/HCOOH 0.1%. High-resolution mass spectrometric analyses were performed with a time-of-flight (TOF) mass spectrometer fitted with an electrospray ionization source (ESI). All measurements were performed in the positive-ion mode. Melting points were recorded with a capillary melting point apparatus. Enantiomeric excesses were determined by chiral HPLC analysis with a Chiracel OD-R column (250 \times 4.6 mm) with H₂O, TFA 0.1%/CH₃CN, TFA 0.1% (40:60) as eluent and a flow rate of 1 mL/min.

General Procedure for Synthesis of β -Keto Ester 3

Imidazolidine Formation: In a 250 mL two-neck flask under a nitrogen atmosphere was dissolved the Fmoc-AA-OH (28.57 mmol) in dry THF. Then, CDI (5.096 g, 31.41 mmol, 1.1 equiv.) was added in three portions. A catalytic amount of DMAP (105 mg, 0.8571 mmol, 3 mol-%) was added 2–3 min later, and the solution was stirred for 1 h at room temp.

Enolate Formation: Under a nitrogen atmosphere, a 500 mL three-neck flask was charged with LiHMDS (100 mL, 100 mmol, 1 M solution in THF) followed by dry THF (100 mL). After cooling at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1,1-dimethylallyl acetate (14.650 g, 114.3 mmol) was added dropwise over 10 min. The solution was stirred at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5–10 min, then at room temp. for 10 min, and finally at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min.

Condensation: The imidazolidine solution was added dropwise to the enolate solution at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ over 5–10 min. After stirring for 15 min (HPLC monitoring), the mixture was removed from the cold bath and poured onto a solution of 10% aqueous citric acid (200 mL) until pH 7. The crude was extracted with EtOAc ($2 \times 100\text{ mL}$). The combined organic layers were washed with saturated NaHCO_3 solution ($1 \times 100\text{ mL}$) and brine ($3 \times 150\text{ mL}$), dried, filtered, and evaporated under reduced pressure to yield the crude product. Purification by flash column chromatography afforded the pure β -keto ester.

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl (4S)-4-(Fmoc-amino)-6-methyl-3-oxoheptanoate (3a): White solid, yield 73%, m.p. 117–118 $^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}\text{ }^{\circ}\text{C} = -10.2$ ($c = 1.00$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 0.95$ (t, $J = 6.2\text{ Hz}$, 6 H), 1.41 (m, 2 H), 1.53 (s, 6 H), 1.68 (m, 1 H), 3.41 (AB, $J = 15.6\text{ Hz}$, 1 H), 3.49 (AB, $J = 15.6\text{ Hz}$, 1 H), 4.22 (t, $J = 6.6\text{ Hz}$, 1 H), 4.42 (s, 1 H), 4.45 (d, $J = 6.6\text{ Hz}$, 2 H), 5.09 (d, $J = 10.8\text{ Hz}$, 1 H), 5.19 (d, $J = 17.4\text{ Hz}$, 1 H), 5.19 (s, 1 H), 6.08 (dd, $J = 10.9$, 17.4 Hz, 1 H), 7.32 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H), 7.40 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H), 7.59 (m, 2 H), 7.78 (d, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 21.7$, 23.4, 25.0, 26.5 (2 C), 40.3, 47.5 (2 C), 58.8, 67.0, 82.7, 113.5, 120.2 (2 C), 125.1 (2 C), 127.2 (2 C), 127.9 (2 C), 141.5 (2 C), 142.0, 143.9 (2 C), 156.2, 165.7, 202.7 ppm. LC (conditions A): $t_{\text{R}} = 2.29$ (major) and 2.52 min (minor; keto–enol equilibrium). LC–MS (ESI+): m/z (%) = 464.3 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 486.3 (10) $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{NO}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 464.2437; found 464.2416. FTIR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3375$, 3041, 2958, 1739, 1717, 1536, 1452, 1353, 1249, 1237, 1222, 1126, 1098, 1038, 942, 760, 737, 730 cm^{-1} .

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl (Fmoc-amino)-3-oxobutanoate (3b): White solid, yield 59%, m.p. 99–100 $^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.55$ (s, 6 H), 3.43 (s, 2 H), 4.23 (m, 3 H), 4.41 (d, $J = 7.0\text{ Hz}$, 2 H), 5.12 (dd, $J = 0.6$, 10.9 Hz, 1 H), 5.21 (d, $J = 17.5\text{ Hz}$, 1 H), 5.46 (br., 1 H), 6.08 (dd, $J = 10.9$, 17.5 Hz, 1 H), 7.30 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H), 7.40 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H), 7.59 (d, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H), 7.76 (d, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 26.4$ (2 C), 47.3, 47.8, 51.0, 67.3, 83.0, 113.7, 120.1 (2 C), 125.2 (2 C), 127.2 (2 C), 127.9 (2 C), 141.5, 141.7 (2 C), 143.9 (2 C), 156.3, 165.4, 198.5 ppm. LC (conditions A): $t_{\text{R}} = 2.19$ (major) and 2.40 min (minor; keto–enol equilibrium). LC–MS (ESI+): m/z (%) = 408.2 (17) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 430.1 (100) $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{NO}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 408.1811; found 408.1811. FTIR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3357$, 3041, 2979, 1724, 1704, 1449, 1436, 1394, 1306, 1288, 1252, 1109, 1073, 1050, 988, 969, 760, 739 cm^{-1} .

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl (4S)-4-(Fmoc-amino)-3-oxo-5-pentanoate (3c): Pale orange solid, yield 80%, m.p. 68–70 $^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}\text{ }^{\circ}\text{C} = +6.61$ ($c = 2.00$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 1.39$ (d, $J = 7.1\text{ Hz}$, 3 H), 1.54 (s, 6 H), 3.45 (AB, $J = 16.0\text{ Hz}$, 1 H),

3.50 (AB, $J = 16.0\text{ Hz}$, 1 H), 4.22 (t, $J = 6.9\text{ Hz}$, 1 H), 4.38–4.50 (m, 3 H), 5.10 (d, $J = 11.0\text{ Hz}$, 1 H), 5.20 (d, $J = 17.5\text{ Hz}$, 1 H), 5.47 (d, $J = 7.2\text{ Hz}$, 1 H), 6.08 (dd, $J = 11.0$, 17.5 Hz, 1 H), 7.32 (td, $J = 0.7$, 7.5 Hz, 2 H), 7.40 (t, $J = 7.5\text{ Hz}$, 2 H), 7.59 (d, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H), 7.75 (d, $J = 7.5\text{ Hz}$, 2 H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 17.4$, 26.4 (2 C), 47.0, 47.3, 56.0, 67.1, 82.8, 113.6, 120.1 (2 C), 125.1 (2 C), 127.2 (2 C), 127.9 (2 C), 141.5, 141.8 (2 C), 143.9 (2 C), 155.8, 165.6, 202.2 ppm. LC (conditions A): $t_{\text{R}} = 2.25$ (major) and 2.48 min (minor; keto–enol equilibrium). LC–MS (ESI+): m/z (%) = 422.3 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 444.2 (70) $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{NO}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 422.1972; found 422.1967. FTIR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3309$, 2983, 2939, 1717, 1685, 1533, 1450, 1316, 1254, 1123, 1048, 923, 833, 757, 737 cm^{-1} .

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl (4S)-4-(Fmoc-amino)-3-oxo-5-phenylpentanoate (3d): Pale pink solid, yield 66%, m.p. 101–102 $^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}\text{ }^{\circ}\text{C} = +0.55$ ($c = 1.00$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 1.52$ (s, 6 H), 3.01 (ABX, $J = 7.0$, 14.0 Hz, 1 H), 3.18 (ABX, $J = 7.0$, 14.0 Hz, 1 H), 3.40 (d, $J = 5.3\text{ Hz}$, 2 H), 4.17 (t, $J = 6.9\text{ Hz}$, 1 H), 4.40 (m, 2 H), 4.67 (m, 1 H), 5.10 (d, $J = 10.8\text{ Hz}$, 1 H), 5.19 (d, $J = 17.5\text{ Hz}$, 1 H), 5.34 (d, $J = 7.6\text{ Hz}$, 1 H), 6.07 (dd, $J = 10.8$, 17.5 Hz, 1 H), 7.14 (d, $J = 7.0\text{ Hz}$, 1 H), 7.23–7.33 (m, 6 H), 7.40 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H), 7.53 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H), 7.77 (d, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 26.4$ (2 C), 37.1, 47.3, 48.0, 60.9, 67.1, 82.8, 113.5, 120.1 (2 C), 125.2 (2 C), 127.2 (2 C), 127.3, 127.9 (2 C), 128.9 (2 C), 129.4 (2 C), 135.9, 141.4 (2 C), 141.8, 143.8 (2 C), 155.8, 165.6, 201.7 ppm. LC (conditions A): $t_{\text{R}} = 2.04$ (major) and 2.19 min (minor; keto–enol equilibrium). LC–MS (ESI+): m/z (%) = 498.2 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 520.2 (10) $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{NO}_5\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 520.2100; found 520.2098. FTIR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3313$, 2984, 1738, 1713, 1692, 1534, 1323, 1254, 1124, 1031, 929, 836, 755, 741, 703 cm^{-1} .

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl (4S)-4-(Fmoc-amino)-8-[(*tert*-butyloxy-carbonyl)aminol]-3-oxooctanoate (3e): Yellow gel, yield 55%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}\text{ }^{\circ}\text{C} = -4.7$ ($c = 1.00$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 1.35$ (br., 2 H), 1.43 (s, 9 H), 1.53 (s, 6 H), 1.62 (br., 2 H), 1.92 (m, 2 H), 3.11 (br., 2 H), 3.42 (AB, $J = 15.7\text{ Hz}$, 1 H), 3.49 (AB, $J = 15.7\text{ Hz}$, 1 H), 4.21 (t, $J = 6.6\text{ Hz}$, 1 H), 4.42 (br., 1 H), 4.46 (br., 2 H), 4.58 (br., 1 H), 5.10 (d, $J = 10.9\text{ Hz}$, 1 H), 5.19 (d, $J = 17.4\text{ Hz}$, 1 H), 5.51 (br., 1 H), 6.08 (dd, $J = 10.9$, 17.4 Hz, 1 H), 7.32 (t, $J = 7.6\text{ Hz}$, 2 H), 7.40 (t, $J = 7.6\text{ Hz}$, 2 H), 7.60 (d, $J = 7.6\text{ Hz}$, 2 H), 7.76 (d, $J = 7.6\text{ Hz}$, 2 H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 22.3$, 26.5, 27.1, 28.6 (3 C), 29.8, 30.6, 40.0, 47.4 (2 C), 60.0, 67.1, 79.4, 82.8, 113.6, 120.1 (2 C), 125.2 (2 C), 127.2 (2 C), 127.9 (2 C), 141.5 (2 C), 141.9, 143.9 (2 C), 156.2, 156.3, 165.7, 202.1 ppm. LC (conditions A): $t_{\text{R}} = 2.29$ (major) and 2.46 min (minor; keto–enol equilibrium). LC–MS (ESI+): m/z (%) = 579.3 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 601.3 (10) $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 579.3039; found 579.3031. FTIR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3375$, 3041, 2958, 2934, 1739, 1717, 1695, 1511, 1450, 1364, 1247, 1165, 1084, 974, 759, 740, 708 cm^{-1} .

1-(1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl) 7-*tert*-Butyl (4S)-4-(Fmoc-amino)-3-oxoheptan-1,7-dioate (3f): Orange oil, yield 53%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}\text{ }^{\circ}\text{C} = +4.72$ ($c = 2.00$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 1.44$ (s, 9 H), 1.53–1.57 (m, 6 H), 1.82–1.90 (m, 1 H), 2.17–2.38 (m, 3 H), 3.47 (AB, $J = 16.0\text{ Hz}$, 1 H), 3.54 (AB, $J = 16.0\text{ Hz}$, 1 H), 4.21 (t, $J = 6.6\text{ Hz}$, 1 H), 4.38–4.47 (m, 3 H), 5.09 (d, $J = 11.3\text{ Hz}$, 1 H), 5.18 (d, $J = 17.4\text{ Hz}$, 1 H), 5.60 (d, $J = 7.4\text{ Hz}$, 1 H), 6.08 (dd, $J = 11.3$, 17.4 Hz, 1 H), 7.32 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H), 7.40 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H), 7.59 (d, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H), 7.76 (d, $J = 7.4\text{ Hz}$, 2 H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 26.1$, 26.4, 26.5, 28.2 (3 C), 31.2, 47.4 (2 C), 59.7, 67.1, 81.1, 82.8, 113.5, 120.2 (2 C), 125.2 (2 C), 127.2 (2 C), 127.9 (2 C), 141.5, 141.9 (2 C), 143.8, 143.9, 156.2, 165.6, 172.3,

201.7 ppm. LC (conditions A): $t_R = 2.54$ (major) and 2.73 min (minor; keto-enol equilibrium). LC-MS (ESI+): m/z (%) = 558.3 (100) [M + Na]⁺. HRMS (ESI): calcd. for C₃₁H₃₈NO₇ [M + H]⁺ 536.2648; found 536.2648. FTIR: $\tilde{\nu}_{\max} = 3334, 2979, 1714, 1515, 1450, 1367, 1320, 1243, 1150, 1123, 1042, 927, 844, 759, 739$ cm⁻¹.

1-(1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl) 7-tert-Butyl (4S)-4-(Fmoc-amino)-3-oxoheptan-1,7-dioate (3g): Brown oil, yield 72%. [α]_D²⁰ = -11.0 ($c = 1.00$, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 1.44$ (s, 9 H), 1.53 (s, 6 H), 2.71 (ABX, $J = 5.0, 17.1$ Hz, 1 H), 2.90 (ABX, $J = 5.0, 17.1$ Hz, 1 H), 3.50 (s, 2 H), 4.23 (t, $J = 6.7$ Hz, 1 H), 4.47 (m, 2 H), 4.57 (m, 1 H), 5.08 (d, $J = 10.9$ Hz, 1 H), 5.18 (d, $J = 17.5$ Hz, 1 H), 5.89 (br., 1 H), 6.08 (dd, $J = 10.9, 17.5$ Hz, 1 H), 7.32 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.41 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.59 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 26.4$ (2 C), 28.2 (3 C), 36.7, 47.1, 47.4, 56.9, 67.3, 82.2, 82.6, 113.4, 120.2 (2 C), 125.2 (2 C), 127.2 (2 C), 127.9 (2 C), 141.5 (2 C), 142.0, 143.8 (2 C), 156.1, 165.7, 170.5, 201.2 ppm. LC (conditions A): $t_R = 2.44$ (major) and 2.60 min (minor; keto-enol equilibrium). LC-MS (ESI+): m/z (%) = 522.1 (100) [M + H]⁺, 544.2 (100) [M + Na]⁺. HRMS (ESI): calcd. for C₃₀H₃₆NO₇ [M + H]⁺ 522.2491; found 522.2492. FTIR: $\tilde{\nu}_{\max} = 3335, 2979, 1714, 1505, 1451, 1367, 1319, 1238, 1151, 1123, 1047, 927, 844, 759, 738$ cm⁻¹.

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl (4S)-4-(Fmoc-amino)tritylthio-3-oxopentanoate (3h): Orange solid, yield 45%, m.p. 70–71 °C. [α]_D²⁰ = -0.24 ($c = 1.00$, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 1.51$ (m, 6 H), 2.52 (ABX, $J = 7.4, 13.1$ Hz, 1 H), 2.78 (ABX, $J = 4.3, 13.1$ Hz, 1 H), 3.15 (AB, $J = 16.0$ Hz, 1 H), 3.21 (AB, $J = 16.0$ Hz, 1 H), 4.22 (br., 2 H), 4.41 (br., 2 H), 5.06 (d, $J = 10.9$ Hz, 1 H), 5.14 (d, $J = 17.6$ Hz, 1 H), 5.23 (br., 1 H), 6.05 (m, 1 H), 7.18–7.31 (m, 12 H), 7.39 (br., 7 H), 7.61 (d, $J = 7.2$ Hz, 2 H), 7.75 (m, 2 H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 26.4, 26.8, 32.8, 47.1, 47.3, 59.1, 67.1, 67.4, 82.6, 113.4, 120.1$ (2 C), 125.2 (2 C), 127.1 (3 C), 127.2 (2 C), 127.9 (2 C), 128.2 (6 C), 129.6 (6 C), 141.4 (2 C), 141.9, 143.8 (2 C), 144.3 (3 C), 155.8, 165.4, 200.3 ppm. LC (conditions A): $t_R = 2.38$ (major) and 2.53 min (minor; keto-enol equilibrium). LC-MS (ESI+): m/z (%) = 718.3 (100) [M + Na]⁺. HRMS (ESI): calcd. for C₄₄H₄₁NO₅SNa [M + Na]⁺ 718.2603; found 718.2589. FTIR: $\tilde{\nu}_{\max} = 3391, 3058, 2980, 2927, 1714, 1490, 1446, 1412, 1319, 1239, 1121, 1033, 926, 845, 739, 699$ cm⁻¹.

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl (4S)-4-(Fmoc-amino)-5-(*N*-Boc-1*H*-indol-3-yl)-3-oxopentanoate (3i): Orange solid, yield 49%, m.p. 64–67 °C. [α]_D²⁰ = -3.6 ($c = 1.00$, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 1.50$ (m, 6 H), 1.64 (s, 9 H), 3.17 (ABX, $J = 6.8, 14.8$ Hz, 1 H), 3.28 (ABX, $J = 6.8, 14.8$ Hz, 1 H), 3.39 (AB, $J = 16.0$ Hz, 1 H), 3.45 (AB, $J = 16.0$ Hz, 1 H), 4.18 (t, $J = 6.6$ Hz, 1 H), 4.39 (d, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 4.78 (m, 1 H), 5.08 (d, $J = 10.9$ Hz, 1 H), 5.16 (d, $J = 17.5$ Hz, 1 H), 5.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 6.04 (dd, $J = 10.9, 17.5$ Hz, 1 H), 7.23–7.35 (m, 4 H), 7.39 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.45 (s, 1 H), 7.51 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.59 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H), 7.75 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 8.13 (br., 1 H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 26.4$ (2 C), 26.9, 28.3 (3 C), 47.3, 48.0, 59.8, 67.2, 82.8, 83.9, 113.5, 115.1, 115.5, 119.0, 120.1 (2 C), 123.0, 124.4, 124.9, 125.2 (2 C), 127.2 (2 C), 127.9 (2 C), 130.3, 135.6, 141.4 (2 C), 141.8, 143.8 (2 C), 149.6, 155.9, 165.7, 201.9 ppm. LC (conditions A): $t_R = 2.28$ (major) and 2.43 min (minor; keto-enol equilibrium). LC-MS (ESI+): m/z (%) = 637.3 (100) [M + H]⁺, 659.3 (10) [M + Na]⁺. HRMS (ESI): calcd. for C₃₈H₄₁N₂O₇ [M + H]⁺ 637.2914; found 637.2918. FTIR: $\tilde{\nu}_{\max} = 2981, 2936, 1718, 1508, 1451, 1368, 1310, 1252, 1226, 1154, 1122, 1083, 1044, 929, 855, 739$ cm⁻¹.

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl (4S)-4-(Fmoc-amino)-7-(*N*-Pbf-guanidino)-3-oxooctanoate (3j): Yellow solid, yield 34%, m.p. 86–88 °C.

[α]_D²⁰ = -0.5 ($c = 1.00$, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 1.43$ (s, 6 H), 1.49 (s, 6 H), 1.58 (br., 3 H), 1.90 (br., 1 H), 2.07 (s, 3 H), 2.49 (s, 3 H), 2.56 (s, 3 H), 2.91 (s, 2 H), 3.20 (br., 2 H), 3.48 (d, $J = 3.8$ Hz, 2 H), 4.16 (t, $J = 6.8$ Hz, 1 H), 4.35 (m, 3 H), 5.06 (d, $J = 10.9$ Hz, 1 H), 5.15 (d, $J = 17.6$ Hz, 1 H), 6.02 (m, 1 H), 6.55 (br., 1 H), 7.26 (m, 2 H), 7.36 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.57 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.73 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H) ppm; the HN Guanidine resonance was not observed. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 12.6, 18.1, 19.5, 25.0, 26.5$ (2 C), 28.1, 28.7 (2 C), 41.0, 43.2, 47.0, 47.2, 60.5, 67.2, 82.9, 86.8, 113.5, 118.0, 120.1 (2 C), 125.1 (2 C), 125.2 (2 C), 127.2 (2 C), 127.9 (2 C), 133.0, 139.1, 141.4 (2 C), 141.8, 143.8 (2 C), 155.7, 156.7, 159.5, 166.3, 202.4 ppm. LC (conditions A): $t_R = 2.07$ (major) and 2.18 min (minor; keto-enol equilibrium). LC-MS (ESI+): m/z (%) = 759.4 (100) [M + H]⁺, 781.5 (10) [M + Na]⁺. HRMS (ESI): calcd. for C₄₁H₅₁N₄O₈S [M + H]⁺ 759.3428; found 759.3434. FTIR: $\tilde{\nu}_{\max} = 2990, 2940, 1716, 1455, 1384, 1312, 1259, 1155, 1087, 761, 742, 731$ cm⁻¹.

General Procedure for ATC Synthesis 7

Synthesis of Bromo- β -keto Esters 5: To a solution of the β -keto ester **3** (2.87 mmol) in acetonitrile (20 mL) was added magnesium perchlorate (210 mg, 0.95 mmol, 0.3 equiv.). The solution was stirred at -45 °C for 10 min. A solution of NBS (537 mg, 3.01 mmol, 1.1 equiv.) in acetonitrile (15 mL) was then added dropwise over 5 min. The reaction was complete after a few minutes of stirring at -45 °C (HPLC monitoring). The mixture was diluted with Et₂O (40 mL) and washed with water (2 × 40 mL) and brine (3 × 20 mL). The organic layer was dried with MgSO₄ and filtered, and the solvent was removed under vacuum to give the crude product, which was used in the next step without further purification.

Hantzsch Cyclization: To a solution of α -monobrominated β -keto ester (2 mmol) in absolute ethanol was added a solution of the thioamide (6.0 mmol, 3 equiv.) dissolved in absolute ethanol. The solution was heated for 2 h at 40 °C until completion of the reaction (HPLC and TLC monitoring). The EtOH was evaporated, and the yellowish solid was partitioned between EtOAc (25 mL) and water (25 mL). The organic layer was washed with water (3 × 20 mL) and brine (1 × 20 mL). The combined organic layers were dried with magnesium sulfate and filtered, and the solvents were evaporated under vacuum to yield the crude product. Purification by silica gel column chromatography afforded ATC **7**.

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl 4-[(Fmoc-amino)methyl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate (7a): White solid, yield 76%, m.p. 102–105 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 1.65$ (s, 6 H), 2.69 (s, 3 H), 4.25 (m, 1 H), 4.38 (d, $J = 7.2$ Hz, 2 H), 4.75 (d, $J = 5.7$ Hz, 2 H), 5.16 (d, $J = 10.9$ Hz, 1 H), 5.26 (d, $J = 17.5$ Hz, 1 H), 5.86 (br., 1 H), 6.17 (dd, $J = 10.9, 17.5$ Hz, 1 H), 7.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.39 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 19.6, 26.7$ (2 C), 40.8, 47.4, 67.1, 83.2, 113.6, 120.1 (2 C), 124.2, 125.3 (2 C), 127.1 (2 C), 127.8 (2 C), 141.4, 142.0 (2 C), 144.2 (2 C), 156.4, 158.5, 160.7, 169.6 ppm. LC (conditions A): $t_R = 2.39$ min. LC-MS (ESI+): m/z (%) = 463.2 (100) [M + H]⁺, 485.2 (10) [M + Na]⁺. HRMS (ESI): calcd. for C₂₆H₂₇N₂O₄S [M + H]⁺ 463.1682; found 463.1692. FTIR: $\tilde{\nu}_{\max} = 3213, 3047, 1710, 1541, 1451, 1280, 1241, 1191, 1158, 1133, 1082, 1056, 926, 825, 734$ cm⁻¹.

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl 4-[(1*S*)-1-(Fmoc-amino)ethyl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate (7b): White solid, yield 69%, m.p. 51–53 °C. [α]_D²⁰ = +8.37 ($c = 1.00$, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 1.48$ (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H), 1.66 (s, 6 H), 2.68 (s, 3 H), 4.23 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 4.36 (d, $J = 6.5$ Hz, 2 H), 5.15 (d, $J = 10.9$ Hz, 1 H), 5.27 (d, $J = 17.4$ Hz, 1 H), 5.68 (m, 1 H), 6.01 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H), 6.18 (dd, $J = 10.9, 17.4$ Hz, 1 H), 7.30 (t, $J =$

7.5 Hz, 2 H), 7.39 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.61 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.76 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 19.5, 22.1, 26.7$ (2 C), 46.6, 47.4, 66.8, 83.2, 113.5, 120.0 (2 C), 123.1, 125.3 (2 C), 127.1 (2 C), 127.7 (2 C), 141.4, 142.0 (2 C), 144.1, 144.2, 155.7, 160.3, 162.6, 169.8 ppm. LC (conditions A): $t_{\text{R}} = 2.49$ min. LC–MS (ESI+): m/z (%) = 477.2 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 477.1844; found 477.1848. FTIR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3317, 2980, 1705, 1499, 1448, 1366, 1315, 1233, 1192, 1132, 1082, 923, 830, 758$ cm^{-1} .

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl 4-[(1S)-1-(Fmoc-amino)-3-methylbutyl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate (7c): White solid, yield 81%, m.p. 98–99 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -0.6^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 0.95$ (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H), 0.99 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H), 1.56 (m, 2 H), 1.66 (s, 6 H), 1.75 (m, 1 H), 2.67 (s, 3 H), 4.21 (t, $J = 7.4$ Hz, 1 H), 4.35 (m, 2 H), 5.14 (d, $J = 10.5$ Hz, 1 H), 5.26 (d, $J = 17.5$ Hz, 1 H), 5.70 (m, 1 H), 5.83 (m, 1 H), 6.19 (dd, $J = 17.5, 10.5$ Hz, 1 H), 7.29 (m, 2 H), 7.39 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H), 7.60 (m, 2 H), 7.75 (d, $J = 7.4$ Hz, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 19.5, 22.3, 23.3, 25.1, 26.7, 26.8, 45.1, 47.4, 48.8, 66.7, 83.3, 113.5, 120.0$ (2 C), 123.8, 125.3 (2 C), 127.1 (2 C), 127.7 (2 C), 141.4 (2 C), 142.1, 144.1, 144.2, 155.9, 160.4, 162.2, 169.8 ppm. LC (conditions A): $t_{\text{R}} = 2.45$ min. LC–MS (ESI+): m/z (%) = 519.3 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 541.3 (10) $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 519.2305; found 519.2318. FTIR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3326, 2956, 1699, 1507, 1450, 1327, 1278, 1251, 1191, 1082, 1044, 923, 830, 759, 736$ cm^{-1} .

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl 2-Amino-4-[(1S)-1-(Fmoc-amino)-3-methylbutyl]-1,3-thiazole-5-carboxylate (7d): White solid, yield 85%, m.p. 113–114 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -16.0^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 0.95$ (m, 6 H), 1.53 (m, 2 H), 1.61 (s, 3 H), 1.62 (s, 3 H), 1.73 (m, 1 H), 4.21 (m, 1 H), 4.32 (dd, $J = 10.3, 7.0$ Hz, 1 H), 4.40 (dd, $J = 10.3, 7.0$ Hz, 1 H), 5.12 (d, $J = 10.9$ Hz, 1 H), 5.23 (d, $J = 17.6$ Hz, 1 H), 5.42 (m, 1 H), 5.82 (br., 2 H), 6.04 (m, 1 H), 6.17 (dd, $J = 17.6, 10.9$ Hz, 1 H), 7.29 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H), 7.38 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H), 7.59 (d, $J = 7.4$ Hz, 2 H), 7.75 (d, $J = 7.4$ Hz, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 22.3, 23.3, 25.1, 26.7, 27.0, 44.4, 47.4, 49.2, 66.7, 82.5, 113.1, 120.0$ (2 C), 125.3 (3 C), 127.1 (2 C), 127.7 (3 C), 141.4 (2 C), 142.5, 144.1 (2 C), 156.1, 161.6, 170.1 ppm. LC (conditions A): $t_{\text{R}} = 2.23$ min. LC–MS (ESI+): m/z (%) = 520.2 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 542.2 (10) $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 520.2270; found 520.2274. FTIR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3313, 2955, 1695, 1615, 1496, 1450, 1316, 1257, 1075, 1043, 923, 827, 758, 738$ cm^{-1} .

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl 4-[(1S)-1-(Fmoc-amino)-3-(tert-butyl)propionate]-2-isopropyl-1,3-thiazole-5-carboxylate (7e): Yellow gel, yield 70%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1.9^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 1.38$ (s, 6 H), 1.40 (s, 9 H), 1.67 (s, 6 H), 2.82 (m, 2 H), 3.29 (m, 1 H), 4.24 (br., 1 H), 4.33 (br., 2 H), 5.15 (d, $J = 10.7$ Hz, 1 H), 5.27 (d, $J = 17.3$ Hz, 1 H), 5.98 (br., 1 H), 6.19–6.25 (m, 2 H), 7.29 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H), 7.38 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H), 7.60 (d, $J = 7.4$ Hz, 2 H), 7.75 (d, $J = 7.4$ Hz, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 23.0$ (2 C), 26.7 (2 C), 28.1 (3 C), 33.7, 41.5, 47.3, 47.8, 67.1, 81.0, 83.6, 113.7, 120.0 (2 C), 123.7, 125.4 (2 C), 127.1 (2 C), 127.8 (2 C), 141.4 (2 C), 141.9, 144.2 (2 C), 155.7, 159.2, 160.3, 169.5, 181.7 ppm. LC (conditions A): $t_{\text{R}} = 2.81$ min. LC–MS (ESI+): m/z (%) = 605.3 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 605.2685; found 605.2690. FTIR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 2975, 1711, 1506, 1450, 1438, 1367, 1246, 1150, 1121, 1084, 1043, 845, 759, 738, 723, 695$ cm^{-1} .

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl 4-[(1S)-1-(Fmoc-amino)-2-phenethyl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate (7f): White solid, yield 75%, m.p. 50–51 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +2.9^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3 ,

400 MHz): $\delta = 1.62$ (d, $J = 5.7$ Hz, 6 H), 2.67 (s, 3 H), 3.13 (d, $J = 6.8$ Hz, 2 H), 4.21 (m, 2 H), 4.39 (m, 1 H), 5.14 (d, $J = 11.0$ Hz, 1 H), 5.23 (d, $J = 17.5$ Hz, 1 H), 5.98 (m, 1 H), 6.11 (m, 2 H), 7.09 (m, 2 H), 7.18–7.23 (m, 3 H), 7.29 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H), 7.39 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H), 7.55 (m, 2 H), 7.76 (d, $J = 7.4$ Hz, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 19.4, 26.5, 26.6, 42.2, 47.2, 51.2, 66.8, 83.2, 113.4, 120.0$ (2 C), 124.4, 125.2, 125.3, 126.6, 127.0 (2 C), 127.7 (2 C), 128.2 (2 C), 129.4, 129.6, 137.2, 141.3 (2 C), 141.9, 144.1 (2 C), 155.7, 160.0 (2 C), 169.8 ppm. LC (conditions A): $t_{\text{R}} = 2.18$ min. LC–MS (ESI+): m/z (%) = 553.3 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 575.3 (10) $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 553.2161; found 553.2166. FTIR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 2925, 2310, 1703, 1501, 1449, 1319, 1245, 1131, 1083, 738, 699$ cm^{-1} .

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl 2-Amino-4-[(1S)-1-(Fmoc-amino)-2-phenethyl]-1,3-thiazole-5-carboxylate (7g): White solid, yield 90%, m.p. 119–120 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0.07^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 1.56$ (m, 6 H), 3.10 (d, $J = 7.2$ Hz, 2 H), 4.20 (m, 2 H), 4.29 (m, 1 H), 5.10 (d, $J = 11.0$ Hz, 1 H), 5.19 (d, $J = 17.5$ Hz, 1 H), 5.71 (q, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 6.07 (br., 2 H), 6.10 (dd, $J = 17.5, 11$ Hz, 1 H), 6.16 (d, $J = 9.2$ Hz, 1 H), 7.13–7.26 (m, 5 H), 7.27 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.38 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.53 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.74 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 26.7, 26.8, 41.4, 47.3, 51.4, 66.9, 82.8, 113.2, 120.0$ (2 C), 125.3, 125.4 (2 C), 126.7, 127.1 (2 C), 127.7 (2 C), 128.3 (2 C), 129.7 (2 C), 137.2, 141.4 (2 C), 142.3, 144.1 (2 C), 155.9, 158.1, 160.5, 169.8 ppm. LC (conditions A): $t_{\text{R}} = 1.96$ min. LC–MS (ESI+): m/z (%) = 554.2 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 576.2 (10) $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 554.2114; found 554.2123. FTIR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3316, 3198, 2982, 1691, 1614, 1494, 1450, 1317, 1280, 1251, 1076, 1046, 923, 827, 758, 739, 699$ cm^{-1} .

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl 4-[(1S)-1-(Fmoc-amino)-[(tert-butoxycarbonyl)amino]pentyl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate (7h): White solid, yield 81%, m.p. 128–129 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1.4^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 1.36$ (br., 2 H), 1.41 (s, 9 H), 1.52 (br., 2 H), 1.65 (s, 6 H), 1.80 (m, 2 H), 2.75 (s, 3 H), 3.08 (br., 2 H), 4.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 1 H), 4.34 (m, 2 H), 4.60 (br., 1 H), 5.16 (d, $J = 10.7$ Hz, 1 H), 5.26 (d, $J = 17.3$ Hz, 1 H), 5.62 (m, 1 H), 6.16–6.19 (m, 2 H), 7.29 (m, 2 H), 7.38 (t, $J = 7.6$ Hz, 2 H), 7.60 (br., 2 H), 7.75 (d, $J = 7.6$ Hz, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 19.3, 23.1, 26.6$ (2 C), 28.5 (3 C), 29.7, 35.7, 40.4, 47.3, 50.1, 66.9, 79.2, 83.5, 113.7, 120.0 (2 C), 123.6, 125.3 (2 C), 127.1 (2 C), 127.8 (2 C), 141.4 (2 C), 141.8, 144.0 (2 C), 156.1, 156.2, 160.2, 161.3, 170.1 ppm. LC (conditions A): $t_{\text{R}} = 2.04$ min. LC–MS (ESI+): m/z (%) = 634.3 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 656.3 (10) $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 634.2951; found 634.2955. FTIR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3298, 3069, 2978, 2934, 1695, 1511, 1450, 1364, 1247, 1165, 1084, 974, 831, 759, 740, 708$ cm^{-1} .

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl 2-Amino-4-[(1S)-1-(Fmoc-amino)-[(tert-butoxycarbonyl)amino]pentyl]-1,3-thiazole-5-carboxylate (7i): White solid, yield 82%, m.p. 147–148 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -15.4^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 1.36$ (br., 2 H), 1.43 (s, 9 H), 1.51 (br., 2 H), 1.62 (s, 6 H), 1.75 (m, 2 H), 3.09 (br., 2 H), 4.19 (t, $J = 7.0$ Hz, 1 H), 4.35 (d, $J = 7.0$ Hz, 2 H), 4.62 (br., 1 H), 5.12 (d, $J = 10.9$ Hz, 1 H), 5.23 (d, $J = 17.6$ Hz, 1 H), 5.39 (m, 1 H), 6.03 (br., 3 H), 6.16 (dd, $J = 17.6, 10.9$ Hz, 1 H), 7.28 (m, 2 H), 7.37 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H), 7.59 (br., 2 H), 7.74 (d, $J = 7.5$ Hz, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 23.0, 26.8$ (2 C), 28.6 (3 C), 29.7, 35.1, 40.3, 47.4, 50.5, 66.9, 79.3, 82.6, 113.2, 118.6, 120.0 (2 C), 125.3 (2 C), 127.2 (2 C), 127.7 (2 C), 141.4 (2 C), 142.4, 144.2 (2 C), 156.1 (2 C), 156.3, 160.9, 170.1 ppm. LC (conditions A): $t_{\text{R}} = 2.08$ min. LC–MS (ESI+): m/z (%) = 635.3 (100) $[\text{M} +$

HJ⁺, 657.3 (10) [M + Na]⁺. HRMS (ESI): calcd. for C₃₄H₄₃N₄O₆S [M + H]⁺ 635.2903; found 635.2908. FTIR: $\tilde{\nu}_{\max}$ = 3316, 2933, 1685, 1498, 1450, 1364, 1248, 1165, 1077, 926, 858, 828, 758, 739 cm⁻¹.

1,1-Dimethylprop-2-en-1-yl 4-[(1*S*)-1-(Fmoc-amino)-2-(*N*-Boc-1*H*-indol-3-yl)ethyl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate (7j): Yellow solid, yield 72%, m.p. 149–150 °C. [α]_D²⁰ = +0.56 (*c* = 1.00, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.53 (m, 6 H), 1.62 (s, 9 H), 2.67 (s, 3 H), 3.26 (m, 2 H), 4.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 1 H), 4.25–4.35 (m, 2 H), 5.09 (d, *J* = 10.8 Hz, 1 H), 5.17 (d, *J* = 17.4 Hz, 1 H), 5.99–6.06 (m, 2 H), 6.11 (m, 1 H), 7.16 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 7.24–7.40 (m, 6 H), 7.56 (m, 3 H), 7.75 (d, *J* = 7.7 Hz, 2 H), 8.08 (br., 1 H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 19.3, 26.5 (2 C), 28.3 (3 C), 31.5, 47.3, 50.3, 67.0, 83.5 (2 C), 113.6, 115.2, 116.1, 119.0, 120.0 (2 C), 122.5, 124.3, 124.9, 125.5 (2 C), 127.2 (2 C), 127.7 (2 C), 127.9, 130.9, 135.4, 141.4 (2 C), 141.8, 144.1 (2 C), 149.8, 155.8, 159.9 (2 C), 170.0 ppm. LC (conditions B): *t*_R = 2.98 min. LC–MS (ESI⁺): *m/z* (%) = 692.4 (100) [M + H]⁺, 714.4 (10) [M + Na]⁺. HRMS (ESI): calcd. for C₄₀H₄₂N₃O₆S [M + H]⁺ 692.2794; found 692.2798. FTIR: $\tilde{\nu}_{\max}$ = 3376, 2978, 2932, 1718, 1504, 1451, 1368, 1331, 1252, 1155, 1082, 936, 855, 833, 758, 739 cm⁻¹.

Compound 7k: White solid, yield 51%, m.p. 134–135 °C. [α]_D²⁰ = –0.98 (*c* = 1.00, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.91 (br., 6 H), 1.25 (s, 6 H), 1.42 (m, 1 H), 1.57 (m, 2 H), 1.62 (br., 9 H), 3.23 (m, 2 H), 4.21 (br., 1 H), 4.33 (m, 2 H), 4.98 (br., 1 H), 5.09 (m, 2 H), 5.12 (s, 2 H), 5.97 (br., 1 H), 6.00 (m, 1 H), 6.07 (br., 2 H), 7.07–7.39 (m, 12 H), 7.50–7.61 (m, 3 H), 7.75 (d, *J* = 7.8 Hz, 2 H), 8.06 (br., 1 H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 22.9 (2 C), 26.6 (2 C), 28.3 (3 C), 29.9 (2 C), 32.1, 45.8, 47.4, 50.7, 67.1, 67.4, 83.5, 83.6, 113.6, 115.3, 116.1, 117.6, 120.1 (2 C), 122.7, 124.3, 124.4, 125.3 (2 C), 127.2 (2 C), 127.8 (2 C), 128.2 (2 C), 128.4, 128.7 (2 C), 129.8, 130.4, 132.2, 136.2, 141.4 (2 C), 142.0, 144.2 (2 C), 149.8, 155.8, 155.9, 161.5, 161.9, 165.4 ppm. LC (conditions B): *t*_R = 3.16 min. LC–MS (ESI⁺): *m/z* (%) = 897.1 (100) [M + H]⁺, 919.1 (10) [M + Na]⁺. HRMS (ESI): calcd. for C₅₂H₅₇N₄O₈S [M + H]⁺ 897.3897; found 897.3899. FTIR: $\tilde{\nu}_{\max}$ = 2917, 2851, 1728, 1593, 1522, 1451, 1368, 1254, 1191, 1143, 1081, 937, 831, 758, 740, 721 cm⁻¹.

Compound 7l: White solid, yield 45%, m.p. 121–122 °C. [α]_D²⁰ = –0.80 (*c* = 1.00, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.26 (s, 6 H), 1.66 (s, 9 H), 2.12 (m, 3 H), 2.47 (s, 3 H), 2.95 (m, 4 H), 3.27 (m, 2 H), 4.16 (br., 1 H), 4.25 (m, 2 H), 5.17 (d, *J* = 10.8 Hz, 1 H), 5.25 (d, *J* = 17.4 Hz, 1 H), 6.04 (m, 1 H), 6.12 (m, 1 H), 6.24 (br., 1 H), 7.21–7.38 (m, 7 H), 7.46–7.58 (br., 4 H), 7.64–7.76 (m, 4 H), 8.13 (br., 1 H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 14.3, 25.6, 26.6, 28.3 (3 C), 29.9 (2 C), 30.3, 33.0, 47.1, 49.0, 67.6, 84.0, 84.6, 114.2, 114.6, 115.5, 118.6, 120.0 (2 C), 122.8, 122.9, 124.5, 124.6, 124.8, 124.9, 125.2, 125.5 (2 C), 127.2 (2 C), 127.8 (2 C), 130.0 (2 C), 135.5, 141.3, 143.7, 143.9 (2 C), 145.1 (2 C), 147.8, 149.7, 155.8, 157.6, 159.1, 163.3, 169.6 ppm. LC (conditions A): *t*_R = 2.84 and 2.87 min. LC–MS (ESI⁺): *m/z* (%) = 850.7 (100) [M + H]⁺, 872.7 (10) [M + Na]⁺. HRMS (ESI): calcd. for C₅₀H₅₂N₅O₆S [M + H]⁺ 850.3638; found 850.3633. FTIR: $\tilde{\nu}_{\max}$ = 2917, 2850, 1728, 1594, 1522, 1451, 1368, 1252, 1191, 1143, 1081, 938, 832, 758, 740, 721 cm⁻¹.

Compound 7m: White solid, yield 70%, m.p. 140–142 °C. [α]_D²⁰ = –0.99 (*c* = 1.00, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.44 (s, 6 H), 1.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 6 H), 1.72 (br., 2 H), 1.92 (br., 2 H), 2.08 (s, 3 H), 2.51 (s, 3 H), 2.57 (s, 3 H), 2.67 (s, 3 H), 2.92 (s, 2 H), 3.23 (br., 2 H), 4.19 (t, *J* = 7.0 Hz, 1 H), 4.39 (m, 2 H), 5.14 (d, *J* = 10.9 Hz, 1 H), 5.28 (d, *J* = 17.6 Hz, 1 H), 5.54 (br., 1 H), 6.04 (br., 1 H), 6.12 (dd, *J* = 17.6, 10.9 Hz, 1 H), 7.15–7.32 (m, 2 H),

7.38 (m, 5 H), 7.57 (m, 2 H), 7.75 (m, 2 H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 12.6, 18.0, 19.4, 19.5, 25.3, 26.5, 26.9, 28.7 (2 C), 33.8, 40.6, 43.4, 47.3, 49.2, 67.0, 83.5, 86.4, 113.6, 117.5, 120.1 (2 C), 122.7, 124.6 (2 C), 125.2 (2 C), 127.2 (2 C), 127.8 (2 C), 132.4, 133.3, 138.5, 141.4, 142.0, 143.8, 144.0, 156.2, 156.6, 158.7, 160.6, 161.8, 170.1 ppm. LC (conditions A): *t*_R = 2.54 min. LC–MS (ESI⁺): *m/z* (%) = 814.4 (100) [M + H]⁺. HRMS (ESI): calcd. for C₄₃H₅₂N₅O₇S₂ [M + H]⁺ 814.3308; found 814.3312. FTIR: $\tilde{\nu}_{\max}$ = 2921, 2853, 1719, 1539, 1452, 1370, 1251, 1135, 1083, 759, 740 cm⁻¹.

Acknowledgments

The authors thank the Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM, UMR5247 CNRS, UM1, UM2, ENSCM) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR), FragSPIN, for financial support. The Laboratory for Physical Measurements of the Montpellier 2 University is thanked for providing analysis facilities.

- [1] J. Gante, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1699; *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780.
- [2] A. J. Souers, J. A. Ellman, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7431.
- [3] M. Eguchi, M. Kahn, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 447.
- [4] Y. J. Chung, L. A. Christianson, H. E. Stanger, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10555.
- [5] D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 1111.
- [6] W. S. Horne, S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1399.
- [7] B. R. Huck, J. D. Fisk, S. H. Gellman, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2607.
- [8] R. S. Roy, P. Balaram, *J. Pept. Res.* **2004**, *63*, 279.
- [9] S. Chatterjee, R. S. Roy, P. Balaram, *J. R. Soc. Interface* **2007**, *4*, 587.
- [10] K. Basuroy, A. Rajagopal, S. Raghothama, N. Shamala, P. Balaram, *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 1671.
- [11] C. André, B. Legrand, C. Deng, C. Didierjean, G. Pickaert, J. Martinez, M. C. Averlant-Petit, M. Amblard, M. Calmes, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 960.
- [12] F. Bouillère, S. Thétiot-Laurent, C. Kouklovsky, V. Alezra, *Amino Acids* **2011**, *41*, 687.
- [13] A. Trabocchi, E. G. Occhiato, D. Potenza, A. Guarna, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7483.
- [14] S. Aravinda, K. Ananda, N. Shamala, P. Balaram, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4789.
- [15] E. Mann, H. Kessler, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4567.
- [16] C. Grison, P. Coutrot, S. Geneve, C. Didierjean, M. Marraud, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10753.
- [17] A. Sengupta, S. Aravinda, N. Shamala, K. M. Raja, P. Balaram, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4214.
- [18] P. G. Vasudev, K. Ananda, S. Chatterjee, S. Aravinda, N. Shamala, P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4039.
- [19] S. Chatterjee, P. G. Vasudev, K. Ananda, S. Raghothama, N. Shamala, P. Balaram, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6595.
- [20] S. Chatterjee, P. G. Vasudev, S. Raghothama, C. Ramakrishnan, N. Shamala, P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5956.
- [21] S. Thétiot-Laurent, F. Bouillère, J. P. Baltaze, F. Brisset, D. Feytens, C. Kouklovsky, E. Miclet, V. Alezra, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9660.
- [22] S. K. Maji, R. Banerjee, D. Velmurugan, A. Razak, H. K. Fun, A. Banerjee, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 633.
- [23] Y. K. Kang, B. J. Byun, *Biopolymers* **2012**, *97*, 1018.
- [24] L. Mathieu, B. Legrand, C. Deng, L. Vezenkov, E. Wenger, C. Didierjean, M. Amblard, M. C. Averlant-Petit, N. Masurier, V. Lisowski, J. Martinez, L. T. Maillard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6006; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6122.
- [25] B. Legrand, L. Mathieu, A. Lebrun, S. Andriamanarivo, V. Lisowski, N. Masurier, S. Zirah, Y. K. Kang, J. Martinez, L. T. Maillard, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6713.

- [26] A. Bandyopadhyay, N. Agrawal, S. M. Mali, S. V. Jadhav, H. N. Gopi, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4855.
- [27] J. Maibaum, D. H. Rich, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 869.
- [28] P. F. Schuda, W. J. Greenlee, P. K. Chakravarty, P. Eskola, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 873.
- [29] C. R. Theberge, C. K. Zercher, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 1521.
- [30] B. D. Harris, K. L. Bhat, M. M. Jouille, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2837.
- [31] R. D. Hoffman, J. Tao, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 7119.
- [32] Y. Honda, S. Katayama, M. Kojima, T. Suzuki, K. Izawa, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3163.
- [33] K. Tomioka, M. Kanai, K. Koga, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2395.
- [34] J. Zhang, P. G. Blazecka, D. A. Pflum, J. Bozelak, D. Vrieze, N. L. Colbry, G. Hoge, D. C. Boyles, B. Samas, T. T. Curran, A. T. Osuma, P. Johnson, S. Kesten, J. B. Schwarz, A. Goodman, M. Plummer, A. Akin, Y. Huang, M. Lovdahl, A. J. Thorpe, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1167.
- [35] R. V. Hoffman, N. Maslouh, F. Cervantes-Lee, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1045.
- [36] R. Paul, G. W. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4596.
- [37] S. Ohta, A. Shimabayashi, S. Hayakawa, M. Sumino, M. Okamoto, *Synthesis* **1985**, 45.
- [38] J. A. Turner, W. S. Jacks, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4229.
- [39] I. D. Watson, A. K. Yudin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17516.
- [40] A. T. Khan, M. A. Ali, P. Goswami, L. H. Choudhury, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8961.
- [41] D. Yang, Y. L. Yan, B. Lui, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7429.

Received: January 6, 2015

Published Online: February 16, 2015

V Synthèse et étude structurale d'oligomères d'ATCs

V.1 Descriptions des séquences

Deux séries d'oligomères **A** et **B** ont été envisagées. (*Figure 76*) La première génération, série **A**, est hydrophobe car alternant des chaînes méthyles et benzyles. Les séquences sont protégées du côté C-ter sous forme d'ester benzylique et sous forme Boc- ou Fmoc- du côté N-ter. Dans la seconde génération, série **B**, l'introduction de chaînes amino-alkyles et la déprotection de l'acide terminal avaient pour but d'accroître la solubilité en vue de pouvoir réaliser l'étude structurale dans les alcools et dans l'eau.

Au sein de ce paragraphe, chaque produit est numéroté de la même manière que dans l'article que nous avons publié et qui est reproduit paragraphe V.5.

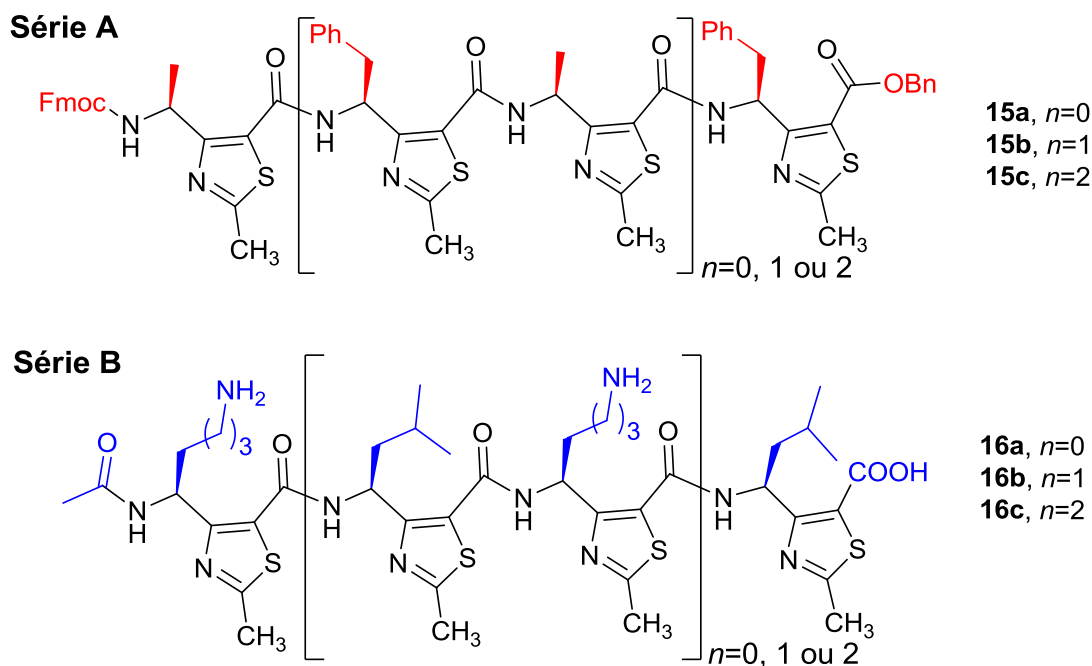


Figure 76 Les six séquences développées

V.2 Synthèse

Le protocole de synthèse des séries **A** et **B** consistait en un couplage itératif des dimères selon une stratégie Fmoc/OBn en solution. Les oligomères de la série **A** ont été synthétisés ainsi : (*Figure 77*)

l'ATC **10a** a été déprotégé en position C-ter par hydrogénolyse dans le méthanol, en présence de palladium adsorbé sur sulfate de baryum donnant **17a**. En parallèle, le groupement Fmoc du composé **10g** a été déprotégé à l'aide de diéthylamine pour donner **17g**. Les molécules **17a** et **17g** ont été couplées à l'aide du système 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide / 1-hydroxybenzotriazole (EDC / HOBT) conduisant au dimère **15a** avec un rendement de 72%. Le lot de **15a** a été divisé en deux parties, l'une est déprotégée en N-ter pour donner **18'** et la seconde en C-ter donnant **19'**. Le couplage peptidique de ces deux espèces a conduit au tétramère **15b** avec un rendement de 72%. Après hydrogénolyse de **15b**, un dernier couplage avec **18** a fourni l'hexamère **15c**.

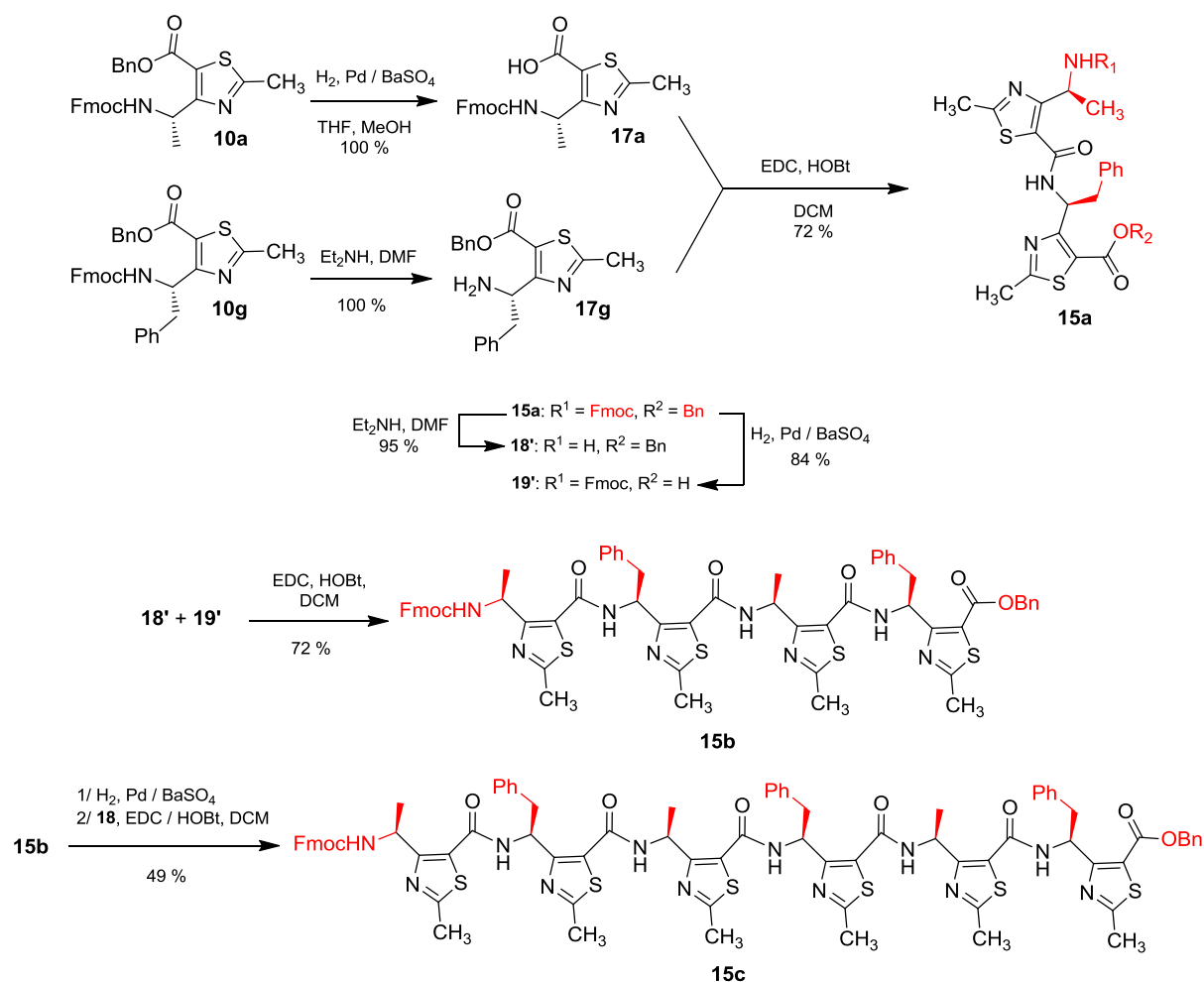


Figure 77 Synthèse des séquences 15a-c de la série A

Les oligomères de la série **B** ont été obtenus selon la même approche résumée sur la **Figure 78**.

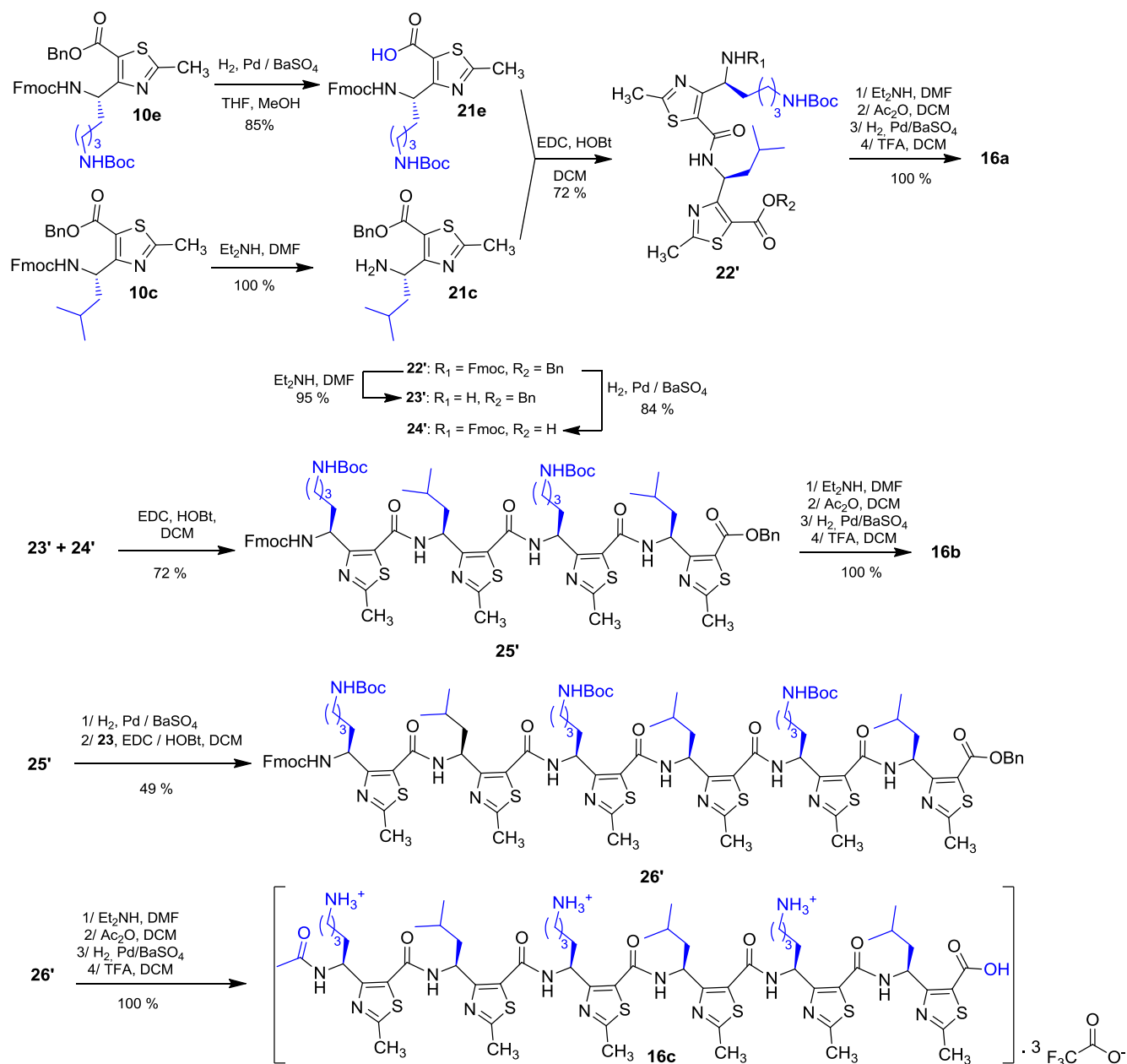


Figure 78 Synthèse des séquences 16a-c de la série B

La conformation adoptée par les dimères, tétramères et hexamères des séries **A** et **B** en solution et à l'état solide a ensuite été étudiée par spectroscopie RMN 1D et 2D, mesure du dichroïsme circulaire et par diffraction des rayons X.

V.3 *Caractérisation structurale*

V.3.a *Etude structurale en solution*

V.3.a.1 *Analyses par Spectroscopie RMN*

La série **A** s'est avérée très soluble dans les solvants halogénés et pratiquement insoluble dans les alcools. Les séquences ont été analysées dans le CDCl₃. La série **B** a quant à elle pu être étudiée dans le CD₃OH ainsi que dans un mélange H₂O/D₂O (9:1, pH 6,5). L'ensemble des signaux RMN ont été attribués en combinant les expériences 1D (¹H, ¹³C et ¹⁵N) et 2D (¹⁵N-HSQC et ¹³C-HSQC et ¹³C-HSQC-TOCSY). Que ce soit dans le CDCl₃, le CD₃OH ou en phase aqueuse, les spectres ¹H de chaque séquence ont montré une dispersion importante des signaux relatifs aux protons ^γCH et aux protons amidiques indiquant que chaque monomère possédait un environnement distinct de ses voisins. Un tel résultat suggérait que toutes les séquences étaient structurées aussi bien en milieu organique qu'en solution aqueuse. Cette dispersion des signaux a également été observée sur les spectres ¹³C et ¹⁵N. De plus, les protons amidiques se sont avérés très déblindés (allant de 9,18 à 10,67 ppm). De telles valeurs de déplacement chimique pouvaient résulter soit de l'implication de proton NH dans des liaisons hydrogène, soit de phénomènes d'anisotropie de champs liés à la présence des noyaux thiazoles. Les spectres ROESY/NOESY ont montré des corrélations NOEs intenses de type NH_{*i*}/^γCH(*i*-1) ainsi que deux corrélations faibles NH_{*i*}/^δCH(*i*-1) et ^γCH(*i*)/^δCH(*i*+1) s'établissant tout au long du squelette. Les cartes d'attribution NOEs se sont avérées similaires pour les dimères **15a** et **16a**, les tétramères **15b** et **16b** et les hexamères **15c** et **16c** mettant en évidence que les dimères, tétramères ou hexamères adoptaient la même conformation quel que soit la nature des chaînes latérales ou le solvant utilisé pour l'analyse. (**Figure 79, Tableau 16**). Cette observation est complétée par les mesures des constantes de couplage ³J(NH,^γCH) ; ces constantes inférieures à 6 Hz sont typiques d'une valeur d'angle φ égale à -60°. Le fait que nous n'observions pas de corrélation longue distance *i*/*i*+2 ou *i*/*i*+3 excluait un arrangement des séquences selon une topologie d'hélices 14 déjà décrite pour les γ-peptides.¹⁵⁵

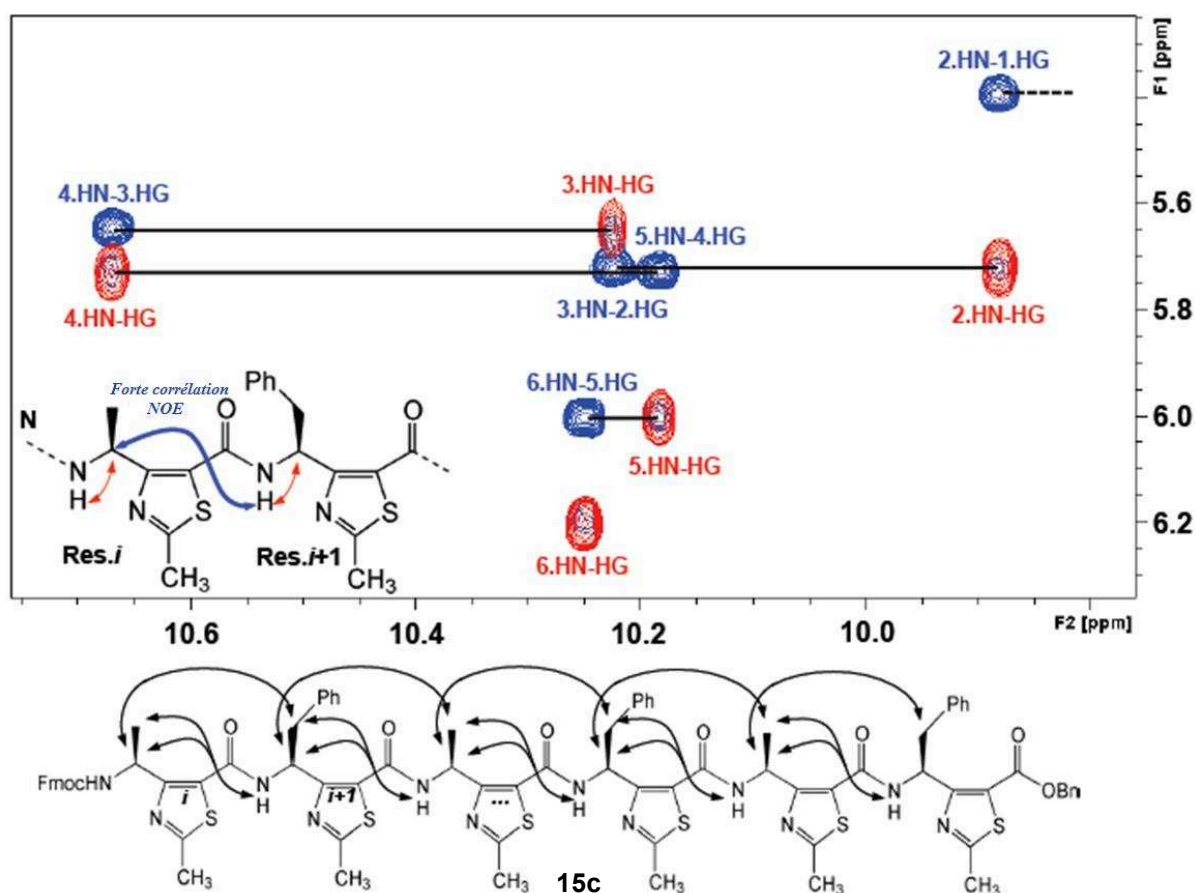


Figure 79 Corrélations NOEs relatives à l'analyse de **15c** (flèches noires). Données extraites des spectres : ROESY (en bleu), TOCSY (en rouge)

La **Figure 79** représente les corrélations, extraites des expériences TOCSY et ROESY, entre les protons amidiques NH_{i+1} et les protons situés en position γ et δ du résidu i de la séquence **15c**. Un autre type de corrélation, plus faible, a été relevé entre les positions γ et δ des résidus i et $i+1$ respectivement. Ces interactions sont conservées quelque soit la nature du solvant et se répètent tout au long de la séquence.

L'ensemble des tâches de corrélations NOEs est classé selon leur intensité donnant accès à des contraintes de distances (**Tableau 16**) : forte $< 2,7 \text{ \AA}$, moyenne $< 3,3 \text{ \AA}$ et faible $< 5,0 \text{ \AA}$. Cette détermination est calculée en prenant pour référence le volume NOE de la paire de protons du méthylène.

Séquence	Nom des corrélations NOEs	Intensité	Type
15a et 16a	2.HN-1.H γ	w/w/w	Séquentiel
	2.HN-1.H δ	m/s/s	Séquentiel
	2.H α -CH ₂ (OBn)	w	Séquentiel
	2.H β -CH ₂ (OBn)	w	Séquentiel
	2.H(OBn)-CH ₂ (OBn)	w	Séquentiel
15b et 16b	1.HN-CH ₂ (Fmoc)	w	Séquentiel
	1.H γ -2.H δ	w/w	Séquentiel
	2.HN-1.H γ	s/s/s	Séquentiel
	2.HN-1.H δ	w/w/w	Séquentiel
	2.H γ -3.H δ	w/w	Séquentiel
	3.HN-2.H γ	s/s/s	Séquentiel
	3.HN-2.H δ	w/w/w	Séquentiel
	3.H γ -4.H δ	w/w/w	Séquentiel
	4.HN-3.H γ	s/s/s	Séquentiel
	4.HN-3.H δ	w/w/w	Séquentiel
	4.HN-CH ₂ (OBn)	m	Séquentiel
4.H γ -CH ₂ (OBn)	w	Séquentiel	
15c et 16c	1.HN-CH ₂ (Fmoc)	w	Séquentiel
	1.H γ -2.H δ	w/w	Séquentiel
	2.HN-1.H γ	s/s/s	Séquentiel
	2.HN-1.H δ	w/w/w	Séquentiel
	2.H γ -3.H δ	w	Séquentiel
	3.HN-2.H γ	s/s/s	Séquentiel
	3.HN-2.H δ	w/w/w	Séquentiel
	3.H γ -4.H δ	w/w/w	Séquentiel
	4.HN-3.H γ	s/s/s	Séquentiel
	4.HN-3.H δ	w/w/w	Séquentiel
	4.H γ -5.H δ	w/w	Séquentiel
	5.HN-4.H γ	s/s/s	Séquentiel
	5.HN-4.H δ	w/w/w	Séquentiel
	5.H γ -6.H δ	w/w/w	Séquentiel
	6.HN-5.H γ	s/s/s	Séquentiel
	6.HN-5.H δ	w/w/w	Séquentiel
4.HN-CH ₂ (OBn)	m	Séquentiel	
4.H γ -CH ₂ (OBn)	w	Séquentiel	

Tableau 16 Intensités des corrélations NOEs pour les séquences 15a-c et 16a-c observées dans le CDCl₃ (en noir), le méthanol (en vert) et l'eau à pH 6,5 (en bleu). Abréviations : forte « s » < 2,7 Å, moyenne « m » < 3,3 Å et faible « w » < 5,0 Å.

Ces intensités renseignent quant à la distance séparant les deux protons considérés et sont utilisées en tant que contraintes de distances dans les calculs de modélisation sous contraintes RMN.

V.3.a.2 Modélisation sous contraintes RMN

Remarque : l'ensemble des paramètres ayant permis les calculs structuraux sont précisés dans le supporting information de l'article publié dans *Angew. Chem. Int. Ed.*

Les constantes de couplage scalaires ainsi que l'intégration des intensités NOEs issues des expériences RMN ont respectivement été utilisées en tant que contraintes d'angles et de distances pour calculer les structures de moindre énergie en utilisant le champ de force AMBER 10. Le protocole de calcul de structures de moindre énergie comporte plusieurs étapes. (**Figure 80**) La première étape consiste à paramétrer le champ de force à partir des angles et des distances caractéristiques extraites de la structure cristalline de l'ATC **10g**. Les valeurs relevées pour les angles Φ , θ , ζ et ψ sont respectivement de : -126° , $+158^\circ$, -4° et $+180^\circ$.

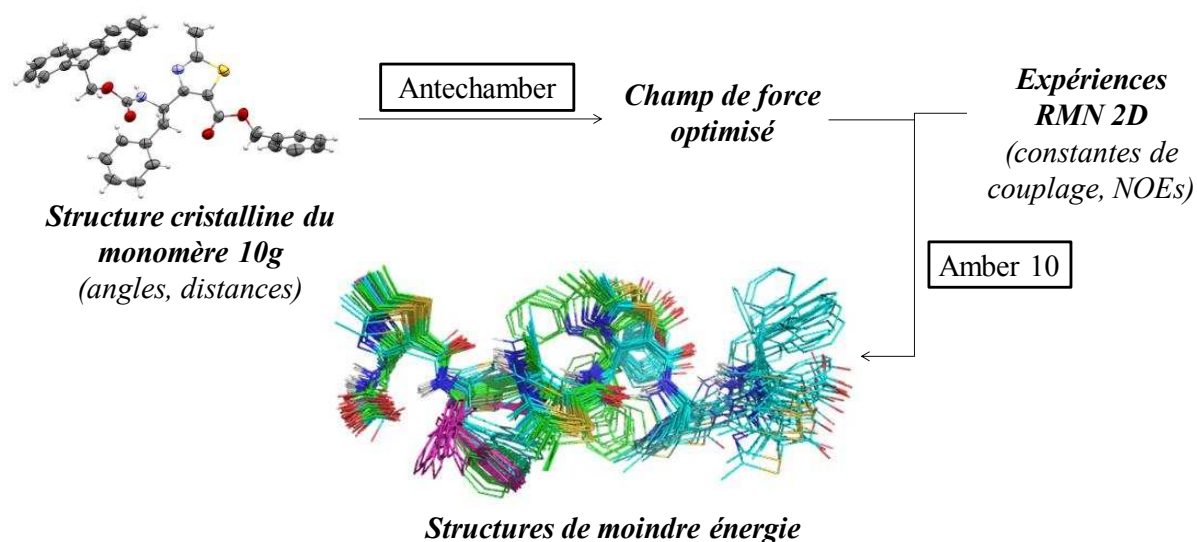


Figure 80 Protocole de détermination structurale

Pour chaque séquence, 100 calculs indépendants ont été effectués, dans le vide pour l'ensemble de la série **A (15a-c)** et dans une boîte d'eau pour l'ensemble de la série **B (16a-c)**. Sur ces 100 combinaisons, seules les 20 plus basses en énergie, considérées comme les plus représentatives des phénomènes présents en solution, ont été conservées. (**Figure 81**) La superposition des structures des oligomères de la famille A dans le CDCl_3 et de ceux de la série B, dans le méthanol ou l'eau démontre une bonne convergence des calculs, ce qui est confirmé par les faibles valeurs de RMSD (calculées par rapport à la position du squelette) : (dimères **15a** (0,11 Å) et **16a** (0,67 Å), les tétramères **15b** (0,48 Å) et **16b** (0,90 Å) et les hexamères **15c** (0,63 Å) et **16c** (1,57 Å)).

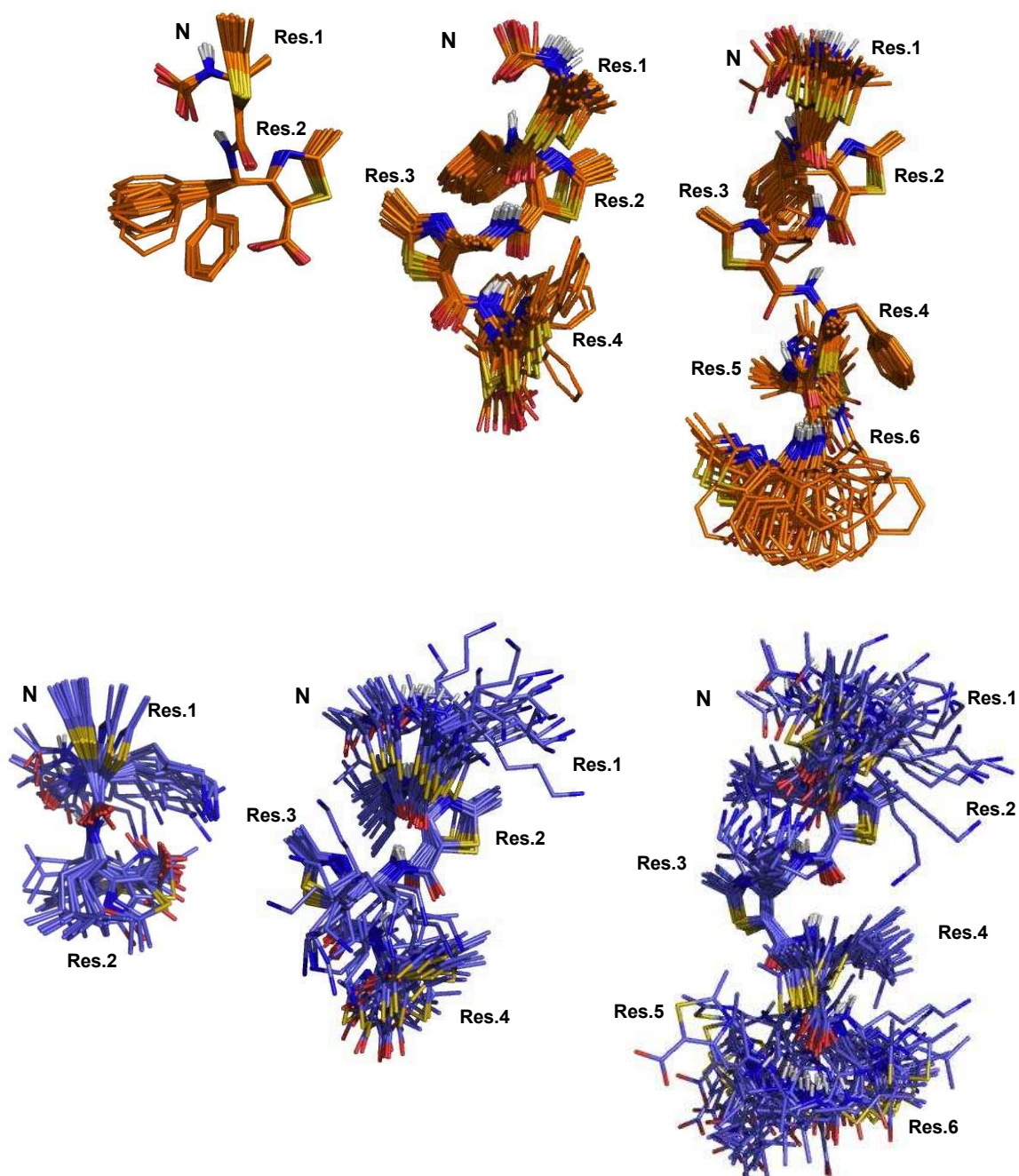


Figure 81 Superposition des 20 structures de moindre énergie pour les séquences 15a-c (en orange, $CDCl_3$) et 16a-c (en bleu, H_2O/D_2O). Les groupements protecteurs en N- et C-ter ont été retirés pour plus de clarté.

Les tétramères et hexamères des séries **A** et **B** s'arrangent en hélices 9 droites stabilisées par un réseau de liaisons hydrogènes de type $CO(i) \dots NH(i+2)$ prenant place tout le long des séquences. Le maintien de la structure hélicoïdale dans l'eau prouve la remarquable stabilité apportée par le réseau de liaisons hydrogène associé à la rigidité des monomères d'ATCs. L'ensemble des structures relatives aux dimères **15a** et **16a** montre que seulement deux

résidus sont capables d'initier l'hélicité *via* l'établissement d'une liaison H à 9 chaînons. La topologie du système est proche d'une hélice de symétrie C_3 où 3 résidus sont nécessaires pour boucler un tour fixant le pas d'hélice à 11,8 Å soit environ le double de celui d'une hélice α . Les chaînes latérales portées par le ^{13}C et le thiazole sont réparties à 60° les unes des autres tout au long de l'axe d'élongation. Les valeurs des angles dièdres sont rassemblées dans le **Tableau 17** à l'issue du paragraphe **V.3.b**.

V.3.a.3 Mesure du dichroïsme circulaire

L'étude structurale des séquences en solution a été complétée par des mesures de dichroïsme circulaire (entre 190 et 300 nm et à 20°C) dans le méthanol et en solutions aqueuses à des pH compris entre 3 et 9. L'analyse de l'hexamère **16c**, en premier lieu dans le méthanol, a révélé une signature dichroïque caractéristique présentant deux minima à 195 et 231 nm attribués aux transitions $\pi-\pi^*$ et $n-\pi^*$ subies par les chromophores amidiques. En outre, un intense maxima observé à 263 nm semblerait correspondre à une contribution de la chiralité du noyau thiazole. L'analyse de **16c** en solution aqueuse a montré un signal dichroïque similaire avec un léger décalage vers le bleu du second minima, qui passa alors de 231 à 226 nm et une diminution mineure de l'intensité du maxima $82\,700\text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ (MeOH) contre $74\,000\text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ (H_2O , pH = 6,5). Les spectres enregistrés pour les composés **16a-c** dans la gamme de pH testée (valeurs des pH : 3,5 ; 4,5 ; 6,5 et 8,5) ont prouvé la stabilité de leur conformation avec une conservation du signal dichroïque. De même, des expériences de montées en température, de 0 à 60° dans le méthanol et de 0 à 90°C dans l'eau, n'ont que légèrement modifié l'allure des courbes en diminuant sensiblement les valeurs des maxima et minima. Les structures ont donc été en partie dénaturées à chaud mais la courbe enregistrée après retour à température ambiante est complètement superposable avec celle obtenue avant le début du chauffage. Enfin, l'ellipticité molaire par résidu augmente en fonction de la longueur des séquences prouvant l'importance du nombre de liaisons hydrogène dans le maintien conformationnel des foldamères. Un plateau semble être quasiment atteint dès la longueur du tétramère. (**Figure 82**)

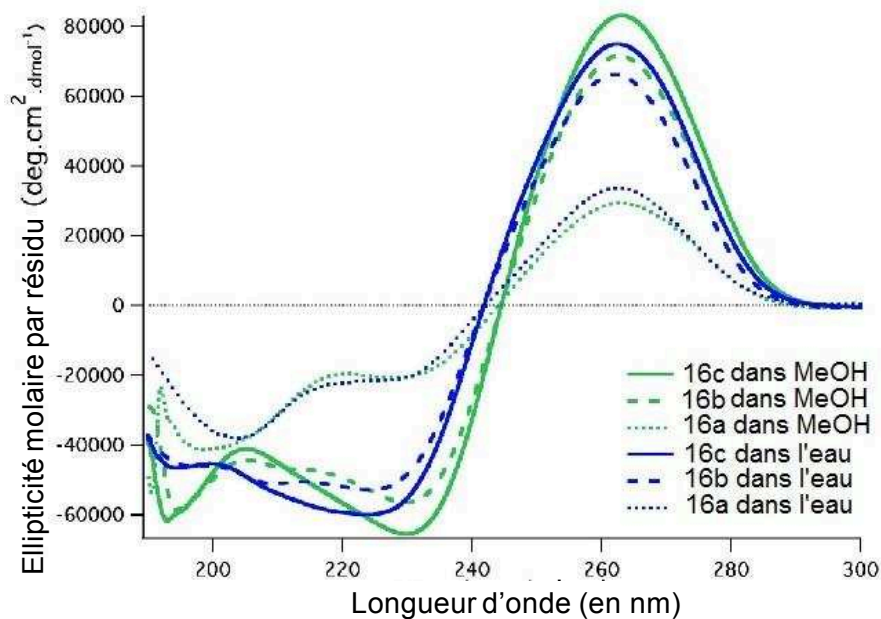


Figure 82 Spectres de dichroïsme circulaire correspondant aux oligomères 16a-c : dans le méthanol (vert) et dans l'eau à pH 6,5 (bleu)

V.3.b Etude structurale à l'état solide

Disposant de la conformation en solution, il était nécessaire de confirmer l'arrangement des séquences à l'état solide. L'oligomère **17** a été synthétisé à partir du composé **15b** en remplaçant le groupement protecteur Fmoc par un Boc en position N-terminale. (Figure 83)

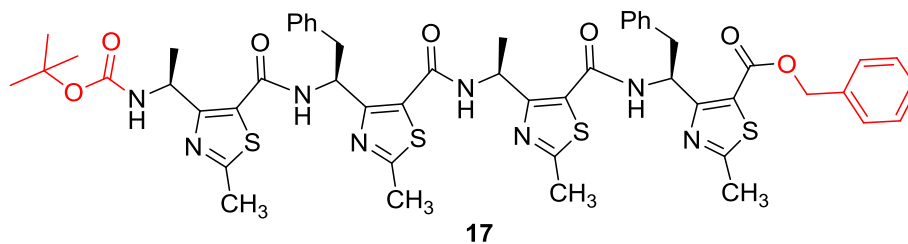


Figure 83 Séquence utilisée pour l'analyse par diffraction X

Cette modification avait pour rôle de favoriser la formation de monocristaux convenables pour la diffraction X. Après de nombreux essais, des cristaux ont été obtenus par solubilisation du composé **17** dans le toluène suivie de la diffusion lente d'éther diisopropylique dans cette même solution. La structure cristalline obtenue a confirmé l'arrangement des oligomères d'ATCs en hélice 3_1 droite. (Figure 84, a)

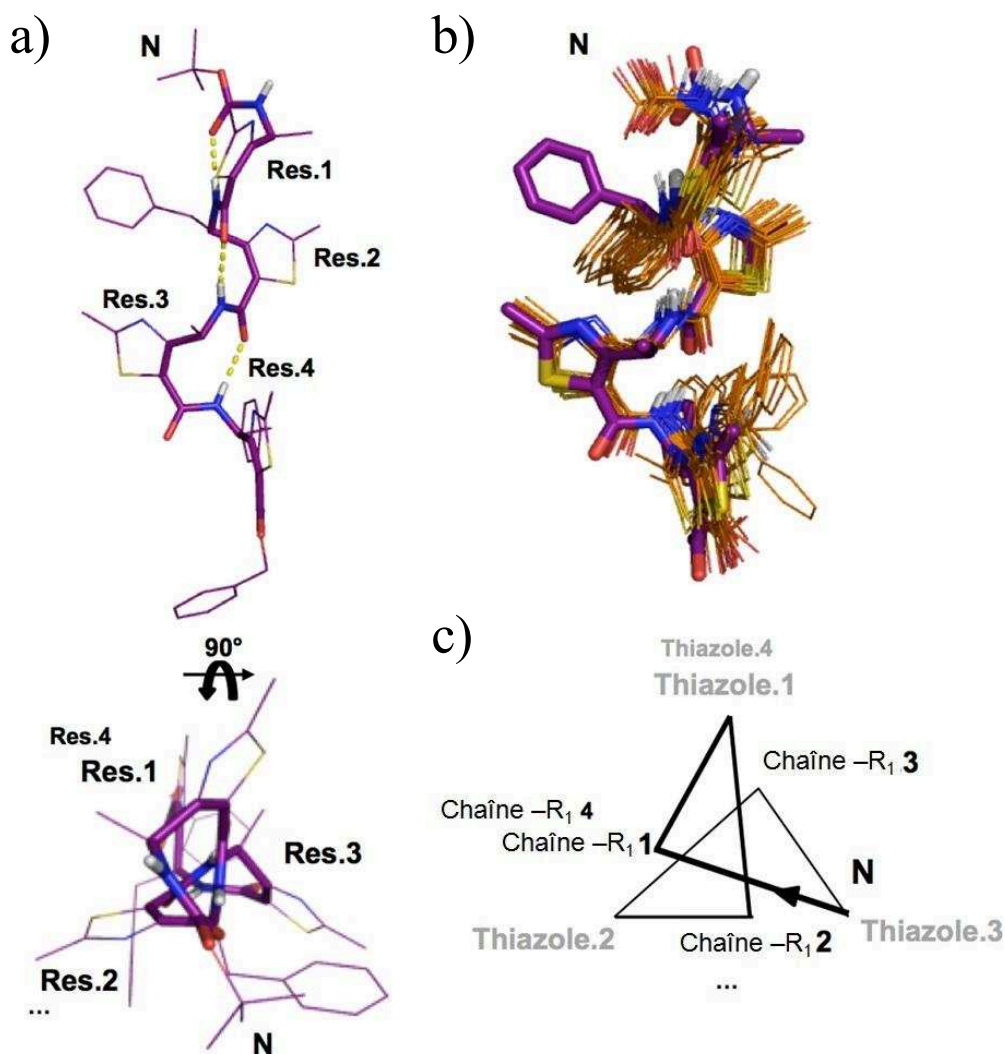


Figure 84 Comparaison des structures en solution et à l'état solide : a) structure cristalline de 17, projetée perpendiculairement et parallèlement à l'axe hélicoïdal, b) superposition des 20 structures de moindre énergie de 15b (en orange) avec la structure RX de 17 (en violet), c) projection schématique des oligomères d'ATCs selon l'axe hélicoïdal indiquant la répartition des chaînes -R₁ et -R₂

La superposition de la structure RX de la séquence **17** avec les 20 structures de moindre énergie obtenues par RMN pour le composé **15b** matérialise la conservation de la conformation des oligomères d'ATCs à la fois en solution et à l'état solide. (**Figure 84, b**) L'observation de ces architectures selon l'axe hélicoïdal confirme la répartition régulière des substituants -R₁ et -R₂ portés par le ^γC et le thiazole tous les 60° tout au long de la séquence, comme l'avaient montré les résultats RMN. (**Figure 84, a et c**)

Les valeurs d'angles dièdres ont été extraites des clichés RX puis comparées avec celles obtenues par RMN ainsi que celles obtenues pour les structures décrites dans la littérature. (**Tableau 17**)

γ -peptides	Valeurs d'angles dièdres (en °)			
	Φ	θ	ξ	ψ
Balaram ¹⁶⁰	+109	-63	-77	+88
Kunwar ¹⁵⁶	+125	-68	-65	+97
Baldauf (prédictions) ¹⁸⁵	-79,8	+122,8	+0,1	-46,5
15a-c	-76 ± 16	+128 ± 12	-6 ± 5	-28 ± 6
16a-c	-72 ± 33	+114 ± 29	-5 ± 6	-23 ± 11
17 (RX)	-78 ± 3	+127 ± 14	0 ± 3	-41 ± 4

Tableau 17 Valeurs moyennes des angles de torsion des oligomères d'ATCs 15a-c, 16a-c et 17 comparés aux exemples décrits dans la littérature

Les valeurs d'angles mesurées à l'état solide et en solution sont similaires entre elles et confirment les prédictions faites par Baldauf¹⁸⁵ sur les séquences de γ -amino acides *Z*-vinylogues. Ces mesures prouvent que l'aromaticité du thiazole intervient de la même manière qu'une double liaison *Z* dans la rigidification du squelette en imposant une valeur d'angle ζ de 0°.

V.4 Conclusion

Au cours de cette étude nous avons synthétisé deux séries de dimère, tétramère et hexamère d'ATCs dont les solubilités ont été modulées selon la nature des substituants -R₁ et -R₂ portées par le ¹³C et le thiazole. La conformation adoptée par ces oligomères a été déterminée en solution par RMN 1D et 2D associées à des techniques de modélisation sous contraintes afin de générer des structures de moindre énergie. La superposition des 20 structures de plus basse énergie a permis de vérifier la bonne convergence des calculs et de montrer que les tétramères et hexamères s'arrangeaient en hélices 3₉ droites originales, présentant un pas de 11,8 Å, stabilisées par un réseau de liaisons hydrogène de type CO(*i*)...NH(*i*+2) s'établissant tout au long de la séquence. La forte contrainte structurale des monomères ATCs associée à la formation d'une liaison hydrogène est capable d'initier une hélicité à partir d'une séquence aussi courte que le dimère. L'analyse à l'état solide par diffraction des rayons X a confirmé l'arrangement en hélice 3₉ observé par RMN ainsi que la répartition régulière à 60° des substituants autour de l'axe hélicoïdal. Enfin, la mesure des angles dièdres a confirmé les prédictions de Baldauf sur l'arrangement structural des γ -amino acides *Z*-vinylogues. Des

mesures de dichroïsme circulaire ont permis d'apprécier la stabilité conformationnelle des édifices à hautes températures et dans une large gamme de pH allant de 3,5 à 8,5.

V.5 Publication

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Angewandte Chemie International Edition*.¹⁹⁶

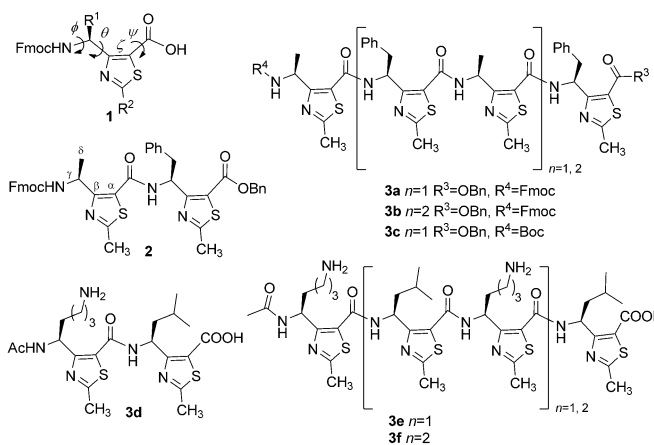
Helical Oligomers of Thiazole-Based γ -Amino Acids: Synthesis and Structural Studies**

Loïc Mathieu, Baptiste Legrand, Cheng Deng, Lubomir Vezenkov, Emmanuel Wenger, Claude Didierjean, Muriel Amblard, Marie-Christine Averlant-Petit, Nicolas Masurier, Vincent Lisowski, Jean Martinez, and Ludovic T. Maillard*

Peptides and proteins are molecular devices that can adopt specific folded and organized structures for performing diverse functions in living systems. The formation of such tertiary and quaternary structures arises from the assembly of stable secondary structures such as helices, sheets, and turns. The ability of synthetic oligomers of β - and γ -amino acids to adopt protein-like secondary structures is of great interest to develop helical mimics with functional properties.^[1] Incorporation of constrained cyclic building blocks reducing the backbone flexibility has permitted to improve the stability of the folding and to substantially enlarge the helical foldamer realms. According to the results obtained with β -peptides,^[2] γ -amino acids were expected to be valuable to design new scaffolds.^[3] Nevertheless, to date, only few γ -subunits are available owing to the difficulty to access stereochemically pure species, and only few γ -oligomer secondary structures have been described.^[4] The first helical fold of γ -peptides, independently reported by the research groups of Hanesian^[5] and Seebach,^[6] was a helix stabilized by 14-membered pseudo-rings. Sheets,^[7] ribbons,^[8] or helices^[9] stabilized by C_7 or C_9 hydrogen-bonded pseudocycles were obtained later by using constrained cyclic γ -amino acid building blocks. Additionally, while the conformational control is crucial for biological function, the access to foldamers bearing a wide variety of side chains and being soluble under physiological

conditions is essential to purchase biological applications. However, the combination of these three criteria remains challenging.^[10]

In this context, we report herein the design of 4-amino(methyl)-1,3-thiazole-5-carboxylic acids (ATCs) **1** as new γ -building blocks (Scheme 1). These highly constrained monomers were built around a thiazole ring to limit conformational flexibility around 0° about the α - β C bond. We proposed a fast and robust synthetic pathway for the formation of



Scheme 1. Thiazole-based γ -amino acid building blocks and oligomeric derivatives. Fmoc = 9-fluorenylmethoxycarbonyl, Boc = *tert*-butoxycarbonyl.

ATCs, thereby giving opportunity of a straightforward modulation of the two substitution positions while controlling the stereochemistry at the γ -carbon atom. We characterized the structures of various ATC oligomers in solution by CD and NMR spectroscopy and in the solid state by X-ray crystallography. Significantly, the ATC sequences adopted a well-defined 9-helix structure in the solid state and in aprotic and protic organic solvents as well as in aqueous solution.

Our synthetic approach to access ATCs is described in Scheme 2. We started from *N*-Fmoc-protected α -amino acids to access benzyl β -ketoesters **4**. Although the cross-Claisen condensation is a well-known reaction to access β -ketoesters, successful results were only achieved when sterically non-hindered esters like ethyl or benzyl acetate were used.^[11] Additionally, the required basic conditions are usually not compatible with Fmoc protection.^[11a] Thus, we turned our attention toward another straightforward reaction: the Lewis

[*] L. Mathieu,^[4] Dr. B. Legrand,^[4] Dr. L. Vezenkov, Dr. M. Amblard, Dr. N. Masurier, Prof. V. Lisowski, Prof. J. Martinez, Dr. L. T. Maillard Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, CNRS

Universités Montpellier I et II
UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
15 Avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5 (France)
E-mail: ludovic.maillard@univ-montp1.fr

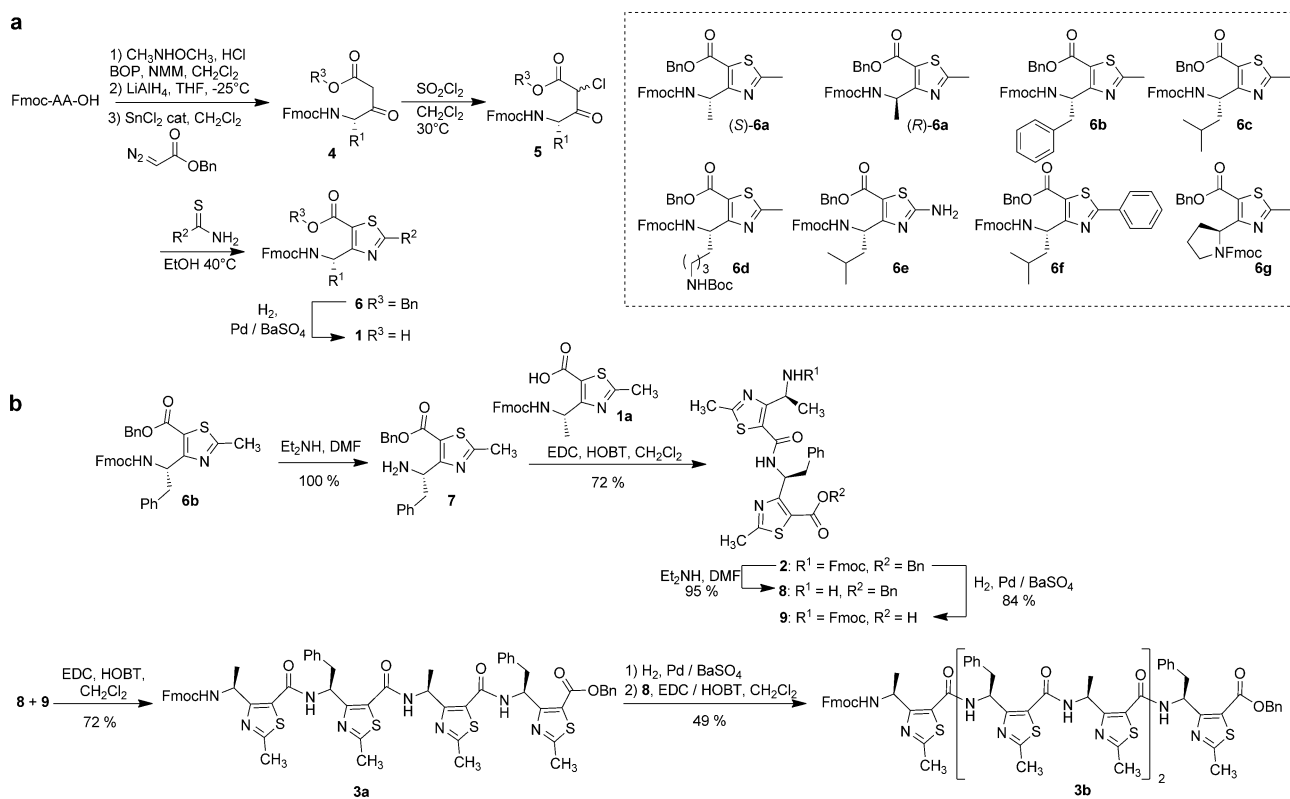
C. Deng, Dr. M.-C. Averlant-Petit
Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire
LCPM-UMR 7568 CNRS Université de Lorraine
1 rue Grandville, 54001 Nancy Cedex 1 (France)

E. Wenger, Dr. C. Didierjean
Laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisation, UMR 7063 CNRS Université de Lorraine
Boulevard des Aiguillettes, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex (France)

[†] These authors contributed equally to the work.

[**] We thank the IBMM, the CNRS, and the University of Montpellier 1 for financial support and the University of Lorraine for NMR and XRD facilities.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201302106>.



Scheme 2. Synthesis of a) *N*-Fmoc protected γ -amino acids and b) oligomers **2**, **3a**, **3b**. AA = α -amino acid; BOP = benzotriazol-1-yloxy-tris-(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate, NMM = *N*-methylmorpholine, EDC = *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride, HOBT = 1-hydroxybenzotriazole.

acid catalyzed C–H insertion of a diazoacetate on aldehydes. The *N*-Fmoc-protected α -amino acids were converted into Weinreb amides. Reduction with LiAlH_4 led to the corresponding aldehydes, which were promptly condensed with benzyl diazoacetate in CH_2Cl_2 in the presence of a catalytic amount of tin(II) chloride to yield the orthogonally protected β -ketoesters **4**. Effective monohalogenations were performed with sulfonyl chloride,^[12] then the α -chloro- β -ketoesters **5** were engaged without any further purification in a Hantzsch cyclization with a thioamide or thiourea to lead to the thiazole-based γ -amino benzylesters **6**. Because racemization is a major issue when aminoaldehyde intermediates are used, the enantiomeric excess was ascertained by determination of the optical rotation of both enantiomers (*S*)-**6a** ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4.9^\circ$ ($c = 1.95$, CHCl_3)) and (*R*)-**6a** ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4.9^\circ$ ($c = 2.08$, CHCl_3)) and by using HPLC on a chiral stationary phase (see Figure S11 in the Supporting Information). The rate of racemization was 2% when the synthesis was performed on a 1 g scale (37% yield on the overall sequence). Starting from a set of *N*-protected amino acids and thioamides, the synthetic pathway provided a highly versatile and flexible method for the introduction of different substitution patterns either on the γ -carbon atom of the backbone or at position 2 of the thiazole core (Scheme 2a). Ab initio calculations from Hoffmann and co-workers^[13] suggested that oligomers of *Z*-vinylogous γ -amino acids would favor two stable helical conformers with seven- and nine-membered hydrogen-bonded pseudocycles. On the other hand and to our knowl-

edge, Mann and Kessler reported the unique example of (hetero)aromatic-based γ -amino acids in which the ring is an oxazole.^[14] Included into a small peptide, such a building block acts as a C_9 turn inducer.

Four γ -peptides, **2**, **3a**, **3b**, and **3c** of different lengths (2, 4, and 6 monomers) were first synthesized through an Fmoc/OBn strategy (Scheme 2b). The peptides exhibited a high solubility in chloroform but were poorly soluble in polar solvents. Hence, assuming that the introduction of lateral chains containing amine groups could greatly improve the solubility in polar solvents, we synthesized γ -peptides **3d**, **3e**, and **3f** from building blocks **6c** and **6d** (see the Supporting Information).

NMR-spectroscopic analyses of **2**, **3a**, and **3b** were conducted in CDCl_3 . The water-soluble compounds **3d**, **3e**, and **3f** were studied in CD_3OH and $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, pH 6.5). In all cases, the NMR signals were well dispersed and nearly all ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonances could be assigned by combining ^{15}N -HSQC and ^{13}C -HSQC at ^{15}N and ^{13}C natural abundance (Tables S1–S18 in the Supporting Information). The sequential assignment was based on the strong $\text{NH}(i)/\text{CH}(i-1)$ NOE correlations on the ROESY/NOESY spectra. In addition, characteristic weak $\text{NH}(i)/\text{CH}(i-1)$ and $^i\text{CH}(i)/\text{CH}(i+1)$ sequential NOE connectivities were observed along the backbones. Similar NOE sets were obtained for dimers **2** and **3d**, for tetramers **3a** and **3e**, and for hexamers **3b** and **3f** (Figure 1, Tables S20–22). The 14-helical fold typical for γ -peptides could be excluded at this stage, since no

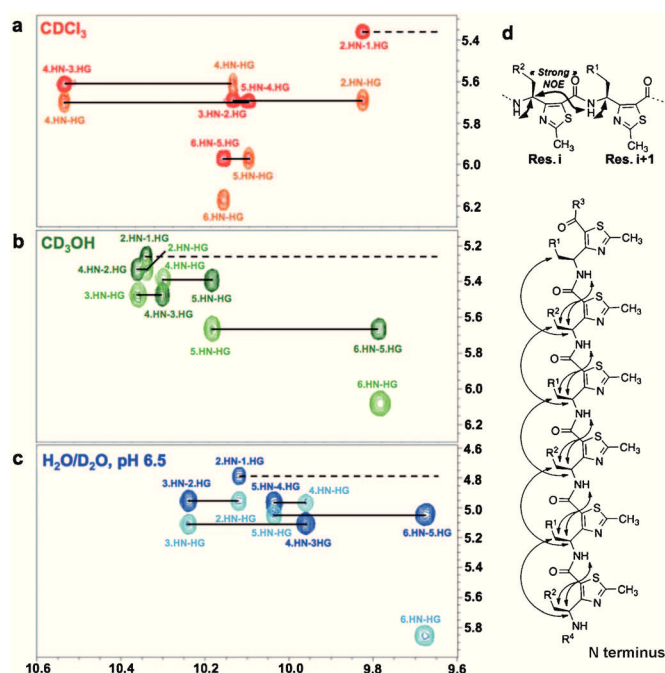


Figure 1. Superimposition of the NH/ ^{13}C H region of the TOCSY (in dark) and ROESY (in light) spectra of a) **3b** recorded in CDCl_3 , b, c) **3f** recorded in CD_3OH and $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, pH 6.5 at 2–10 mM. Typical strong sequential NOE correlations of $\text{HN}(i)/^{13}\text{C}\text{H}(i-1)$ are annotated. ^1H chemical shifts on both axes are given in ppm. HG corresponds to γCH . d) Typical interresidue NOE pattern along the **3b** and the **3f** hexamers.

typical ($i, i+2$), ($i, i+3$) medium-range NOEs were detected.^[15] Whatever the length of the oligomers and the nature of the solvent, all the amide protons exhibited remarkable downfield chemical shifts, for example, from 9.18 ppm for dimer **2** (Table S1) to 10.67 ppm for hexamer **3b** in CDCl_3 (Table S5). As a comparison, Kunwar and co-workers previously described a 9-helix for a γ -peptide oligomer in which amide resonances were found between 6.92 and 7.60 ppm in CDCl_3 .^[9a] This marked unshielding of the amide protons could be attributed to a highly stable hydrogen-bonding pattern and/or to a ring-current effect of the thiazole heterocycle. In addition, $^3J(\text{NH}, ^{13}\text{C}\text{H})$ values smaller than 6 Hz (5.4 ± 0.4 Hz) were typical of ϕ values around -60° (Table S19). Taken together, these data were strong evidence of a well-organized system in solution for all compounds whatever the solvent considered.

The ATC monomers were parameterized using the Antechamber package^[16] starting from the X-ray crystal structure of **6b**, which exhibited an extended conformation with dihedral angles $\phi = -126^\circ$, $\theta = 158^\circ$, $\zeta = -4^\circ$ and $\psi = 180^\circ$ (Figure S6 and Table S25). NOEs were used as restraints for calculations on the structure in solution determined by NMR spectroscopy by using a simulated annealing protocol with AMBER 10.^[17] The solution structures of **2**, **3a**, and **3b** in CDCl_3 were solved by using 39, 87, and 124 unambiguous restraint distances, respectively. Figure S5 depicts a superimposition of the 20 lowest-energy structures calculated for each compound. The root-mean-square deviation (RMSD) values for the backbone are 0.11 Å, 0.48 Å, 0.63 Å, respec-

tively, when the capping groups are omitted. The tetramer **3a** and the hexamer **3b** exhibited tight right-handed 9-helix structures stabilized by $\text{C}=\text{O}(i)\cdots\text{HN}(i+2)$ hydrogen bonds. Notably only two residues were necessary to initiate the folding into C_9 hydrogen-bonded pseudocycles as observed on dimer **2**. The hydrogen-bonding patterns were homogenous along the entire sequences in a forward direction, from N to C. The average values of the dihedral angles for the ATC helix were $\phi = -76 \pm 16^\circ$, $\theta = 128 \pm 12^\circ$, $\zeta = -6 \pm 5^\circ$, and $\psi = -28 \pm 6^\circ$ (Table 1). Only small distortions were observed on the ψ angles of the C-terminal residues of each oligomer.

Table 1: Average backbone torsion angles for γ -peptides adopting 9-helical fold. The ψ angles of the last residue of the NMR and XRD structures were omitted.

	ϕ	θ	ζ	ψ
Balaram's oligomers ^[9b]	109°	-63°	-77°	88°
Kunwar's oligomers ^[9a]	125°	-68°	-65°	97°
Predicted Z-vinylogous γ -oligomers ^[13]	-79.8°	122.8°	0.1°	-46.5°
ATC oligomers				
Average NMR values:				
2, 3a, 3b	$-76 \pm 16^\circ$	$128 \pm 12^\circ$	$-6 \pm 5^\circ$	$-28 \pm 6^\circ$
3d, 3e, 3f	$-72 \pm 33^\circ$	$114 \pm 29^\circ$	$-5 \pm 6^\circ$	$-23 \pm 11^\circ$
XRD structure of 3c	$-78 \pm 3^\circ$	$127 \pm 14^\circ$	$0 \pm 3^\circ$	$-41 \pm 4^\circ$

Importantly, we were able to crystallize the tetramer **3c** by solvent diffusion of diisopropyl ether into a solution of the oligomer in toluene. Low-resolution X-ray diffraction data were sufficient to show that ATC γ -peptides adopt the same helical structure in solid state and solution (Figure 2a, b). All amide groups of the molecule form inter- or intrahelix hydrogen bonds (Figure S7). The typical average dihedral angles were comparable to those measured in NMR-spectroscopic experiments ($\phi = -78 \pm 3^\circ$, $\theta = 127 \pm 14^\circ$, $\zeta = 0 \pm 3^\circ$ and $\psi = -41 \pm 4^\circ$, Table 1) with a notable deviation of the C-terminal ψ torsion angle ($\psi = -165^\circ$), which allowed the packing of the molecules into infinite chains in the crystal. Simulations of Hofmann and co-workers predicted that Z-vinylogous γ -oligomers could adopt a helical fold with nine-membered hydrogen-bonded pseudocycles with close torsion angles ($\phi = -79.8^\circ$, $\theta = 122.8^\circ$, $\zeta = 0.1^\circ$, $\psi = -46.5^\circ$).^[13] By comparison, the C_9 hydrogen-bonded helices reported by the research groups of Balaram and Kunwar have values of $\phi = 109^\circ$, $\theta = -63^\circ$, $\zeta = -77^\circ$, $\psi = 88^\circ$ and $\phi = 125^\circ$, $\theta = -68^\circ$, $\zeta = -65^\circ$, $\psi = 97^\circ$, respectively.^[9] Considering the global shape of the ATC oligomers, the edifice appeared to be close to a C_3 -symmetric helix with three residues to achieve a complete rotation with a pitch of 11.8 Å. This helix had a rise-per-residue of 3.9 Å and exhibited six substitution patterns per turn, which were distributed around a 60° angle all along the axis (Figure 2c). We then solved the NMR solution structures of the compounds **3d**, **3e**, and **3f** in water (pH 6.5) by using 12, 49, and 72 constraints, respectively, with the generalized Born solvation model^[18] in AMBER (Figure 3a and S5, Table 1). As expected, since similar NOE sets were obtained for the water-soluble series (Tables S20–22), comparable

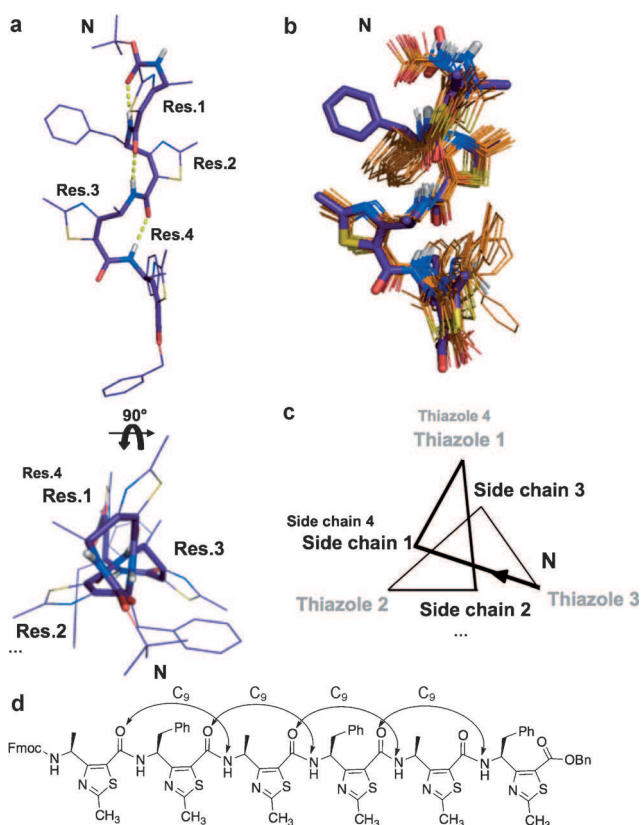


Figure 2. a) Orthogonal and axial views of the crystal structure of the tetramer **3c**.^[19] b) Superimposition of the 20 lowest-energy NMR structures of **3a** (in orange) with the XRD structure of **3c** (in purple). Nonamide protons and capping groups are omitted for clarity. c) Axial projection of the ATC oligomers. d) Characteristic hydrogen-bond network of oligomer **3b**.

structures were calculated showing that the ATC oligomers remarkably conserved their unique fold even in water.

The far-UV CD spectra for **3d**, **3e**, **3f** were then recorded in methanol and water (pH 6.5) between 190 and 300 nm (Figure 3b). The CD signatures of the hexamer **3f** shared similar global shapes in methanol and in water. We observed two minima at 195 and 231 nm and 195 and 226 nm in methanol and water, respectively, and a strong maximum around 263 nm. The two minima were assigned to the π - π^* and n - π^* transitions of the amide chromophore, respectively, while the maximum could be attributed to the thiazole core. The classical blue shift observed for the n - π^* transition in aqueous solution is certainly a result of stronger solute-solvent hydrogen-bond interactions and/or the higher water polarizability. The first NV1 π - π^* transition minimum was weaker in water, but no significant wavelength shift was detected. Interestingly, the intensity of the maximum dramatically increased with the oligomer size from two to six residues to reach a molar ellipticity value per residue of 82 700 deg cm² dmol⁻¹ in methanol and 74 000 deg cm² dmol⁻¹ in water for **3f**, thus suggesting an increased stability with length. Some differences were observed for tetramer **3e**, since a third weak minimum appeared at 211 nm, and for dimer **3d** for which the first minimum was red-shifted at 200–205 nm in all solvents.

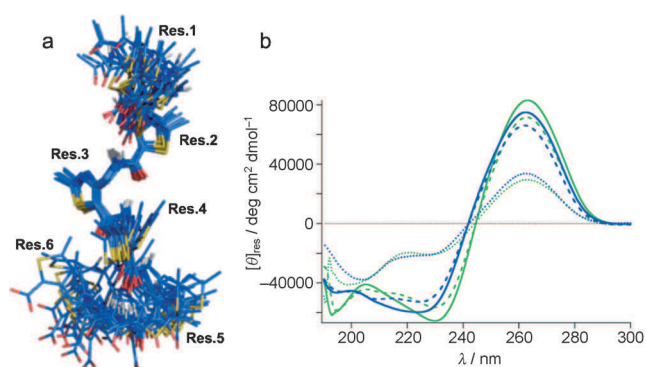


Figure 3. a) Overlay of the 20 lowest-energy structures of hexamer **3f** calculated from NMR data in water, pH 6.5. Lateral chains are omitted for clarity. b) CD spectra of **3d** (•••••), **3e** (----), and **3f** (—) at 200 μ m in MeOH (green) and water, pH 6.5 (blue). $[\theta]_{\text{res}}$ = molar ellipticity per residue.

This study thus presents the design of a new family of ring-constrained γ -amino acids and the identification of a novel right-handed 9-helix structure in γ -peptides. These features resulted from the planar conformation of the γ C- β C- α C-C(O) torsion angle imposed by the thiazole heterocycle. Moreover, we demonstrate that ATC oligomers display a high stability in organic and in aqueous media, which is of particular importance for applications in medicinal chemistry. The fast and highly robust synthetic pathway ensures the access to a wide diversity of enantiopure ATCs, thereby giving a real opportunity to straightforwardly modulate the physicochemical properties of the oligomers and to drive molecular recognition.

Received: March 13, 2013

Published online: April 25, 2013

Keywords: conformation analysis · foldamers · helical structures · peptidomimetics · γ -peptides

- [1] a) D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. Kühnle, B. Martinoni, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913–941; b) D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071–13072; c) D. J. Hill, M. J. Mio, R. B. Prince, T. S. Hughes, J. S. Moore, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893–4012; d) S. Hecht, I. Huc, *Foldamers: Structure, Properties and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**; e) C. M. Goodman, S. Choi, S. Shandler, W. F. DeGrado, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 252–262; f) D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 1111–1239; g) P. G. Vasudev, S. Chatterjee, N. Shamala, P. Balaram, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 657–687.
- [2] a) D. Seebach, J. L. Matthews, *Chem. Commun.* **1997**, 2015–2022; b) K. Gademann, T. Hintermann, J. V. Schreiber, *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 905–925; c) R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232; d) F. Fülöp, T. A. Martinek, G. K. Toth, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 323–334; e) D. Seebach, J. Gardiner, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1366–1375.
- [3] G. P. Dado, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1054–1062.
- [4] F. Bouillère, S. Thétiot-Laurent, C. Kouklovsky, V. Alezra, *Amino Acids* **2011**, *41*, 687–707.

- [5] S. Hanessian, X. Luo, R. Schaum, S. Michnick, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8569–8570.
- [6] T. Hintermann, K. Gademann, B. Jaun, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 983–1002.
- [7] a) M. Khurram, N. Qureshi, M. D. Smith, *Chem. Commun.* **2006**, 5006–5008; b) M. G. Woll, J. R. Lai, I. A. Guzei, S. J. C. Taylor, M. E. B. Smith, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11077–11078; c) M. Hagihara, N. J. Anthony, T. J. Stout, J. Clardy, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6568–6570.
- [8] a) A. Kothari, M. K. Qureshi, E. M. Beck, M. D. Smith, *Chem. Commun.* **2007**, 2814–2816; b) J. Farrera-Sinfreu, L. Zaccaro, D. Vidal, X. Salvatella, E. Giralt, M. Pons, F. Albericio, M. Royo, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6048–6057.
- [9] a) G. V. Sharma, P. Jayaprakash, K. Narsimulu, A. Ravi Sankar, K. Ravinder Reddy, P. Radha Krishna, A. C. Kunwar, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3010–3013; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2944–2947; b) P. G. Vasudev, N. Shamala, K. Ananda, P. Balaran, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5052–5055; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4972–4975.
- [10] a) J. A. Kritzer, J. Tirado-Rives, S. A. Hart, J. D. Lear, W. L. Jorgensen, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 167–178; b) B. Baptiste, C. Douat-Casassus, K. Laxmi-Reddy, F. Godde, I. Huc, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7175–7185; c) J. P. Saludes, J. B. Ames, J. Gervay-Hague, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5495–5505; d) L. Berlicki, L. Pils, E. Weber, I. M. Mandity, C. Cabrele, T. A. Martinek, F. Fulop, O. Reiser, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 2251–2255; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2208–2212; e) S. B. Shin, K. Kirshenbaum, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5003–5006.
- [11] a) Y. Honda, S. Katayama, M. Kojima, T. Suzuk, K. Izawa, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3163–3166; b) S. Ohta, A. Shimabayashi, S. Hayakawa, M. Sumino, M. Okamoto, *Synthesis* **1985**, 45–48; c) J. A. Turner, W. S. Jacks, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4229–4231.
- [12] Y. Honda, S. Katayama, M. Kojima, T. Suzuki, K. Izawa, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 447–449.
- [13] C. Baldauf, R. Gunther, H. J. Hofmann, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5351–5361.
- [14] E. Mann, H. Kessler, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4567–4570.
- [15] L. Guo, W. Zhang, A. G. Reidenbach, M. W. Giuliano, I. A. Guzei, L. C. Spencer, S. H. Gellman, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5965–5968; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5843–5846.
- [16] J. Wang, W. Wang, P. Kollman, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–1174.
- [17] D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, M. Crowley, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossvy, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, D. H. Mathews, M. G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, P. A. Kollman, University of California, San Francisco, **2008**.
- [18] D. Bashford, D. A. Case, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *51*, 129–152.
- [19] CCDC-922304 (**3c**) contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

VI L'ATC comme mime de coude: conception d'un analogue de la Gramicidine S

D'une manière simplifiée, il est possible d'assimiler les hélices d'ATCs à une succession de coudes. Partant de cette observation, nous avons cherché à mesurer l'intérêt que pouvaient avoir les ATCs utilisés en tant que mimes de coude au sein de petites séquences peptidiques.

VI.1 Intérêt du développement de mimes de coudes

Les coudes sont des éléments de structures secondaires fréquemment rencontrés au sein de peptides biologiquement actifs et de protéines globulaires. Ils apportent notamment une contrainte conformationnelle essentielle dans plusieurs peptides antibiotiques pour lesquels les activités biologiques dépendent de structures en épingles à cheveux β ou feuillet β à l'instar de la protégrine, tachylepsin, des défensines et de la gramicidine S.^{197,198} De nombreux mimes de coude ont été développés, la plupart à partir de β -amino acides dont certains ont été détaillés dans l'introduction de ce manuscrit.^{126,144,199} Toutefois, peu de γ -amino acides ont été utilisés pour mimer de telles structures, probablement à cause de la difficulté à les obtenir stéréochimiquement purs.²⁰

L'objectif du projet consistait en premier lieu à étudier l'influence conformationnelle qu'engendrait l'introduction d'un ATC de configuration (*R*) et (*S*) au sein d'une courte séquence α -peptidique. La seconde partie traitait de la valorisation biologique de l'ATC en tant que mime de coude *via* la synthèse d'un analogue de la gramicidine S et l'évaluation de son intérêt comme agent antimicrobien.

VI.2 Etude structurale de térapeptides hybrides $\alpha\gamma\alpha\alpha$

VI.2.a Les travaux de Mann et Kessler

Mann et Kessler ont publié en 2003 le premier exemple de γ -amino acide construit autour d'un hétéroaromatique de type oxazole (composé **18**).²⁰⁰ Leur étude consistait à analyser l'influence que pouvait avoir l'introduction d'un tel monomère contraint sur les conformations d'une courte séquence peptidique hybride $\alpha\gamma\alpha\alpha$ **19**. (*Figure 85*)

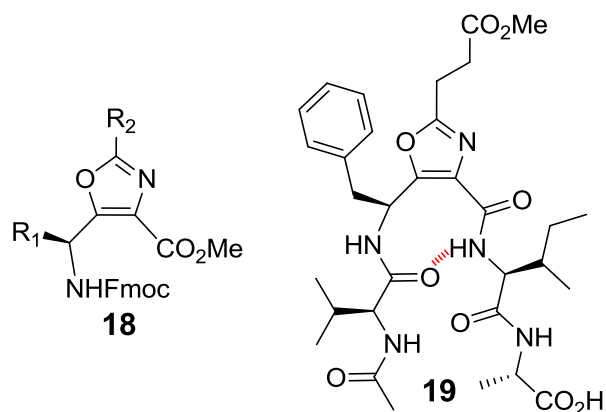


Figure 85 Séquence peptidique linéaire **19** contenant le γ -aminoacide **18** construit autour d'un noyau oxazole

L'étude en RMN du proton du composé **19** dans le CDCl₃ et dans le DMSO-d₆ a révélé une dispersion des signaux correspondant aux NH des résidus Ile, Ala, Val et γ Phe. Tandis que les déplacements chimiques des protons NH Ala, Val et du γ -amino acide étaient très sensibles aux effets de température, le proton NH du résidu Ile en était indépendant. Par ailleurs, ce proton amidique était également peu sensible à l'addition de DMSO-d₆. Ces observations démontraient sa participation dans une liaison hydrogène intramoléculaire. Une forte corrélation entre le NH de l'isoleucine et le α CH du résidu γ Phe observée dans le spectre ROESY suggérait que la liaison hydrogène s'établissait entre NH(Ile)...CO(Val), formant un pseudo-cycle à 9 chaînons. L'ensemble de ces données semblait montrer que le γ -amino acide oxazole se comportait comme un mime de coude. Toutefois, la structure tridimensionnelle exacte du mime de coude **19** n'a pas été caractérisée.

VI.2.b Influence de la chiralité de l'ATC sur la conformation du térapeptide

De manière similaire aux travaux de Mann et Kessler, nous avons voulu déterminer l'influence conformationnelle qu'engendrait l'introduction d'un ATC au sein de courtes séquences. Nous avons également étudié l'impact de la configuration (*R*) ou (*S*) du γ -amino acide sur la structuration. Ainsi, deux térapeptides Ac-Val-(*S* ou *R*)ATC-Ile-Ala-NH₂ **20** et **21** ont été synthétisés et analysés (Figure 86).

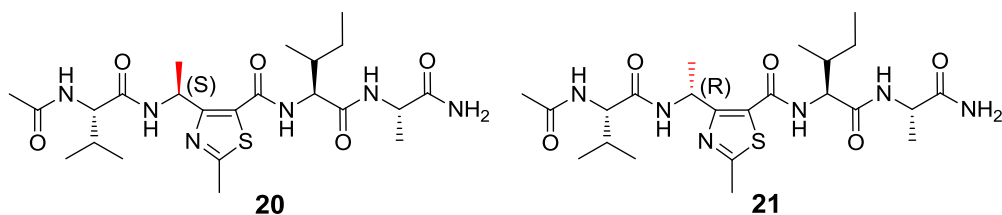


Figure 86 *Tétrapeptides modèles : Ac-Val-(S)ATC-Ile-Ala-NH₂ 20 et Ac-Val-(R)ATC-Ile-Ala-NH₂ 21*

Ces deux tétramères ont été synthétisés en phase solide sur résine Rink Amide *via* une stratégie Fmoc. (**Schéma 4**) La première étape consistait à charger l’alanine sur la résine par un couplage peptidique en présence de HBTU (hexafluorophosphate de 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium), HOBt et d’un excès de NMM (N-méthylmorpholine) à température ambiante en trois heures. L’amine était ensuite déprotégée par une solution de pipéridine à 20% (vv) dans le DMF. Le second acide aminé, Fmoc-Ile-OH, a été couplé de la même façon. Après déprotection de ce dimère en position N-terminale, l’ATC, (*R*) ou (*S*), était introduit, puis l’oligomère correspondant, déprotégé en N-ter pour coupler le dernier amino acide, la Fmoc-Val-OH. L’amine terminale de la séquence résultante a été déprotégée puis acétylée en présence d’anhydride acétique. Le clivage par un mélange de TFA (acide trifluoroacétique) et d’eau (95:5) a conduit aux deux peptides **20** et **21**. Après purification par HPLC préparative, les séquences **20** et **21** ont été analysées. Le rendement après purification s’élève à respectivement 29 et 22%.

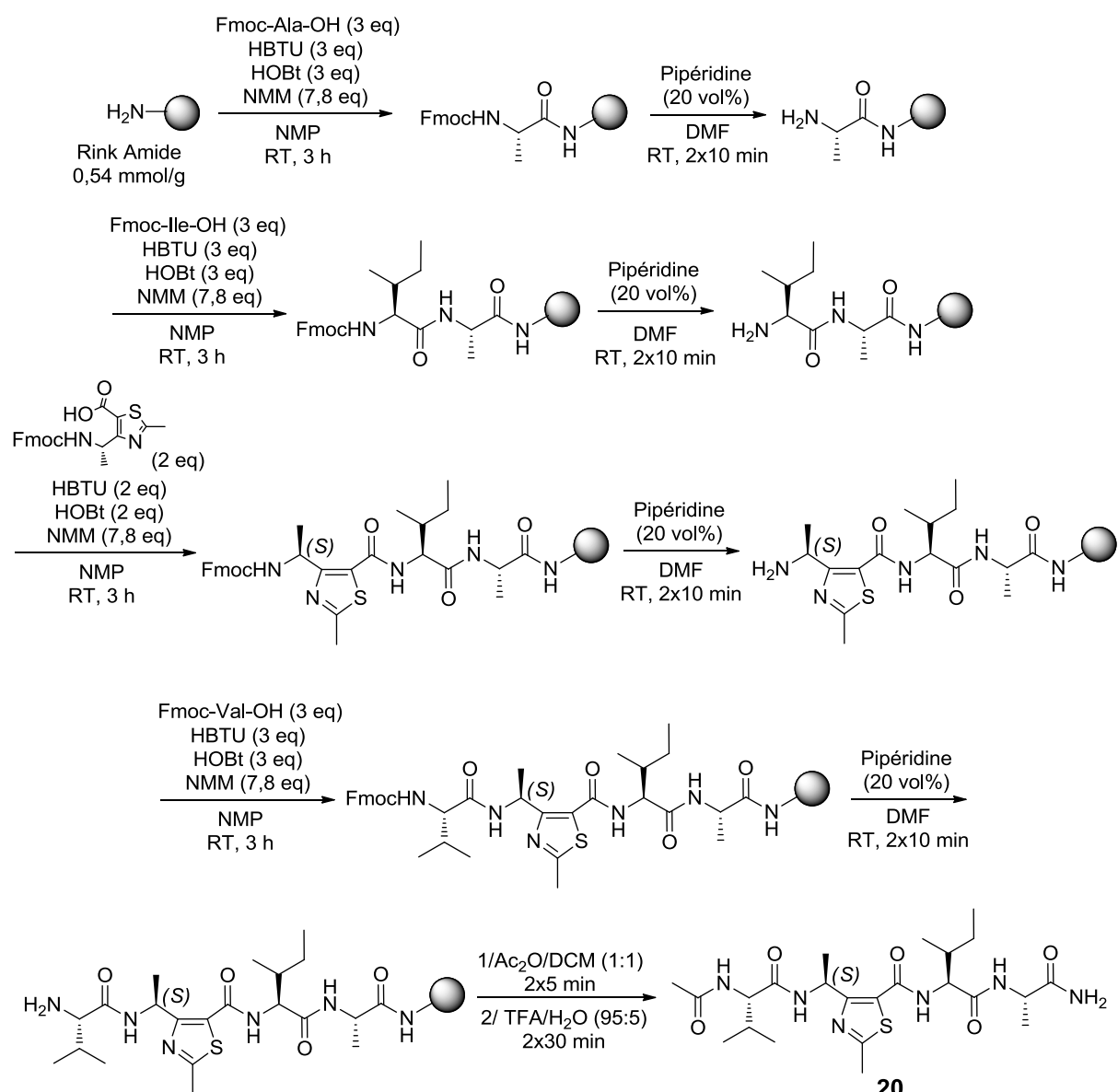


Schéma 4 Synthèse des séquences 20 et 21 sur phase solide (illustration avec le composé 20)

VI.2.c Données expérimentales

L'analyse conformationnelle des séquences hybrides **20** et **21** a été réalisée *via* des mesures de dichroïsme circulaire, des expériences RMN 1D et 2D, des simulations de dynamique moléculaire et des calculs *ab-initio* basés sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT).

VI.2.c.1 Dichroïsme circulaire

La signature dichroïque des composés **20** et **21** dans le méthanol est quasiment identique (au signe près) à celle du dimère d'ATCs **16a**, composé contraint autour d'une liaison hydrogène

à 9 chaînons. Un tel résultat suggérerait que les γ -amino acides adoptaient une conformation similaire tant au sein des deux séquences hybrides **20** et **21** qu'au sein du dimère **16a**. (**Figure 87**) L'opposition des signaux relatifs à **20** (vert) et **21** (bleu) est due à la stéréochimie opposée des deux ATCs employés. Enfin, la présence d' α -amino acides contribue au profil général des signaux dichroïques qui de ce fait diffèrent légèrement de ceux relatifs aux oligomères d'ATCs purs.

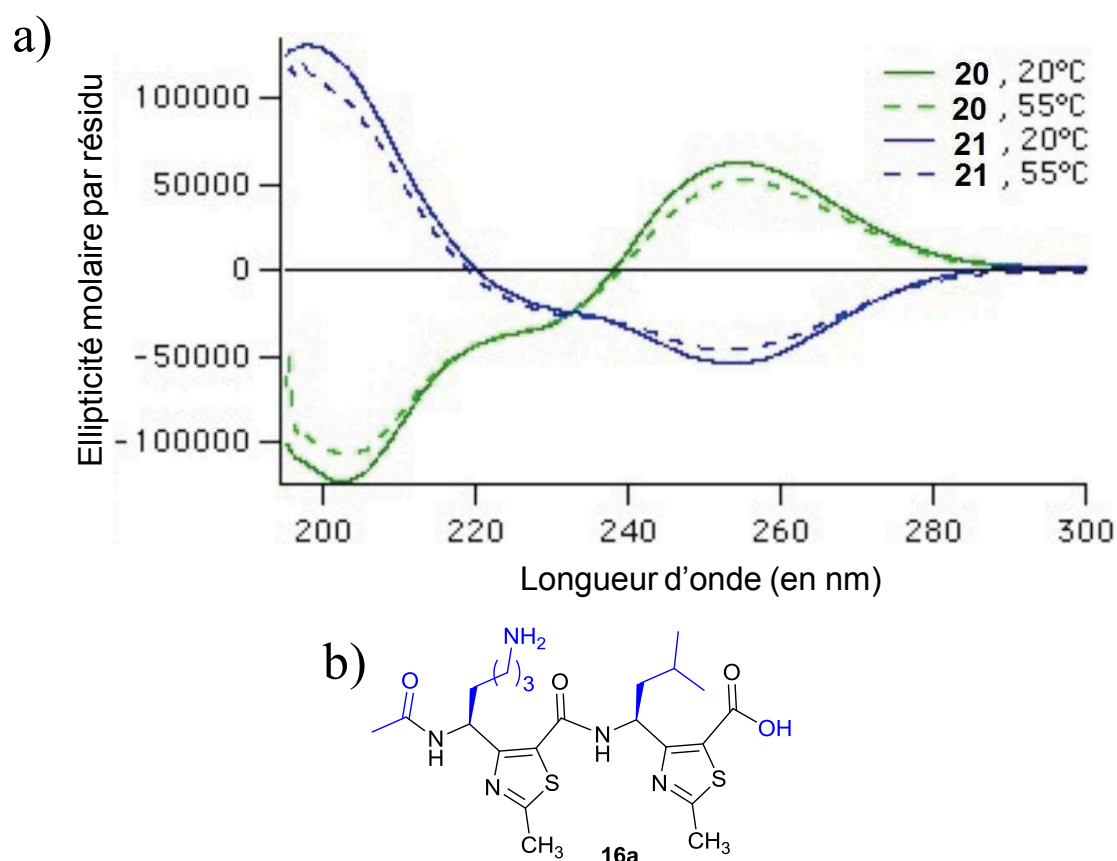


Figure 87 Spectres dichroïques de **20** et **21** (MeOH), **b**) rappel de la structure du dimère **16a**

VI.2.c.2 Résonance magnétique nucléaire

Les analyses RMN des composés **20** et **21** ont été réalisées dans deux solvants, le CD₃OH et le DMSO-d₆. Comme observé dans le cas des oligomères hélicoïdaux d'ATCs, les protons ATC-NH étaient très déblindés, au delà de 9,3 ppm et ce indépendamment du solvant utilisé. Pour les deux séquences, de fortes corrélations ROEs ont été observées entre le NH de l'isoleucine et le proton en γ de l'ATC (**Figure 88, a**). Par analogie avec les oligomères d'ATCs, l'ensemble de ces données suggérerait la présence d'une liaison hydrogène s'établissant entre le NH de l'isoleucine et le carbonyle du résidu valine formant un pseudo-

cycle à 9 chaînons. Par ailleurs, les déplacements correspondants aux protons des résidus Ile et Ala positionnés en C-ter des deux séquences étaient similaires quelque soit le solvant considéré. A l'inverse, des variations significatives entre les deux peptides ont été relevées pour les protons Ile-NH, ATC-NH, ATC-H γ et l'ensemble des protons de la valine en N-ter. Ces observations suggéraient que la configuration du γ -amino acide ATC, (*R*) ou (*S*), influençait essentiellement le repliement de la partie N-terminale de la séquence tandis que la structure des portions C-ter était globalement similaire.

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence expérimentalement pour chaque séquence la présence de la liaison hydrogène en C₉ autour de l'ATC. Pour cela, nous avons voulu évaluer la stabilité des liaisons H *via* leur titration graduelle, par le DMSO-d₆. Que ce soit pour la séquence **20** homochirale ou la séquence **21** hétérochirale, deux groupes de protons ont pu être différenciés. Les protons NH des résidus Ile et Ala étaient peu influencés par l'ajout de DMSO-d₆ alors que les protons ATC-NH et Val-NH amidiques ont montré des variations notables dans leurs déplacements chimiques. Ces résultats semblaient indiquer une meilleure accessibilité de ces sites pour le solvant titrant et l'existence d'au moins une liaison hydrogène à partir du proton NH de l'isoleucine. Cependant, la mesure des coefficients de température des différents protons amidiques, entre 293 et 333K dans le DMSO deutéré semblait suggérer l'inverse : en effet, toutes les résonances des protons amidiques des séquences **20** et **21** étaient fortement dépendantes de la température, suggérant que ces protons étaient exposés au solvant. Plusieurs références évoquaient toutefois que dans le cas de protons amidiques très déblindés, notamment liés à des effets d'anisotropie de champs, les expériences de dépendance à la température étaient équivoques. En conséquence, l'interprétation des valeurs de coefficients de température pouvait être délicate.

VI.2.d Modélisation sous contraintes RMN

Disposant des données issues des expériences RMN 1D et 2D dans le méthanol, la conformation des séquences en solution a été déterminée par modélisation sous contraintes. (*Figure 88*)

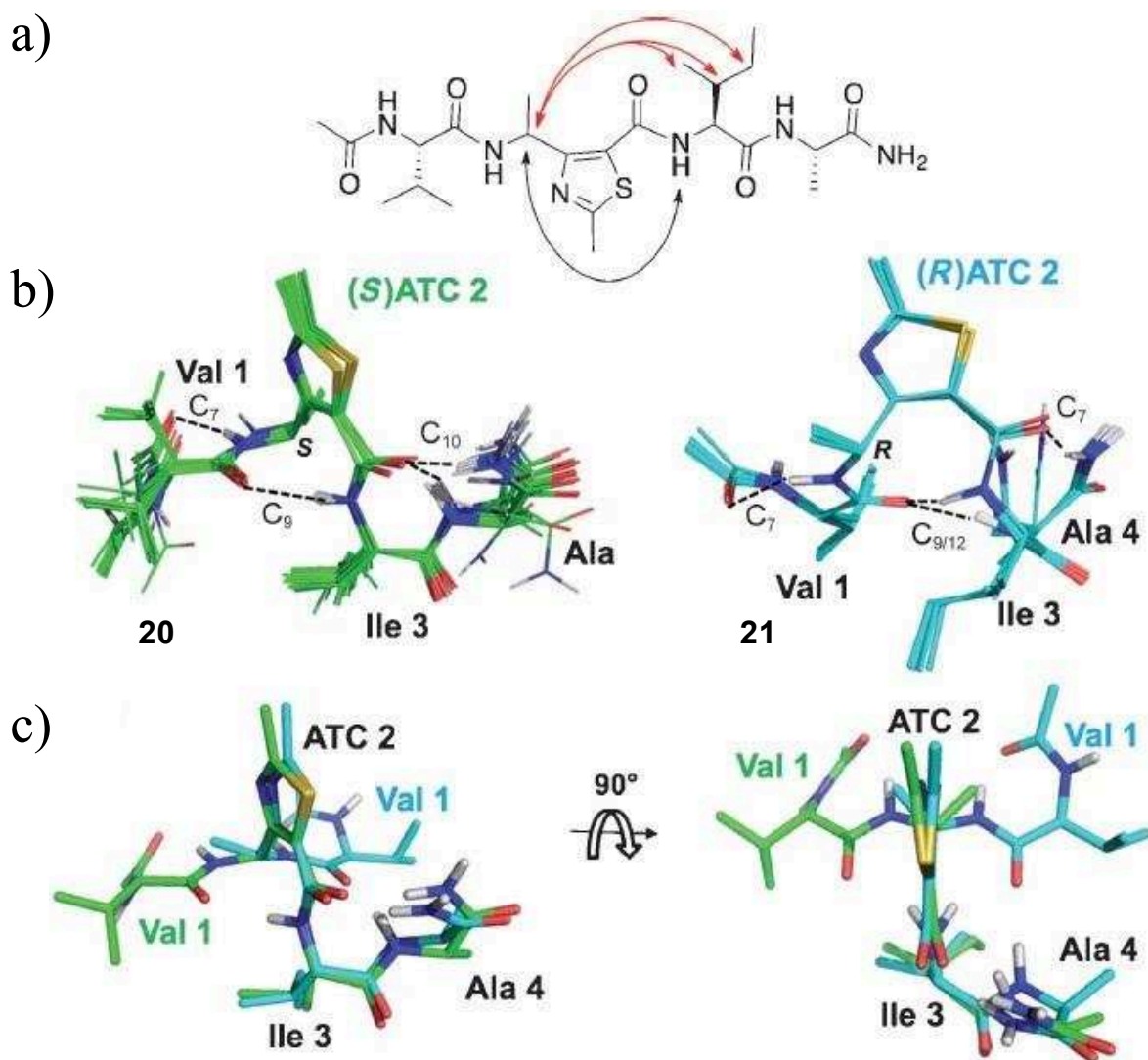


Figure 88 a) Corrélations NOEs stabilisant le pseudo-cycle C_9 (en noir) et engendrant l'arrangement tridimensionnel (en rouge), b) superposition des 20 structures de moindre énergie (avec indication des différents types de liaison hydrogène observés) pour les composés **20** (en vert) et **21** (en cyan), c) superposition des structures des composés **20** (en vert) et **21** (en cyan)

Pour les deux diastéréoisomères, les structures modélisées étaient largement superposables démontrant une bonne convergence des calculs. Dans les deux séquences, la structuration résultait de la création d'une liaison hydrogène de type $CO(i)\dots NH(i+2)$ s'établissant entre le NH de l'isoleucine et le carbonyle de la valine formant un pseudo-cycle à 9 chaînons autour du résidu d'ATC. Les peptides **20** et **21** étaient également contraints par deux autres types de liaisons H formant des pseudo-cycles à 7 et 10 chaînons. Le composé **21** quant à lui possédait une liaison hydrogène supplémentaire $NH(Ala)\dots CO(Val)$ formant un pseudo-cycle bidenté $C_{9/12}$. (**Figure 88, b**) Comme suggéré par l'analyse RMN, les portions C-ter des deux séquences étaient superposables tandis que les extrémités N-ter divergeaient imposant deux conformations radicalement différentes (**Figure 88, b et c**) :

- une conformation « en S » dite « twist-turn » pour **20**,
- un arrangement rappelant une structure de type en « reverse-turn » pour **21**.

Les angles de torsion Φ , θ , ξ et ψ des ATCs (*R*) et (*S*) au sein des deux séquences figurent dans le **Tableau 18**.

Séquences	Valeurs d'angles dièdres (en °)			
	Φ	θ	ξ	ψ
20 (RMN)	-54 ± 2	$+113 \pm 5$	-3 ± 1	-14 ± 3
21 (RMN)	$+57 \pm 2$	-105 ± 2	$+3 \pm 2$	$+10 \pm 2$
17 (RX)	-78 ± 3	$+127 \pm 14$	0 ± 3	-41 ± 4

Tableau 18 Comparaison des valeurs d'angles de torsion entre les séquences 17, 20 et 21

VI.2.e Simulations de dynamique moléculaire et calculs de densité fonctionnelle

Les modélisations par contraintes RMN menées sur des séquences aussi courtes que **20** et **21** n'offrent qu'une information approximative sur l'existence de liaisons hydrogène et la stabilité des structures. Les stabilités des conformations en « twist-turn » et « reverse-turn » ont donc été évaluées par une étude de dynamique moléculaire (MD) menée pendant 50 ns dans des boîtes de méthanol avec pour point de départ les 20 structures de moindre énergie préalablement déterminées. Tout au long des simulations, les composés **20** et **21** ont conservé leur conformation globale. L'évolution des structures tridimensionnelles a été appréciée par suivi de l'état des différentes liaisons H au cours du temps. (**Figure 89**)

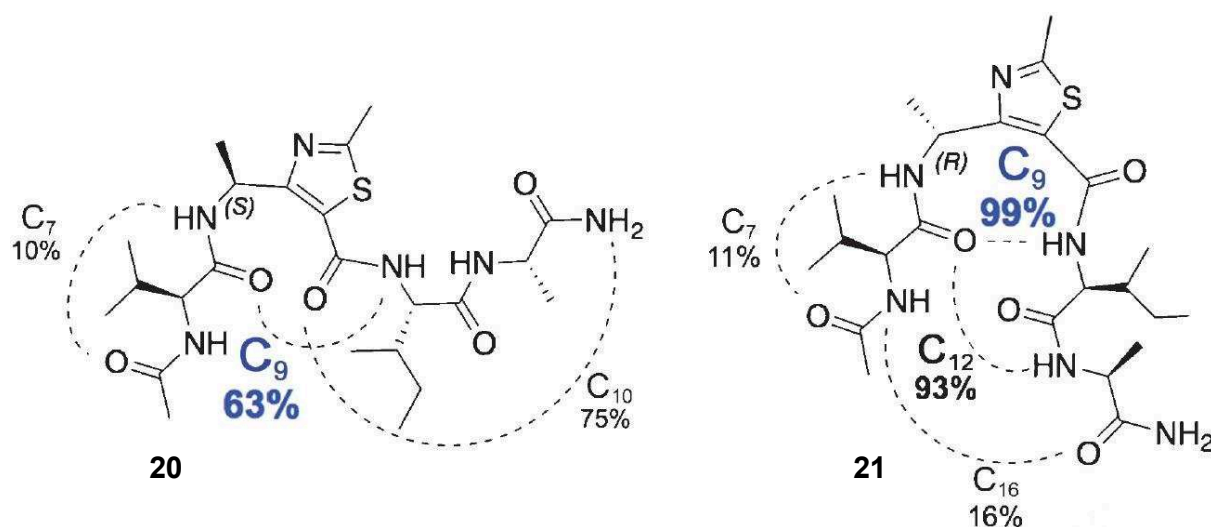


Figure 89 Occurrence des liaisons hydrogène au sein des structures de **20** et **21**, déterminée par simulations de dynamique moléculaire

La conformation du peptide **21** est relativement stable. En effet, au cours des 50 ns de simulation, les occurrences des liaisons hydrogène bifides formant les pseudo-cycles $C_{9/12}$ ont été estimées à respectivement 99 et 93%. De plus, des simulations menées en l'absence de contraintes ont confirmé la grande stabilité de ces liaisons H qui ont été conservées à hauteur de 93 et 84% respectivement. Après optimisation de la structure par DFT (calculs réalisés par le Professeur Young Kee Kang, Chungbuk National University, Corée du Sud) seule la liaison hydrogène C_9 a été conservée tandis que l'interaction de type C_{12} a disparu. Cette disparition met en lumière le rôle incontournable du pseudo-cycle à 9 chaînons dans la structuration.

Dans le cas de la séquence **20**, la conformation en « twist-turn » a été maintenue tout au long des calculs de dynamiques sous contraintes RMN. Les occurrences des liaisons hydrogène formant les pseudo-cycles C_9 et C_{10} ont été évaluées à respectivement 63 et 75%, mettant en évidence une stabilité modérée. Toutefois, le retrait des contraintes RMN engendra un changement de conformation en 1,5 ns, le peptide passant de la structure « twist-turn » au « reverse-turn » entraînant par la même occasion une modification des valeurs d'angles dièdres. Les données RMN montraient l'existence d'un seul état conformationnel ou tout au moins d'une seule population. Cependant, les deux conformations « twist-turn » et « reverse-turn » pour lesquelles les corrélations NOEs devaient être identiques ne pouvaient pas être discriminées. Nous avons donc entrepris des calculs par DFT des énergies relatives aux deux conformations afin de déterminer l'arrangement le plus probable pour le peptide **20**. Les calculs ont démontré que, dans le méthanol, la structure de type « twist-turn » était plus stable de 3,40 kcal/mol par rapport au « reverse-turn ». La proportion de ces deux arrangements à 298 K a été évaluée à respectivement 99,7 contre 0,3%.

Enfin, les énergies relatives des liaisons C_9 au sein des séquences **20** et **21** ont été comparées. Il en est ressorti que la liaison hydrogène simple en C_9 était plus stable de 2 kcal/mol pour le « reverse-turn » **21** comparé au « twist-turn » **20**.

VI.2.f Conclusion de l'étude structurale des séquences hybrides α -ATC- $\alpha\alpha$

Les expériences RMN associées à la modélisation sous contraintes ont montré que l'introduction d'un ATC au sein d'une séquence térapeptidique induisait, en solution, un arrangement sous la forme de mimes de coude. Cette structuration est la conséquence de l'établissement d'une liaison hydrogène formant un pseudo-cycle à 9 chaînons, similaire à celles observées au sein d'oligomères d'ATCs. En outre, la configuration de l'ATC s'avéra

avoir un impact direct sur la conformation de la séquence en solution (« twist-turn » pour la stéréochimie (*S*) et « reverse-turn » pour la (*R*)). Les simulations de dynamique moléculaire ont confirmé les conformations prédites par modélisation sous contraintes RMN et ont de plus permis la quantification des occurrences des différentes liaisons hydrogène impliquées dans l'arrangement des deux tétramères. Enfin, les calculs de densité fonctionnelle ont hiérarchisé les énergies des liaisons H de type C₉ observées au sein des deux séquences (celle contraignant le « reverse-turn » s'avère plus stable que celle du « twist-turn »).

VI.3 Synthèse, étude structurale et évaluation biologique d'un analogue de la gramicidine S

A la lumière des résultats structuraux obtenus, notamment pour la séquence **21**, nous avons souhaité illustrer l'intérêt du (*R*)-ATC en tant que promoteur de « reverse-turn » en synthétisant un analogue de la gramicidine S.

VI.3.a Introduction

La gramicidine S est un cyclodecapeptide sécrété par la souche *Bacillus brevis* et est construite suivant la séquence [cyclo-(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro)₂]. Elle présente une symétrie de type C₂. (**Figure 90**)

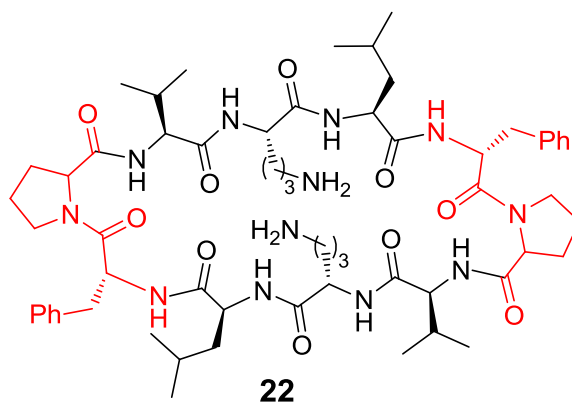


Figure 90 Gramicidine S

Ce composé est un antibactérien puissant, actif à la fois sur des bactéries Gram - et Gram + et également sur plusieurs champignons pathogènes.²⁰¹ Son effet thérapeutique est indissociable d'une forte activité hémolytique limitant son utilisation en clinique. L'action de la gramicidine S repose sur le caractère amphiphile de la structure en feuillet β qui présente à la fois une face polaire et une face apolaire permettant son insertion dans la bicouche lipidique

de la membrane bactérienne et causant sa destruction.²⁰² La séquence est structurée en feuillet autour de deux coudes β de type II' formés par l'enchaînement dipeptidique D-Phe-Pro.

Un analogue de la gramicidine S doit présenter une structure en épingle à cheveux et respecter l'amphiphilie des deux faces nécessaire à l'activité antibactérienne. Idéalement, il doit également présenter une plus faible hémotoxicité.

Nous avons conçu l'analogue **23** dans lequel les deux coudes D-Phe-Pro ont été substitués par deux (R)-ATCs dérivés de la D-phénylalanine. L'objectif était de démontrer que ce cyclopeptide hybride conservait une structure en feuillet. (**Figure 91**)

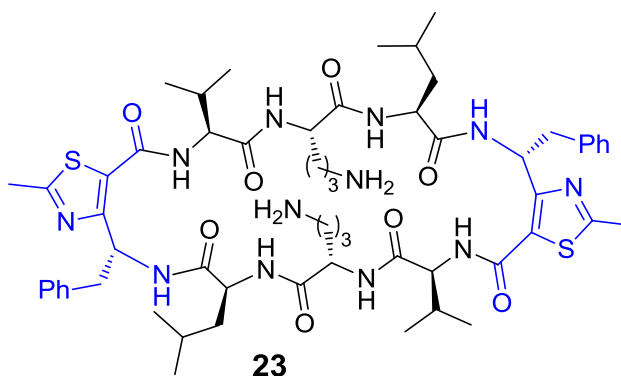


Figure 91 Analogue de la gramicidine S

VI.3.b Synthèse de l'analogue 23 de la gramicidine S

L'élongation de la séquence a été réalisée en phase solide sur résine 2-chlorotrityle selon une stratégie Fmoc / tBu à l'aide d'un mélange HBTU, HOBt, NMM dans le DMF pour les couplages et de pipéridine / DMF pour les déprotections en N-terminal. La cyclisation a été effectuée en solution diluée avec HBTU, HOBt et NMM dans le DMF, après décrochage du support par une solution de TFA 1% dans le dichlorométhane. Enfin, les chaînes latérales des deux ornithines du cyclopeptide **24** ont été déprotégées par traitement acide au TFA. Le composé **23** a été isolé après purification par HPLC en phase inverse avec un rendement non optimisé de 16%. (**Schéma 5**) Parallèlement nous avons préparé la gramicidine S selon un protocole analogue.

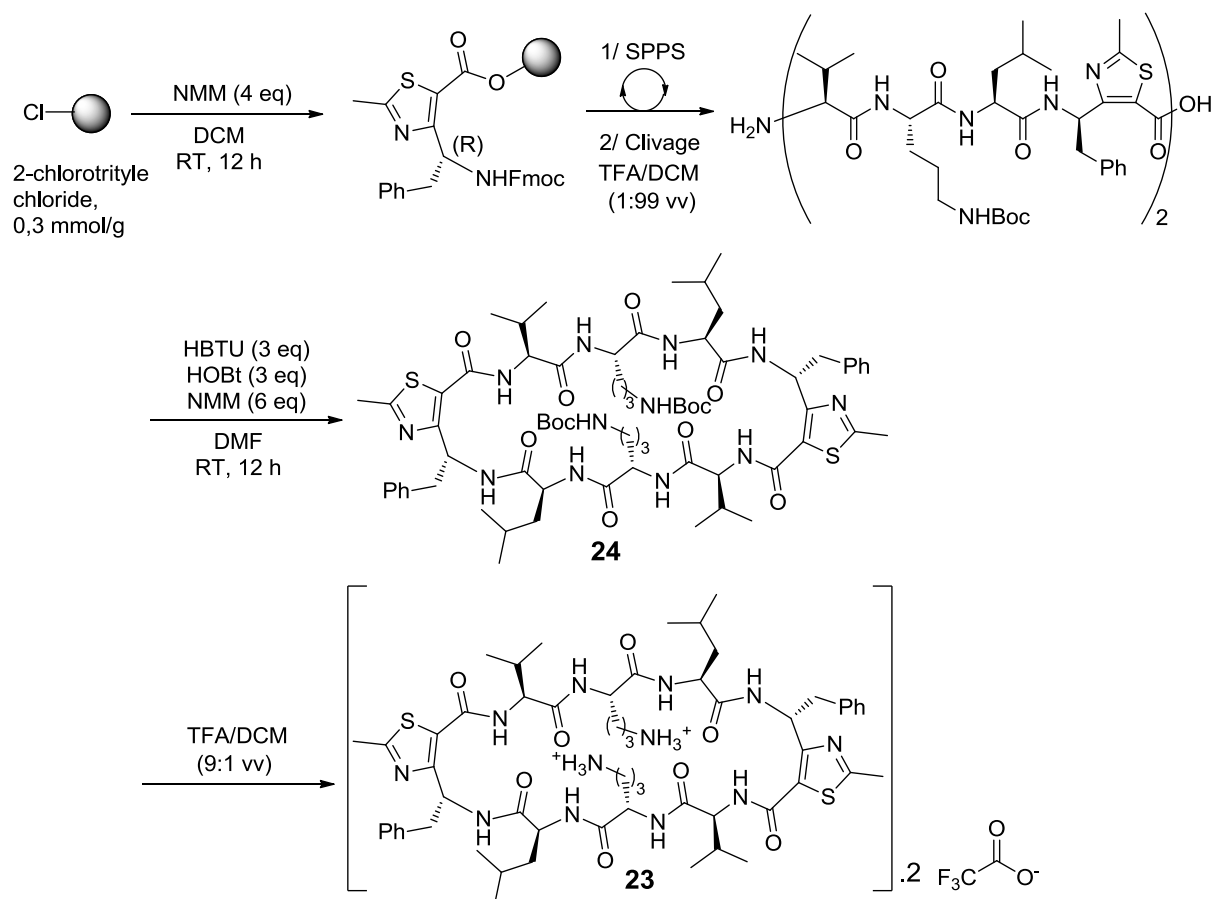


Schéma 5 Synthèse de l'analogue 23

Les conformations adoptées en solution par la gramicidine S **22** et son analogue **23** ont été étudiées par spectroscopie RMN 1D et 2D.

VI.3.c Etude structurale par RMN

Pour des questions de solubilité de la gramicidine S et de son analogue **23**, l'ensemble des analyses RMN a été réalisé dans le DMSO- d_6 . Les paramètres RMN relevés pour la gramicidine S, constantes de couplage $^3J(\text{HNH}_\alpha)$ et coefficients de température liés aux protons amidiques, s'avéraient similaires à ceux décrits dans la littérature. De plus, les corrélations ROEs observées étaient compatibles avec la structure cristalline publiée par Overhand.²⁰³

L'analyse RMN ^1H de l'analogue **23** a conduit à un seul ensemble de signaux pour les résidus Val, Orn, Leu et (R)-ATC indiquant une symétrie au sein du peptide cyclique. Les constantes de couplages $^3J(\text{HNH}_\alpha)$ des résidus Val, Orn, Leu présentaient des valeurs d'environ 8 Hz ; traduisant une conformation étendue de la séquence Val-Orn-Leu compatible avec une structure en feuillet. La détermination des coefficients de température des protons amidiques a

permis de montrer que les protons NH des résidus leucine et valine participaient à l'établissement de liaisons hydrogène. Les corrélations ROEs observés entre les ATC-H γ et Val-NH s'avéraient également caractéristiques de la formation d'un pseudo-cycle à 9 chaînons autour du γ -amino acide. La structure a finalement été résolue par modélisation sous contraintes RMN. (*Figure 92*)

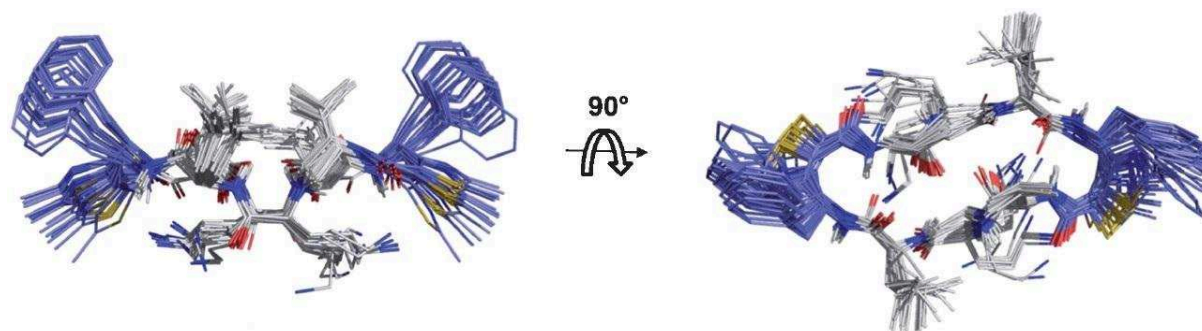


Figure 92 Superposition des 20 structures de moindre énergie de l'analogue 23

Les 20 structures calculées étaient superposables, indiquant à nouveau une convergence des calculs. La conformation correspondait à un feuillet β antiparallèle stabilisé par la présence des deux (*R*)-ATC jouant le rôle de « reverse-turns » structurés autour de deux liaisons hydrogène de type CO(*i*)...NH(*i*+2) formant des pseudo-cycles à 9 chaînons. (*Figure 93, a*)

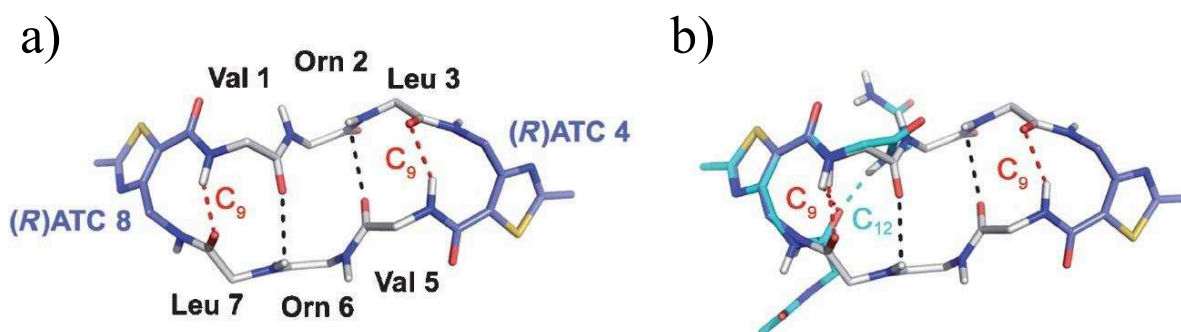


Figure 93 a) squelette de l'analogue 23 et b) superposition des squelettes de 23 (en blanc) avec le mime de « reverse-turn » 21 (en bleu). Les liaisons hydrogène apparaissent en pointillés

Tel que représenté dans la *Figure 93, b*), la structure des deux « reverse-turn » était identique à celle observée au sein du térapeptide hybride **22**. La conformation de l'analogue **23** s'approchait largement de celle de la gramicidine S. (*Figure 94, a*) Le remplacement du fragment D-Phe-Pro par le (*R*)-ATC a substitué le pseudo-cycle C₁₀ par un C₉ engendrant un léger écart conformationnel de l'analogue par rapport à sa référence. Cette différence a causé le basculement des deux chaînes latérales benzyliques du côté chargé vers la face hydrophobe. (*Figure 94, b*)

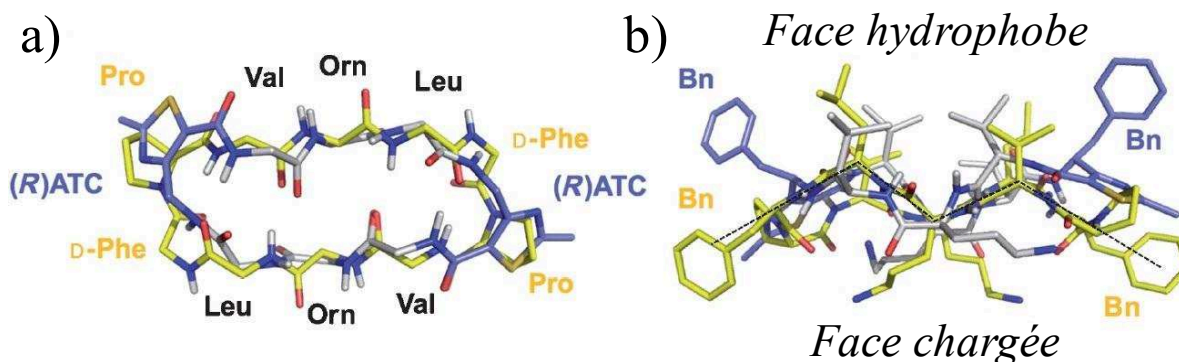


Figure 94 a) Superposition des squelettes de la gramicidine S (en jaune) et de son analogue 23 (en bleu), b) répartition des chaînes latérales portées par ces deux composés

VI.3.d Evaluation de l'activité biologique

L'activité antibactérienne de l'analogue **23** vis-à-vis de 4 souches Gram + et Gram – (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) a été comparée à celle de la gramicidine S utilisée comme référence. Le DMSO ayant permis la solubilisation des espèces a été utilisé en tant que contrôle négatif. L'activité antibactérienne de l'analogue **23** s'est avérée très légèrement réduite tout en restant du même ordre de grandeur que celle de la gramicidine S. L'activité hémotoxique a également été déterminée. Le contrôle négatif était à nouveau le DMSO tandis que le témoin positif consistait en une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS). (**Tableau 19**) L'analogue **23** a montré une hémotoxicité réduite d'un facteur six par rapport au composé naturel. Cette diminution pourrait être due à l'orientation opposée des chaînes benzyliques au sein des deux échantillons, augmentant l'hydrophilie observée par HPLC et le caractère amphiphile.

Souche bactérienne	Concentration minimale inhibitrice (µg/mL)	
	Analogue 23	Gramicidine S 22 (référence)
<i>Escherichia coli</i>	25	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 50	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,68	3,125
<i>Bacillus subtilis</i>	3,125	1,56
Hémolyse (en %)	14	80

Tableau 19 Evaluation des activités antibactérienne et hémolytique de l'analogue 23 (la gramicidine S 22 fait office de référence)

VI.4 Conclusion sur la synthèse, la conformation et l'activité biologique de l'analogue de la gramicidine S

La conception de l'analogue **23** de la gramicidine S a consisté à remplacer l'enchaînement D-Phe-Pro par le (*R*)-ATC dérivé de la phénylalanine. Les analyses RMN associées à la modélisation sous contraintes ont montré que la conformation en feuillet était conservée pour le composé **23** même si l'orientation des deux chaînes latérales benzyliques était modifiée. L'évaluation biologique de l'analogue a mis en avant une activité antibactérienne, sur 4 souches Gram + et Gram -, du même ordre de grandeur que la référence **22**. Enfin, l'introduction de l'ATC a permis une diminution importante de l'hémotoxicité, probablement *via* le renforcement de l'hydrophilie et de l'amphiphilie de l'analogue **23**.

VI.5 Publication

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Chemistry, a European Journal*.²⁰⁴

Amino Acids

Thiazole-Based γ -Building Blocks as Reverse-Turn Mimetic to Design a Gramicidin S Analogue: Conformational and Biological Evaluation

Baptiste Legrand,^[a] Loïc Mathieu,^[a] Aurélien Lebrun,^[a] Soahary Andriamanarivo,^[a] Vincent Lisowski,^[a] Nicolas Masurier,^[a] Séverine Zirah,^[b] Young Kee Kang,^[c] Jean Martinez,^[a] and Ludovic T. Maillard^{*[a]}

Abstract: This paper describes the ability of a new class of heterocyclic γ -amino acids named ATCs (4-amino(methyl)-1,3-thiazole-5-carboxylic acids) to induce turns when included in a tetrapeptide template. Both hybrid Ac-Val-(*R* or *S*)-ATC-Ile-Ala-NH₂ sequences were synthesized and their conformations were studied by circular dichroism, NMR spectroscopy, MD simulations, and DFT calculations. It was demonstrated that the ATCs induced highly stable C₉ pseudocycles in both compounds promoting a twist turn and a re-

verse turn conformation depending on their absolute configurations. As a proof of concept, a bioactive analogue of gramicidin S was successfully designed using an ATC building block as a turn inducer. The NMR solution structure of the analogue adopted an antiparallel β -pleated sheet conformation similar to that of the natural compound. The hybrid α,γ -cyclopeptide exhibited significant reduced haemotoxicity compared to gramicidin S, while maintaining strong antibacterial activity.

Introduction

Among the various secondary structures, reverse turns are one of the major structural elements in biologically active peptides and globular proteins. They are key features for protein folding by pre-organizing polypeptide chains and are involved in many of the molecular recognition events in biological systems.^[1] They are also an essential part of antimicrobial peptides that contain β -hairpins or β -sheets, for example, protegrin, tachyplesin, defensins and gramicidin S.^[2] In this context, numerous efforts have been made to develop small-turn inducers. A large variety of scaffolds derived from β -amino acids

have been characterized,^[3] while homo- or heterogeneous sequences incorporating γ -amino acids have received far less attention due, in part, to the difficulty to access stereochemically pure γ -building blocks.^[3e,f,4] Mann and Kessler reported the first example of (hetero)aromatic-based γ -amino acids in which the ring is an oxazole. They suggested that when included into a small peptide, such a γ -amino acid building block induced a C₉ turn.^[4d] However, the turn conformation was not fully characterized.

We recently described a new class of constrained heterocyclic γ -amino acids built around a thiazole ring, that is, 4-amino(methyl)-1,3-thiazole-5-carboxylic acids (ATCs, **1a** and **2**; Figure 1). We demonstrated the high propensity of ATC oligomers to adopt a C₉ helical structure in solid and solution states in both organic solvents and water.^[5] We now report the synthesis of $\alpha\text{-}\alpha\text{-ATC-}\alpha$ hybrid tetrapeptides and their structural studies by circular dichroism (CD), NMR spectroscopy, molecular dynamic simulations, and DFT calculations. To investigate the impact of the ATC configuration on the peptide shape, we prepared the two diastereomers **3a** and **3b** consisting in Ac-Val-(*S* or *R*)-ATC-Ile-Ala-NH₂ (Figure 1). Based on our structural data, the (*R*)-ATC motif was then selected as a surrogate for the D-Phe-Pro turn to synthesize a biologically active analogue of the gramicidin S (GS; Figure 1), a highly haemolytic β -hairpin cyclodecapeptide antibiotic. The antimicrobial and haemolytic activities of analogue **4** (Figure 1) were tested and its NMR solution structure was determined and compared to the characteristic β -pleated sheet of the GS.

[a] Dr. B. Legrand,⁺ L. Mathieu,⁺ A. Lebrun, S. Andriamanarivo, Prof. V. Lisowski, Dr. N. Masurier, Prof. J. Martinez, Dr. L. T. Maillard
Institut des Biomolécules Max Mousseron
UMR 5247, CNRS, Universités Montpellier I et II
UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
15 Avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5 (France)
Fax: (+33) 4-67-54-86-54
E-mail: ludovic.maillard@univ-montp1.fr

[b] Dr. S. Zirah
Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN)
UMR 7245 CNRS/MNHN
Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes (MCAM)
57, rue Cuvier, 75005 Paris (France)

[c] Prof. Y. K. Kang
Department of Chemistry and BK21 PLUS Research Team
Chungbuk National University
Cheongju, Chungbuk 361-763 (Republic of Korea)

[⁺] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201402190>.

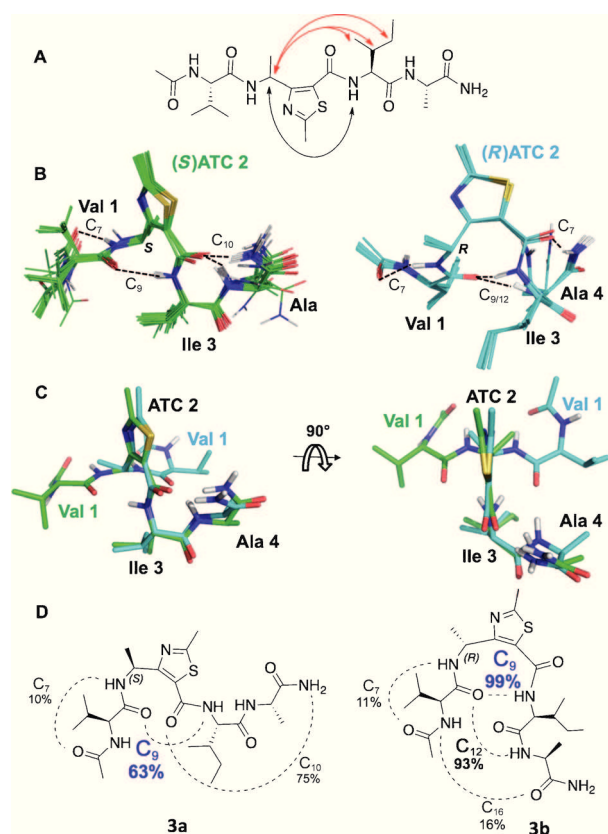


Figure 2. A) In black, typical NOE correlations stabilizing the C_9 pseudocycle; in red, principal NOE correlations driving the folding. B) Overlay of the 20 lowest-energy structures of compounds **3a** (in green) and **3b** (in cyan). C) Superimposition of the NMR lowest energy structures of **3a** (in green) and **3b** (in cyan). D) Occurrence of the hydrogen bonding on **3a** (in green) and **3b** over 50 ns rMD (cutoff: $d_{O-N} < 3.5$ Å and N-H-O angle $> 120^\circ$).

Molecular dynamic simulations

To get further insight on the stability of these structures and to investigate the set of conformations that **3a** and **3b** could adopt in solution, molecular dynamic simulations were achieved in a methanol box for 50 ns, starting from their lowest NMR structures. Simulations were launched using the inter-residue NOE-derived upper distances with (rMD) and without restraints (MD). The stability of each peptide folding during the simulations was assessed by computing: 1) the atom-positional root-mean-square deviation from the initial structure (RMSD); 2) the root-mean-square fluctuation (RMSF) values of the backbone heavy atoms (Figure S4 in the Supporting Information); 3) the occupancy of the hydrogen bonds along the simulations; and 4) the backbone dihedral angle distributions (Figure S5 in the Supporting Information).^[7] The backbone RMSD were rather low over the restrained MD for both compounds (i.e., (0.43 ± 0.22) and (0.68 ± 0.22) Å for **3a** and **3b**, respectively) showing the two peptides conserved their overall conformations in methanol all along simulations. This was also reflected by the small RMSF values, which showed small oscillations on the central ATC and Ile residues, while the N and C termini (Val and Ala residues) underwent higher mobility for all trajectories. In both **3a** and **3b** the torsional angle distribu-

tions of the ATC residues were unimodal and narrow (Figure S5 in the Supporting Information). For the other residues, values were relatively low dispersed with minor populations, which explained the small variations of the RMSD. Only the ψ_1 dihedral angle distributions of Val were bimodal (Figure S5 in the Supporting Information), reflecting the larger fluctuation of the C-terminal atoms and explaining the small jumps on RMSDs (Figure S4 in the Supporting Information). The conformational behavior of **3a** and **3b** was studied by monitoring hydrogen-bond patterns over the simulations. With 63 and 75% occurrence, respectively, the C_9 pseudoring and the lateral C_{10} lateral pseudocycle in the “twist”-turn conformation **3a** imposed by (S)-ATC were moderately stable (Figure 2d, Table S22 in the Supporting Information). However, the $C_{9/12}$ hydrogen bonds stabilizing the reverse turn in **3b** induced by the (R)-ATC residue were more stable with a percentage of occupancy of 99 and 93%, respectively, during the 50 ns. The other hydrogen bonds were transients with a low occurrence $< 16\%$.

During the unrestrained simulations, RMSFs were globally larger. The initial NMR conformation of **3b** was remarkably maintained (RMSD = 0.61 ± 0.17 Å) during the 50 ns MD, confirming the high stability of the folding. The $C_{9/12}$ bidentate hydrogen bonds were preserved with 93 and 84% occupancy over the whole simulation. The most significant change occurred on the ψ_1 dihedral angle distribution of Val (Figure S5 in the Supporting Information) without impacting the peptide global shape. By comparison, after 1.5 ns, **3a** underwent a transition from a twist- to a reverse-turn structure stabilized by a bidentate $C_{9/12}$ pseudo cycle, mirroring the **3b** conformation. This structural rearrangement was associated with concomitant rotations of ψ_1 , ϕ_{2r} and ϕ_3 dihedral angles (from 50 to -7° , -58 to -112° , and -59 to -135° , respectively), but was not compatible with NOE correlations observed between ATC-H γ and Ile side chain protons. Although NMR spectroscopy could not ascertain the reverse-turn structure, since no characteristic NOEs could be found, the fast interconversion between the twist- and reverse-turn conformations in solution could not be excluded. Finally, in order to estimate the relative stabilities of the twist- and reverse-turn structures of **3a**, the MD structures were optimized at the B3LYP/6-31G(d) level of theory. The single-point energies of these two turn structures were calculated at the same level of theory with the conductor-like polarizable continuum model (CPCM)^[8] in methanol. The twist-turn structure was found to be more stable by 3.40 kcal mol $^{-1}$ than the reverse-turn structure in methanol, which indicates the relative populations of 99.7 and 0.3% for twist- and reverse-turn structures, respectively, at 298 K for **3a**.

DFT calculations

The stability of the C_9 and $C_{9/12}$ hydrogen bond(s) in **3a** and **3b** were also investigated by DFT calculations by using Gaussian 03.^[9] The two lowest-energy NMR structures of **3a** and **3b** were optimized at the B3LYP/6-31G(d) level of theory. After optimization, both **3a** and **3b** displayed the C_9 hydrogen bond around the γ -amino acid. The C_{12} hydrogen bond suggested in **3b** by NOE data and MD simulations disappeared after optimi-

zation. As a consequence the C_9 $C=O(i)\cdots HN(i+2)$ hydrogen bond remained the major peptide folding driving force. The relative strength of the C_9 hydrogen bonds of the optimized structures was more deeply evaluated via the natural bond orbital (NBO) analysis^[10] at the B3LYP/6-31+G(d,p) level of theory (Table 1). Compounds **3a** and **3b** shared similar values

Table 1. Relative strength of the hydrogen bonds calculated using the NBO method at the B3LYP/6-31+G(d,p)//B3LYP/6-31G(d) level of theory [units for atomic charges and Wiberg index in electrons, and the stabilization energies (ΔE_2) are in kcal mol ⁻¹].				
	Natural charges		Wiberg index ^[a]	ΔE_2 ^[b]
	δ_O	δ_H		
3a	-0.690	+0.465	0.705	16.17
3b	-0.690	+0.467	0.699	18.02

[a] Wiberg index indicates the strength of the Ile N–H bond. [b] The second perturbation energy of the lone pair orbitals of the oxygen with the corresponding N–H antibonding orbital, which is called the hyperconjugation is due to the charge transfer.^[10]

of atomic charges and Wiberg index calculated for Ile N–H bond.^[11] However, in accordance to rMD simulations, calculation of hyperconjugation (ΔE_2) term due to charge transfer showed that the C_9 hydrogen bond was more stable by about 2 kcal mol⁻¹ in the reverse turn **3b** than in the “twist”-turn **3a**.

Synthesis and structural studies of the ATC-containing gramicidin S analogue **4**

As a proof of concept, we present a successful application of the ATC C_9 turn for the design of a new derivative of the highly effective bactericidal gramicidin S (GS).^[12,13] GS is an amphiphilic C_2 -symmetrical cyclodecapeptide that adopts a highly stable antiparallel β -pleated sheet conformation stabilized by four intramolecular hydrogen bonds. The two strands are linked by two hydrophobic type II' β -turns formed by D-Phe-Pro dipeptides. Detailed structure–activity relationship studies revealed that a large number of amino acid substitutions are tolerated,^[13] while the stable, antiparallel β -sheet conformation is considered essential and is maintained among a wide range of derivatives.^[14] Nevertheless, the major limitation in the clinical use of GS is due to its high lysogenic activity.^[12] Considering (R)-ATC as a reverse-turn inducer, (R)-ATC **3c** was used as a surrogate for the D-Phe-Pro sequence to design the GS analogue **4**. The linear peptide was obtained by classical Fmoc solid-phase peptide synthesis then cyclized under high dilution conditions with HBTU/HOBt as a coupling reagent, purified by HPLC, and the side chains were deprotected (see the Supporting Information). GS was synthesized as a control under similar conditions. The NMR resonances of GS and the analogue **4** were fully assigned in [D₆]DMSO at 298 K. NMR observables (³J(HNH_α), amide proton temperature coefficients) for GS were similar to those previously reported (see Table S14–S19 in the Supporting Information). The entire set of ROE correlations was compatible with the XRD structure provided by Overhand

and al.^[15] A single set of signals was observed in **4** for the Val, Orn, Leu, and (R)-ATC suggesting that it also exhibited a C_2 -symmetric structure. The amide protons following the ATC residue (i.e., Val HN) were strongly unshielded (9.28 ppm) as previously described for ATC oligomers and compounds **3a** and **3b**. The Val/Orn/Leu had relatively high ³J(HNH_α) coupling constants (8.0, 8.0, and 8.5 Hz, respectively) compatible with an extended conformation, but significantly lower than those of the GS. The corresponding ϕ torsional angles might display more degrees of freedom than in the natural GS. Temperature coefficients exhibited comparable trends than in GS, but with smaller values. The Orn and ATC-NH shared the higher values ($\Delta\delta/\Delta T = -3.8$ ppbK⁻¹) compared to the Val HN ($\Delta\delta/\Delta T = -2.5$ ppbK⁻¹) and Leu HN ($\Delta\delta/\Delta T = 0$ ppbK⁻¹). This suggested that these two first amide protons were solvent-shielded and involved in hydrogen bonding. Nevertheless, as previously discussed for **3a** and **3b**, the measured values for the amide protons close to the thiazole rings should be interpreted with caution. The typical strong ROE correlations between ATC-H γ and the amide proton of the following residue (i.e., Val-HN) supported the presence of the ATC-driven C_9 pseudocycle. In addition, unambiguous long-range NOEs were observed between the Val and the Leu on either side of the C_9 turn (Table S19 in the Supporting Information). The solution structures of **4** were solved using 90 distances and 6 torsion angles restraints and exhibited a slightly distorted antiparallel β -pleated sheet stabilized by (R)-ATCs acting as reverse turns with $C=O(i)\cdots HN(i+2)$ hydrogen bonds (Figure 3a and b). As expected, the ATCs γ -amino acid adopted similar conformations in **3b** and **4** (Figure 3c). The dissymmetry of the C_9 -turn of (R)-ATC may explain the non-ideal geometry of the sheet compared to that of the GS stabilized by the D-Phe-Pro dipeptide (C_{10} -turn). The major difference between **4** and GS arose from the flip of the benzyl

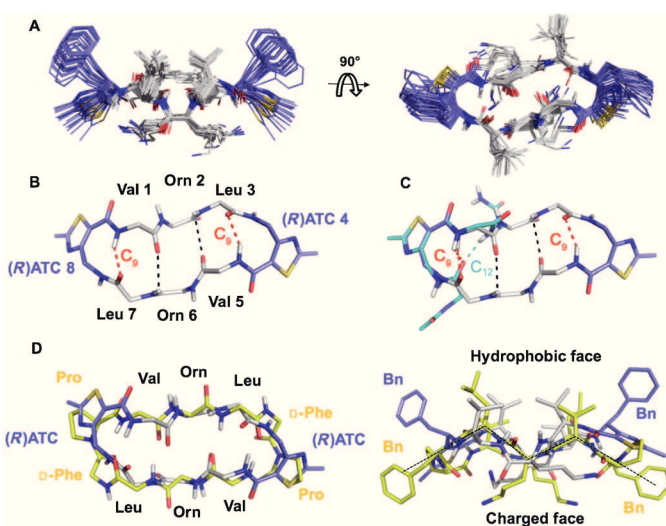


Figure 3. A) Overlay of the 20 lowest-energy NMR structures of **4** (ATC residues are in blue, protons are omitted for clarity). B) Backbone of the analogue **4**, hydrogen bonds are represented in dashed lines and C) superimposition of the backbone of **4** (white and blue for ATC) and the reverse-turn **3b** (cyan). D) Superimposition of the backbone of **4** (white and blue) and GS (yellow).

side chains from the charged face to the hydrophobic side of the sheet thus strengthening the amphipathicity (Figure 3 d).

Antimicrobial activities

GS analogue **4** was then tested for its antimicrobial activity against a representative range of Gram-positive and Gram-negative bacteria strains. It conserved functional mimicry of the natural product although the antibiotic activities were slightly reduced. More importantly, the haemolytic activity of **4** was decreased sixfold (Table 2). Several studies support the haemotoxicity is highly correlated to the hydrophobicity and/or am-

Table 2. Antibacterial and haemolytic activities of 4 compared to GS.		
	4	GS
<i>E. coli</i> ^[a]	25	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^[a]	> 50 ^[b]	50 ^[b]
<i>S. aureus</i> ^[a]	4.68	3.125
<i>Bacillus subtilis</i> ^[a]	3.125	1.56
hemolysis [%] ^[c]	14	80

[a] Minimal inhibitory concentrations (MICs) in $\mu\text{g mL}^{-1}$ were determined after 48 h incubation. [b] 50 μM was the maximal tested concentration compatible with the compound solubility in culture media. [c] The percentage of haemolytic activity of red blood human cells caused at 100 μM peptide concentration.

phipathicity of the molecule.^[16] As suggested by RP-HPLC analyses and by the re-orientation of the benzyl side chains, the haemotoxicity decrease could be explained in part by a higher hydrophilicity and amphiphilicity of **4** compared to GS.

Conclusion

We have demonstrated, using various techniques, that γ -amino acid ATC was able to induce a turn in solution when included in a short peptide sequence. It stabilized a typical C_9 -turn with a similar geometry to that adopted in the 9-helix ATC oligomers. Depending on the configuration of the γ -amino acid stereocenter, ATCs could serve as turn mimetic. We successfully synthesized a gramicidin S analogue exhibiting reduced haemotoxicity, while maintaining interesting antibacterial activities. Considering the high diversity and the unique conformational properties of these γ -amino acid residues, we believe that the development of such turn mimics and their incorporation into biologically active molecules to constraint active conformations is of interest.

Experimental Section

General procedures

Commercially available reagents and solvents were used without any further purification. Reactions were monitored by HPLC using an analytical Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm column (50 \times 4.6 mm, 5 μm) using a flow rate of 5.0 mL min^{-1} , and gradients

from 100:0 to 0:100 eluents A/B over 3 min, in which eluents A = $\text{H}_2\text{O/TFA}$ 0.1% and B = $\text{CH}_3\text{CN/TFA}$ 0.1%. Detection was done at 214 and 254 nm using a photodiode array detector. Retention times are reported as follows: t_r (min). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at room temperature in deuterated solvents. Chemical shifts (δ) are given in parts per million relative to TMS or relative to the solvent (^1H : δ (CDCl_3) = 7.24 ppm; ^{13}C : δ (CDCl_3) = 77.2 ppm). The following abbreviations were used to designate the signal multiplicities: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), br (broad). Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed using aluminium-backed silica gel plates coated with a 0.2 mm thickness of silica gel or with aluminium oxide 60 F254, neutral. LC-MS spectra (ESI) were recorded on an HPLC using an analytical Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm column (50 \times 4.6 mm, 5 μm) using a flow rate of 3.0 mL min^{-1} , and gradients of 100:0 to 0:100 eluents A/B over 3 min, in which eluents A = $\text{H}_2\text{O/HCOOH}$ 0.1% and B, $\text{CH}_3\text{CN/HCOOH}$ 0.1%. High-resolution mass spectrometric analyses were performed with a time-of-flight (TOF) mass spectrometer fitted with an electrospray ionisation source (ESI). All measurements were performed in the positive ion mode. Melting points (m.p.) are uncorrected and were recorded on a capillary melting point apparatus. Enantiomeric excesses were determined by Chiral HPLC analysis using a Chiralcel OD-R column (250 mm \times 4.6 mm) with H_2O , TFA 0.1%/ACN, TFA 0.1%. (40: 60) as eluent and a flow rate of 1 mL min^{-1} .

Synthesis of (S)-1a, (R)-1b and 2

Compounds **1a**, **1b**, and **2** were synthesized from Fmoc-(S)-alanine, Fmoc-(R)-alanine and Fmoc-(S)-phenylalanine, according to the previously described procedure.^[5]

General procedure for the preparation of hybrid peptides **3a** and **3b**

Peptides **3a** and **3b** were synthesized by solid-phase methods using standard Fmoc chemistry. The peptides were assembled on ChemMatrix® Rink Amide resin loaded at 0.54 mmol g^{-1} . Chain elongations were performed with Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, (S)-**1a** or (R)-**1b**, and Fmoc-Val-OH (0.3 mmol each), using 20% piperidine/NMP for Fmoc deprotection, HBTU/HOBt for activation (0.3 mmol each), *N*-methylmorpholine (NMM, 6 equiv) and NMP (5 mL) as solvent. After completion of the synthesis, the linear peptides were acetylated with $\text{Ac}_2\text{O/DCM}$ (1:1 v/v; 3 \times 5 min), then cleaved from the resin with 100% CF_3COOH . After removing the solvent, the peptides were purified by preparative HPLC on a Delta Pak, C18 column (15 μm , 40 \times 100 mm; Solvent A: $\text{H}_2\text{O/TFA}$ vol/vol 0.1%; Solvent B: MeCN/TFA vol/vol 0.1%; flow 20 mL min^{-1} ; linear gradient A/B: from 85:15 to 60:40 in 30 min). HPLC analyses were performed on an analytical Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm column (50 \times 4.6 mm, 5 μm) using a flow rate of 5.0 mL min^{-1} , and gradients from 100:0 to 0:100 eluents A/B over 3 min, in which eluents A = $\text{H}_2\text{O/TFA}$ 0.1% and B = $\text{CH}_3\text{CN/TFA}$ 0.1%. Detections were done at 214 and 254 nm using a photodiode array detector. The retention times were determined to be 1.28 min for **3a** and 1.26 min for **3b**. Compounds **3a** and **3b** were obtained in 35 and 32% yields respectively. **3a**: t_r = 1.28 min; LC-MS: (ESI+): m/z (%): 511.2 (100) $[M+H]^+$, 533.2 (10) $[M+Na]^+$. **3b**: t_r = 1.26 min; LC-MS: (ESI+): m/z (%): 511.2 (100) $[M+H]^+$; for NMR data see Tables S1–S4 in the Supporting Information.

Synthesis of gramicidin S

The backbone-cyclic peptide was assembled on 2-chlorotrityl chloride resin (Novabiochem). Fmoc-Pro-OH (0.25 mmol) was loaded on 2-chlorotritylchloride resin (800 mg, loading 0.3 mmol g^{-1}) in the presence of *N*-methylmorpholine (NMM, 4 equiv) in CH_2Cl_2 (15 mL). The unreacted sites on the resin were capped by washing with a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{DIPEA}$ (17:2:1) followed by MeOH. Following removal of the Fmoc-group using 20% piperidine in *N*-methyl-2-pyrrolidinone (NMP), chain elongation was performed with Fmoc-D-Phe, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-D-Phe, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH (1 mmol each, 4 equiv), using 20% piperidine/NMP for Fmoc deprotection, HBTU (4 equiv) for activation, DIPEA as base and NMP as solvent. After completion of the synthesis, the linear peptide was cleaved from the resin with $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{water}$ (1:99 v/v). After removing the solvent, the peptide was cyclized overnight using HBTU (4 equiv) for activation, *N*-methylmorpholine (11 equiv) as base in DMF (30 mL). The solvent was removed under reduced pressure then the protected peptide was purified by preparative HPLC on a Delta Pak, C18 column (15 μm , $40 \times 100 \text{ mm}$; Solvent A: $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ vol/vol 0.1%; Solvent B: MeCN/TFA vol/vol 0.1%; flow 20 mL min^{-1} ; linear gradient A/B: from 50:50 to 10:90 in 30 min) and lyophilized. Boc removal was done using TFA/Water (9:1 v/v). Gramicidin S was recovered in 12% yield (39 mg). HPLC analysis was performed on an analytical chromatolith speed rod RP-C18 185 Pm column ($50 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) using a flow rate of 5.0 mL min^{-1} , and gradient from 100:0 to 0:100 eluents A/B over 3 min, in which eluents A= $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ 0.1% and B= $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ 0.1%. Detections were done at 214 and 254 nm using a photodiode array detector. $t_r=2.14 \text{ min}$; LC-MS: (ESI+): m/z (%): 571.4 (100) [$M+2\text{H}$] $^{2+}$, 1141.8 (35) [$M+\text{H}$] $^+$; for NMR data see Tables S14 and S15 in the Supporting Information.

Synthesis of gramicidine S analogue 4

Compound 4 was synthesized according to the general procedure from Boc- β^3 -hAla-OH (1.0 g, 4.99). The backbone-cyclic peptide was assembled on 2-chloro-trityl chloride resin (Novabiochem). Compound 2 (0.25 mmol) was loaded on 2-chloro-tritylchloride resin (800 mg, loading 0.3 mmol g^{-1}) in the presence of *N*-methylmorpholine (NMM, 4 equiv) in CH_2Cl_2 (15 mL). The unreacted sites on the resin were capped by washing with a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{DIPEA}$ (17:2:1) followed by MeOH. Following removal of the Fmoc-group using 20% piperidine in *N*-methyl-2-pyrrolidinone (NMP), chain elongation was performed with Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-(*R*)-ATC 2, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH (1 mmol each, 4 equiv), using 20% piperidine/NMP for Fmoc deprotection, HBTU (4 equiv) for activation, DIPEA as base and NMP as solvent. After completion of the synthesis, the linear peptide was cleaved from the resin with $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{water}$ (1:99 v/v). After removing the solvent, the peptide was cyclized overnight using HBTU (4 equiv) for activation, *N*-methylmorpholine (11 equiv) as base in DMF (30 mL). The solvent was removed under reduced pressure then the protected peptide was purified by preparative HPLC on a Delta Pak, C18 column (15 μm , $40 \times 100 \text{ mm}$; Solvent A: $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ vol/vol 0.1%; Solvent B: MeCN/TFA vol/vol 0.1%; flow 20 mL min^{-1} ; linear gradient A/B: from 50:50 to 10:90 in 30 min) and lyophilized. Boc removal was done using TFA/Water (9:1 v/v). The cyclopeptide 4 was recovered in 16% yield (45 mg). HPLC analysis was performed on an analytical chromatolith speed rod RP-C18 185 Pm column ($50 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) using a flow rate of 5.0 mL min^{-1} , and gradients from 100:0 to 0:100 eluents A/B over 3 min, in which eluents A= $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ 0.1%

and B= $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ 0.1%. Detections were done at 214 and 254 nm using a photodiode array detector. $t_r=1.78 \text{ min}$; LC-MS: (ESI+): m/z (%): 571.4 (100) [$M+2\text{H}$] $^{2+}$, 1141.7 (28) [$M+\text{H}$] $^+$; for NMR data see Tables S14–S15 in the Supporting Information.

NMR experiments

The NMR samples contained 3a or 3b (5 mM) dissolved in $[\text{D}_6]$ DMSO and in $[\text{D}_3]$ MeOH and gramicidine S or 4 (20 mM) dissolved in $[\text{D}_6]$ DMSO. All spectra were recorded on a Bruker Avance III 600 equipped with a 5 mm quadruple-resonance (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P). Homonuclear 2D spectra DQF-COSY, TOCSY, and ROESY were typically recorded in the phase-sensitive mode using the States-TPPI method as data matrices of $256\text{--}512 \text{ real } (t_1) \times 2048 (t_2)$ complex data points; 8–64 scans per t_1 increment with 1.5 s recovery delay and spectral width of 6009 Hz in both dimensions were used. The mixing times were 80 ms for TOCSY and 300 ms spinlock for ROESY experiments. In addition, 2D heteronuclear spectra ^{15}N - ^1H , ^{13}C - ^1H HSQC, and ^{13}C - ^1H HMBC were acquired to fully assign the oligomers (8–128 scans, 256 real $(t_1) \times 2048 (t_2)$ complex data points). Spectra were processed and visualized with Topspin 3.0 (Bruker Biospin) on a Linux Station. The matrices were zero-filled to $1024 (t_1) \times 2048 (t_2)$ points after apodization by shifted sine-square multiplication and linear prediction in the F1 domain. Chemical shifts were referenced to TMS.

Structure calculations

Parameter files for the ornithine residue were taken from the Amber parameter database provided by the Bryce group at the University of Manchester.^[17] The ATC amino acid was built using Sirius,^[18] parameter files were then generated using Antechamber and the R.E.D. server.^[19] Leap was then used to create the topology and coordinate files for 3a, 3b and 4.

^1H chemical shifts were assigned according to classical procedures. NOE cross-peaks were integrated and assigned within the NMRView software.^[20] The volume of a ROE between methylene pair protons was used as a reference of 1.8 Å. The lower bound for all restraints was fixed at 1.8 Å and upper bounds at 2.7, 3.3, and 5.0 Å, for strong, medium, and weak correlations, respectively. Pseudo-atom corrections of the upper bounds were applied for unresolved aromatic, methylene, and methyl protons signals as described previously.^[21] Structure calculations were performed with AMBER 10^[22] in two stages: cooking and simulated annealing (SA) in vacuum. The cooking stage was performed at 500 K to generate 100 initial random structures. SA calculations were carried during 20 ps (20 000 steps, 1 fs long) as described elsewhere. First, the temperature was risen quickly and was maintained at 1000 K for the first 5000 steps, then the system was cooled gradually from 1000 K to 100 K from step 5001 to 18 000 and finally the temperature was brought to 0 K during the 2000 remaining steps. For the 3000 first steps, the force constant of the distance restraints was increased gradually from $2.0 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}$ to $20 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}$. For the rest of the simulation (step 3001 to 20 000), the force constant was kept at $20 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}$. The calculations were launched in vacuum for 3a, 3b, and 4. The 20 lowest energy structures with no violations $>0.3 \text{ \AA}$ were considered as representative of the peptide structure. The representation and quantitative analysis were carried out using Ptraj,^[23] MOLMOL,^[24] and PyMOL.^[25] The 20 lowest energy structures of 3a and 3b peptidomimetics were used for a molecular dynamic simulation during 50 ns in a methanol box (see the MD section).

Molecular dynamic simulations in an explicit solvent box

The lowest energy structures of **3a** and **3b** were immersed in a methanol box with a layer of 10 Å for a molecular dynamic simulation stage of 50 ns using the following protocol. First, a minimization procedure consisting in two stages: 1) The solute was kept fixed while the solvent methanol positions are optimized (10 000 steps) and then 2) the entire system was minimized (2500 steps). 3) The system was then allowed to heat up from 0 to 300 K at constant volume keeping the solute fixed (50 000 steps, that is, 50 ps). 4) The whole system was equilibrated at a constant pressure of 1 atm and at 300 K over 50 000 steps (50 ps). 5) Molecular dynamic simulations were finally performed at 300 K and 1 atm during 50 ns (time steps of 0.1 fs). NMR inter-residues restraints were applied during the entire runs (Tables S11 and S12 in the Supporting Information).

DFT calculations

From MD simulations in methanol, compound **3a** underwent a transition after 1.5 ns from a twist-turn structure to a reverse-turn structure stabilized by a bifurcated C_{9/12} pseudocycle. However, the reverse-turn structure did not provide any characteristic NOE correlation probed by NMR experiments. So, the twist-turn and reverse-turn structures were reoptimized at the B3LYP/6-31G(d) level of theory. Then, the single-point energies of this reverse-turn structure and the twist-turn structure obtained from NMR experiments were calculated at the same level of theory with the conductor-like polarizable continuum model (CPCM)^[8] in methanol. The twist-turn structure was found to be more stable by 3.40 kcal mol⁻¹ than the reverse-turn structure in methanol, which indicates the relative populations of 99.7 and 0.3% for twist- and reverse-turn structures at 298 K, respectively.

The two NMR structures **3a** and **3b** were optimized at the B3LYP/6-31G(d) level of theory. To figure out the relative strength of the C₉ hydrogen bond between the amide hydrogen of the third Ile residue and the carbonyl oxygen of the first Val residue, a natural bond orbital (NBO) analysis was performed for the optimized structures at the B3LYP/6-31+G(d,p) level of theory. The three kinds of properties were compared to understand the relative strength of the hydrogen bond and the calculated results are shown in Table 1. The first values are the natural atomic charges of oxygen (the carbonyl oxygen of the first Val residue) and hydrogen (the amide hydrogen of the third Ile residue). The second value is the Wiberg bond index of the N–H bond of the third Ile residue, which shows the strength of a bond. The third value is the second perturbation energy (ΔE_2) of the lone pair orbitals of the oxygen with the corresponding N–H antibonding orbital, which is called the hyperconjugation due to the charge transfer. We can say that the hydrogen bond is strong when the magnitudes of atomic charges become larger, the Wiberg index becomes smaller, and ΔE_2 becomes larger.

Circular dichroism

Circular dichroism (CD) experiments were carried out using a Jasco J815 spectropolarimeter. The spectra were recorded with of compounds **3a** (0.2 mM), **3b** (0.2 mM) and **4** (0.1 mM) dissolved in MeOH using a 1 mm path length CD cuvette at 20 °C, over a wavelength range of 190–300 nm. Continuous scanning mode was used, with a response of 1.0 s with 0.2 nm steps and a bandwidth of 2 nm. The signal-to-noise ratio was improved by acquiring each spectrum over an average of two scans. The baseline was corrected by subtracting the background from the sample spectrum.

Antimicrobial activities

GS and **4** were dissolved at 1 mg mL⁻¹ in DMSO then successively diluted in the same solvent. DMSO was used as negative control. The antibacterial activities of GS and **4** were monitored by liquid growth inhibition assay performed in microtiter plates. Briefly, a DMSO solution (10 µL) of GS or **4** at different concentrations (ranging from 1 mg mL⁻¹ to 1 µg mL⁻¹; 100 to 0.1 µg mL⁻¹ final concentrations, respectively) was added to a suspension of a mid-logarithmic phase culture of bacteria (90 µL; OD_{620nm} = 0.02) in poor-broth nutrient medium. Cultures were carried out in triplicate and microbial growths were assessed by measuring turbidity at 620 nm after incubation (48 h, 37 °C). The MIC was defined as the lowest concentration of antibiotic where bacterial growth was not detected. The MICs were determined from independent triplicate assays and were based on a serial twofold plus or minus system. To be considered valid, MIC determinations for each of the 3 replicates had to be within plus or minus 1 dilution of each other.

Haemolytic activities

GS and **4** (2 mM) were dissolved in DMSO then successively diluted in the same solvent. The haemolytic activities of GS and **4** were monitored in microtiter plates. PBS (45 µL) and sample (5 µL) were added to a freshly prepared blood solution (50 µL; 5 × 10⁵ erythrocytes per µL). The mixtures were incubated to the 37 °C during 30 min. After the incubation period, erythrocytes were separated by centrifugation (300 g, 10 °C, 10 min). A 50 µL portion of each supernatant was further transferred to a microwell plate to measure the absorbance at 490 nm into a microplate reader. DMSO was used as negative control while SDS (0.1% final concentration) was used for 100% haemolysis.

Acknowledgements

We thank the IBMM, the Laboratoire de Mesure Physique of Montpellier, the CNRS and the University of Montpellier 1 for financial support.

Keywords: amino acids · gramicidin S · hybrid peptide · thiazoles

- [1] a) J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167–339; b) C. M. Wilmot, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 221–232; c) G. D. Rose, L. M. Gierasch, J. A. Smith, *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1–109; d) E. Vass, M. Hollosi, F. Besson, R. Buchet, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1917–1954.
 [2] a) M. D. Seo, H. S. Won, J. H. Kim, T. Mishig-Ochir, B. J. Lee, *Molecules* **2012**, *17*, 12276–12286; b) R. M. Eppard, H. J. Vogel, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1999**, *1462*, 11–28; c) L. T. Nguyen, E. F. Haney, H. J. Vogel, *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 464–472.
 [3] a) Y. J. Chung, L. A. Christianson, H. E. Stanger, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10555–10556; b) D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 1111–1239; c) W. S. Horne, S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1399–1408; d) B. R. Huck, J. D. Fisk, S. H. Gellman, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2607–2610; e) R. S. Roy, P. Balaram, *J. Pept. Res.* **2004**, *63*, 279–289; f) S. Chatterjee, R. S. Roy, P. Balaram, *J. R. Soc. Interface* **2007**, *4*, 587–606; g) K. Basuroy, A. Rajagopal, S. Raghobama, N. Shamala, P. Balaram, *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 1671–1678; h) C. André, B. Legrand, C. Deng, C. Didierjean, G. Pickaert, J. Martinez, M. C. Averlant-Petit, M. Amblard, M. Calmes, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 960–963.
 [4] a) F. Bouillère, S. Thétiot-Laurent, C. Kouklovsky, V. Alezra, *Amino Acids* **2011**, *41*, 687–707; b) A. Trabocchi, E. G. Occhiato, D. Potenza, A. Guarna, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7483–7492; c) S. Aravinda, K. Ananda,

- N. Shamala, P. Balam, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4789–4795; d) E. Mann, H. Kessler, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4567–4570; e) C. Grison, P. Coutrot, S. Geneve, C. Didierjean, M. Marraud, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10753–10764; f) A. Sengupta, S. Aravinda, N. Shamala, K. M. Raja, P. Balam, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4214–4222; g) P. G. Vasudev, K. Ananda, S. Chatterjee, S. Aravinda, N. Shamala, P. Balam, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4039–4048; h) S. Chatterjee, P. G. Vasudev, K. Ananda, S. Raghohama, N. Shamala, P. Balam, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6595–6606; i) S. Chatterjee, P. G. Vasudev, S. Raghohama, C. Ramakrishnan, N. Shamala, P. Balam, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5956–5965; j) S. Thetiot-Laurent, F. Bouillere, J. P. Baltaze, F. Brisset, D. Feytens, C. Kouklovsky, E. Miclet, V. Alezra, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9660–9663; k) S. K. Maji, R. Banerjee, D. Velmurugan, A. Razak, H. K. Fun, A. Banerjee, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 633–639; l) Y. K. Kang, B. J. Byun, *Biopolymers* **2012**, *97*, 1018–1025.
- [5] L. Mathieu, B. Legrand, C. Deng, L. Vezhenkov, E. Wenger, C. Didierjean, M. Amblard, M. C. Averlant-Petit, N. Masurier, V. Lisowski, J. Martinez, L. T. Maillard, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6122–6126; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6006–6010.
- [6] N. H. Andersen, J. W. Neidigh, S. M. Harris, G. M. Lee, Z. Liu, H. Tong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8547–8561.
- [7] a) X. Daura, K. Gademann, H. Schafer, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2393–2404; b) J. Dolenc, J. H. Müsser, M. O. Steinmetz, W. F. van Gunsteren, *J. Biomol. NMR* **2010**, *47*, 221–235; c) J. R. Allison, M. Muller, W. F. van Gunsteren, *Protein Sci.* **2010**, *19*, 2186–2195; d) Z. Gattin, A. Glattli, B. Jaun, W. F. van Gunsteren, *Biopolymers* **2007**, *85*, 318–332.
- [8] V. Barone, M. Cossi, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995–2001.
- [9] Gaussian 03, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
- [10] F. Weinhold in *Encyclopedia of Computational Chemistry, Vol. 3* (Eds.: P. v. R. Schleyer, N. L. Allinger, T. Clark, J. Gasteiger, P. A. Kollman, H. F. Schaefer, III, P. R. Schreiner), John Wiley & Sons, Chichester **1998**, pp. 1792–1811.
- [11] K. B. Wiberg, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 1083.
- [12] L. H. Kondejewski, S. W. Farmer, D. S. Wishart, R. E. Hancock, R. S. Hodges, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1996**, *47*, 460–466.
- [13] E. J. Prenner, R. N. Lewis, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1999**, *1462*, 201–221.
- [14] a) D. C. Hodgkin, B. M. Oughton, *Biochem. J.* **1957**, *65*, 752–756; b) M. Doi, S. Fujita, Y. Katsuya, M. Sasaki, T. Taniguchi, H. Hasegawa, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *395*, 85–93; c) K. Yamada, M. Unno, K. Kobayashi, H. Oku, H. Yamamura, S. Araki, H. Matsumoto, R. Katakai, M. Kawai, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12684–12688; d) M. Kawai, H. Yamamura, R. Tanaka, H. Umemoto, C. Ohmizo, S. Higuchi, T. Katsu, *J. Peptide Res.* **2005**, *65*, 98–104; e) C. Solanas, B. G. de La Torre, M. Fernandez-Reyes, C. M. Santiveri, M. A. Jimenez, L. Rivas, A. I. Jimenez, D. Andreu, C. Catiuela, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4119–4129; f) M. Tamaki, K. Takanashi, T. Harada, K. Fujinuma, M. Shindo, M. Kimura, Y. Uchida, *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 1481–1484; g) M. van der Knaap, L. T. Lageveen, H. J. Busscher, R. Mars-Groenendijk, D. Noort, J. M. Otero, A. L. Llamas-Saiz, M. J. van Raaij, G. A. van der Marel, H. S. Overkleef, M. Overhand, *Chem-MedChem* **2011**, *6*, 840–847; h) J. Xiao, B. Weisblum, P. Wipf, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4731–4734; i) E. Kamysz, B. Mickiewicz, W. Kamysz, S. Bielinska, S. Rodziejewicz-Motowidlo, J. Ciarkowski, *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 211–217; j) V. V. Kapoerchan, E. Spalburg, A. J. de Neeling, R. H. Mars-Groenendijk, D. Noort, J. M. Otero, P. Ferraces-Casais, A. L. Llamas-Saiz, M. J. van Raaij, J. van Doorn, G. A. van der Marel, H. S. Overkleef, M. Overhand, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4259–4265; k) G. M. Grotenbreg, A. E. Buizert, A. L. Llamas-Saiz, E. Spalburg, P. A. van Hooft, A. J. de Neeling, D. Noort, M. J. van Raaij, G. A. van der Marel, H. S. Overkleef, M. Overhand, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7559–7565.
- [15] A. L. Llamas-Saiz, G. M. Grotenbreg, M. Overhand, M. J. van Raaij, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2007**, *63*, 401–407.
- [16] a) L. H. Kondejewski, M. Jelokhani-Niaraki, S. W. Farmer, B. Lix, C. M. Kay, B. D. Sykes, R. E. Hancock, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 13181–13192; b) C. McInnes, L. H. Kondejewski, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14287–14294.
- [17] <http://www.pharmacy.manchester.ac.uk/bryce/amber/>.
- [18] <http://www.ngbw.org/sirius/>.
- [19] E. Vanquelef, S. Simon, G. Marquant, E. Garcia, G. Klimerak, J. C. Delepine, P. Cieplak, F.-Y. Dupradeau, *Nucl. Acids Res.* **2011**, *39*, W511–W517.
- [20] B. A. Johnson, R. A. Blevins, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 603–614.
- [21] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley-Interscience, New York, **1986**.
- [22] AMBER 10, D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham, III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, M. Crowley, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossvary, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, D. H. Mathews, M. G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, P. A. Kollman, University of California, San Francisco, **2008**.
- [23] D. R. Roe and T. E. Cheatham, *J. Chem. Theory Comput.*, **2013**, *9*, 3084–3095.
- [24] R. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 51–55.
- [25] Delano Scientific, <http://www.pymol.org/>

Received: February 14, 2014

Published online on March 25, 2014

VII Intérêt des hélices d'ATCs dans le développement d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine

Nous avons vu en introduction que les interactions entre protéines constituent un point de contrôle et de régulation crucial pour une majorité de processus cellulaires et sont à ce titre des cibles biologiques particulièrement attractives. Cependant, le développement d'inhibiteurs puissants hautement spécifiques et de taille modérée est actuellement un véritable défi dû au fait que les interfaces entre protéines sont, dans de nombreux cas, de larges surfaces relativement planes et hydrophobes. Les foldamères pourraient constituer une solution viable pour la reconnaissance de ces interfaces. C'est dans ce cadre qu'à partir des connaissances acquises sur les structures tridimensionnelles d'oligomères contenant un ou plusieurs motifs ATCs, nous avons entrepris un programme autour de l'inhibition de l'interaction entre la protéine NCoA-1 et son partenaire STAT6.

VII.1 Contexte

L'étiopathologie de l'asthme fait intervenir de multiples facteurs dont le principal est une réaction immunitaire immédiate de type antigène-IgE, s'accompagnant de la libération de médiateurs bronchoconstricteurs et pro-inflammatoires. La réaction allergique est déclenchée en réponse à un contact avec un allergène qui, après présentation aux différentes cellules du système immunitaire, induit une libération massive des interleukines 4 et 13 (IL-4 et IL-13) par les lymphocytes T « helpers » (Th). Entre autres actions, l'IL-4 est responsable de l'activation des lymphocytes B et de la production d'immunoglobulines de classe E (IgE).²⁰⁵ Le couple de protéines STAT6-NCoA-1 est impliqué dans la cascade de signalisation de l'interleukine 4 (IL4).

Lors de la liaison de l'IL-4 à son récepteur, une cascade de phosphorylation impliquant les JAK kinases aboutit à l'activation d'un facteur de transcription spécifique nommé STAT6. (*Signal Transducer and Activator of Transcription 6*). La protéine STAT6 phosphorylée dimérise et transloque dans le compartiment nucléaire pour se fixer sur l'ADN au niveau de régions régulatrices de l'expression génique. Pour initier la transcription, STAT6 interagit avec NCoA-1, aussi appelé co-activateur-1 de récepteur d'hormone stéroïde (SRC-1), qui recrute ensuite une série de facteurs auxiliaires ainsi que l'ARN polymérase. Il avait été proposé que l'interaction STAT6-NCoA-1 puisse être une cible thérapeutique pertinente pour le traitement de l'asthme allergique.

Chez l'homme, STAT6 est une protéine modulaire de 847 amino acides dont la masse est de 94 kDa. Elle comporte plusieurs domaines impliqués dans la liaison à l'ADN, la dimérisation et le recrutement de NCoA-1. (*Figure 95*)



Figure 95 Description de l'organisation de la protéine STAT-6. CC : domaine « coiled-coil », DBD : domaine de liaison à l'ADN, SH2 (SRC-homology 2) : domaine de dimérisation, TAD : domaine de trans-activation impliqué dans le recrutement de NCoA-1

La structure cristallographique du complexe STAT6 (794-814)-NCoA-1 a été publiée en 2004 par Razeto et coll.²⁰⁶ Elle montre que la séquence d'interaction STAT6 (794-814), bien que non structurée en solution, s'organise en une hélice α amphipathique au contact du domaine PAS-B de la protéine NCoA-1. Ces travaux et ceux de Litterst²⁰⁷ suggéraient que la reconnaissance était essentiellement gouvernée par une séquence consensus LXXLL (802-806) dans la région C-terminale du domaine de transactivation de STAT6. De tels motifs, aussi appelés « nuclear receptor box » (NR box) sont connus pour être impliqués dans de nombreuses interactions protéine-protéine. Une étude systématique des processus de reconnaissance entre STAT6 et NCoA-1 a été publiée en 2008 par le groupe du Prof. J. Robinson²⁰⁸ qui a identifié, au travers d'un scan alanine de la séquence STAT6 794-814, les rôles essentiels des résidus Leu 794, Pro 797, Leu 802 et Leu 806. Ces deux derniers résidus appartiennent à la séquence consensus LXXLL.²⁰⁶ (*Figure 96*)

STAT6 794-814

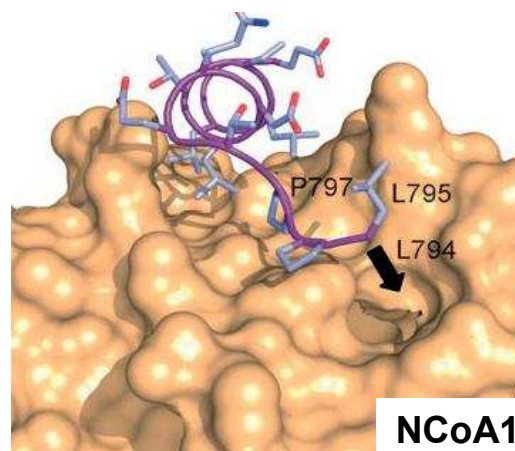


Figure 96 Structuration hélicoïdale de la séquence STAT6 794-814 lors de son interaction avec NCoA-1 (structure cristallographique pdb 1OJ5)

Nous nous sommes proposés de cibler l'interaction STAT6-NCoA-1 par deux séries d'oligomères, le premier constitué uniquement d'ATCs, le second combinant une extrémité α -peptidique en N-terminale et un poly-ATC du côté C-terminal. Ce projet est réalisé en collaboration avec le groupe du Prof. J. Robinson, qui nous a fourni l'ensemble des constructions et des clones pour la production de la protéine NCoA-1.

VII.2 Production de la protéine

Le protocole a consisté à cultiver la souche bactérienne *E. coli BL21-(DE3)pLysS* transformée avec le plasmide pOCI845 contenant un gène synthétique codant le domaine de NCoA-1 compris entre les résidus 257 à 385. Le gène comporte également une séquence codant pour un hexa-His-tag situé à l'extrémité N-terminale de la protéine et un site de coupure spécifique de la TEV protéase. Après une pré-culture sur 10 mL de milieu LB, la culture est poursuivie en fermenteur, à 37°C en présence de deux antibiotiques, l'ampicilline et le chloramphénicol. La production de NCoA-1 est déclenchée par addition d'IPTG, 3 L de culture fournissant environ 50 g de bactéries.

Les essais de purification de NCoA-1 ont ensuite été réalisés en utilisant comme point de départ la méthode développée par Markus Seitz et al.²⁰⁸ Celle-ci a toutefois dû être optimisée à la suite de nombreux problèmes de précipitation de la protéine. Typiquement, à l'issue de la culture, les cellules sont centrifugées puis remises en suspension dans un tampon de lyse (TRIS 50 mM, NaCl 300 mM, β -mercaptoéthanol 2 mM, 1 pastille de cocktail antiprotéase RocheTM, pH 7,0) avant d'être lysées par sonication. Après centrifugation et élimination du culot insoluble, le surnageant est chargé sur une colonne de nickel (Ni-NTA) sélective de la séquence poly-histidine insérée dans la construction du côté N-terminal (Hi-tag). La phase est lavée par un tampon phosphate en présence d'un gradient d'imidazole (20 à 200 mM) afin d'éliminer les protéines fixées de manière non-spécifique. La protéine His-tag NCoA-1 est finalement éluée par 300 mM d'imidazole. Après dessalage sur une colonne HiPrep 26/10 (chromatographie d'exclusion stérique) dans un tampon composé de 50 mM TRIS, 300 mM NaCl, 2 mM BME, pH 7,0 le tag His₆ est clivé en 2 h 30 par la TEV protéase à 22°C. Une dernière étape de purification par gel filtration permet d'obtenir le domaine NCoA-1 257-385 dans le tampon HEPES (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, pH 7,4) avec une pureté suffisante pour envisager des expériences d'interaction. Les diverses étapes du protocole de purification ont été suivies par électrophorèse avec révélation au bleu de Coomassie. (**Figure 97**)

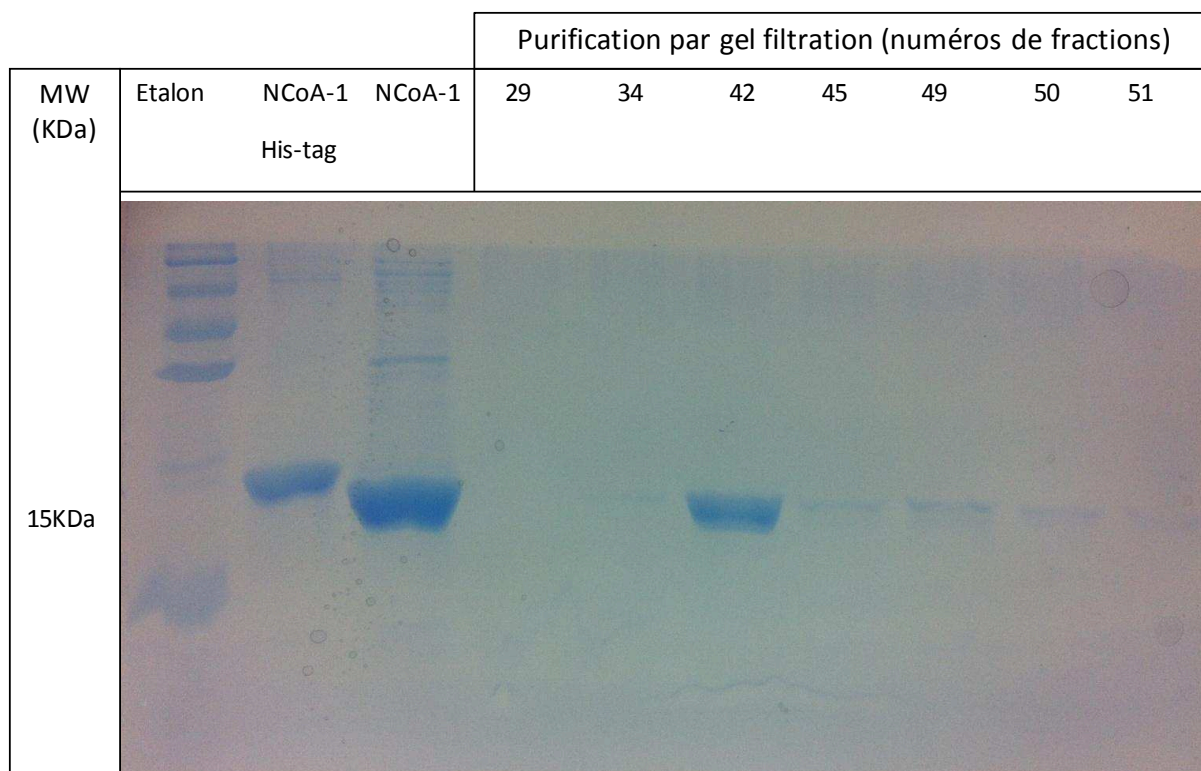


Figure 97 Gel d'électrophorèse ; étapes de purification de NCoA-1 His-tag, clivage du His-tag et suivi de la purification finale de NCoA-1

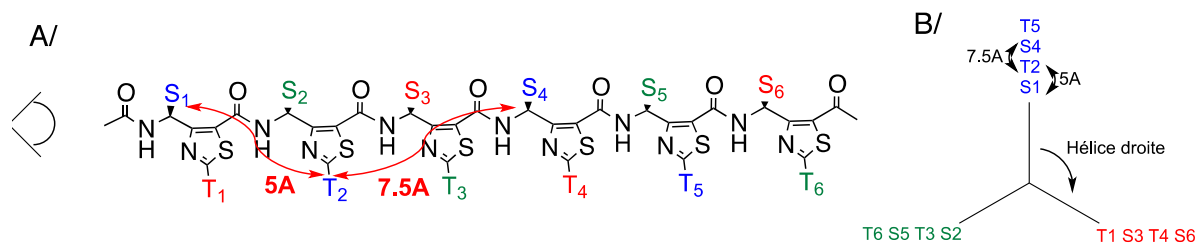
VII.3 Conception d'un analogue de STAT6

Afin de développer des inhibiteurs d'interaction du couple STAT6-NCoA-1, nous avons envisagé de développer des analogues de la séquence minimale d'interaction (15 résidus), STAT6 794-808. Ces quelques résidus forment une hélice- α amphipathique capable d'interagir spécifiquement avec NCoA-1 au sein d'une gouttière hydrophobe. Les oligomères d'ATCs adoptant une topologie hélicoïdale pourrait servir de mime d'hélice α . C'est ce que nous avons commencé à explorer durant les derniers mois de ma thèse. Nous avons notamment réalisé le design d'une première génération d'oligomères d'ATCs et d'une séquence hybride $(\alpha\text{-peptides})_7 / (\text{ATC})_3$.

VII.3.a Design d'un oligomère d'ATCs

L'analyse des structures des oligomères d'ATCs montre que sur une même face de l'hélice, les chaînes latérales sont réparties régulièrement tous les 5 et 7,5 Å. Ces chaînes sont portées par le C γ du résidu 1 (noté S₁), par le thiazole du résidu 2 (noté T₂) et par le C γ du résidu 4 (noté S₄). (*Figure 98, a) et b*) Partant de ce constat, nous avons entrepris de mimer, au sein d'une face d'un oligomère, les éléments de reconnaissance de STAT6 pour NCoA-1 que sont

les résidus Leu 794, 802 et 806 et Pro 797. Nous avons cherché à intégrer sur la séquence d'ATCs des substituants en positions S₁, T₂, S₄, T₅ et S₆ afin de reproduire les distances entre les résidus clés au sein de la séquence de STAT6. (**Figure 98, c**)



C/ Séquence STAT6 794-814: 794-LLPTEQDLTKLLE-808

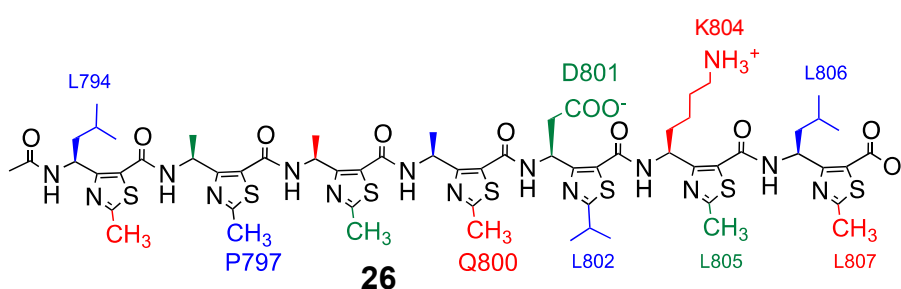


Figure 98 a) et b) Répartition des chaînes latérales le long d'un oligomère d'ATCs. Les chaînes latérales d'une même couleur se trouvent sur la même face de l'hélice. **c)** Conception de l'oligomère 25 analogue de la séquence STAT6 794-808. Les chaînes en bleu miment les chaînes latérales des résidus Leu 794, 802 et 806 et Pro 797

Une séquence hybride α/γ a également été conçue en conservant le trimère d'ATCs en position C-terminale auquel a été ajouté l'heptapeptide LLPTEQ, porté par STAT6. (**Figure 99**)

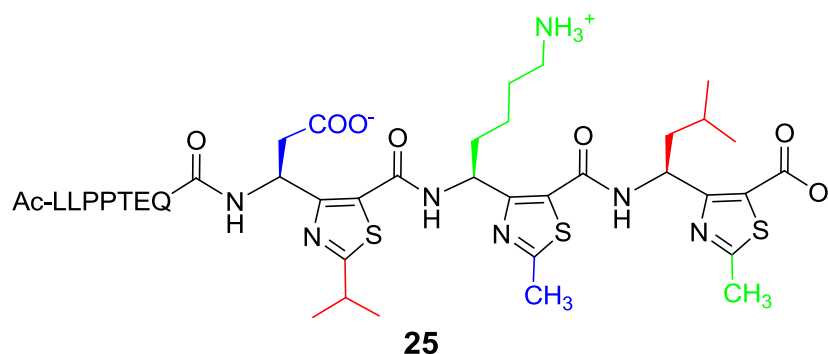


Figure 99 Séquence hybride 26 $\alpha\gamma$

Nous pensons que l'introduction d'un fragment α -peptidique, plus flexible qu'un oligomère d'ATCs, pourrait engendrer une meilleure interaction avec la gouttière hydrophobe de NCoA-1.

La séquence α/γ **25** et le γ -heptapeptide **26** ont été synthétisés en phase solide sur résine Wang *via* une stratégie Fmoc. (**Schéma 6**) La première étape consistait à charger le premier ATC sur la résine par estérification en présence de DIC et de DMAP. Les résidus suivants ont été couplés en utilisant l'EDCI en présence de HOBt et d'un excès de DIEA. Le clivage par un cocktail composé de TFA/TIS/eau (95:2.5:2.5) a conduit aux composés **25** et **26**. Après purification par HPLC préparative, les deux séquences ont été analysées par LC-MS (ESI+). Les rendements après purification s'élèvent à respectivement 7 et 5%.

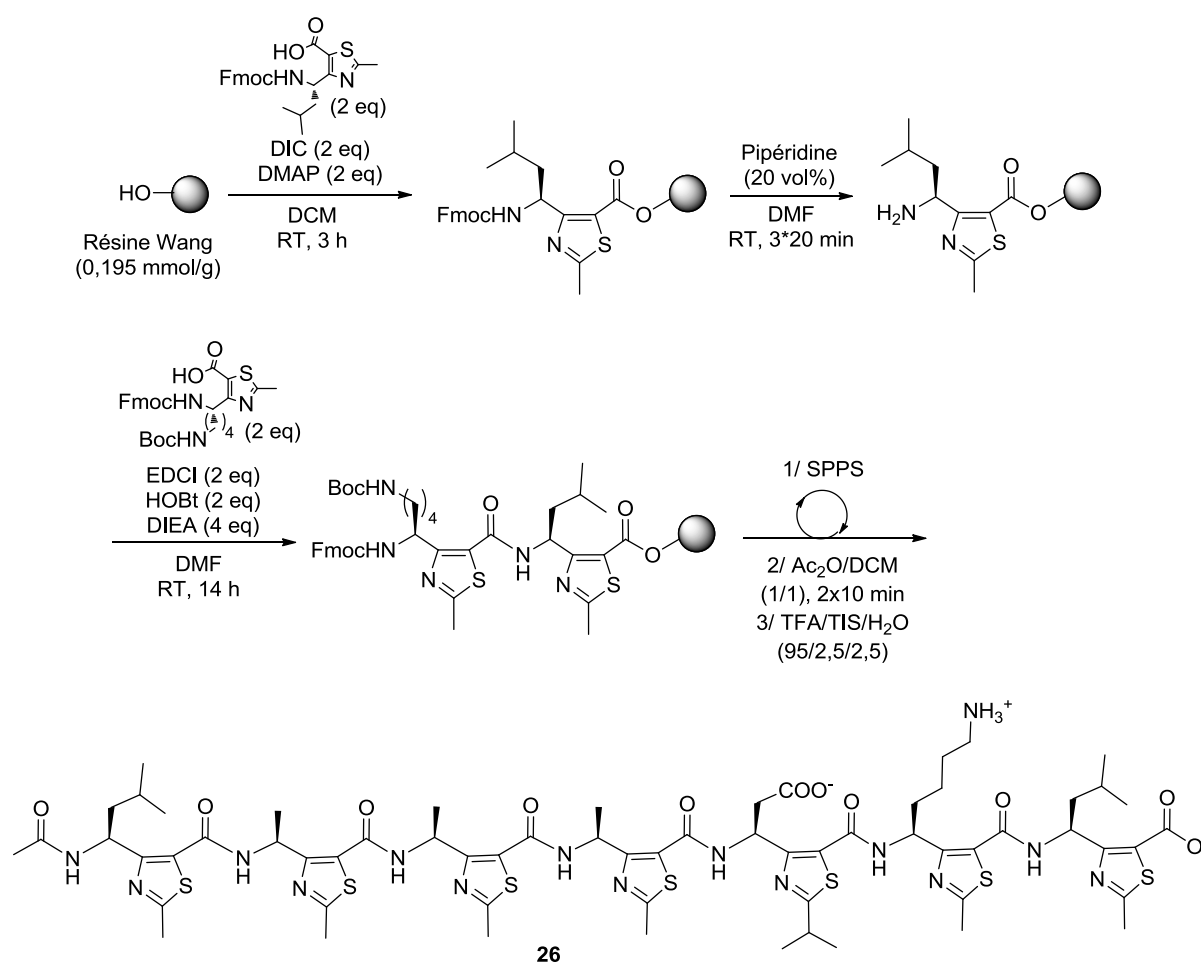


Schéma 6 Synthèse des séquences candidates **25** et **26** (illustration avec le composé **26**)

VII.4 Evaluation de l'interaction par mesure de polarisation de fluorescence

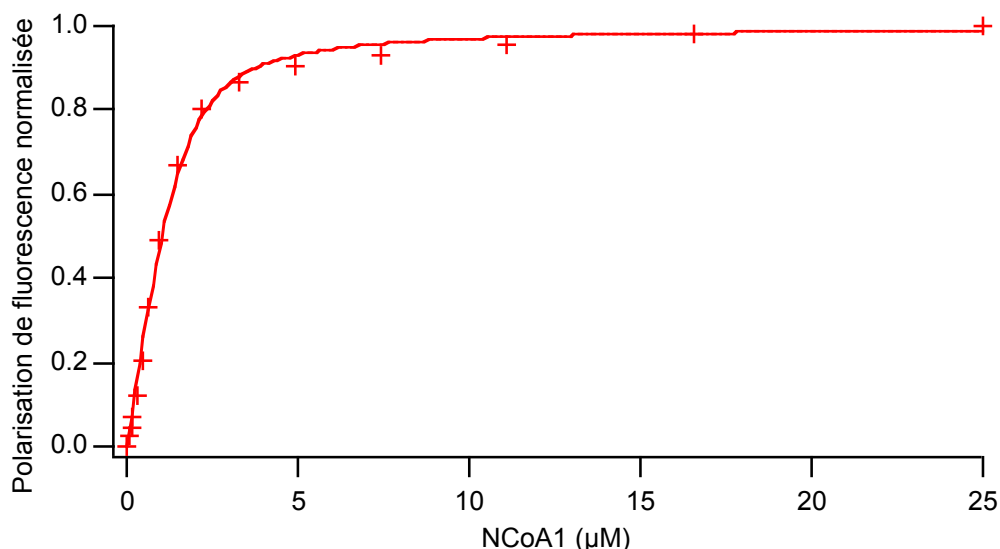
Nous avons mis en place au laboratoire le test de compétition par polarisation de fluorescence décrit par Seitz permettant d'évaluer les activités des séquences **25** et **26** vis-à-vis de NCoA-1.²⁰⁸ Pour cela, nous avons synthétisé la sonde fluorescente, analogue du peptide STAT6 794-814, marqué en position N-terminale par un motif carboxyfluorescéine (*séquence* : Fluorescéine-LLPTEQDLTKLLLEGQGESG, notée FluoSTAT6). Dans un test de polarisation de fluorescence, l'échantillon contenant la protéine et la sonde est irradié par une lumière polarisée. La mesure de la polarisation de l'émission de fluorescence est proportionnelle à la fraction de sonde en interaction avec la protéine. Il est alors possible d'estimer l'affinité de l'interaction protéine/sonde et/ou de réaliser des tests en compétition. La constante de dissociation (K_D) peut être ensuite être calculée à partir de la concentration inhibitrice 50 (IC_{50}) *via* la relation de Cheng-Prusoff généralisée par Nikolovska-Coleska et coll.²⁰⁹

Dans un premier temps, l'activité de NCoA-1 a été évaluée en estimant l'affinité de son interaction avec la sonde FluoSTAT6. Expérimentalement, la sonde dont la concentration est gardée constante à 1 μ M a été dosée par des quantités croissantes de NCoA-1 (de 56 nM à 24,6 μ M). (**Graphique 1**) La constante d'affinité a été mesurée à 476 nM, une valeur du même ordre de grandeur que celle décrite dans la littérature. L'ajustement a été réalisé en utilisant l'**Equation 6** :

$$B = \frac{1}{2[R_t]} \left[(L_t + R_t + K_D) - \sqrt{(L_t + R_t + K_D)^2 - (4L_tR_t)} \right]$$

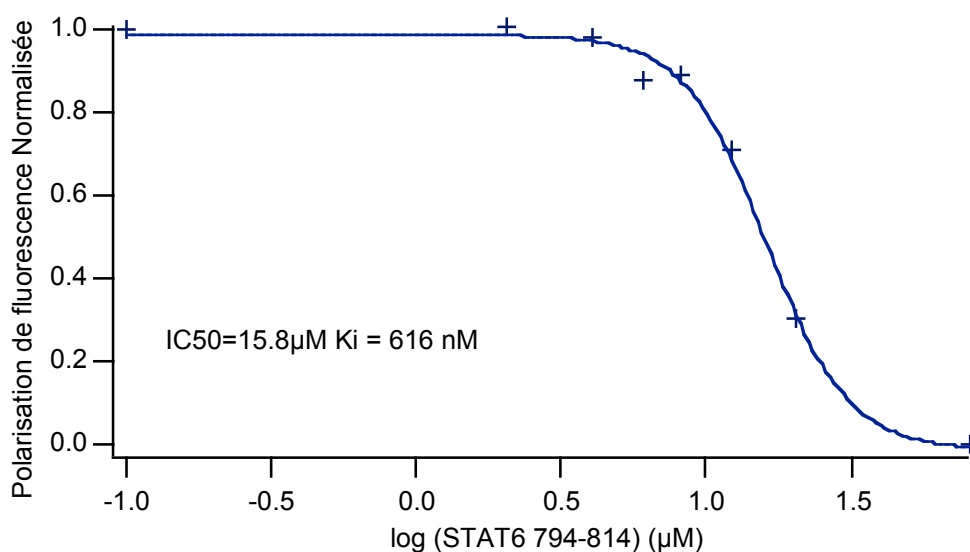
Equation 6 Ajustement de la constante K_D

dans laquelle B représente la fraction de la sonde liée à la protéine, et L_t et R_t les concentrations totales en protéine et en sonde. K_D est la constante de dissociation du complexe.²⁰⁹



Graphique 1 Titration de FluoSTAT6 (1 µM) par des concentrations croissantes de NCoA-1 (56 nM-24,6 µM). L'affinité de l'interaction K_D est de 476 nM

Pour valider le test, nous avons ensuite réalisé un test de compétition entre FluoSTAT6 et le peptide froid STAT6 794-814. Les concentrations de la sonde et de NCoA-1 ont été fixées respectivement à 1 µM et 5 µM. (**Graphique 2**) L'affinité du peptide froid a été calculée à partir de la valeur d' IC_{50} en utilisant l'équation de Cheng-Prusoff généralisée par Nikolovska-Coleska et coll.²⁰⁹ Le K_i , estimé à 616 nM, est du même ordre de grandeur que celui du peptide sonde. Les écarts d'affinité par rapport à la littérature (facteur 2) peuvent s'expliquer par le fait que peut-être 50% seulement de la protéine NCoA-1 était fonctionnelle (cette hypothèse sera vérifiée sous peu).



Graphique 2 Expérience de déplacement de FluoSTAT6 (1 µM) par des concentrations croissantes de STAT6 794-814 (0-100 µM). La concentration de NCoA-1 a été fixée à 5 µM. La constante d'inhibition K_i est de 616 nM.

Les deux séquences **25** et **26** ont été évaluées sur NCoA-1 (5 μM) par compétition avec la sonde Fluo-STAT6 (1 μM). Cependant aucun déplacement de la sonde n'a été mis en évidence aux concentrations testées (de 0 à 1 000 μM).

VII.5 Conclusions et perspectives sur le développement d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine

Le mode d'interaction de la protéine NCoA-1 et du peptide STAT6 constitue un modèle intéressant pour étudier la possibilité de concevoir des inhibiteurs d'interaction protéine-protéine à partir de séquences comportant des ATCs. L'utilisation et l'adaptation du protocole de production et de purification de NCoA-1 a permis d'obtenir des fractions ayant une concentration en protéine suffisante pour réaliser les tests de polarisation de fluorescence. Ce test a été validé par mesure de l'affinité de l'interaction NCoA-1-STAT6. La conception des deux séquences d'interaction **25** et **26** a été réalisée à partir de la structure cristalline du complexe NCoA-1-STAT6 en tentant de mimer la séquence minimale d'interaction par des oligomères d'ATCs. La synthèse sur phase solide a permis d'obtenir deux séquences d'intérêt. Cependant actuellement aucune des deux séquences n'a montré de capacité d'inhibition de l'interaction STAT6-NCoA-1. Ces candidats sont en cours d'analyse structurale par RMN afin de vérifier leur arrangement tridimensionnel en solution. A l'issue de ces expériences, la conformation exacte des candidats testés sera connue. Ainsi, de nouvelles séquences γ -ATC pures et hybrides α/γ -ATC feront l'objet d'une conception plus minutieuse afin de mesurer l'intérêt des foldamères d'ATCs dans l'inhibition d'interaction protéine-protéine. Enfin, un suivi par microcalorimétrie permettrait de vérifier la bonne fixation des séquences candidates sur NCoA-1.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'étude théorique prédictive de Baldauf nous a permis de concevoir et de développer une nouvelle famille de γ -amino acides hétérocycliques contraints, les ATCs (acides 4-Amino-(méthyl)-1,3-Thiazole-5-Carboxyliques). La rigidité structurale engendrée par l'introduction d'un noyau thiazole entre les liaisons C α -C β a permis de limiter la flexibilité du bloc ATC en réduisant la valeur de l'angle ζ à 0°. Les deux voies de synthèse, la première mettant en œuvre la réaction de Büchner-Curtius-Schlotterbeck et sa version optimisée utilisant la réaction croisée de Claisen, se sont avérées compatibles avec l'introduction d'une large variété de chaînes latérales au niveau des deux points de diversification des ATCs.

Deux séries d'oligomères, i.e. dimères, tétramères et hexamères, solubles dans les solvants organiques halogénés, les alcools et l'eau ont été obtenues par couplage peptidique. La conformation adoptée par ces oligomères a été déterminée en solution par RMN 1D et 2D associées à des techniques de modélisation sous contraintes. Ces études ont permis de montrer que les tétramères et hexamères s'arrangeaient en hélices 3_9 droites, présentant un pas de 11,8 Å, stabilisées par un réseau de liaisons hydrogène de type CO(*i*)...NH(*i*+2) s'établissant tout au long de la séquence, faisant entrer les oligomères d'ATCs dans le monde des foldamères. Les substituants se répartissent régulièrement à 60° autour de l'axe hélicoïdal. Cette conformation a été confirmée à l'état solide par diffraction des rayons X sur un tétramère. Une étude par dichroïsme circulaire en fonction de la température et du pH, a mis en avant leur remarquable stabilité conformationnelle.

Dans une troisième partie, nous avons évalué l'influence conformationnelle que pouvait générer l'introduction d'un ATC de configuration (*R*) et (*S*) au sein d'une courte séquence peptidique linéaire. Les expériences RMN associées à la modélisation sous contraintes ont montré un arrangement des deux peptides hybrides $\alpha\gamma\alpha\alpha$ sous la forme de mimes de coude en solution, « twist-turn » pour la stéréochimie (*S*) et « reverse-turn » pour la (*R*). Cette structuration est la conséquence de l'établissement d'une liaison hydrogène formant un pseudo-cycle à 9 chaînons, similaire à ceux observés au sein d'oligomères d'ATCs. Ces résultats ont été confirmés par des simulations de dynamique moléculaire et des calculs théoriques en fonctionnelle de densité. Afin de valoriser et de mettre en avant l'intérêt du monomère ATC pour la conception de mimes de coude, nous avons conçu un analogue fonctionnel de la gramicidine S, un cyclodécapeptide symétrique antibactérien, en remplaçant l'enchaînement D -Phe-Pro par un (*R*)-ATC dérivé de la phénylalanine. Les analyses RMN associées à la modélisation sous contraintes ont montré que le squelette de l'analogue

conservait la conformation de la gramicidine S grâce à l'établissement de 4 liaisons hydrogène. L'intérêt thérapeutique de l'analogue a été confirmé par mesure de son activité antibactérienne sur 5 souches Gram + et Gram - ; celle-ci s'est avérée du même ordre de grandeur que celle de la gramicidine de référence tout en étant 6 fois moins hémotoxique.

A partir des connaissances acquises quant à la structure tridimensionnelle des oligomères d'ATCs, nous avons cherché à vérifier, dans une quatrième partie, l'intérêt thérapeutique des oligomères γ -ATC purs et hybrides α/γ -ATC en tant qu'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine. Le modèle choisi reposait sur le système NCoA-1-STAT6. La protéine NCoA-1 a été produite et purifiée selon un protocole décrit dans la littérature que nous avons été amené à optimiser. Le test de polarisation de fluorescence a tout d'abord été validé par mesure de l'affinité de l'interaction NCoA-1-STAT6 avant d'être utilisé pour l'évaluation des deux séquences d'intérêt. Les résultats ont indiqué une absence d'interaction avec la cible aux concentrations testées. De ce fait, de nouvelles séquences sont actuellement en cours de synthèse.

PARTIE EXPERIMENTALE

Sont reproduits dans la partie expérimentale les « Supporting Information » associées aux articles publiés et dont les copies ont été intégrées paragraphes *V* et *VI* du chapitre **II**. Les produits sont numérotés tels que dans les articles afin de conserver une nomenclature homogène entre l'article et son « Supporting Information ». La partie expérimentale relative au paragraphe *IV* est décrite à la fin de l'article inséré dans ce même paragraphe.

Les expériences relatives au paragraphe *VII* sur la conception d'inhibiteurs de l'interaction STAT6-NCoA-1 figurent à la fin de cette partie expérimentale.

Les travaux ayant donné lieu à la publication des trois articles scientifiques présentés dans la partie « **Résultats et discussions** » ont été menés par une équipe composée :

- Des Docteurs Baptiste LEGRAND, Marie-Christine AVERLANT-PETIT et Cheng DENG ainsi que d'Aurélien LEBRUN, chargés des analyses RMN,
- D'Emmanuel WENGER et du Docteur Claude DIDIERJEAN, chargés des analyses RX,
- Du Professeur Young Kee Kang, chargé des calculs DFT,
- Du Docteur Séverine ZIRAH, chargé de l'évaluation biologique de l'analogue de la gramicidine S,
- Du Docteur Ludovic MAILLARD, chargé de la supervision du projet « Foldamères » et de l'écriture des articles,
- Des Docteurs Nicolas MASURIER, Muriel AMBLARD ainsi que des Professeurs Vincent LISOWSKI et Jean MARTINEZ, chargés de l'optimisation, la validation et de la correction des articles,
- De Clément BONNEL, Soahary ANDRIAMANARIVO et du Docteur Lubomir VEZENKOV, chargés de différentes synthèses de synthons,
- Du Docteur Loïc MATHIEU, chargé de la production de synthons ATCs, de la mise au point de la seconde voie de synthèse des ATCs, de l'exemplification de cette nouvelle voie, de la synthèse des oligomères ainsi que de la production de la protéine NCoA-1 et du fragment STAT6.

Synthèse et étude structurale d'oligomères d'ATCs

Supporting Information

© Wiley-VCH 2013

69451 Weinheim, Germany

Helical Oligomers of Thiazole-Based γ -Amino Acids: Synthesis and Structural Studies**

*Loïc Mathieu, Baptiste Legrand, Cheng Deng, Lubomir Vezenkov, Emmanuel Wenger, Claude Didierjean, Muriel Amblard, Marie-Christine Averlant-Petit, Nicolas Masurier, Vincent Lisowski, Jean Martinez, and Ludovic T. Maillard**

anie_201302106_sm_miscellaneous_information.pdf

I. General experimental section	4
II. General procedure for synthesis of compounds 4	5
Benzyl (4S)-4-(N-Fmoc)-amino-3-oxopentanoate.....	5
Benzyl (4S)-4-(N-Fmoc)-amino-3-oxo-5-phenylpentanoate.....	5
Benzyl (4S)-4-(N-Fmoc)-amino-6-methyl-3-oxoheptanoate.....	6
Benzyl (4S)-4-(N-Fmoc)-amino-8-[(tert-butyloxycarbonyl)amino]-3-oxooctanoate	6
Benzyl 3-oxo-3- [(2S)-(N-Fmoc)-pyrrolidin-yl]-propanoate.....	7
III. General procedure for synthesis of compounds 6	8
Benzyl 4-[(1S)-1-(N-Fmoc)-aminoethyl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate 6a.....	8
Benzyl 4-[(1S)-1-(N-Fmoc)-amino-2-phenethyl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate 6b	
.....	8
Benzyl 4-[(1S)-1-(N-Fmoc)-amino-3-methylbutyl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate	
6c.....	9
Benzyl 4- {(1S)-1-(N-Fmoc)-amino-[(tert-butoxycarbonyl)amino]pentyl}-2-methyl-1,3-	
thiazole-5-carboxylate 6d.....	9
Benzyl 2-amino-4-[(1S)-1-(N-Fmoc)-amino-3-methylbutyl]-1,3-thiazole-5-carboxylate	
6e.....	10
Benzyl 4-[(1S)-1-(N-Fmoc)-amino-3-methylbutyl]-2-phenyl-1,3-thiazole-5-carboxylate	
6f.....	10
Benzyl 2-methyl-4-[(2S)-(N-Fmoc)-pyrrolidin-2-yl]-1,3-thiazole-5-carboxylate 6g.....	10
IV. Synthesis of oligomers 2, 3a-3f	12
General procedure 1: hydrogenolysis of O-benzylesters.....	12
General procedure 2: Fmoc deprotection	12
General procedure 3: peptide coupling of ATC building blocks	12
General procedure 4: peptide coupling of ATC-ATC building blocks.....	12
Synthesis of compound 2:	13
Synthesis of compound 3a:.....	13
Synthesis of compound 3b:.....	13
Synthesis of compound 3c.....	13
Synthesis of compound 3d:.....	15
Synthesis of compound 3e:	16
Synthesis of compound 3f:.....	17
V. NMR and molecular modeling studies	18
Figure S1: Nomenclature and torsion angles description.....	19
Tables S1-S6: ¹ H, ¹³ C and ¹⁵ N NMR chemical shifts for 2, 3a and 3b in CDCl ₃ (nd: not	
determined).....	20
Table S1-S2: ¹ H, ¹⁵ N and ¹³ C NMR chemical shifts for 2 in CDCl ₃ at 293 K.....	20

Tables S7-S18: ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR chemical shifts for 3d, 3e and 3f in CD₃OH and H₂O/D₂O, pH 6.5(nd: not determined)	23
Table S7-S8: ¹ H, ¹⁵ N and ¹³ C NMR chemical shifts for 3d in CD ₃ OH at 298 K.....	23
Table S9-S10: ¹ H, ¹⁵ N and ¹³ C NMR chemical shifts for 3d in H ₂ O/D ₂ O, pH 6.5 at 278 K.....	23
Table S11-S12: ¹ H, ¹⁵ N and ¹³ C NMR chemical shifts for 3e in CD ₃ OH at 298 K.....	24
Table S13-S14: ¹ H, ¹⁵ N and ¹³ C NMR chemical shifts for 3e in H ₂ O/D ₂ O, pH 6.5 at 278 K.....	24
Table S15-S16: ¹ H, ¹⁵ N and ¹³ C NMR chemical shifts for 3f in CD ₃ OH at 308 K.....	25
Table S17-S18: ¹ H, ¹⁵ N and ¹³ C NMR chemical shifts 3f in H ₂ O/D ₂ O, pH 6.5 at 278 K.....	25
Table S19: Coupling Constants ³J(NH, ^γCH) of 2, 3a, 3b, 3d, 3e and 3f at 298 K (in Hz). Values were measured in CDCl₃ for 2, 3a and 3b, and in CD₃OH and H₂O/D₂O(pH 6.5) for water-soluble compounds 3d, 3e and 3f.	26
Figure S2: ¹H NMR spectra of the compounds 2, 3a and 3b at 293 K in CDCl₃.	27
Figure S3: ¹H NMR spectra of the compounds 3d, 3e and 3f at 298 K in CD₃OH.	28
Figure S4: ¹H NMR spectra of the compounds 3d, 3e and 3f at 278 K in water, pH 6.5. ..	29
Table S20-S22: Inter-residue NOEs unambiguously assigned in the ROESY spectra of 2, 3a, and 3b.	30
- Table S20: Inter-residue NOEs correlations observed in the ROESY spectrum of dimers 2 in CDCl ₃ at 293 K (black), 3d in methanol at 298 K (green) and in water, pH 6.5 at 278 K (blue).....	30
- Table S21: Inter-residue NOEs correlations observed in the ROESY spectrum of tetramers 3a in CDCl ₃ at 293 K (black), 3e in methanol at 298 K (green) and in water, pH 6.5 at 278 K (blue).....	30
- Table S22: Inter-residue NOEs correlations observed in the ROESY spectrum of hexamers 3b in CDCl ₃ at 288 K (black), 3f in methanol at 308 K (green) and in water, pH 6.5 at 278 K (blue).....	30
Figure S5: Superimposition on the backbone heavy atoms of the 20 lowest energy NMR solution structures of 2, 3a, 3b in CDCl₃ (in orange) and 3d, 3e, 3f in H₂O/D₂O (in blue). H atoms and for 3d, 3e, and 3f, the C-terminal moieties are omitted.	31
Table S23: Root Mean Square Deviations (RMSD, Å) of the 20 lowest energy NMR structures of 2, 3a, 3b in CD₃Cl.	32
Table S24: Root Mean Square Deviations (RMSD, Å) of the 20 lowest energy NMR structures of 3d, 3e, 3f in H₂O/D₂O, pH 6,5.	32
VI. Crystallographic data	33
Figure S6: X-ray crystal structure of compound 6b.....	34
Table S25: Selected crystallographic data for 6b and 3c.....	34
Figure S7: Stereoview of a part of the crystal packing of 3c.....	35
VII. Structure parameters of 2, 3a, 3b and 3c	36
Table S26: Backbone dihedral angles (°) of 2, 3a, 3b NMR structures in CDCl ₃ , 3e, 3f and 3d in H ₂ O/D ₂ O and 3c XRD structure. Values are ordered from C to N and are average on the 20 lowest energy NMR structures.....	36
Table S27: Hydrogen bonding pattern statistical analysis on NMR and XRD structures (d _{0-N} < 3.5 Å and N-H-O angle > 120°).....	37
VIII. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra	39
Figure S8: ¹ H-NMR and ¹³ C-NMR spectra of N-Fmoc Benzyl (4S)-4-amino-3-oxopentanoate.....	39
Figure S9: ¹ H-NMR and ¹³ C-NMR spectra of N-Fmoc Benzyl (4S)-4-amino-3-oxo-phenylpentanoate.....	40
Figure S10: ¹ H-NMR and ¹³ C-NMR spectra of N-Fmoc Benzyl (4S)-4-amino-6-methyl-3-oxoheptanoate.....	41
Figure S11: ¹ H-NMR and ¹³ C-NMR spectra of N-Fmoc Benzyl (4S)-4-amino-8[(tert-butylloxycarbonyl)amino]3-oxooctanoate.....	42

Figure S12: ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of N-Fmoc Benzyl 3-oxo-3- [(2S)-pyrrolidin-yl]-propanoate	43
Figure S13: ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of Compound 6a	44
Figure S14: ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of Compound 6b	46
Figure S15: ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of Compound 6c	47
Figure S16: ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of Compound 6d	48
Figure S17: ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of Compound 6e	49
Figure S18: ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of Compound 6f	50
Figure S19: ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of Compound 6g	51
Figure S20: ^{13}C -NMR spectra of Compound 2	52
Figure S21: ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of Compound 8	53
Figure S22: ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of Compound 10	54

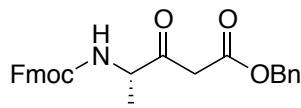
I. General experimental section

Commercially available reagents and solvents were used without any further purification. Reactions were monitored by HPLC using an analytical Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm column (50x4.6 mm, 5 μ m) using a flow rate of 5.0 mL/min, and gradients from 100/0 to 0/100 eluents A/B over 3 min, in which eluents A=H₂O / TFA 0.1% and B=CH₃CN / TFA 0.1%. Detection was done at 214 nm and 254 nm using a Photodiode Array Detector. Retention times are reported as follows: Tr (min). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at room temperature in deuterated solvents. Chemical shifts (δ) are given in parts per million relative to TMS or relative to the solvent [¹H: δ (CDCl₃)=7.24 ppm; ¹³C: δ (CDCl₃)=77.2 ppm]. The following abbreviations are used to designate the signal multiplicities: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), br (broad). Analytical Thin-Layer Chromatography (TLC) was performed using aluminium-backed silica gel plates coated with a 0.2 mm thickness of silica gel or with aluminium oxide 60 F254, neutral. LC-MS spectra (ESI) were recorded on an HPLC using an analytical Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm column (50x4.6 mm, 5 μ m) using a flow rate of 3.0 mL/min, and gradients of 100/0 to 0/100 eluents A/B over 3 min, in which eluents solvent A = H₂O / HCOOH 0.1% and solvent B, CH₃CN / HCOOH 0.1%. High-Resolution Mass Spectrometric analyses were performed with a time-of-flight (TOF) mass spectrometer fitted with an Electrospray Ionisation source (ESI). All measurements were performed in the positive ion mode. Melting points (mp) are uncorrected and were recorded on a capillary melting point apparatus. Enantiomeric excesses were determined by Chiral HPLC analysis using a Chiracel OD-R column (250 mm x 4.6 mm) with H₂O, TFA 0.1% / ACN, TFA 0.1%. (40: 60) as eluent and a flow rate of 1 mL/min.

II. General procedure for synthesis of compounds 4

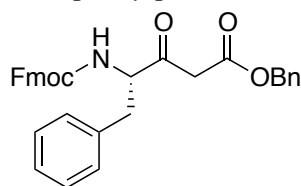
The Fmoc-AA *N*-methoxy-*N*-methylamide (Weinreb amide) was synthesized according to procedure reported by Fehrentz and Castro¹. LiAlH₄ (13.2 mmol) was added in small portions to a solution of Fmoc-AA *N*-methoxy-*N*-methylamide (22.0 mmol) in anhydrous THF (40 ml) under argon at -25 °C. The reaction was monitored by TLC until completion then 1 M KHSO₄ aqueous solution (90 mL) was added dropwise at -25°C to the reaction mixture. The suspension was diluted in 200 mL EtOAc. The organic layer was washed with 2 x 300 mL brine then dried on MgSO₄, filtered and evaporated in vacuo. The aldehyde was promptly engaged in the next step. The crude residue was dissolved in dry DCM (80 mL) then benzyl diazoacetate (26.4 mmol) and SnCl₂ (6.6 mmol) were added in one portion. The reaction mixture was stirred for 1h 30 at 30°C until nitrogen release stopped. After removing DCM under reduced pressure, the crude was diluted in EtOAc (150 mL), washed with 2 x 200 mL 1M KHSO₄ and 1 x 200 ml water, dried on MgSO₄, filtered and evaporated. The crude mixture was purified by chromatography on silica gel.

Benzyl (4S)-4-(N-Fmoc)-amino-3-oxopentanoate



White solid. Yield: 46 % (4.47 g). Mp: 67-69°C. $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = -1.1^\circ$ (c 2.00, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ ppm 1.35 (3H, d, J = 7.0 Hz); 3.55 (2H, s); 4.18 (1H, t, J = 7.0 Hz); 4.41 - 4.45 (3H, m); 5.16 (2H, d, J = 4.0 Hz); 5.36 (1H, d, J = 7.0 Hz); 7.30 (9H, m); 7.55 (2H, d, J = 7.5 Hz); 7.74 (2H, d, J = 7.5 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ ppm 17.3; 46.0; 47.4; 56.0; 67.1; 67.6; 120.2 (2C); 125.2; 125.3; 127.3 (2C); 127.8 (2C); 128.6 (2C); 128.7; 128.8 (2C); 135.3; 141.5 (2C); 143.9 (2C); 155.9; 166.7; 201.9. LC Tr = 1.91 min. LC-MS: (ESI+): m/z 444.2 ([M+H]⁺) 100%, 466.2 ([M+Na]⁺) 10%. HRMS (ESI+) m/z calcd. for [C₂₇H₂₆NO₅]⁺: [M+H]⁺ 444.1811, found 444.1812. FT-IR: ν_{max} (cm⁻¹) 3311, 3037, 1716, 1684, 1531, 1450, 1240, 739.

Benzyl (4S)-4-(N-Fmoc)-amino-3-oxo-5-phenylpentanoate

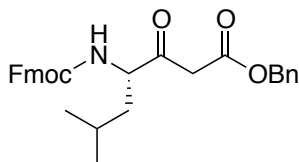


White solid. Yield: 56% (6.39 g). Mp: 86 to 89°C. $[\alpha]_D^{22^\circ\text{C}} = -7.5^\circ$ (c 1.92, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ ppm 3.00 (1H, dd, J = 14 Hz, J = 6.5 Hz); 3.14 (1H, dd, J = 14 Hz, J = 6.5 Hz); 3.49 (1H, AB, J = 14 Hz); 3.51 (1H, AB, J = 14 Hz); 4.19 (1H, t, J = 6.5 Hz); 4.42 (2H, t, J = 6.5 Hz); 4.64 (1H, q, J = 6.5 Hz); 5.17-5.25 (3H, m); 7.13 (1H, m); 7.27-7.44 (13H, m); 7.52 (2H, t, J = 7.0 Hz); 7.77 (2H, d, J = 7.0 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ ppm 36.9; 46.9; 47.2; 60.9; 66.9; 67.3; 120.0 (2C); 125.0 (2C); 127.1 (2C); 127.2 (2C); 127.8 (2C); 128.5; 128.6 (2C); 128.7; 128.8 (2C); 129.3 (2C); 135.0; 135.7; 141.3 (2C); 143.6 (2C); 155.7; 166.5; 201.2. LC

¹ Fehrentz, J. A.; Castro, B. *Synthesis* 1983, 676–678.

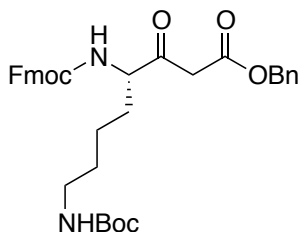
Tr = 2.24 min. LC-MS (ESI): m/z = 520.1 ($[M+H]^+$). HMRS (ESI+) m/z calcd. for $[C_{33}H_{30}NO_5]^+$: $[M+H]^+$ 520.2124 found 520.2119. FT-IR: $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$ 3322, 1737, 1714, 1693, 1532, 1538, 1449, 1259, 1104, 1085, 1031, 757, 735, 700.

Benzyl (4S)-4-(N-Fmoc)-amino-6-methyl-3-oxoheptanoate



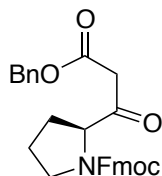
Gel. Yield: 39% (4.80 g). $[\alpha]_D^{22^\circ\text{C}} = +11.8^\circ$ (c 1.92, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ ppm 0.95 (3H, d, J = 6.0 Hz); 0.97 (3H, d, J = 6.0 Hz); 1.42 (1H, m); 1.66 (2H, m); 3.57 (1H, AB, J = 8.0 Hz); 3.59 (1H, AB, J = 8.0 Hz); 4.24 (1H, m); 4.45-4.52 (3H, m); 5.18 (1H, d, J = 7.0 Hz); 5.20 (2H, s); 7.34-7.45 (9H, m); 7.53 (2H, dd, J = 4.5 Hz, J = 7.0 Hz); 7.80 (2H, d, J = 7.5 Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ ppm 21.6; 23.4; 24.9; 40.0; 46.4; 47.5; 58.8; 67.0; 67.5; 120.2 (2C); 125.1; 125.2; 127.3 (2C); 127.9 (2C); 128.6 (2C); 128.7; 128.8 (2C); 135.3; 141.5 (2C); 144.0 (2C); 156.2; 166.8; 202.5. LC Tr = 2.23 min. LC-MS: (ESI+) m/z = 486.1 ($[M+H]^+$) 100%, 508.1 ($[m+\text{Na}]^+$) 10%. HMRS (ESI+) m/z calcd. for $[C_{30}H_{32}NO_5]^+$: $[M+H]^+$ 486.2280, found 486.2294. FT-IR: $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$ 3355, 3067, 2956, 2871, 1737, 1714, 1515, 1450, 1318, 1247, 1216, 1151, 1116, 1042, 995, 758, 737, 697.

Benzyl (4S)-4-(N-Fmoc)-amino-8-[(tert-butyloxycarbonyl)amino]-3-oxooctanoate



Gel. Yield: 25% (2.67 g). $[\alpha]_D^{22^\circ\text{C}} = -0.68^\circ$ (c 2.0, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ ppm 1.22-1.50 (4H, m); 1.41 (9H, s); 1.57 (1H, m); 1.86 (1H, m); 3.05 (2H, m); 3.53 (2H, AB, J = 4.0 Hz); 4.18 (1H, t, J = 7.0 Hz); 4.43-4.55 (4H, m); 5.15 (2H, m); 5.47 (1H, m); 7.29-7.39 (9H, m); 7.57 (2H, d, J = 7.0 Hz); 7.74 (2H, d, J = 7.0 Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ ppm 22.3; 28.6 (3C); 29.8; 30.4; 41.5; 46.3; 47.4; 60.6; 67.1; 67.5; 79.5; 120.2 (2C); 125.25 (2C); 127.3 (2C); 127.9 (2C); 128.6 (2C); 128.7; 128.8 (2C); 135.3; 141.5 (2C); 143.9 (2C); 156.3; 156.3; 166.75; 201.8. LC Tr = 2.18 min. LC-MS: (ESI+) m/z = 601.0 ($[M+H]^+$) 100%, 623.1 ($[m+\text{Na}]^+$) 10%. HMRS (ESI+) m/z calcd. for $[C_{35}H_{41}N_2O_7]^+$: $[M+H]^+$ 601.2914, found 601.2920. FT-IR: $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$ 3355, 2975, 2947, 2880, 1742, 1720, 1683, 1524, 1479, 1454, 1329, 1236, 1165, 1056, 1024, 869, 777, 731, 697.

Benzyl 3-oxo-3-[(2S)-(N-Fmoc)-pyrrolidin-yl]-propanoate

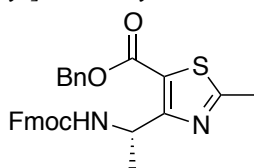


Gel. Yield: 31 % (3.20 g). $[\alpha]_D^{30^\circ} = -33.5^\circ$ (c 2.15, CHCl_3). Mixture of two major conformers. ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ ppm 1.74-2.05 (4H, m); 3.07 (0.8H, s); 3.46 (2H, m); 3.58 (1.2H, s); 4.11-4.53 (4H, m); 5.07 (0.8H, s); 5.16 (1.2H, s); 7.24-7.36 (9H, m); 7.48 (1H, m); 7.58 (1H, m); 7.69-7.76 (2H, m). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ ppm 23.6; 24.6; 28.7; 29.7; 45.5; 46.9; 47.0; 47.5; 65.1; 65.6; 67.0; 67.3; 67.5; 67.7; 120.2; 124.8; 124.9; 125.2; 125.3; 127.3 (2C); 127.4; 127.9; 128.6 (2C); 128.8 (2C); 135.6; 141.6; 144.0; 144.1; 154.5; 155.4; 166.8; 167.1; 201.9; 202.4. LC Tr = 1.97 min (90%) and 2.15 min (10%). LC-MS: (ESI +) $m/z = 470.2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 100%. FT-IR: ν_{max} (cm^{-1}) 2954, 2883, 1695, 1450, 1415, 1348, 1247, 1184, 1116, 1084, 987, 757, 738, 697.

III. General procedure for synthesis of compounds 6

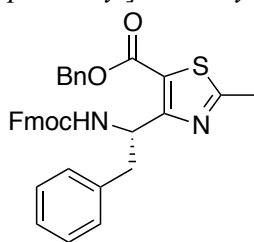
A solution of SO_2Cl_2 (2.6 mmol) in dry DCM (4 mL) was added dropwise to a solution of **4** (2 mmol) in dry DCM (12 mL) at 0°C . After 30 min stirring at 0°C , the mixture was reached to room temperature while the stirring was maintained 30 min more. Chlorination reaction was monitored by reverse phase HPLC and by TLC. After solvent removing, the crude was solubilized in a solution of thioamide or thiourea (5 equiv.) in absolute ethanol (4 mL) and stirred at 40°C overnight. The solvent was removed in vacuo and the crude was dissolved in DCM and washed 5 times with 1M KHSO_4 . The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated. The crude mixture was purified by chromatography on silica gel.

Benzyl 4-[(1S)-1-(N-Fmoc)-aminoethyl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate 6a



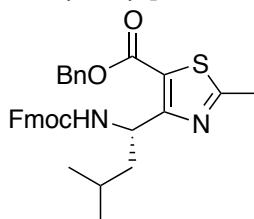
(S)-6a: White solid. Yield: 84% (840 mg). Mp: $49\text{-}51^\circ\text{C}$. ee: 92%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ\text{C}} = +4.9^\circ$ (c 1.95 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ ppm 1.47 (3H, d, $J = 9.0$ Hz); 2.69 (3H, s); 4.20 (1H, t, $J = 6.0$ Hz); 4.33 (2H, d, $J = 6.0$ Hz); 5.31 (2H, s); 5.74 (1H, q, $J = 6.0$ Hz); 6.35 (1H, d, $J = 9.0$ Hz); 7.31 (9H, m); 7.58 (2H, d, $J = 6.0$ Hz); 7.74 (2H, d, $J = 6.0$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ ppm 19.6; 21.0; 46.6; 47.4; 67.0; 67.3; 120.1 (2C); 121.4; 125.4 (2C); 127.2 (2C); 127.8 (2C); 128.4 (2C); 128.6; 128.8 (2C); 135.5; 141.5 (2C); 144.2; 144.3; 155.7; 161.2; 163.8; 170.6. LC Tr = 2.02 min. LC-MS: (ESI +) $m/z = 499.2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 100%. HRMS calcd for $[\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}]^+$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 499.1692, found 499.1693. FT-IR: ν_{max} (cm^{-1}) 2975, 1707, 1498, 1448, 1312, 1244, 1073, 740. **(R)-6a**: Yield: 86%. ee: 98%. $[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ\text{C}} -4.9^\circ$ (c 2.08, CHCl_3).

Benzyl 4-[(1S)-1-(N-Fmoc)-amino-2-phenethyl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate 6b



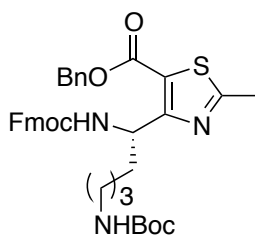
White solid. Yield: 92% (1.37 g). Mp: $156\text{-}158^\circ\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ\text{C}} = +7.0^\circ$ (c 2.08, CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ ppm 2.67 (3H, s); 3.05 (2H, t, $J = 6.0$ Hz); 4.10 (2H, m); 4.36 (2H, m); 5.25 (2H, s); 5.87 (1H, d, $J = 9.0$ Hz); 5.95 (1H, m); 7.02-7.37 (13H, m); 7.52 (2H, q, $J = 8.0$ Hz); 7.74 (2H, d, $J = 8.0$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz): δ ppm 19.5; 42.0; 47.2; 51.4; 66.8; 67.2; 119.9 (3C); 125.2; 125.3; 126.5; 127.0 (2C); 127.6 (2C); 128.2 (2C); 128.4 (2C); 128.5; 128.7 (2C); 129.4 (2C); 135.3; 137.0; 141.2 (2C); 144.0 (2C); 155.7; 161.0; 161.8; 170.1. LC Tr = 2.45 min. LC-MS: (ESI+) $m/z = 575.1$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 100%, 609.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 10%. HRMS calcd for $[\text{C}_{35}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}]^+$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 575.2005, found 575.1995. FT-IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3325; 1702; 1542; 1516; 1450; 1278; 1257; 1232; 1201; 1178; 1145; 1086; 1074; 1041; 1016; 985; 757; 739; 727; 700.

Benzyl 4-[(1S)-1-(N-Fmoc)-amino-3-methylbutyl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate 6c



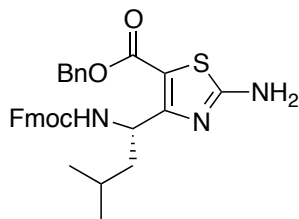
Pale yellow solid. Yield: 50% (541 mg). Mp: 80.0-81.2 °C. $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = +3.6$ (c 1.0, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm 0.94 (3H, d, $J = 8.0$ Hz); 0.96 (3H, d, $J = 8.0$ Hz); 1.54 (1H, m); 1.66-1.72 (2H, m); 2.69 (3H, s); 4.22 (1H, t, $J = 7$ Hz); 4.36 (2H, m); 5.34 (2H, s); 5.77 (2H, s); 7.27-7.44 (9H, m); 7.60 (2H, t, $J = 7.0$ Hz); 7.76 (2H, d, $J = 7.0$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ ppm 19.5; 21.9; 23.4; 25.1; 45.2; 47.4; 48.9; 66.8; 67.3; 120.0 (2C); 121.7; 125.3 (2C); 127.1 (2C); 127.7 (2C); 128.5 (2C); 128.6; 128.8 (2C); 135.4; 141.4 (2C); 144.1; 144.2; 156.0; 161.2; 163.6; 170.4. LC Tr = 2.13 min. LC-MS: (ESI+) $m/z = 520.2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$). HRMS calcd for $[\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}]^+$: $[\text{M}+\text{H}]^+ 541.2161$, found 541.2164. FT-IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3320, 2955, 1695, 1614, 1496, 1450, 1371, 1253, 1175, 1042, 758, 739.

Benzyl 4-[(1S)-1-(N-Fmoc)-amino-[(tert-butoxycarbonyl)amino]pentyl]-2-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylate 6d



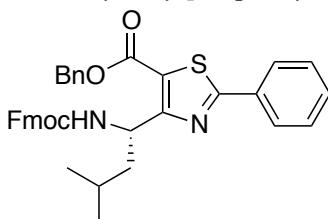
Pale yellow solid. Yield: 74 % (970 mg). Mp: 46.2-47.0 °C. $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = -0.6$ (c 1.0, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm 1.26 (2H, m); 1.35-1.55 (11H, m); 1.77 (2H, m); 2.69 (3H, s); 3.05 (2H, m); 4.22 (1H, m); 4.38 (2H, m); 4.53 (1H, s); 5.33 (2H, m); 5.65 (1H, m); 5.86 (1H, m); 7.23-7.48 (5H, m); 7.30 (2H, m); 7.41 (2H, m); 7.60 (2H, m); 7.76 (2H, d, $J = 7$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ ppm 19.5; 23.1; 27.0; 28.6 (3C); 35.8; 40.5; 47.4; 50.1; 66.9; 67.4; 77.4; 120.1 (2C); 121.9; 125.3 (2C); 127.1 (2C); 127.8 (2C); 128.5 (2C); 128.6; 128.8 (2C); 135.4; 141.4 (2C); 144.1; 144.2; 156.1 (2C); 161.2; 162.8; 170.6. LC Tr = 2.18 min. LC-MS: (ESI+) $m/z = 656.2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 100%, 678.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$). HRMS calcd for $[\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}]^+$: $[\text{M}+\text{H}]^+ 656.2794$, found 656.2791. FT-IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3347, 3065, 2931, 1701, 1506, 1450, 1365, 1321, 1243, 1167, 1075, 867, 758, 739, 697.

Benzyl 2-amino-4-[(1S)-1-(N-Fmoc)-amino-3-methylbutyl]-1,3-thiazole-5-carboxylate 6e



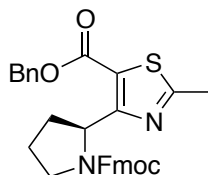
Pale yellow solid. Yield 65% (705 mg). Mp 80.0-81.2 °C. $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = -6.4$ (c 1.00, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm 0.91 (6H, d, $J = 7.0$ Hz); 1.50 (1H, m); 1.64-1.70 (2H, m); 2.1 (2H, br); 4.22 (1H, t, $J = 7.0$ Hz); 4.36 (2H, m); 5.28 (2H, s); 5.53 (1H, m); 6.01 (1H, d, $J = 7.5$ Hz); 7.27-7.43 (9H, m); 7.60 (2H, t, $J = 7.0$ Hz); 7.74 (2H, d, $J = 7.0$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ ppm 21.8; 23.3; 25.0; 44.3; 47.4; 48.9; 66.9; 67.0; 120.1 (2C); 121.8; 125.4 (2C); 127.2 (2C); 127.8 (2C); 128.4 (2C); 128.5; 128.7 (2C); 135.7; 141.4 (2C); 144.1; 144.2; 156.2; 161.4; 163.4; 170.1. LC Tr = 2.11 min. LC-MS: (ESI+) $m/z = 542.1$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 100%, 564.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 10%. HRMS calcd for $[\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}]^+$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 542.2126, found 542.2114. FT-IR: ν_{max} (cm^{-1}) 3320, 2955, 1695, 1614, 1496, 1450, 1371, 1253, 1175, 1042, 758, 739.

Benzyl 4-[(1S)-1-(N-Fmoc)-amino-3-methylbutyl]-2-phenyl-1,3-thiazole-5-carboxylate 6f



Pale yellow solid. Yield: 68% (819 mg). Mp: 120.8-122.1 °C. $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = -44.2$ (c 1.00, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm 0.95 (3H, d, $J = 7.5$ Hz); 0.97 (3H, d, $J = 7.5$ Hz); 1.63 (1H, m); 1.71 (2H, m); 4.23 (1H, t, $J = 7$ Hz); 4.39 (2H, d, $J = 7$ Hz); 5.38 (2H, s); 5.84 (2H, s); 7.34-7.59 (14H, m); 7.74 (2H, dd, $J = 7.0$ Hz, $J = 2.0$ Hz); 7.99 (2H, dd, $J = 7.0$ Hz, $J = 2.0$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ ppm 21.8; 23.2; 25.0; 45.2; 47.3; 49.0; 66.6; 67.3; 115.0; 119.9 (2C); 121.4; 125.2 (2C); 127.0 (2C); 127.6 (2C); 128.4 (2C); 128.5; 128.7 (2C); 129.1; 131.3 (2C); 132.7 (2C); 135.3; 141.3 (2C); 144.0; 144.1; 155.9; 161.2; 164.6; 171.1. LC Tr = 2.75 min. LC-MS: (ESI+) $m/z = 603.2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 100%, 625.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) 10%. HRMS calcd for $[\text{C}_{37}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}]^+$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 603.2318, found 603.2308. FT-IR ν_{max} (cm^{-1}): 3322, 3065, 2954, 1699, 1495, 1450, 1427, 1369, 1318, 1247, 1216, 1072, 1044, 756, 737, 686.

Benzyl 2-methyl-4-[(2S)-(N-Fmoc)-pyrrolidin-2-yl]-1,3-thiazole-5-carboxylate 6g



White solid. Yield: 77% (802 mg). $[\alpha]_D^{30^\circ\text{C}} = +5.3^\circ$ (c 1.95, CHCl_3). Mixture of 2 major conformers in a 1 to 1 ratio. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ ppm 1.74-1.95 (3H, m); 2.31-2.37 (1H, m); 2.60 (1.5H, s); 2.66 (1.5H, s);

3.63-3.67 (1H, m); 3.75-3.81 (0.5H, m); 3.89-3.93 (0.5H, m); 4.14-4.26 (2H, m); 4.33-4.38 (1H, m); 5.21 (1H, s); 5.29 (1H, s); 5.67 (0.5H, dd, J = 8.5 Hz, J = 3.0 Hz); 5.76 (0.5H, dd, J = 8.0 Hz, J = 3.0 Hz); 7.08-7.37 (9H, m); 7.59 (1H, d, J = 7.5 Hz); 7.66 (2H, m); 7.74 (1H, d, J = 7.5 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ ppm 19.5, 19.6, 23.3, 24.5, 32.9, 34.0, 47.3, 47.6, 56.1, 56.3, 67.0, 67.1, 67.2, 119.9, 120.0, 120.6, 121.4, 124.8, 125.2, 125.5, 126.9, 127.0, 127.5, 127.6, 128.1, 128.2, 128.4, 128.6, 135.4, 135.5, 141.1, 141.2, 141.3, 141.4, 144.1, 144.3, 144.4, 154.8, 154.9, 161.2, 161.3, 164.4, 165.6, 169.7, 170.0. LC: Tr = 2.04 min (94%) and 2.12 min (6%). LC-MS: (ESI +) m/z = 525.2 ([M+H]⁺) 100%, 547.3 ([M+Na]⁺). HR-MS calc. for [C₃₁H₂₉N₂O₄S]⁺: [M+H]⁺ 525.1769, found 525.1856. FT-IR ν_{max} (cm⁻¹): 3749, 2952, 2880, 1697, 1525, 1497, 1449, 1414, 1347, 1327, 1248, 1185, 1084, 1030, 990, 909, 871, 787, 757, 738, 696.

IV. Synthesis of oligomers 2, 3a-3f

General procedure 1: hydrogenolysis of O-benzylesters

Pd / BaSO₄ 5% ww (525 mg; 20 mol%) was dispersed into a solution of *O*-benzylester (1.23 mmol) in 30 mL THF and 12.5 mL EtOH. The mixture was degassed and saturated with hydrogen. After 2h of vigorous stirring at 30°C, HPLC monitoring showed 50% conversion. The catalyst was removed by filtration through a Celite pad with DCM as eluent. After evaporation in vacuo, a second cycle of hydrogenolysis was performed. After removing of catalyst by filtration through Celite with DCM as eluent, the evaporation of filtrate afforded the desired product which was used without any further purification.

General procedure 2: Fmoc deprotection

Fmoc derivative (1.23 mmol) was solubilized in 25 mL of diethylamine / DMF (1:9 vv) and stirred for 30 min at RT. The mixture was concentrated then the crude was purified by chromatography on neutral alumina (DCM, then DCM/EtOH 99:1 vv).

General procedure 3: peptide coupling of ATC building blocks

To a solution of *N*-Fmoc-ATC-OH **1** (0.37 mmol) and NH₂-ATC-OBn **7** (0.37 mmol) in 2.5 ml anhydrous DCM at 0°C, were added EDC (72 μL; 1.1 equiv.) and HOBT (55 mg; 1.1 equiv.). The mixture was stirred 30 min at 0°C then 4 h at RT. The reaction was monitored by TLC (Silica gel; DCM/EtOAc, 9:1 vv). Solvent was removed in vacuo. The crude was purified by chromatography on silica gel.

General procedure 4: peptide coupling of ATC-ATC building blocks

To a solution of *N*-Fmoc-ATC-ATC-OH (0.32 mmol, 1.2 eq) and NH₂-ATC-ATC-OBn (169 mg, 0.26 mmol) in 3 ml anhydrous DCM at 0°C, were added EDC (46 μL; 1.0 equiv.) and HOBT (35 mg; 1 equiv.). The mixture was stirred 30 min at 0°C then 4 h at RT. The reaction was monitored by TLC until completion (Silica gel; DCM/EtOAc, 9:1 vv). Solvent was removed in vacuo. The crude mixture was purified by chromatography on silica gel

Synthesis of compound **2**:

compound **2** was synthesized from **6a** (0.37 mmol) and **6b** (0.37 mmol). **6a** and **6b** were unprotected according to general procedures 1 and 2 respectively. Peptide coupling was done according to general procedure 3. After purification by chromatography on silica gel (Eluent: DCM / EtOAc 9:1 then 7:3 v/v), **2** was recovered as a white solid. Yield: 72% (198 mg). LC Tr = 2.49 min. LC-MS: (ESI+) $m/z = 743.1$ ($[M+H]^+$). HRMS calcd for $[C_{42}H_{39}N_4O_5S_2]^+$: $[M+H]^+$ 743.2347, found 743.2352. 1H NMR spectrum of **2** in $CDCl_3$ at 293 K: Figure S2; 1H NMR, ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts of **2** in $CDCl_3$ at 293 K: Table S1 and S2; Coupling Constants $^3J(NH, ^\gamma CH)$ in $CDCl_3$: Table S19; NOE correlations observed in the ROESY spectrum in $CDCl_3$ at 293 K: Table S20.

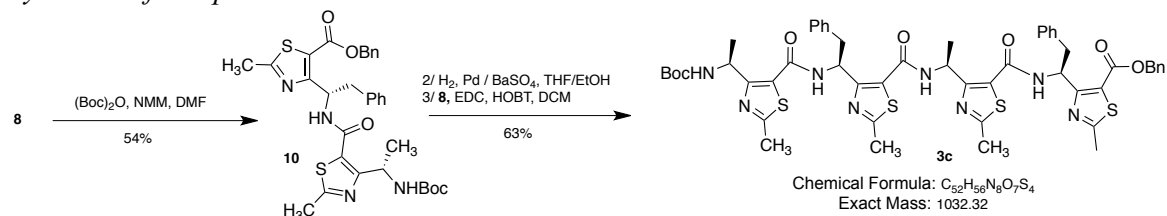
Synthesis of compound **3a**:

3a was synthesized from **2**. **2** was unprotected according to general procedures 1 and 2 to yield **8** and **9** respectively. **8** (165 mg, 0.32 mmol, 1.2 eq) and **9** (169 mg, 0.26 mmol) were coupled according to general procedure 4. **3a** was recovered as a white solid. Yield: 72% (216 mg). 1H NMR spectrum of **3a** in $CDCl_3$ at 293 K: Figure S2; 1H NMR, ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts for **3a** in $CDCl_3$ at 293 K: Table S3 and S4; Coupling Constants $^3J(NH, ^\gamma CH)$ in $CDCl_3$: Table S19; NOE correlations observed in the ROESY spectrum in $CDCl_3$ at 293 K: Table S21. LC Tr = 2.60 min. LC-MS: (ESI+) $m/z = 1155$ ($[M+H]^+$).

Synthesis of compound **3b**:

3b was synthesized from **2** (95 mg, 128 μ mol) and **3a** (140 mg, 122 μ mol). The Fmoc group at the *N*-term of **2** was removed by aminolysis according to general procedure 2 to yield **8** (95%). **3a** was unprotected by hydrogenolysis according to general procedure 1. Three cycles of reaction were necessary to have complete conversion of the benzylester. The recovered acid was reacted with **8** (122 μ mol, 1 equiv.), EDC (1.1 equiv.) and HOBT (1.1 equiv.) in 2 mL anhydrous DCM at 0°C for 30 min then 4h at RT. The reaction was monitored by TLC (Silica gel; DCM/EtOAc, 7:3 v/v; rf 0.4). Solvent was removed in vacuo. The crude was purified by chromatography on silica gel (Eluent: DCM then DCM / EtOAc 9:1 and 8:2 v/v). Yield 49% (93 mg). 1H NMR spectrum of **3b** in $CDCl_3$ at 293 K: Figure S2; 1H NMR, ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts for **3b** in $CDCl_3$ at 293 K: Table S5 and S6; Coupling Constants $^3J(NH, ^\gamma CH)$ in $CDCl_3$: Table S19; NOE correlations observed in the ROESY spectrum in $CDCl_3$ at 293 K: Table S22. LC Tr = 2.81 min. LC-MS: (ESI+) $m/z = 784$ ($[M+2H]^{2+}$).

Synthesis of compound **3c**

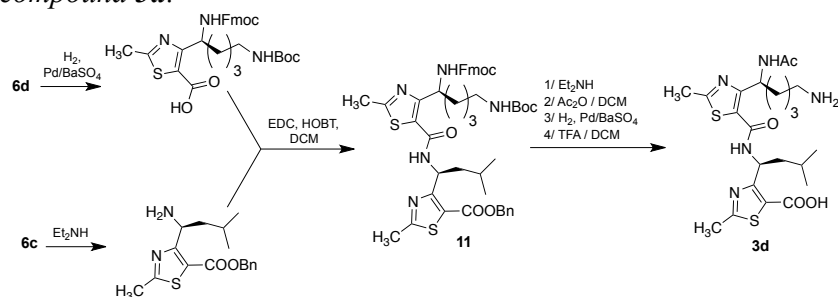


Synthesis of compound **10**: **8** (100 mg, 0.192 mmol, 1 equiv.) and $(Boc)_2O$ (63 mg, 1.5 equiv.) were dissolved in 1 mL DMF. *N*-methylmorpholine (64 μ L, 1.5 equiv.) was added to the reaction mixture. The solution was stirred at RT over night then the solvent was removed in vacuo. The crude was purified by chromatography on silica gel (Eluent: DCM then DCM/EtOAc 9:1 and 8:2 v/v). **10** was isolated as a white solid. Yield: 54% (65 mg). 1H

NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ ppm 1.45 (9H, s); 1.48 (3H, d, $J = 7.0$ Hz); 2.66 (6H, s); 3.14-3.20 (2H, m); 5.32 (2H, s); 5.45 (1H, br); 5.65 (1H, t, $J = 7.0$ Hz); 6.16 (1H, m); 7.16-7.43 (10H, m); 9.46 (1H, d, $J = 5.7$ Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ ppm 18.9, 19.7, 20.9, 28.4 (3C), 40.4, 44.7, 51.9, 67.1, 80.3, 122.3, 126.4, 128.2 (2C), 128.4 (4C), 128.7 (2C), 129.5 (2C), 135.5, 137.8, 156.2, 161.1, 164.0, 169.9 (2C). Four quaternary carbons are missed. LC Tr = 2.22 min. LC-MS: (ESI+) $m/z = 621.1$ ($[M+H]^+$) 100%. HR-MS (ES+) calc. for $[C_{32}H_{37}N_4O_5S_2]^+$: $[M+H]^+$ 621.2205, found 621.2194.

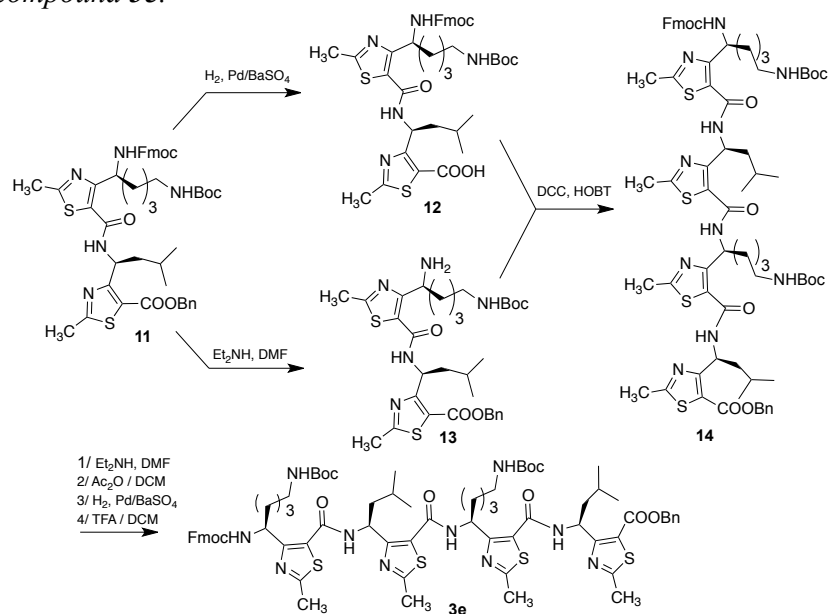
Synthesis of compound **3c**: **10** (36 mg, 68 μ mol) was deprotected by hydrogenolysis according to general procedure 1. The recovered acid was reacted with **8** (35 mg, 68 μ mol, 1 equiv.), EDC (1.1 equiv.) and HOBT (1.1 equiv.) in 1 mL anhydrous DCM 30 min at 0°C then 4h at RT. The reaction was monitored by TLC until completion (alumina gel; DCM/EtOH, 99:1 v/v; rf 0.4). Solvent was removed in vacuo. The crude was purified by chromatography on neutral alumina gel (Eluent: DCM). Yield 69% (48 mg). LC Tr = 2.48 min. LC-MS: (ESI+) $m/z = 1033.3$ ($[M+H]^+$), 467.1 ($[M+2H]^{2+}$). **3c** was crystallized by solvent diffusion of diisopropyl ether into a saturated solution of the oligomer in toluene. Crystallographic data: Figure S7 and Table S25.

Synthesis of compound 3d:



3d was synthesized from **6c** and **6d**. **6c** and **6d** were unprotected according to general procedures 1 and 2 respectively. Peptide coupling was done according to general procedure 3 to yield compound **11**. Removal of *N*-Fmoc protecting group was done according to general procedure 2. *N*-term amine was acetylated with 2 ml Ac₂O/DCM (1:1 v/v) for 1h. The solvent was evaporated then the *O*-benzyl ester protecting group was removed according to general procedure 1. The crude was mixed with TFA/DCM (1:1) for 1h then evaporated. **3d** was recovered as a white solid after precipitation with Et₂O. Overall yield: 64% (35 mg). LC Tr = 1.59 min. LC-MS: (ESI+) *m/z* = 596.3 ([M+H]⁺) 100%, 618.2 ([M+Na]⁺) 10%. ¹H NMR spectrum of **3d** in CD₃OH: Figure S3; ¹H NMR, ¹⁵N and ¹³C NMR chemical shifts for **3d** in CD₃OH at 298 K: Table S7 and S8; Coupling Constants ³*J*(NH, ^γCH) in CD₃OH: Table S19; NOE correlations observed in the ROESY spectrum in CD₃OH at 298 K: Table S20. ¹H NMR spectrum of **3d** in H₂O/D₂O, pH 6.5: Figure S4; ¹H NMR, ¹⁵N and ¹³C NMR chemical shifts for **3d** in H₂O/D₂O, pH 6.5 at 278 K: Table S9 and S10; Coupling Constants ³*J*(NH, ^γCH) in H₂O/D₂O, pH 6.5: Table S19; NOE correlations observed in the ROESY spectrum in H₂O/D₂O, pH 6.5 at 278 K: Table S20.

Synthesis of compound **3e**:



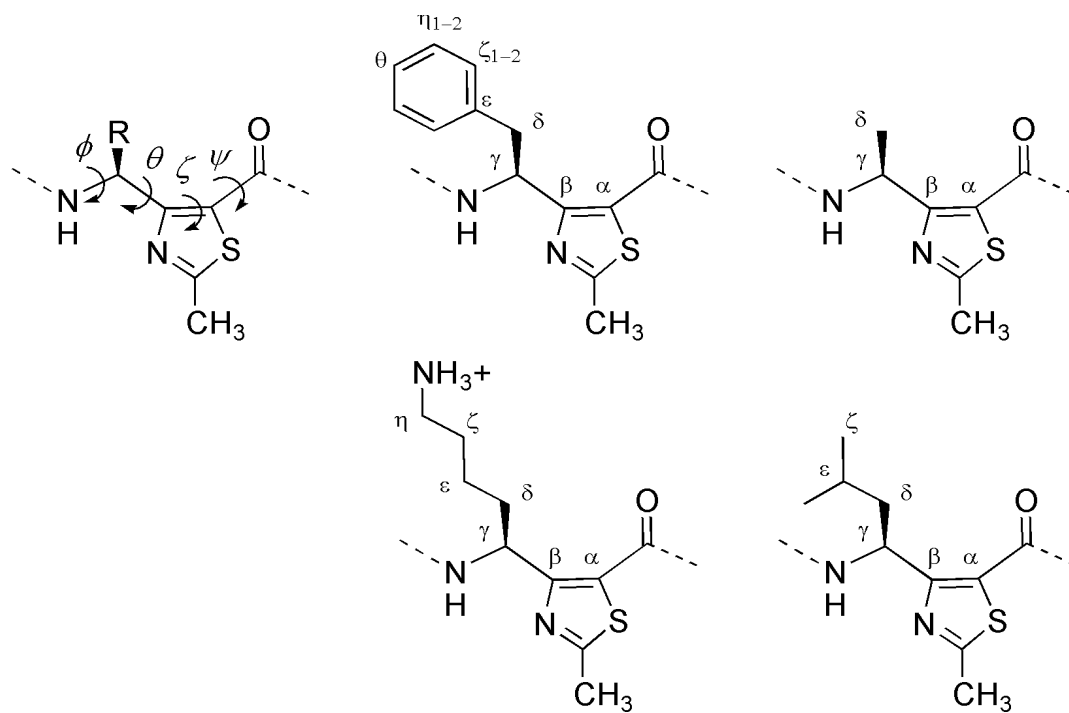
3e was synthesized from compound **11**. **11** was unprotected according to general procedures 1 and 2 to yield **12** and **13** respectively. **12** (175 mg, 0.226 mmol, 1.05 eq) and **13** (138 mg, 0.215 mmol) were coupled with DCC (49 mg, 0.237 mmol, 1.1 equiv.) and HOBT (32 mg, 0.237 mmol, 1.1 equiv.) in 10 mL anhydrous DCM at 0°C for 30 min then 4h at RT to yield **14**. After purification by chromatography on silica gel (DCM/AcOEt, 90/10 to 80:20 v/v), **14** was recovered as a white solid. Yield: 54%. Removal of *N*-Fmoc protecting group was done according to general procedure 2. *N*-term amine was acetylated with 2 ml Ac₂O/DCM (1:1 v/v) for 1h. The solvent was evaporated then the *O*-benzyl ester protecting group was removed according to general procedure 1. The crude was mixed with TFA/DCM (1:1) for 1h then evaporated. **3e** was recovered as white solid after precipitation with Et₂O. Overall yield: 85 %. LC Tr = 1.55 min. LC-MS: (ESI+) *m/z* = 931.5 ([*M*+*H*]⁺). ¹H NMR spectrum of **3e** in CD₃OH: Figure S3; ¹H NMR, ¹⁵N and ¹³C NMR chemical shifts for **3e** in CD₃OH at 298 K: Table S11 and S12; Coupling Constants ³*J*(NH, ^νCH) in CD₃OH: Table S19; NOE correlations observed in the ROESY spectrum in CD₃OH at 298 K: Table S21. ¹H NMR spectrum of **3e** in H₂O/D₂O, pH 6.5: Figure S4; ¹H NMR, ¹⁵N and ¹³C NMR chemical shifts for **3e** in H₂O/D₂O, pH 6.5 at 278 K: Table S13 and S14; Coupling Constants ³*J*(NH, ^νCH) in H₂O/D₂O, pH 6.5: Table S19; NOE correlations observed in the ROESY spectrum in H₂O/D₂O, pH 6.5 at 278 K: Table 21.

V. NMR and molecular modeling studies

NMR experiments. The NMR samples contained 5-10 mM of **2**, **3a** and **3b** dissolved in CDCl₃ and **3d**, **3e** and **3f** dissolved in CD₃OH and H₂O/D₂O (9/1), pH 6.5. All spectra were recorded on a Bruker Avance 600 AVANCE III spectrometer equipped with a 5 mm triple-resonance cryoprobe (¹H, ¹³C, ¹⁵N). Homonuclear 2-D spectra DQF-COSY, TOCSY (DIPS12) and ROESY were typically recorded in the phase-sensitive mode using the States-TPPI method as data matrices of 256-512 real (t₁) × 2048 (t₂) complex data points; 8-48 scans per t₁ increment with 1.0 s recovery delay and spectral width of 6009 Hz in both dimensions were used. The mixing times were 60 ms for TOCSY and 350-450 ms for the ROESY and the NOESY experiments. In addition, 2D heteronuclear spectra ¹⁵N, ¹³C-HSQC and ¹³C-HSQC-TOCSY were acquired to fully assign the oligomers (8-32 scans, 256-512 real (t₁) × 2048 (t₂) complex data points). Spectra were processed with Topspin (Bruker Biospin) and visualized with Topspin or NMRview on a Linux station. The matrices were zero-filled to 1024 (t₁) × 2048 (t₂) points after apodization by shifted sine-square multiplication and linear prediction in the F1 domain. Chemical shifts were referenced to the solvent.

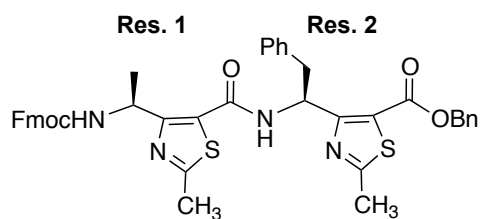
Structure calculations. ¹H chemical shifts were assigned according to classical procedures. NOE cross-peaks were integrated and assigned within the NMRView software (B. A. Johnson, R. A. Blevins, *J. Biomol. NMR* 1994, 4, 603). The volume of a ROE between methylene pair protons was used as a reference of 1.8 Å. The lower bound for all restraints was fixed at 1.8 Å and upper bounds at 2.7, 3.3 and 5.0 Å, for strong, medium and weak correlations, respectively. Pseudo-atoms corrections of the upper bounds were applied for unresolved aromatic, methylene and methyl protons signals as described previously (Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic acids*; Wiley-Interscience: New York, 1986). Structure calculations were performed with AMBER 10 (D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, M. Crowley, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossvary, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, D.H. Mathews, M.G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, and P.A. Kollman (2008), AMBER 10, University of California, San Francisco) in three stages: cooking, simulated annealing in vacuum and refinement in a solvent box. The cooking stage was performed at 600 K to generate 100 initial random structures. SA calculations were carried during 20 ps (20000 steps, 1 fs long) as described elsewhere. First, the temperature was risen quickly and was maintained at 600 K for the first 5000 steps, then the system was cooled gradually from 600 K to 100 K from step 5001 to 18000 and finally the temperature was brought to 0 K during the 2000 remaining steps. For the 3000 first steps, the force constant of the distance restraints was increased gradually from 2.0 kcal.mol⁻¹.Å to 20 kcal.mol⁻¹.Å. For the rest of the simulation (step 3001 to 20000), the force constant is kept at 20 kcal.mol⁻¹.Å. The calculations were launched in vacuum for **2**, **3a** and **3b** and using the generalized born solvation model to solved the structures of the oligomers **3d**, **3e** and **3f** in water. The 20 lowest energy structures with no violations > 0.3 Å were considered as representative of the peptide structure. The representation and quantitative analysis were carried out using Ptraj, MOLMOL (R. Koradi, M. Billeter, K. Wuthrich, *J. Mol. Graph.* 1996, 14, 51) and PyMOL (Delano Scientific).

Figure S1: Nomenclature and torsion angles description.



Tables S1-S6: ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR chemical shifts for **2**, **3a** and **3b** in CDCl_3 (nd: not determined)

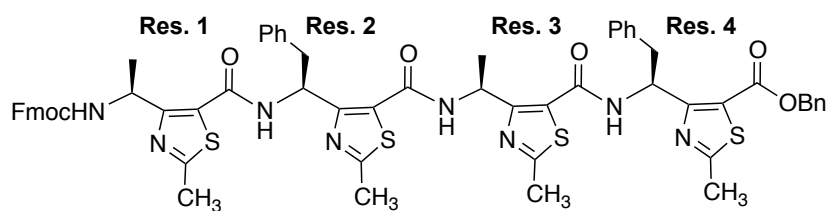
Table S1-S2: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts for **2** in CDCl_3 at 293 K.



Residue	HN	γCH	δCH	Others
Fmoc	-	-	-	CH_2 4.38, 4.44; CH 4.24
Res. 1	5.73	5.73	1.49	CH_3 2.65
Res. 2	9.18	6.18	3.14, 3.20	CH_3 2.63; ^{15}C 7.29 ^{13}C 7.17 $^{\text{H}}\text{C}$ 6.98
OBn	-	-	-	CH_2 5.31

Residue	N	γC	δC	Others
Fmoc	-	-	-	CH_2 67.1; CH 47.1
Res. 1	nd	45.3	20.9	CH_3 19.7
Res. 2	127.9	51.5	40.4	CH_3 19.2; ^{15}C 129.0 ^{13}C 126.0 $^{\text{H}}\text{C}$ 129.0
OBn	-	-	-	CH_2 67.1

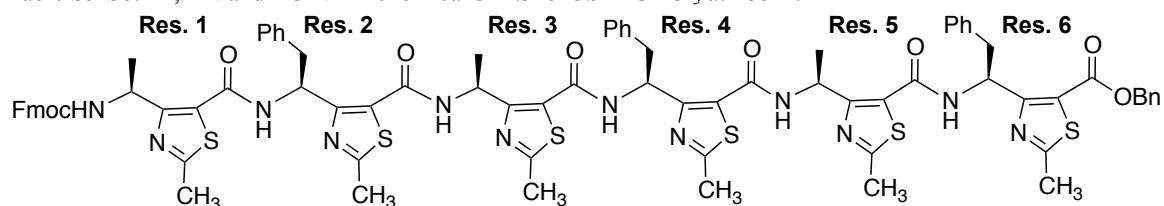
Table S3-S4: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts for **3a** in CDCl_3 at 293 K



<i>Residue</i>	<i>HN</i>	γCH	δCH	<i>Others</i>
Fmoc	-	-	-	CH_2 4.40, 4.42; CH 4.24
Res. 1	5.70	5.38	1.45	CH_3 2.66
Res. 2	9.72	5.72	3.18, 3.37	CH_3 2.64; ^{15}C 7.08 ^{13}C 7.05 $^{\text{a}}\text{CH}$ 7.05
Res. 3	10.04	5.97	1.66	CH_3 2.65
Res. 4	10.12	6.16	3.20	CH_3 2.65; ^{15}C 7.19 ^{13}C 7.36 $^{\text{a}}\text{CH}$ 7.36
OBn	-	-	-	CH_2 5.30

<i>Residue</i>	<i>N</i>	γC	δC	<i>Others</i>
Fmoc	-	-	-	CH_2 67.4; CH 47.1
Res. 1	nd	43.5	20.4	CH_3 19.8
Res. 2	132.1	50.9	39.3	CH_3 19.8; ^{15}C 128.7 ^{13}C 128.3 $^{\text{a}}\text{C}$ 128.3
Res. 3	134.5	44.8	19.6	CH_3 19.8
Res. 4	129.5	51.7	40.3	CH_3 19.8; ^{15}C 128.3 ^{13}C 128.7 $^{\text{a}}\text{C}$ 129.0
OBn	-	-	-	CH_2 67.0

Table S5-S6: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts for **3b** in CDCl_3 at 288 K.



<i>Residue</i>	<i>HN</i>	γCH	δCH	<i>Others</i>
Fmoc	-	-	-	CH_2 4.45; CH 4.23
Res. 1	5.93	5.39	1.50	CH_3 2.69
Res. 2	9.89	5.72	3.21, 3.42	CH_3 2.71; ^{13}C 7.08 ^{15}N 7.05 ^9CH 7.05
Res. 3	10.23	5.64	1.66	CH_3 2.68
Res. 4	10.67	5.73	3.24, 3.44	CH_3 2.71; ^{13}C 7.08 ^{15}N 7.05 ^9CH 7.05
Res. 5	10.18	6.00	1.71	CH_3 2.69
Res. 6	10.26	6.19	3.25	CH_3 2.68; ^{13}C 7.30 ^{15}N 7.19 ^9CH 7.36
OBn	-	-	-	CH_2 5.34

<i>Residue</i>	<i>N</i>	γC	δC	<i>Others</i>
Fmoc	-	-	-	CH_2 67.0; CH 47.0
Res. 1	nd	45.3	20.4	CH_3 19.6
Res. 2	132.2	51.1	39.2	CH_3 19.6; ^{13}C 128.7 ^{15}N 128.3 ^9C 128.3
Res. 3	134.8	45.2	19.6	CH_3 19.6
Res. 4	133.6	51.1	39.2	CH_3 19.6; ^{13}C 128.7 ^{15}N 128.3 ^9C 128.3
Res. 5	134.8	44.6	19.8	CH_3 19.6
Res. 6	129.9	51.8	40.2	CH_3 19.6; ^{13}C 129.0 ^{15}N 128.7 ^9C 128.3
OBn	-	-	-	CH_2 67.0

Tables S7-S18: ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR chemical shifts for **3d**, **3e** and **3f** in CD_3OH and $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, pH 6.5(nd: not determined)

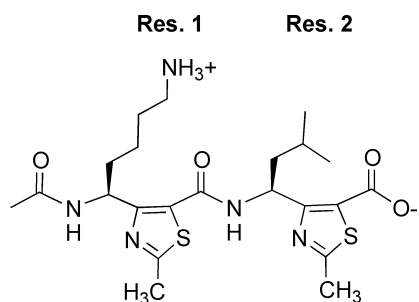


Table S7-S8: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts for **3d** in CD_3OH at 298 K.

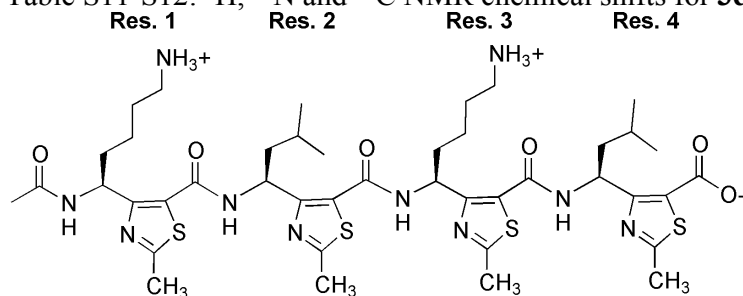
Residue	HN	γCH	δCH	Others
OMe	-	-	-	CH_3 1.98
Res. 1	8.50	5.39	1.83, 1.97	$^{\epsilon}\text{CH}_2$ 1.07; $^{\zeta}\text{CH}_2$ 1.49; $^{\eta}\text{CH}_2$ 2.78; $^{\theta}\text{NH}$ 7.65; CH_3 2.67
Res. 2	9.86	6.08	1.69, 1.91	$^{\epsilon}\text{CH}$ 1.71; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 1.01; CH_3 2.67

Residue	N	γC	δC	Others
OMe	-	-	-	CH_3 20.9
Res. 1	133.5	48.5	43.4	$^{\epsilon}\text{C}$ 22.6; $^{\zeta}\text{C}$ 26.5; $^{\eta}\text{C}$ 39.3; $^{\theta}\text{N}$ nd; CH_3 17.8
Res. 2	131.2	47.8	33.0	$^{\epsilon}\text{C}$ 25.0; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 20.9, 21.9; CH_3 17.8

Table S9-S10: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts for **3d** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, pH 6.5 at 278 K.

Residue	HN	γCH	δCH	Others
OMe	-	-	-	CH_3 1.73
Res. 1	8.33	4.64	1.51, 1.61	$^{\epsilon}\text{CH}_2$ 0.46, 0.69; $^{\zeta}\text{CH}_2$ 0.94, 1.05; $^{\eta}\text{CH}_2$ 2.47; $^{\theta}\text{NH}$ 7.21; CH_3 2.38
Res. 2	9.57	5.86	1.47, 1.60	$^{\epsilon}\text{CH}$ 1.34; CH_3 0.68

Residue	N	γC	δC	Others
OMe	-	-	-	CH_2 ; CH
Res. 1	133.8	nd	31.5	$^{\epsilon}\text{C}$ 21.5; $^{\zeta}\text{C}$ 25.6; $^{\eta}\text{C}$ 32.1; $^{\theta}\text{N}$ nd; CH_3 17.8
Res. 2	139.7	46.8	42.2	$^{\epsilon}\text{C}$ 42.2; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 24.6; CH_3 17.8

Table S11-S12: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts for **3e** in CD_3OH at 298 K

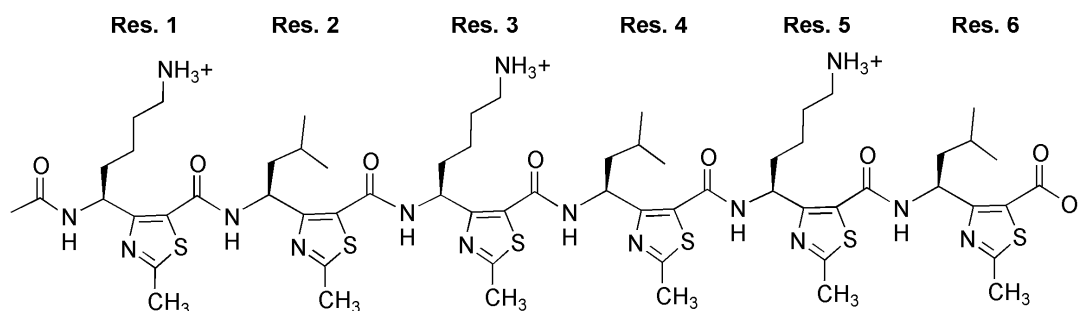
<i>Residue</i>	<i>HN</i>	γ <i>CH</i>	δ <i>CH</i>	<i>Others</i>
OMe	-	-	-	CH ₃ 1.99
Res. 1	8.68	5.24	1.92	$^{\epsilon}\text{CH}_2$ 1.05, 1.17; $^{\zeta}\text{CH}_2$ 1.56; $^{\eta}\text{CH}_2$ 2.80; $^{\theta}\text{NH}$ 7.76; CH ₃ 2.63
Res. 2	10.42	5.38	1.81, 2.03	$^{\epsilon}\text{CH}$ 1.13; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 0.61, 0.82; CH ₃ 2.69
Res. 3	10.31	5.65	2.13	$^{\epsilon}\text{CH}_2$ 1.20, 1.30; $^{\zeta}\text{CH}_2$ 1.59; $^{\eta}\text{CH}_2$ 2.84; $^{\theta}\text{NH}$ 7.73; CH ₃ 2.69
Res. 4	9.90	6.06	1.68, 1.97	$^{\epsilon}\text{CH}$ 1.69; CH ₃ 1.02; CH ₃ 2.69

<i>Residue</i>	<i>N</i>	γ <i>C</i>	δ <i>C</i>	<i>Others</i>
OMe	-	-	-	CH ₃ 20.7
Res. 1	131.9	49.0	32.6	$^{\epsilon}\text{C}$ 22.6; $^{\zeta}\text{C}$ 26.8; $^{\eta}\text{C}$ 39.3; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH ₃ 17.9
Res. 2	134.7	48.6	41.9	$^{\epsilon}\text{C}$ 24.5; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 20.3, 21.7; CH ₃ 17.9
Res. 3	133.0	48.5	32.6	$^{\epsilon}\text{C}$ 22.7; $^{\zeta}\text{C}$ 26.8; $^{\eta}\text{C}$ 39.3; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH ₃ 17.9
Res. 4	133.2	48.1	43.4	$^{\epsilon}\text{C}$ 24.9; CH ₃ 20.1; CH ₃ 17.9

Table S13-S14: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts for **3e** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, pH 6.5 at 278 K

<i>Residue</i>	<i>HN</i>	γ <i>CH</i>	δ <i>CH</i>	<i>Others</i>
OMe	-	-	-	CH ₃ 1.99
Res. 1	8.49	4.74	1.63	$^{\epsilon}\text{CH}_2$ 0.48, 0.59; $^{\zeta}\text{CH}_2$ 1.14; $^{\eta}\text{CH}_2$ 2.46; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH ₃ 2.39
Res. 2	10.05	4.94	1.41, 1.79	$^{\epsilon}\text{CH}$ 0.60; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 0.09, 0.47; CH ₃ 2.42
Res. 3	10.08	5.02	1.72, 1.87	$^{\epsilon}\text{CH}_2$ 0.66, 0.82; $^{\zeta}\text{CH}_2$ 1.12; $^{\eta}\text{CH}_2$ 2.55; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH ₃ 2.42
Res. 4	9.66	5.85	1.52, 1.66	$^{\epsilon}\text{CH}$ 1.36; CH ₃ 0.69; CH ₃ 2.42

<i>Residue</i>	<i>N</i>	γ <i>C</i>	δ <i>C</i>	<i>Others</i>
OMe	-	-	-	CH ₃ 21.1
Res. 1	134.1	nd	31.6	$^{\epsilon}\text{C}$ 22.0; $^{\zeta}\text{C}$ 25.7; $^{\eta}\text{C}$ 39.1; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH ₃ 17.9
Res. 2	138.1	48.4	40.5	$^{\epsilon}\text{C}$ 24.1; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 19.0, 22.2; CH ₃ 17.9
Res. 3	136.4	48.6	31.4	$^{\epsilon}\text{C}$ 21.7; $^{\zeta}\text{C}$ 25.7; $^{\eta}\text{C}$ 39.3; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH ₃ 17.9
Res. 4	138.5	47.3	42.3	$^{\epsilon}\text{C}$ 24.7; CH ₃ 21.9; CH ₃ 17.9

Table S15-S16: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts for **3f** in CD_3OH at 308 K.

Residue	^1HN	$^1\gamma\text{CH}$	$^1\delta\text{CH}$	Others
Ome	-	-	-	CH_3 1.99
Res. 1	8.62	5.26	1.92	$^{\epsilon}\text{CH}_2$ 1.07, 1.20; $^{\zeta}\text{CH}_2$ 1.58; $^{\eta}\text{CH}_2$ 2.82; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH_3 2.71
Res. 2	10.42	5.32	1.82, 2.04	$^{\epsilon}\text{CH}$ 1.14; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 0.6, 0.83; CH_3 2.69
Res. 3	10.44	5.47	2.07	$^{\epsilon}\text{CH}_2$ 1.18, 1.33; $^{\zeta}\text{CH}_2$ 1.64; $^{\eta}\text{CH}_2$ 2.88; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH_3 2.71
Res. 4	10.37	5.39	1.93	$^{\epsilon}\text{CH}$ 1.31; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 0.70, 0.87; CH_3 2.69
Res. 5	10.25	5.66	2.14	$^{\epsilon}\text{CH}_2$ 1.21, 1.31; $^{\zeta}\text{CH}_2$ 1.60; $^{\eta}\text{CH}_2$ 2.86; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH_3 2.70
Res. 6	9.81	6.08	1.69, 1.97	$^{\epsilon}\text{CH}$ 1.78; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 1.02; CH_3 2.69

Residue	^{15}N	^{13}C	^{13}C	Others
Ome	-	-	-	CH_3 20.5
Res. 1	131.8	49.0	32.9	$^{\epsilon}\text{C}$ 23.1; $^{\zeta}\text{C}$ 27.1; $^{\eta}\text{C}$ 39.3; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH_3 17.9
Res. 2	134.7	48.6	42.0	$^{\epsilon}\text{C}$ 24.4; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 20.1, 21.7; CH_3 17.9
Res. 3	133.6	49.9	32.5	$^{\epsilon}\text{C}$ 23.0; $^{\zeta}\text{C}$ 27.1; $^{\eta}\text{C}$ 39.3; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH_3 17.9
Res. 4	134.1	48.6	42.3	$^{\epsilon}\text{C}$ 24.3; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 20.7, 21.7; CH_3 17.9
Res. 5	132.9	49.5	32.5	$^{\epsilon}\text{C}$ 23.0; $^{\zeta}\text{C}$ 26.7; $^{\eta}\text{C}$ 39.3; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH_3 17.9
Res. 6	133.1	48.0	43.4	$^{\epsilon}\text{C}$ 24.9; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 20.7; CH_3 17.9

Table S17-S18: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts **3f** in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, pH 6.5 at 278 K

Residue	^1HN	$^1\gamma\text{CH}$	$^1\delta\text{CH}$	Others
Ome	-	-	-	CH_3 1.77
Res. 1	8.51	4.77	1.64	$^{\epsilon}\text{CH}_2$ 0.48, 0.60; $^{\zeta}\text{CH}_2$ 1.18; $^{\eta}\text{CH}_2$ 2.49; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH_3 2.38
Res. 2	10.12	4.95	1.44, 1.79	$^{\epsilon}\text{CH}$ 0.60; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 0.07, 0.47; CH_3 2.45
Res. 3	10.24	5.10	1.86	$^{\epsilon}\text{CH}_2$ 0.61, 0.70; $^{\zeta}\text{CH}_2$ 1.20; $^{\eta}\text{CH}_2$ 2.52; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH_3 2.46
Res. 4	9.96	4.96	1.81	$^{\epsilon}\text{CH}$ 0.50; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 0.12, 0.66; CH_3 2.44
Res. 5	10.04	5.04	1.73, 1.87	$^{\epsilon}\text{CH}_2$ 0.67, 0.85; $^{\zeta}\text{CH}_2$ 1.15; $^{\eta}\text{CH}_2$ 2.56; $^{\theta}\text{NH}$ nd; CH_3 2.42
Res. 6	9.67	5.85	1.63, 1.66	$^{\epsilon}\text{CH}$ 1.36; $^{\zeta}\text{CH}_3$ 0.70; CH_3 2.40

Residue	N	γC	δC	Others
OMe	-	-	-	CH ₃ 21.1
Res. 1	8.51	45.3	20.4	¹³ C 22.0; ¹³ C 25.7; ¹³ C 39.1; ¹⁵ NH nd; CH ₃ 17.9
Res. 2	132.2	51.1	39.2	¹³ C 24.1; ¹³ CH ₃ 19.0, 22.2; CH ₃ 17.9
Res. 3	134.8	45.2	19.6	¹³ C 22.0; ¹³ C 25.7; ¹³ C 39.1; ¹⁵ NH nd; CH ₃ 17.9
Res. 4	133.6	51.1	39.2	¹³ C 24.1; ¹³ CH ₃ 19.0, 22.2; CH ₃ 17.9
Res. 5	134.8	44.6	19.8	¹³ C 22.0; ¹³ C 25.7; ¹³ C 39.1; ¹⁵ NH nd; CH ₃ 17.9
Res. 6	129.9	51.8	40.2	¹³ C 24.1; ¹³ CH ₃ 19.0, 22.2; CH ₃ 17.9

Table S19: Coupling Constants $^3J(\text{NH}, \gamma\text{CH})$ of 2, 3a, 3b, 3d, 3e and 3f at 298 K (in Hz). Values were measured in CDCl₃ for 2, 3a and 3b, and in CD₃OH and H₂O/D₂O (pH 6.5) for water-soluble compounds 3d, 3e and 3f.

Residue	2	3a	3b	3d	3e	3f
Res. 1	o	8.0	7.9	7.9 5.1	6.7 5.3	6.6 5.3
Res. 2	7.7	6.2	5.7	6.6 8.7	5.0 4.9	5.1 4.9
Res. 3		5.6	5.3		5.6 5.6	5.6 5.6
Res. 4		7.4	5.8		7.4 8.5	4.9 4.7
Res. 5			5.6			4.9 5.6
Res. 6			7.6			7.4 8.3

o: overlaps.

Figure S2: ^1H NMR spectra of the compounds 2, 3a and 3b at 293 K in CDCl_3 .

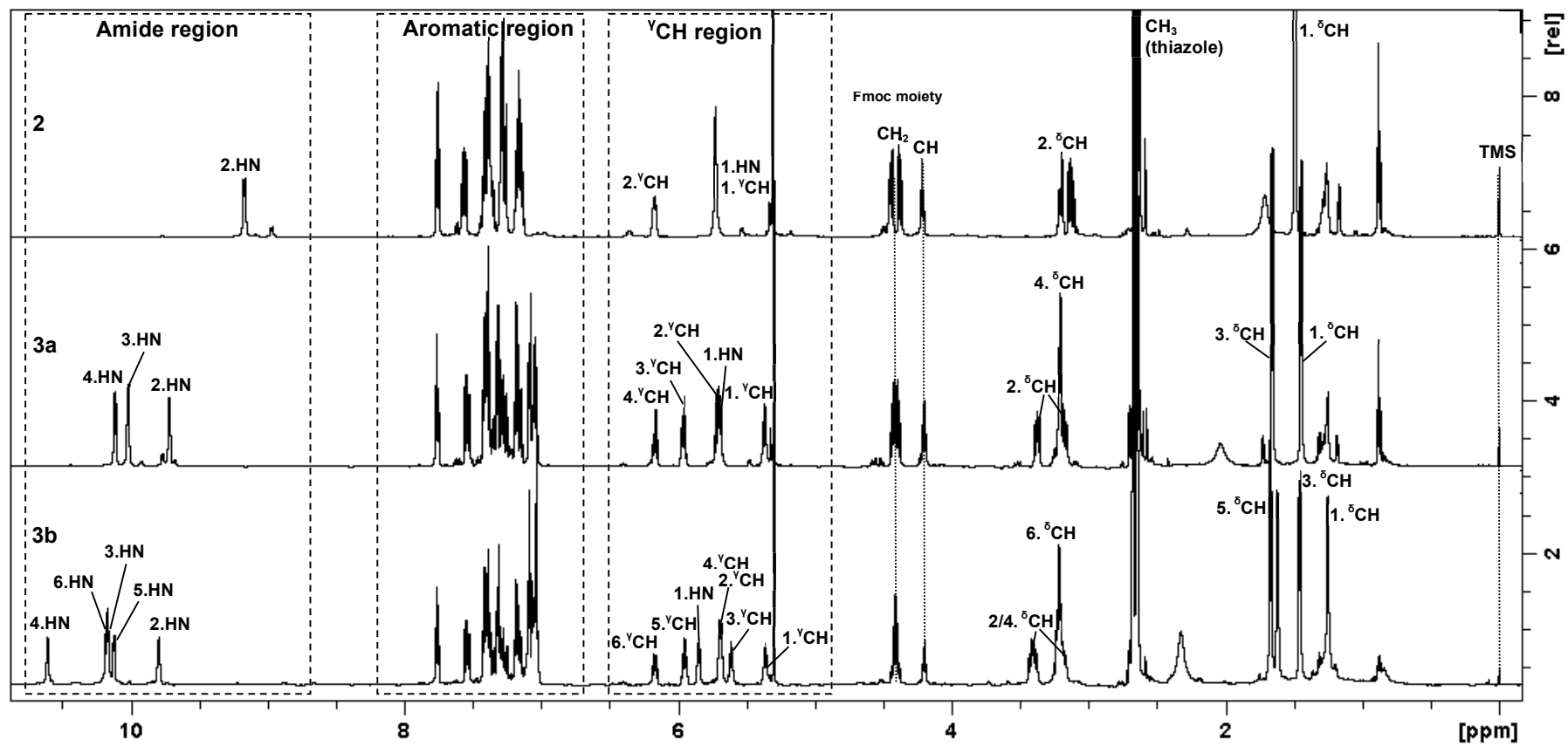


Figure S3: ^1H NMR spectra of the compounds 3d, 3e and 3f at 298 K in CD_3OH .

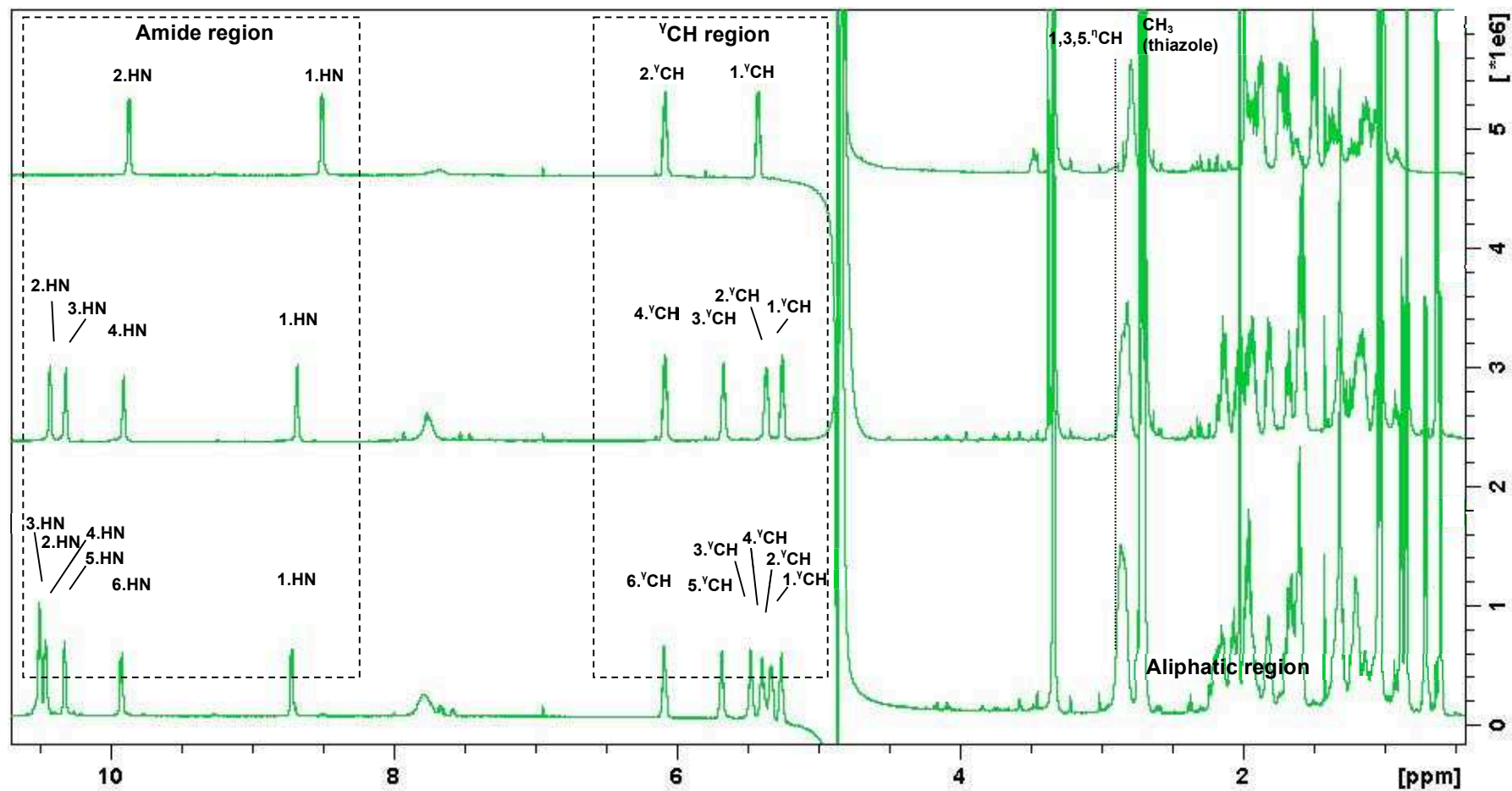


Figure S4: ^1H NMR spectra of the compounds 3d, 3e and 3f at 278 K in water, pH 6.5.

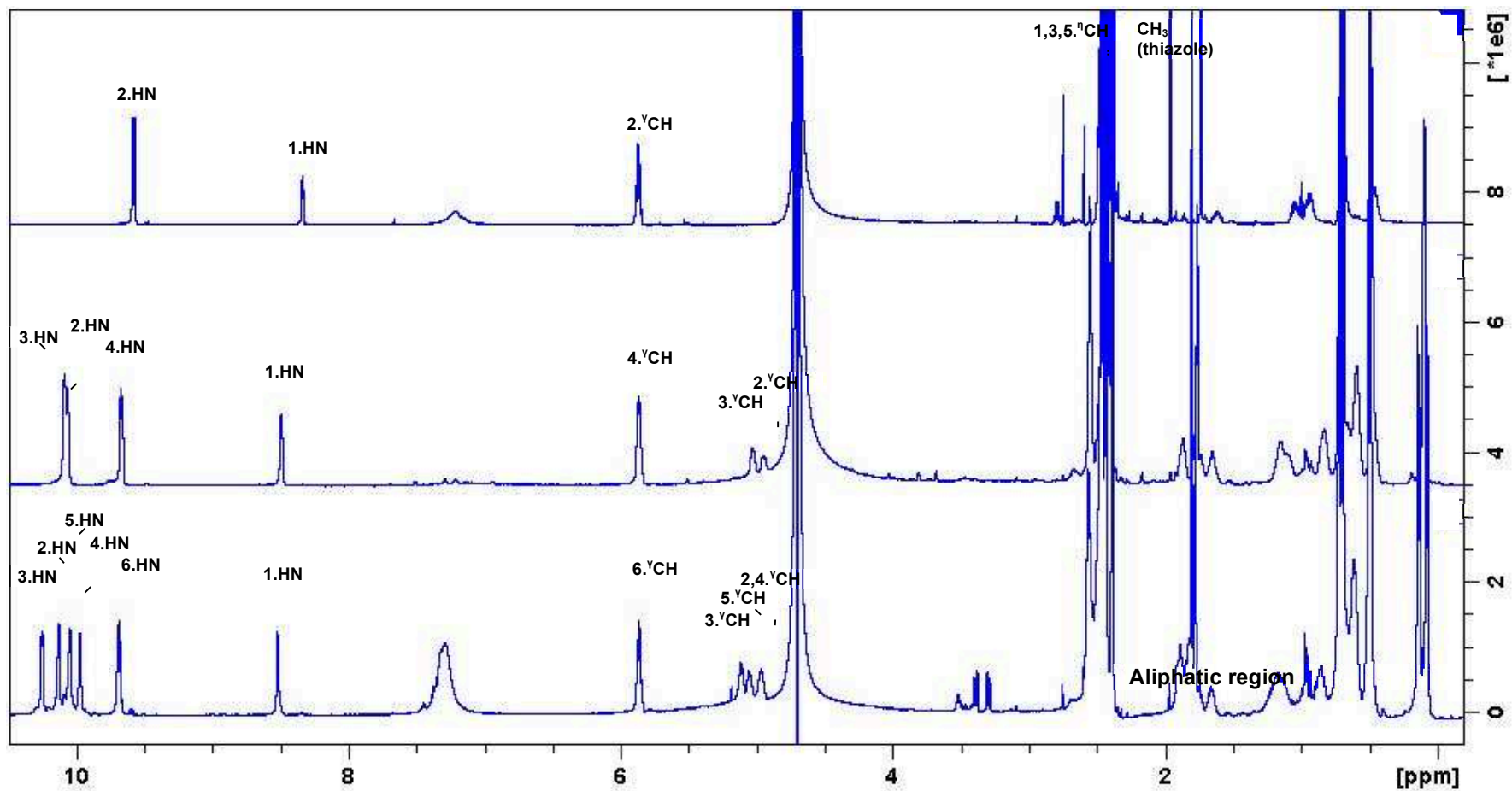


Table S20-S22: Inter-residue NOEs unambiguously assigned in the ROESY spectra of **2**, **3a**, and **3b**.

Strong “s” < 2.7 Å; medium “m” < 3.3 Å; weak “w” < 5.0 Å.

- **Table S20:** Inter-residue NOEs correlations observed in the ROESY spectrum of dimers **2** in CDCl₃ at 293 K (black), **3d** in methanol at 298 K (green) and in water, pH 6.5 at 278 K (blue).

Name of the NOE correlation	NOE	Type
2.HN-1.HG	w/w/w	Sequential
2.HN-1.HD	m/s/s	Sequential
2.HA-CH ₂ (Z)	w	Sequential
2.HB-CH ₂ (Z)	w	Sequential
2.HZ-CH ₂ (Z)	w	Sequential

- **Table S21:** Inter-residue NOEs correlations observed in the ROESY spectrum of tetramers **3a** in CDCl₃ at 293 K (black), **3e** in methanol at 298 K (green) and in water, pH 6.5 at 278 K (blue).

Name of the NOE correlation	NOE	Type
1.HN-CH ₂ (Fmoc)	w	Sequential
1.HG-2.HD	w/w	Sequential
2.HN-1.HG	s/s/s	Sequential
2.HN-1.HD	w/w/w	Sequential
2.HG-3.HD	w/w	Sequential
3.HN-2.HG	s/s/s	Sequential
3.HN-2.HD	w/w/w	Sequential
3.HG-4.HD	w/w/w	Sequential
4.HN-3.HG	s/s/s	Sequential
4.HN-3.HD	w/w/w	Sequential
4.HN-CH ₂ (Z)	m	Sequential
4.HG-CH ₂ (Z)	w	Sequential

- **Table S22:** Inter-residue NOEs correlations observed in the ROESY spectrum of hexamers **3b** in CDCl₃ at 288 K (black), **3f** in methanol at 308 K (green) and in water, pH 6.5 at 278 K (blue).

Name of the NOE correlation	NOE	Type
1.HN-CH ₂ (Fmoc)	w	Sequential
1.HG-2.HD	w/w	Sequential
2.HN-1.HG	s/s/s	Sequential
2.HN-1.HD	w/w/w	Sequential
2.HG-3.HD	w	Sequential
3.HN-2.HG	s/s/s	Sequential
3.HN-2.HD	w/w/w	Sequential
3.HG-4.HD	w/w/w	Sequential
4.HN-3.HG	s/s/s	Sequential
4.HN-3.HD	w/w/w	Sequential
4.HG-5.HD	w/w	Sequential
5.HN-4.HG	s/s/s	Sequential
5.HN-4.HD	w/w/w	Sequential
5.HG-6.HD	w/w/w	Sequential
6.HN-5.HG	s/s/s	Sequential
6.HN-5.HD	w/w/w	Sequential
4.HN-CH ₂ (Z)	m	Sequential
4.HG-CH ₂ (Z)	w	Sequential

Figure S5: Superimposition on the backbone heavy atoms of the 20 lowest energy NMR solution structures of **2**, **3a**, **3b** in CDCl₃ (in orange) and **3d**, **3e**, **3f** in H₂O/D₂O (in blue). H atoms and for **3d**, **3e**, and **3f**, the C-terminal moieties are omitted.

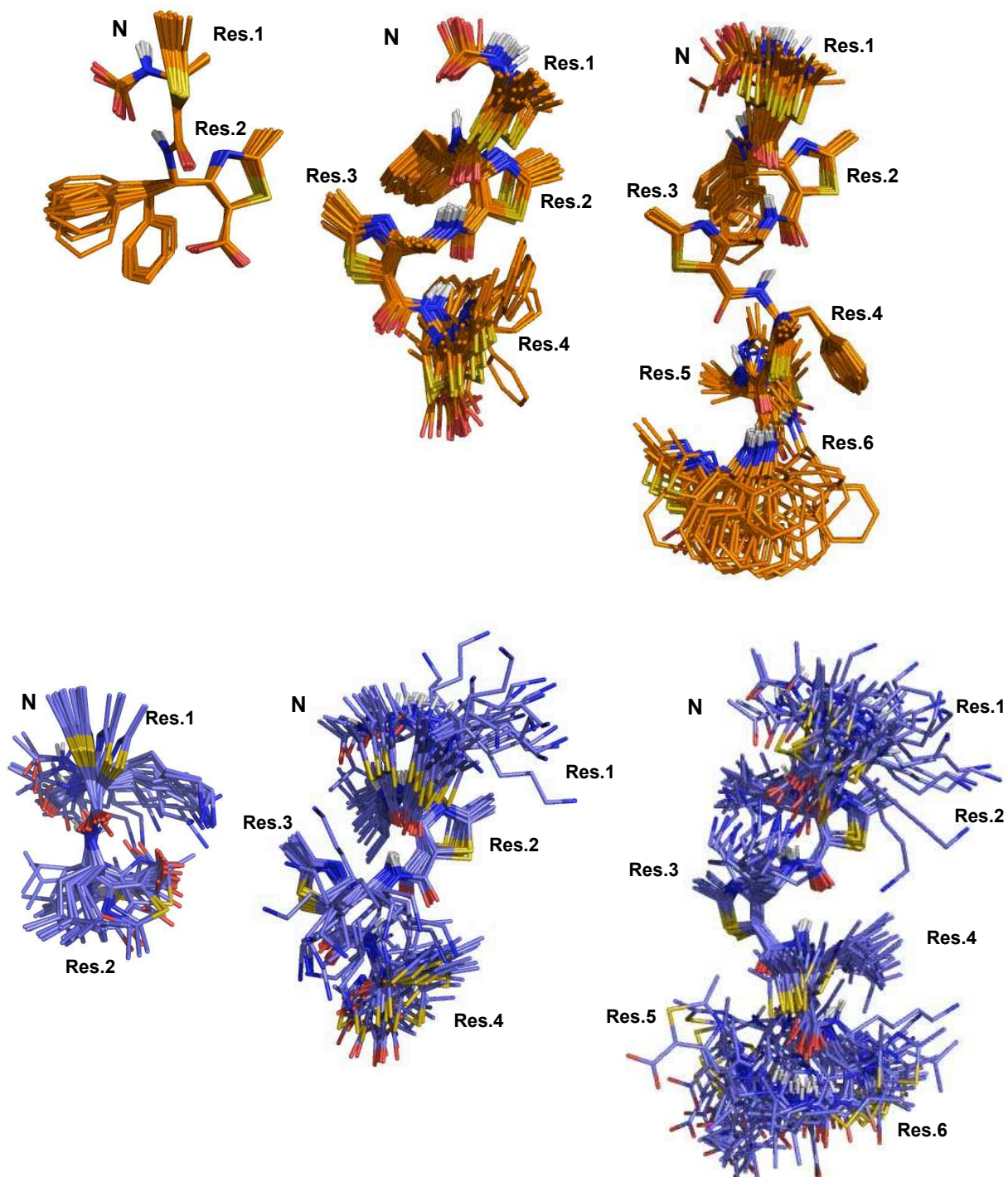


Table S23: Root Mean Square Deviations (RMSD, Å) of the 20 lowest energy NMR structures of **2**, **3a**, **3b** in CD₃Cl.

Oligomer	2	3a	3b
all atoms	2.18	2.20	2.08
all heavy atoms	1.82	1.88	1.77
backbone heavy atoms	1.84	1.93	1.95
all heavy atoms ^a	0.81	1.08	0.96
backbone heavy atoms ^a	0.11	0.48	0.63

^aCapping groups have been omitted.

Table S24: Root Mean Square Deviations (RMSD, Å) of the 20 lowest energy NMR structures of **3d**, **3e**, **3f** in H₂O/D₂O, pH 6.5.

Oligomer	3d	3e	3f
all atoms	1.72	1.84	2.50
all heavy atoms	1.30	1.43	2.10
backbone heavy atoms	0.67	0.90	1.57

I. Crystallographic data

X-ray data for compound **6b** and **3c** were collected at 100K with an Oxford Diffraction Xcalibur 2 diffractometer equipped with copper high-intensity/low-power micro-source X-ray tube. Crystals for compound **3c** exhibited weak diffracting power. Data were processed using CrysAlis RED (Oxford Diffraction, **2003**). X-ray structures were solved with SIR2004 (Burla M.C., Caliandro R., Camalli M., Carrozzini B., Cascarano G.L., De Caro L., Giacovazzo C., Polidori G. and Spagna R. (2005) *J. Appl. Cryst.* **2005**, 38:381-388). The crystallographic refinements were conducted using SHELXL-97 (Sheldrick G.M. *Acta Cryst.* **2008**, A64: 112-122). In compound **6b**, carbon atoms of the terminal fluorenyl group showed high atomic displacement parameters and the analysis of their displacement ellipsoids revealed some rotational structural disorder in this group. Selected crystallographic data are provided in the table S12.

CCDC 915084 (**6b**) and CCDC 922304 (**3c**) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif

Figure S6: X-ray crystal structure of compound 6b

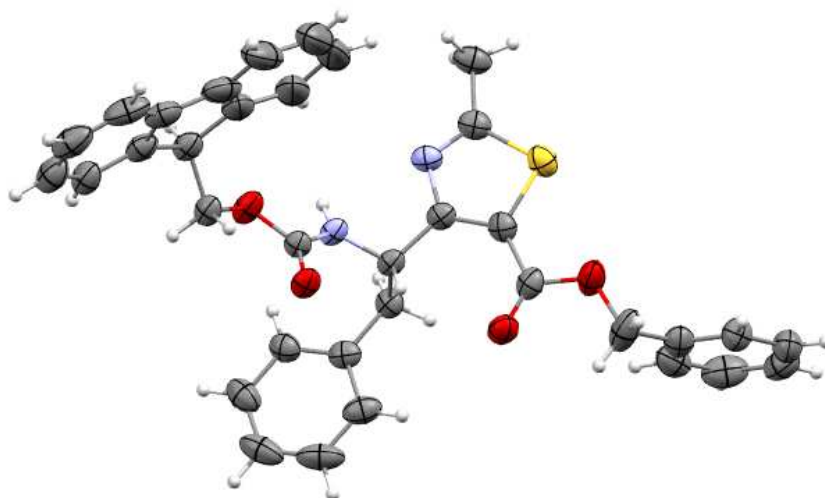
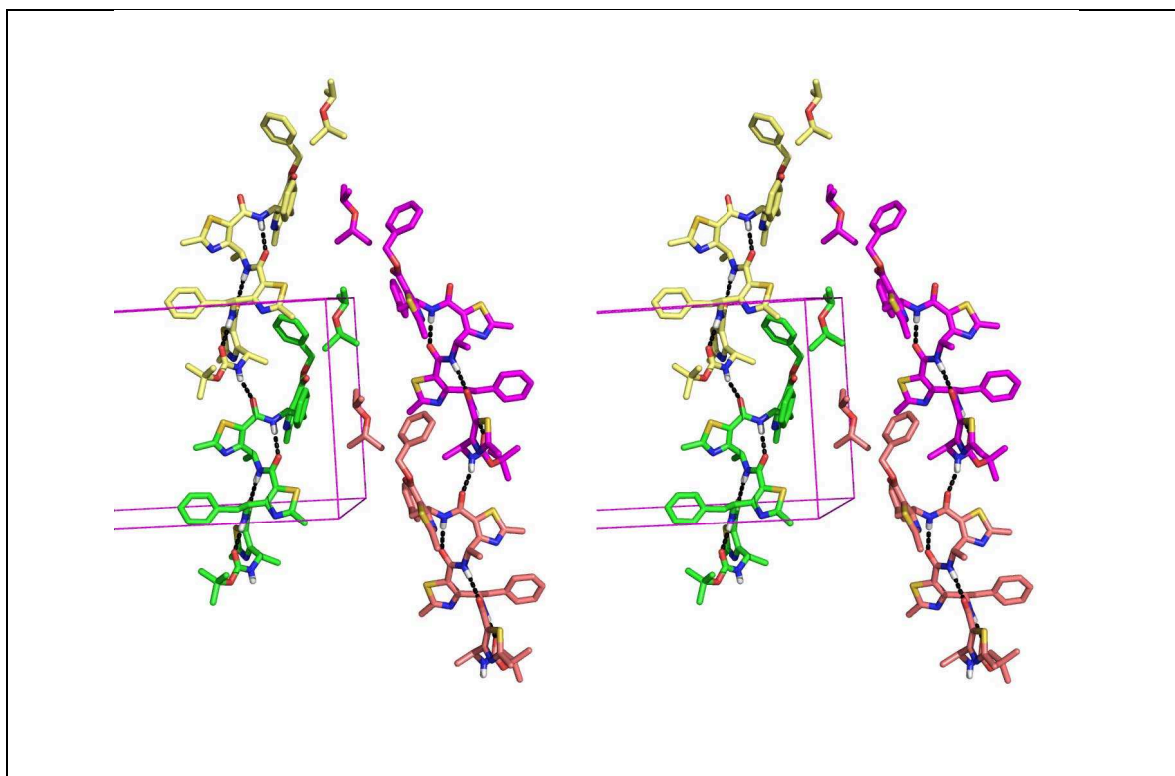


Table S25: Selected crystallographic data for 6b and 3c

Compound	6b	3c
Molecular formula	C ₃₅ H ₃₀ N ₂ O ₄ S	C ₅₂ H ₅₆ N ₈ O ₇ S ₄ , C ₆ H ₁₄ O
<i>Mr</i>	574.7	1135.46
Wavelength	1.5418	1.5418
Space group	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
<i>a</i>	4.8828(2)	15.640(1)
<i>b</i>	21.076(1)	15.821(2)
<i>c</i>	14.2244(7)	24.894(3)
<i>alpha</i>	90	90
<i>beta</i>	98.205(4)	90
<i>gamma</i>	90	90
Volume	1448.8(1)	6160(1)
<i>D</i> _x (g.cm ⁻³)	1.317	1.224
<i>Z</i>	2	4
F(000)	604	2408.0
<i>N</i> _{ref}	6018	6383
Data completeness	0.98	0.98
Theta(max)	76.96	50.7
<i>R</i> ₁	0.055	0.072
<i>wR</i> ₂	0.152 (6013)	0.211
<i>S</i>	1.041	1.005
<i>N</i> _{par}	380	714

Figure S7: Stereoview of a part of the crystal packing of 3c.

The asymmetric unit of **3c** crystals consisted of one ATC tetramer and one diisopropyl ether molecule. **3c** molecules self-assembled along the *a* crystallographic axis to form infinite chains of helices. Infinite chains of diisopropyl ether molecules mediated helix chains. Two helix chains and one diisopropyl ether chain are shown. Hydrogen atoms attached to carbon atoms are not indicated for clarity. Hydrogen, oxygen, nitrogen and sulfur atoms are colored following atom type. Different colors have been used for carbon atoms to distinguish independent molecules. Hydrogen bonds are represented as black dashed bonds.



II. Structure parameters of 2, 3a, 3b and 3c

Table S26: Backbone dihedral angles ($^{\circ}$) of 2, 3a, 3b NMR structures in $CDCl_3$, 3e, 3f and 3d in H_2O/D_2O and 3c XRD structure. Values are ordered from C to N and are average on the 20 lowest energy NMR structures.

Residue	Angles	2 (20)	3a (20)	3b (20)	3c (XRD)	3d (20)	3e (20)	3f (20)
Res.1	ϕ	-77 ± 12	-71 ± 7	-76 ± 6	-81	-81 ± 43	-81 ± 33	-69 ± 18
	θ	119 ± 4	121 ± 2	122 ± 2	121	122 ± 25	115 ± 9	124 ± 9
	ζ	-8 ± 2	-8 ± 2	-8 ± 2	-4	-6 ± 7	-9 ± 3	-8 ± 6
	ψ	-21 ± 2	-29 ± 3	-30 ± 3	-40	-18 ± 20	-23 ± 3	-25 ± 13
Res.2	ϕ	-82 ± 10	-61 ± 3	-66 ± 4	-78	-131 ± 33	-57 ± 9	-68 ± 7
	θ	148 ± 5	123 ± 2	127 ± 2	119	111 ± 15	121 ± 4	122 ± 5.8
	ζ	2 ± 2	-9 ± 1	-9 ± 1	0	-1 ± 4	-10 ± 3	-8 ± 5
	ψ	1 ± 2	-30 ± 3	-34 ± 2	-38	-	-28 ± 5	-24 ± 10
Res.3	ϕ		-68 ± 8	-84 ± 8	-75		-85 ± 25	-81 ± 31
	θ		119 ± 3	119 ± 4	121		122 ± 9	116 ± 11
	ζ		-7 ± 2	-7 ± 2	-1		-6 ± 3	-5 ± 8
	ψ		-25 ± 3	-26 ± 3	-45		-23 ± 5	-17 ± 14
Res.4	ϕ		-96 ± 30	-65 ± 3	-80		-105 ± 31	-62 ± 23
	θ		150 ± 6	127 ± 2	147		120 ± 28	115 ± 10
	ζ		1 ± 3	-9 ± 1	3		3 ± 3	-7 ± 5
	ψ		3 ± 3	-33 ± 3	-165		-	-21 ± 10
Res.5	ϕ			-85 ± 14				-66 ± 29
	θ			119 ± 6				117 ± 14
	ζ			-6 ± 4				-7 ± 3
	ψ			-23 ± 9				-23 ± 6
Res.6	ϕ			-84 ± 20				-113 ± 34
	θ			139 ± 7				114 ± 27
	ζ			1 ± 3				-1 ± 3
	ψ			2 ± 3				-

Table S27: Hydrogen bonding pattern statistical analysis on NMR and XRD structures ($d_{O-N} < 3.5 \text{ \AA}$ and $N-H-O$ angle $> 120^\circ$).

Oligomer	$CO(i-1) \cdots HN(i+1)$			
		Occurrence	Distance	Angle
2 (20)	i = 1	20/20	2.82 ± 0.04	152.9 ± 2.0
3a (20)	i = 1	20/20	2.77 ± 0.01	172.0 ± 2.5
	i = 2	20/20	2.77 ± 0.02	164.1 ± 7.0
	i = 3	19/20	2.78 ± 0.02	171.0 ± 2.0
3b (20)	i = 1	20/20	2.80 ± 0.02	164.1 ± 3.1
	i = 2	20/20	2.83 ± 0.06	174.0 ± 2.8
	i = 3	20/20	2.78 ± 0.02	165.5 ± 3.0
	i = 4	20/20	2.84 ± 0.02	174.6 ± 2.3
	i = 5	19/20	2.80 ± 0.05	169.5 ± 2.3
3c (XRD)	i = 1	1/1	2.01	177.0
	i = 2	1/1	1.97	171.3
	i = 3	1/1	2.00	166.2
3d (20)	i = 1	10/20	2.97 ± 0.2	161 ± 10.2
3e (20)	i = 1	20/20	2.88 ± 0.06	161.5 ± 6.5
	i = 2	17/20	2.84 ± 0.03	155.9 ± 3.9
	i = 3	14/20	2.96 ± 0.13	158.4 ± 6.6
3f (20)	i = 1	17/20	2.86 ± 0.03	165.0 ± 7.2
	i = 2	19/20	2.84 ± 0.03	159.4 ± 6.2
	i = 3	16/20	2.93 ± 0.10	157.9 ± 5.9
	i = 4	18/20	2.90 ± 0.06	154.3 ± 5.9
	i = 5	18/20	2.91 ± 0.10	159.4 ± 7.0

Circular dichroism

Circular dichroism. Circular dichroism (CD) experiments were carried out using a Jasco J815 spectropolarimeter. The spectra were recorded with 0.1-0.2 mM of compounds **3d**, **3e** and **3f** dissolved in MeOH or MQ water (pH 6,5) using a 1 mm path length CD cuvette at 20°C, over a wavelength range of 190-300 nm. Continuous scanning mode was used, with a response of 1.0 s with 0.2 nm steps and a bandwidth of 2 nm. The signal to noise ratio was improved by acquiring each spectrum over an average of two scans. Baseline was corrected by subtracting the background from the sample spectrum.

III. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra

Figure S8: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of *N-Fmoc Benzyl (4S)-4-amino-3-oxopentanoate*

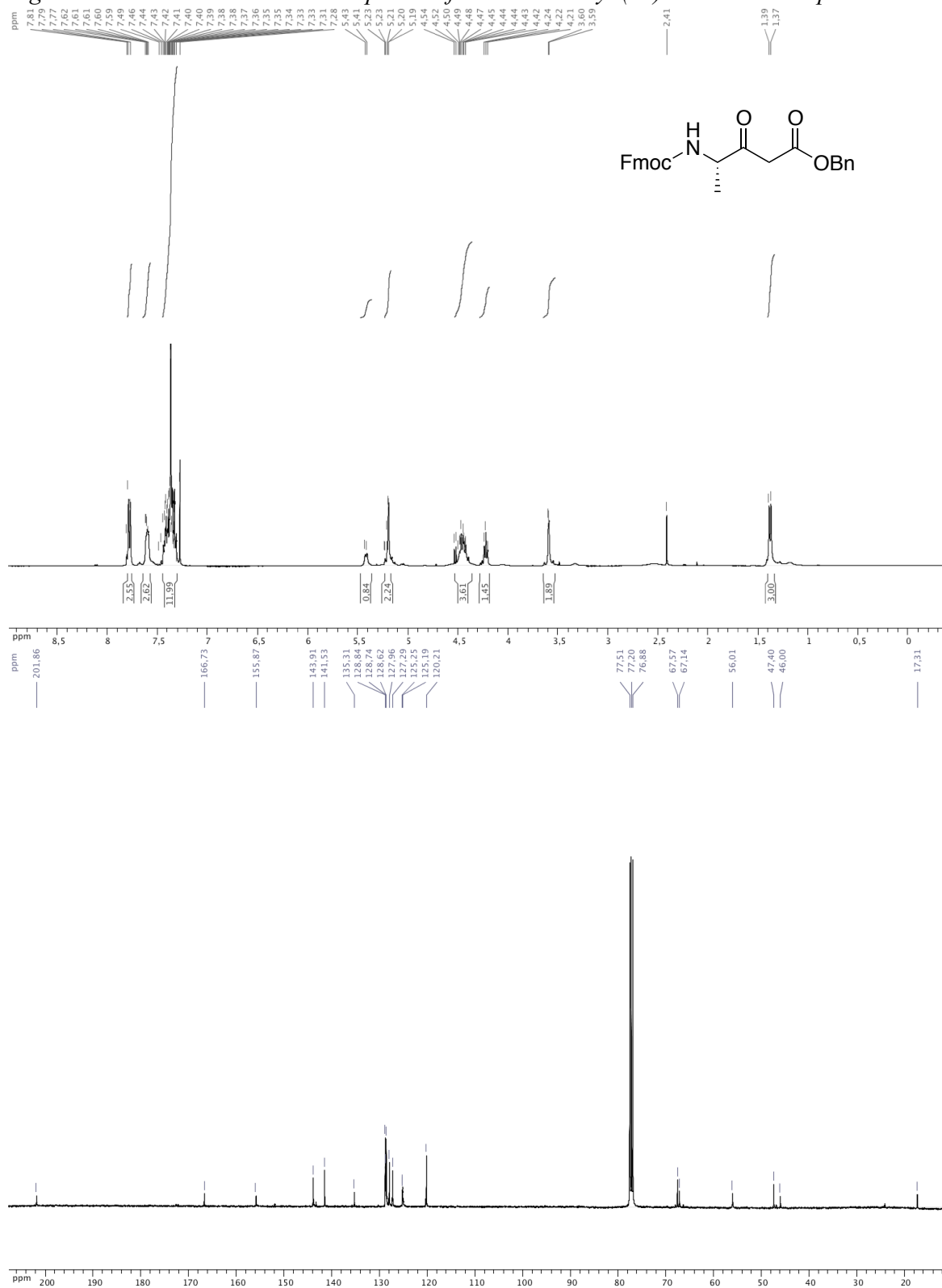


Figure S9: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of *N*-Fmoc Benzyl (4*S*)-4-amino-3-oxo-phenylpentanoate

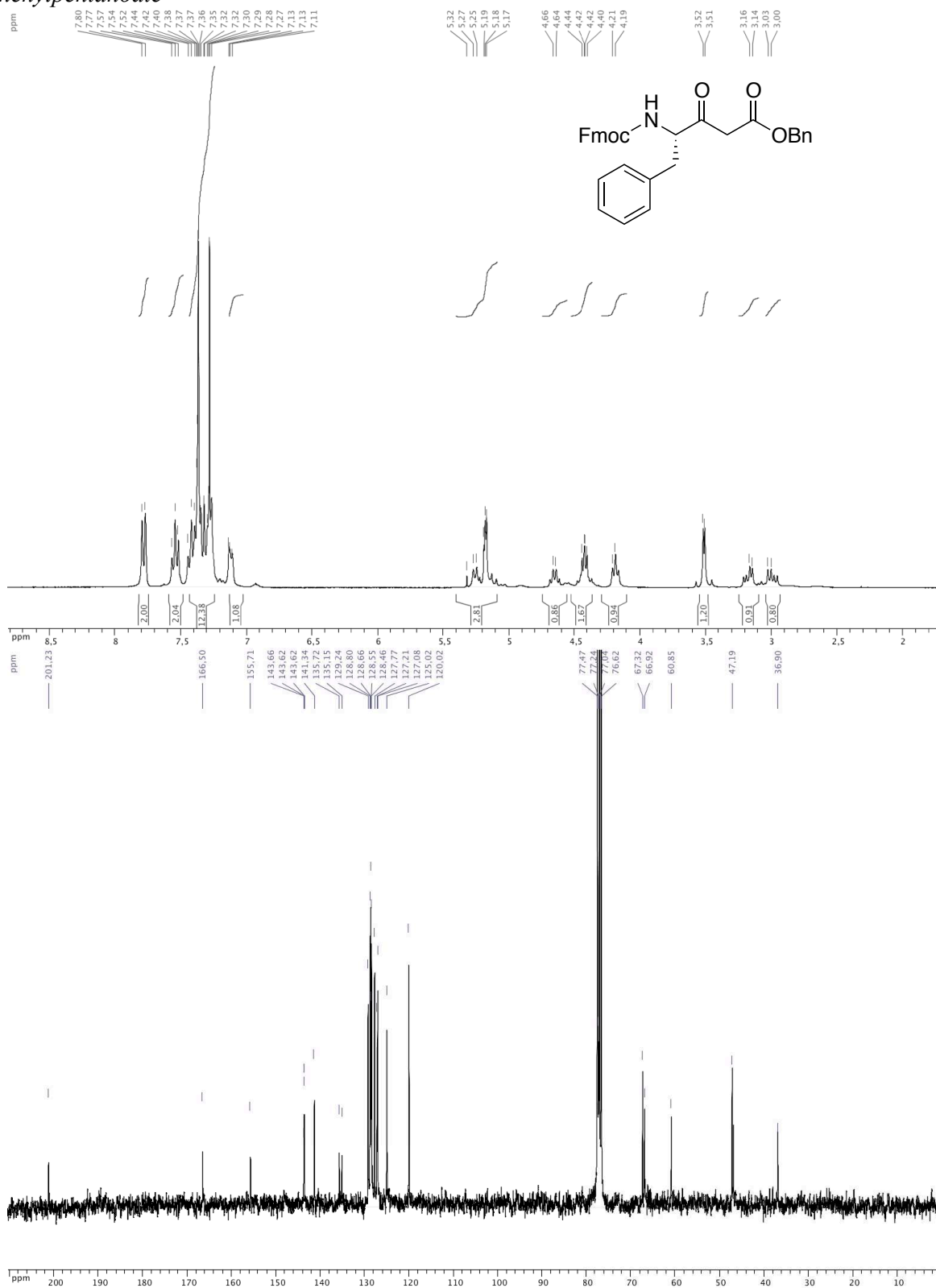


Figure S10: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of *N*-Fmoc Benzyl (4*S*)-4-amino-6-methyl-3-oxoheptanoate

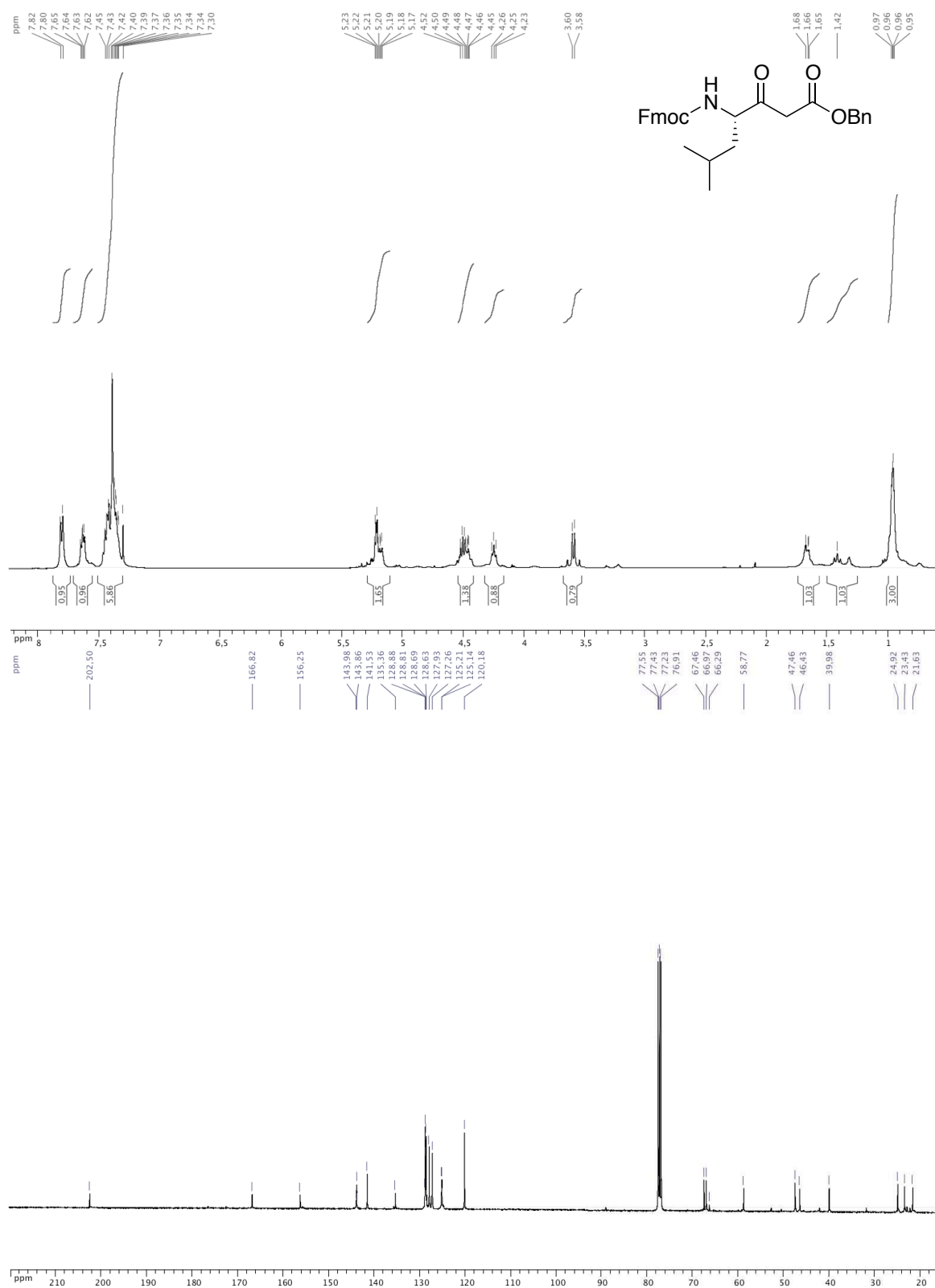


Figure S11: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of *N*-Fmoc Benzyl (4*S*)-4-amino-8[(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]3-oxooctanoate

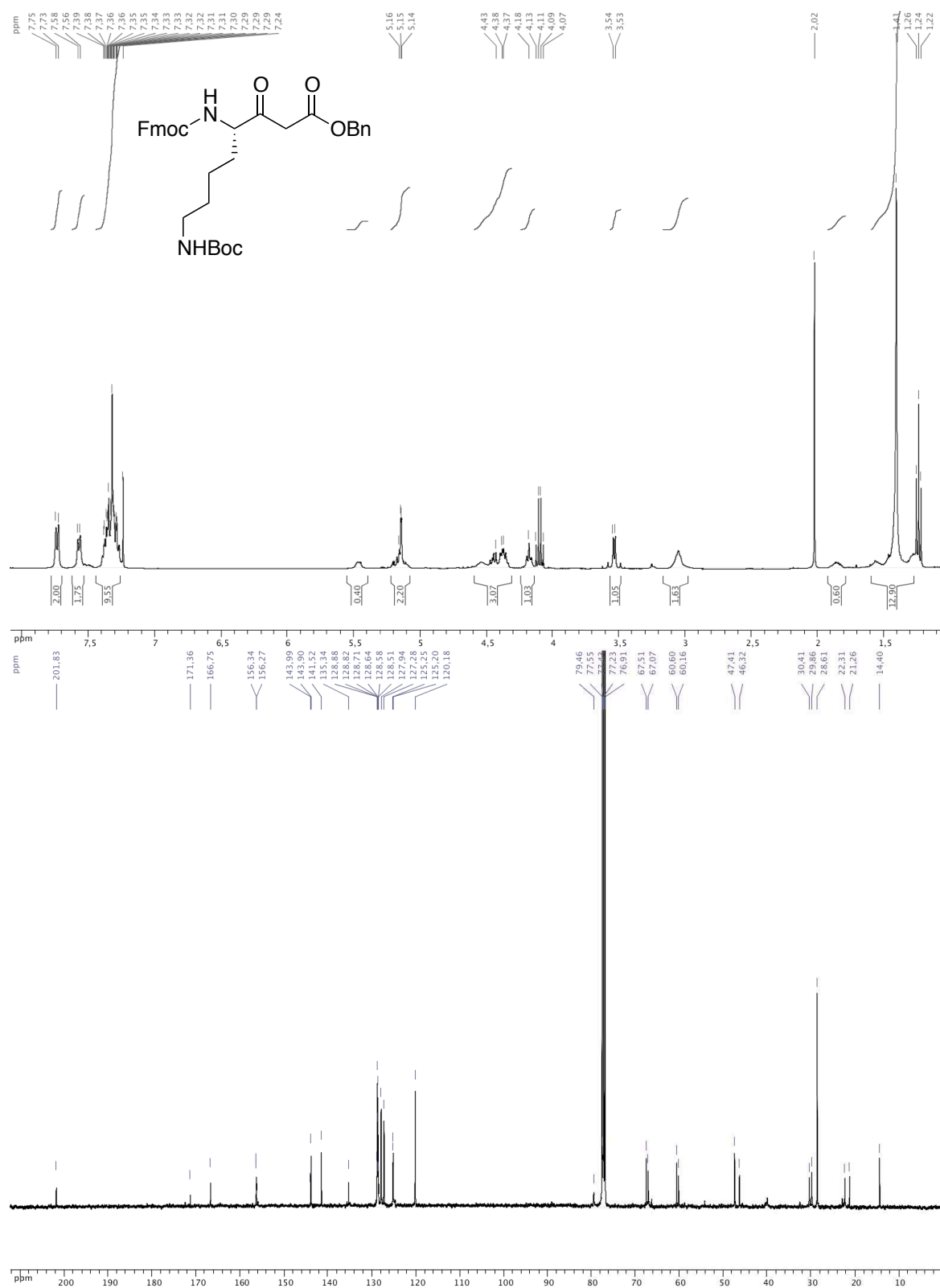


Figure S12: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of *N*-Fmoc Benzyl 3-oxo-3-[(2*S*)-pyrrolidin-yl]-propanoate

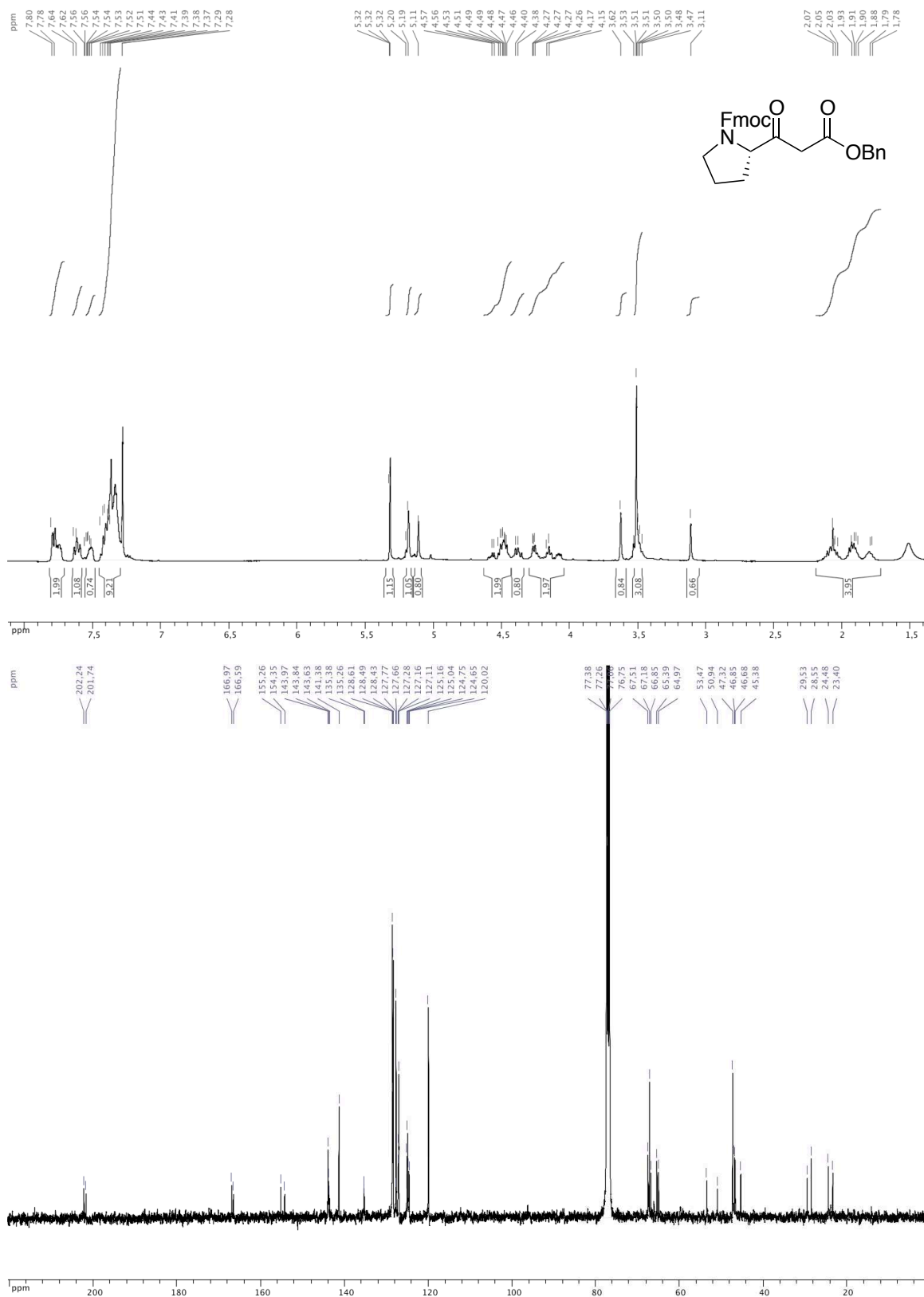
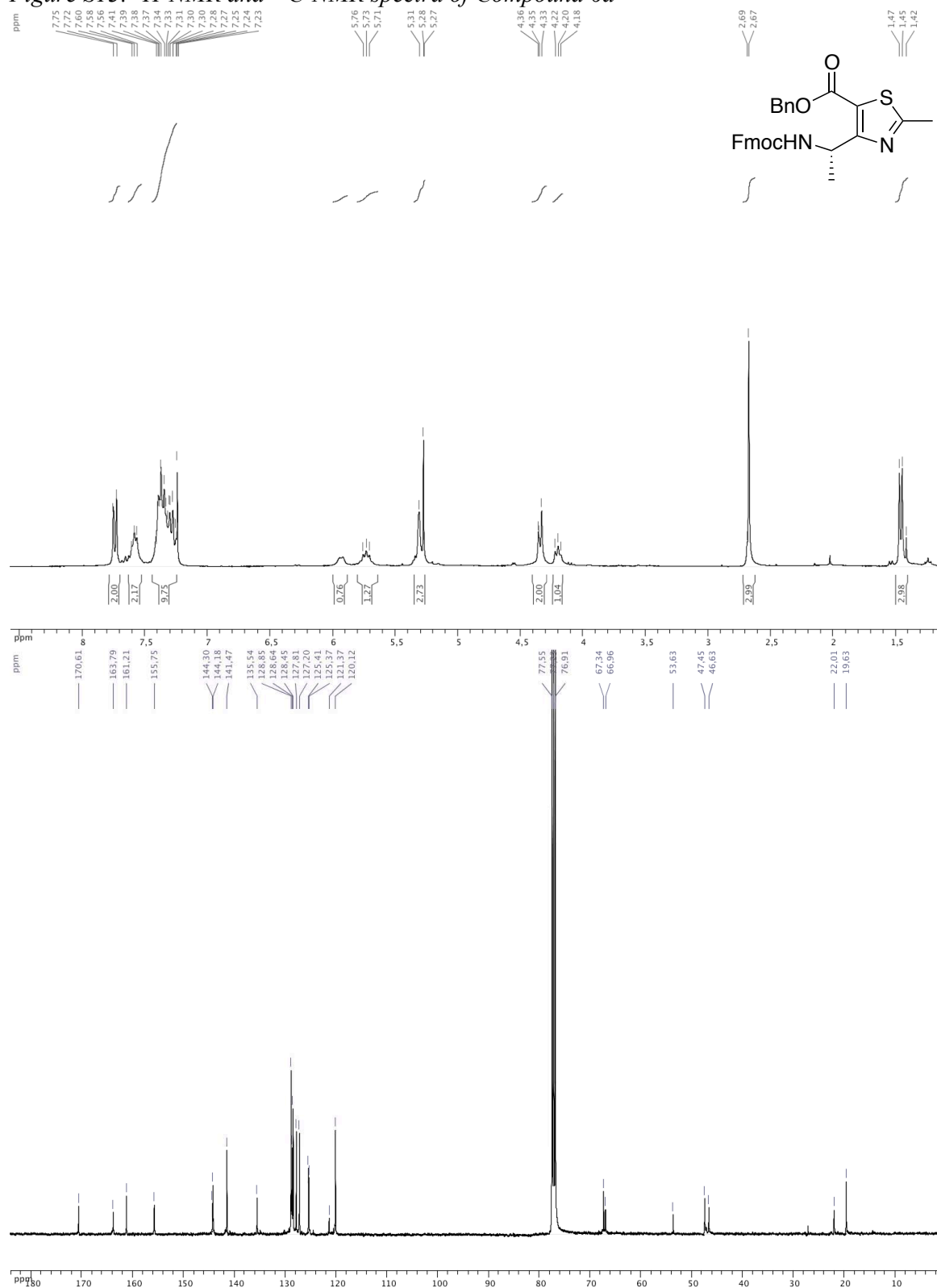


Figure S13: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of Compound 6a



Chiral HPLC analysis (chiralcel OD-R 250 mm x 4.6 mm; H_2O , TFA 0.1% / ACN, TFA 0.1%. 40: 60; 1ml / min).
(S)-6a: tr 27.5 min (ee 98%).

(R)-6a: tr 20.7 min (ee 93%).

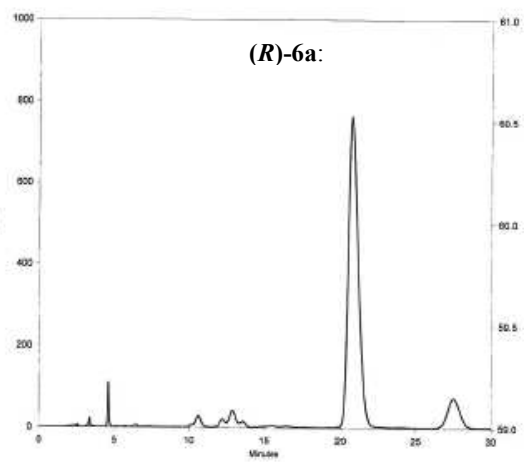
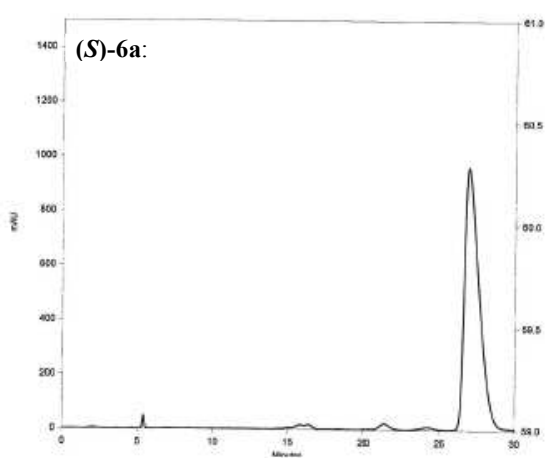


Figure S14: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of Compound 6b

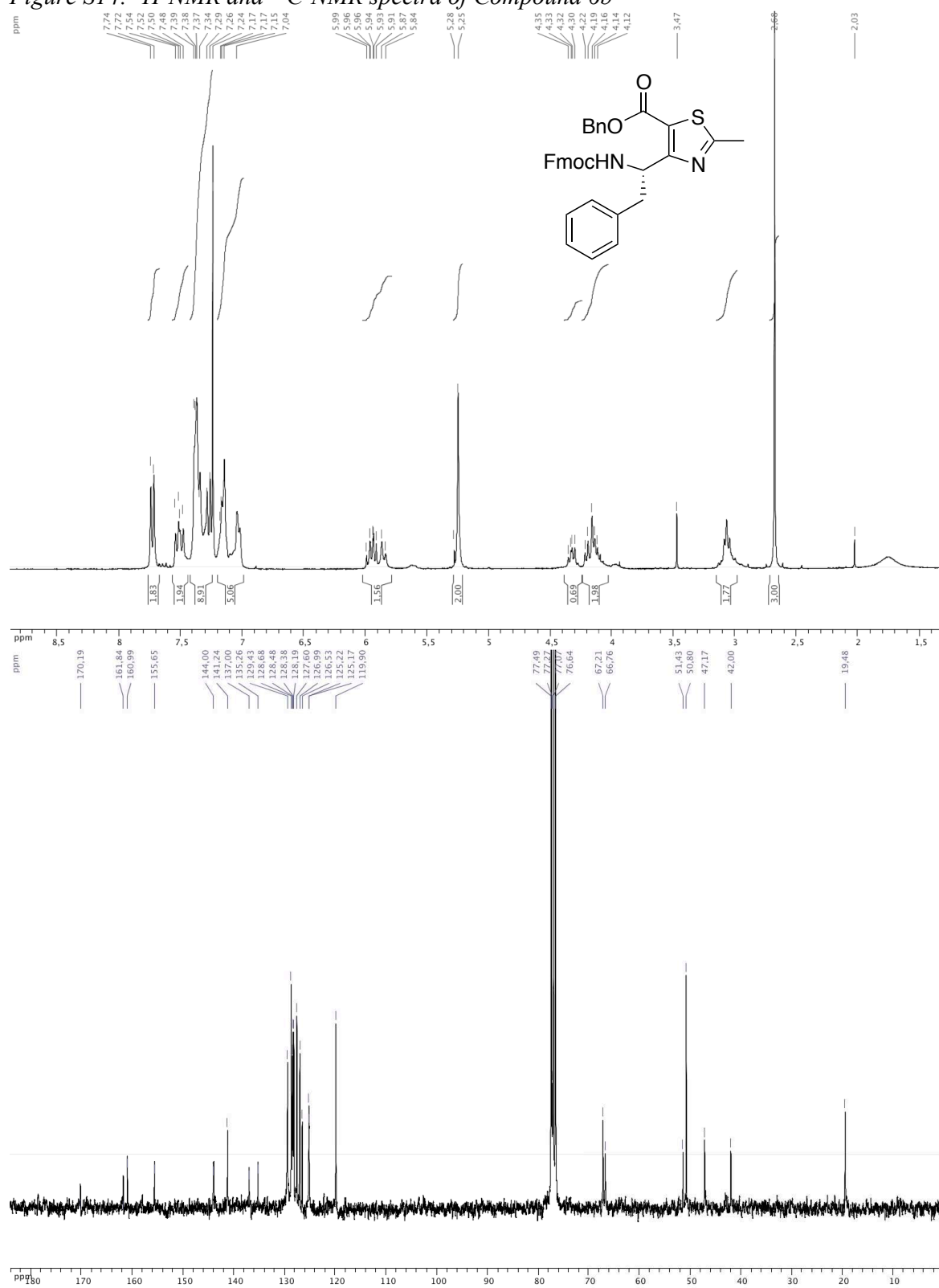


Figure S15: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of Compound 6c

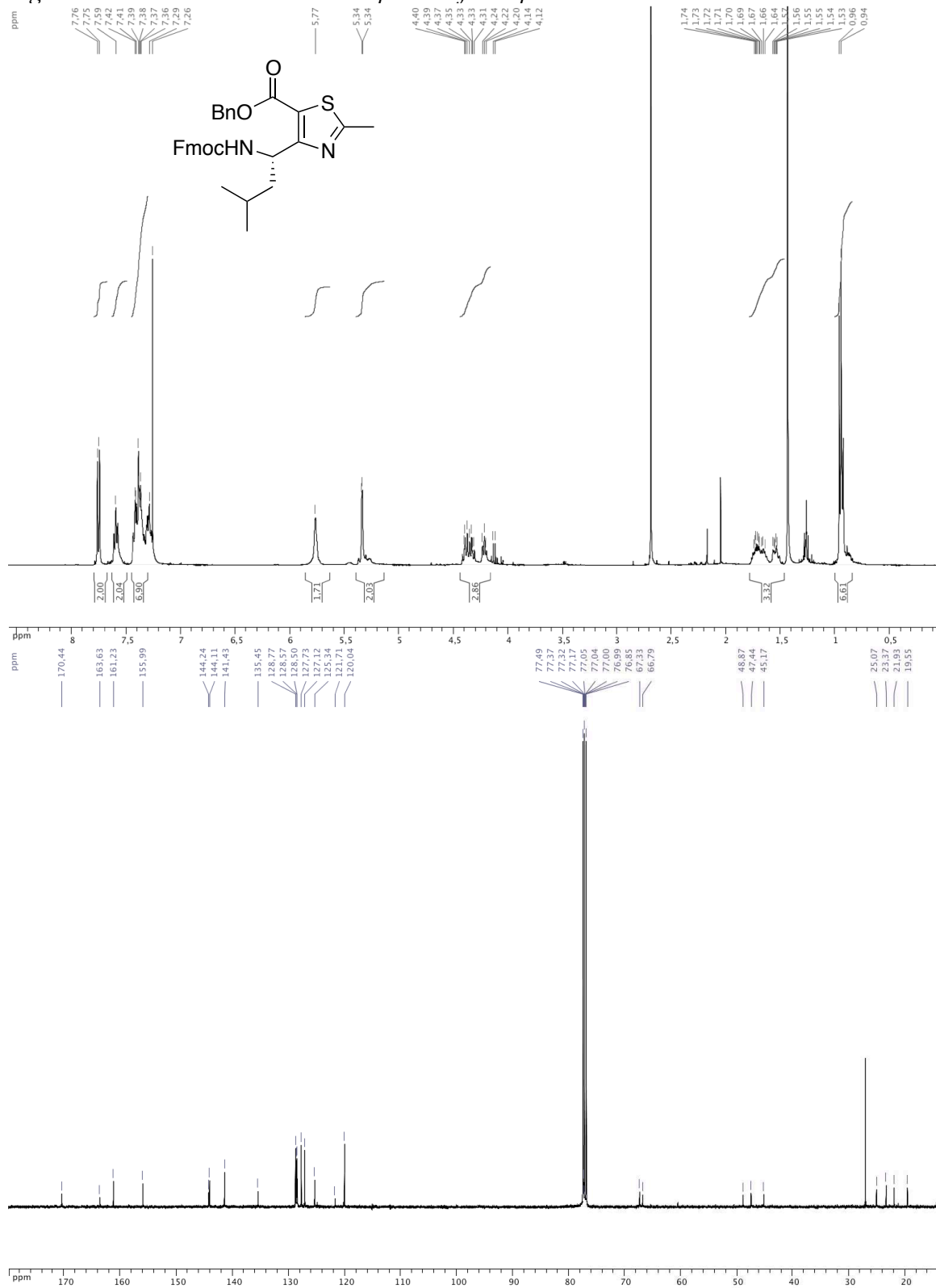


Figure S16: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of Compound 6d

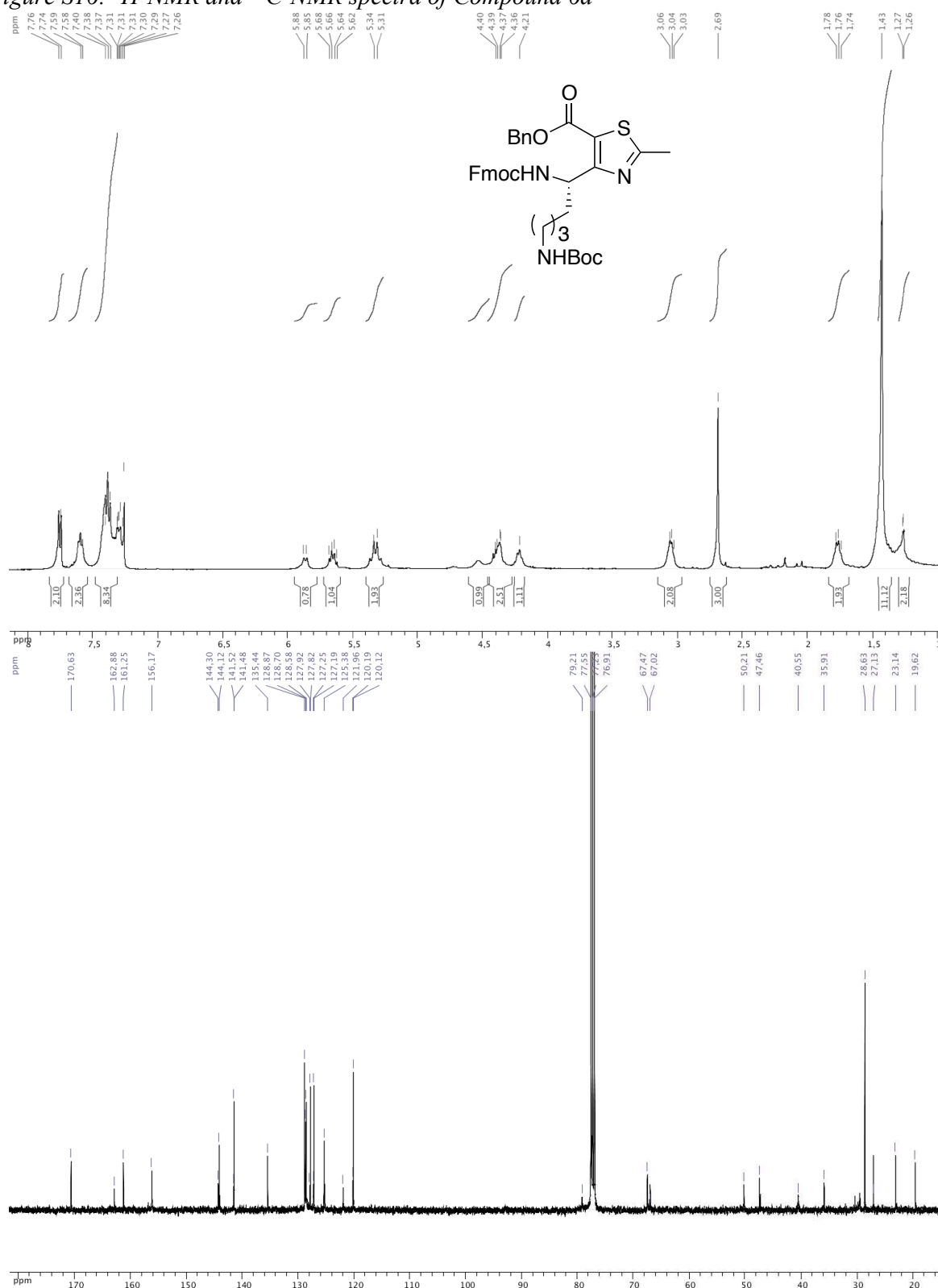


Figure S17: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of Compound 6e

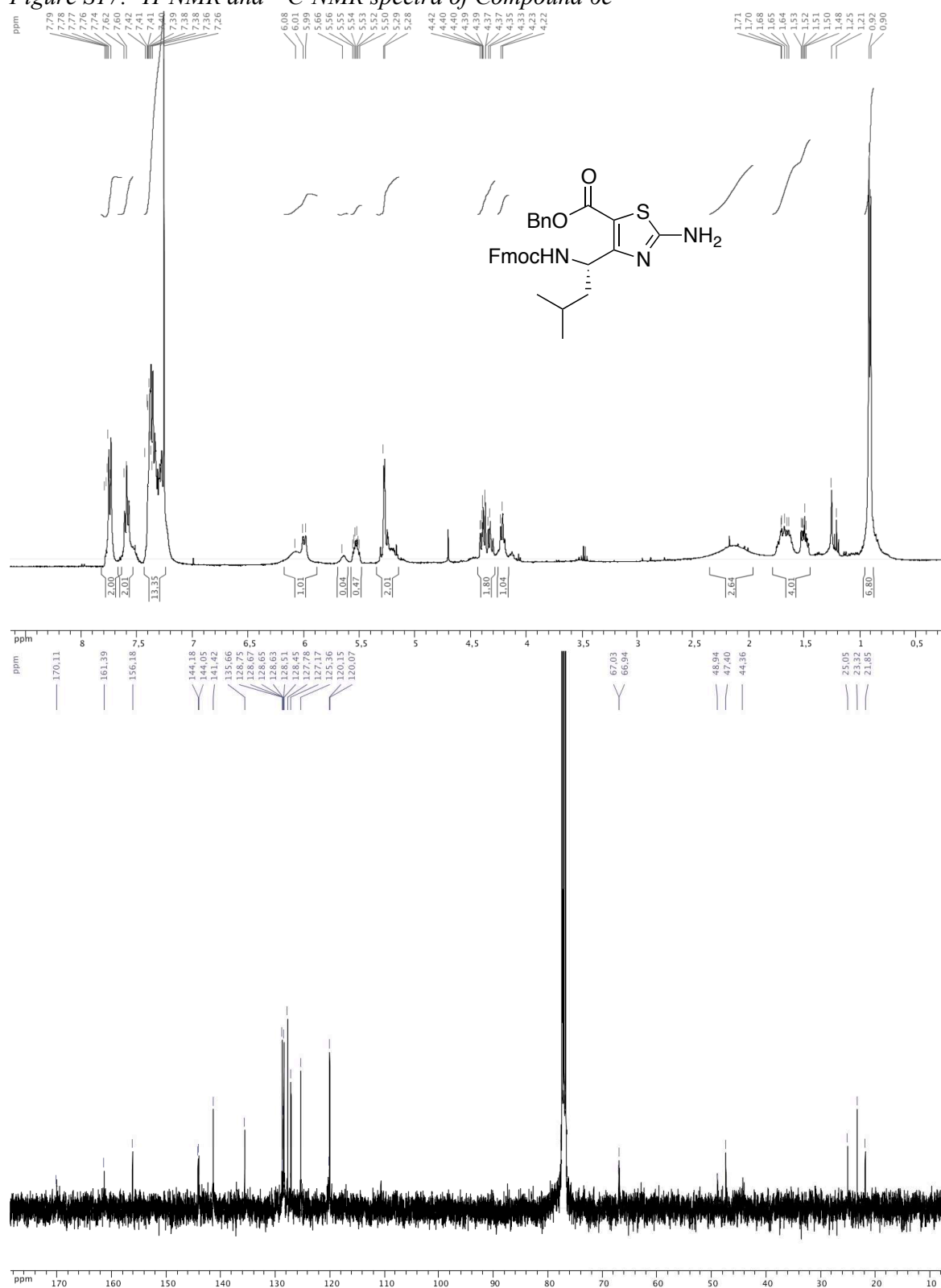


Figure S18: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of Compound 6f

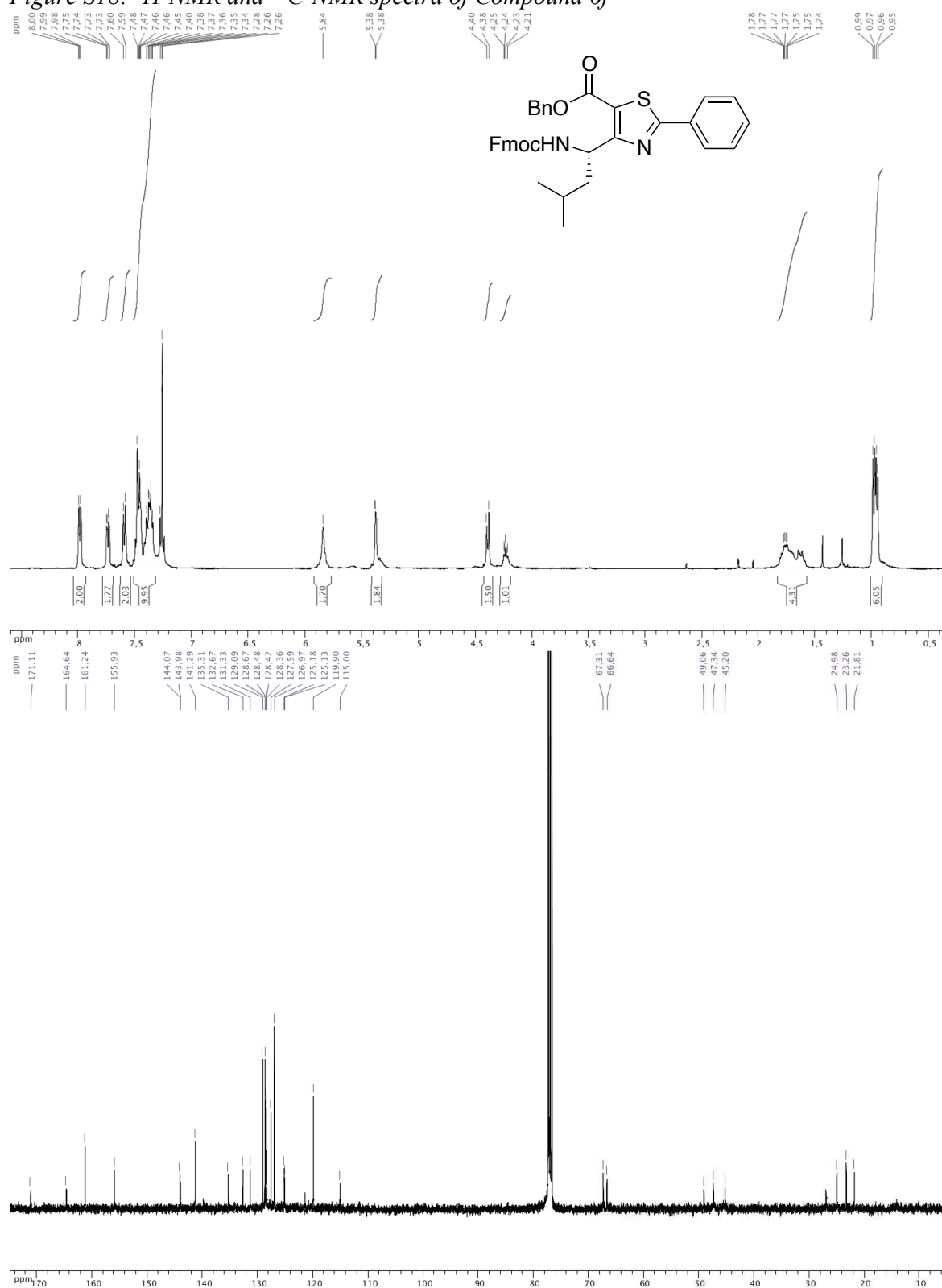


Figure S19: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of Compound 6g

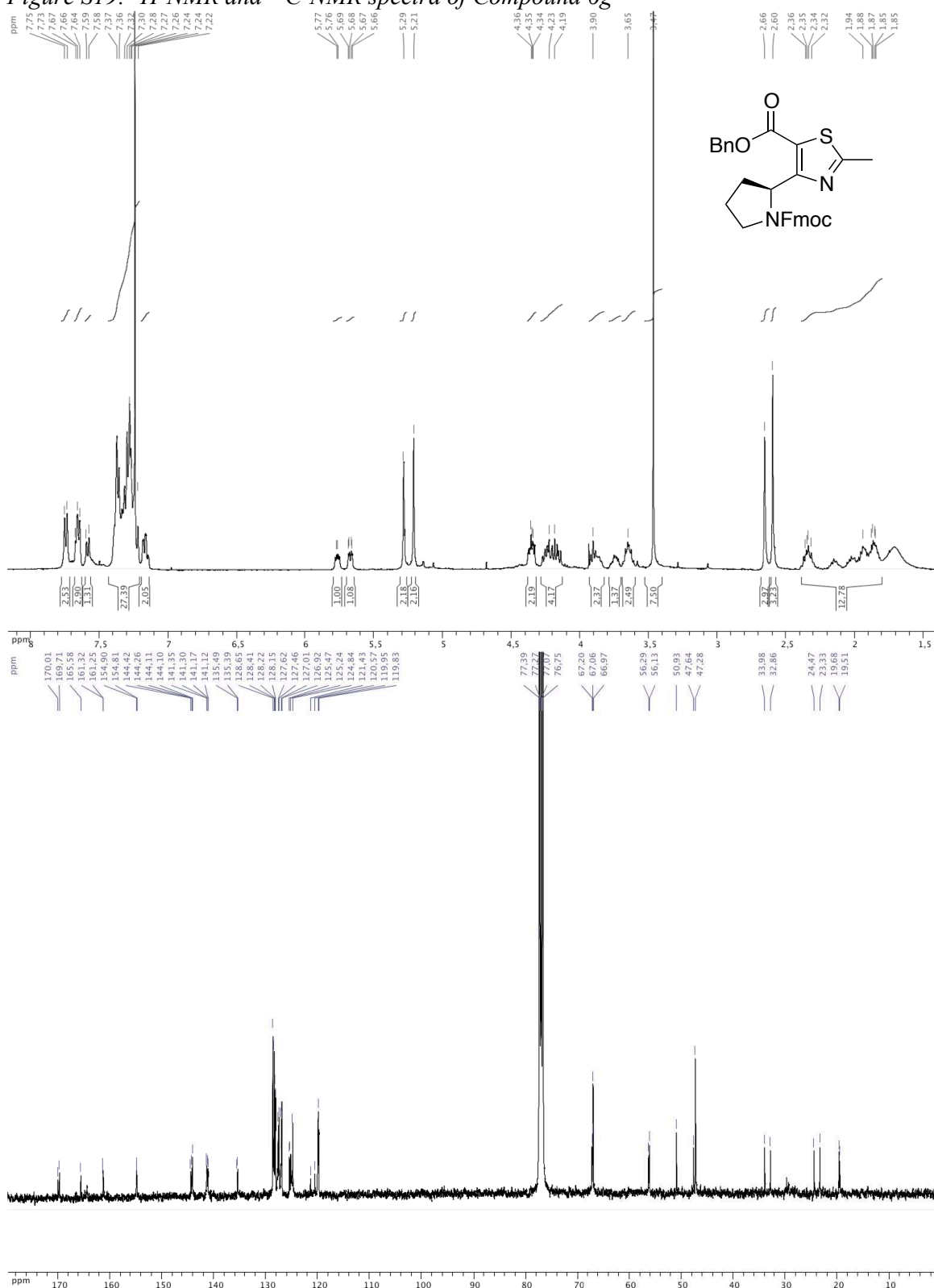


Figure S20: ^{13}C -NMR spectra of Compound 2

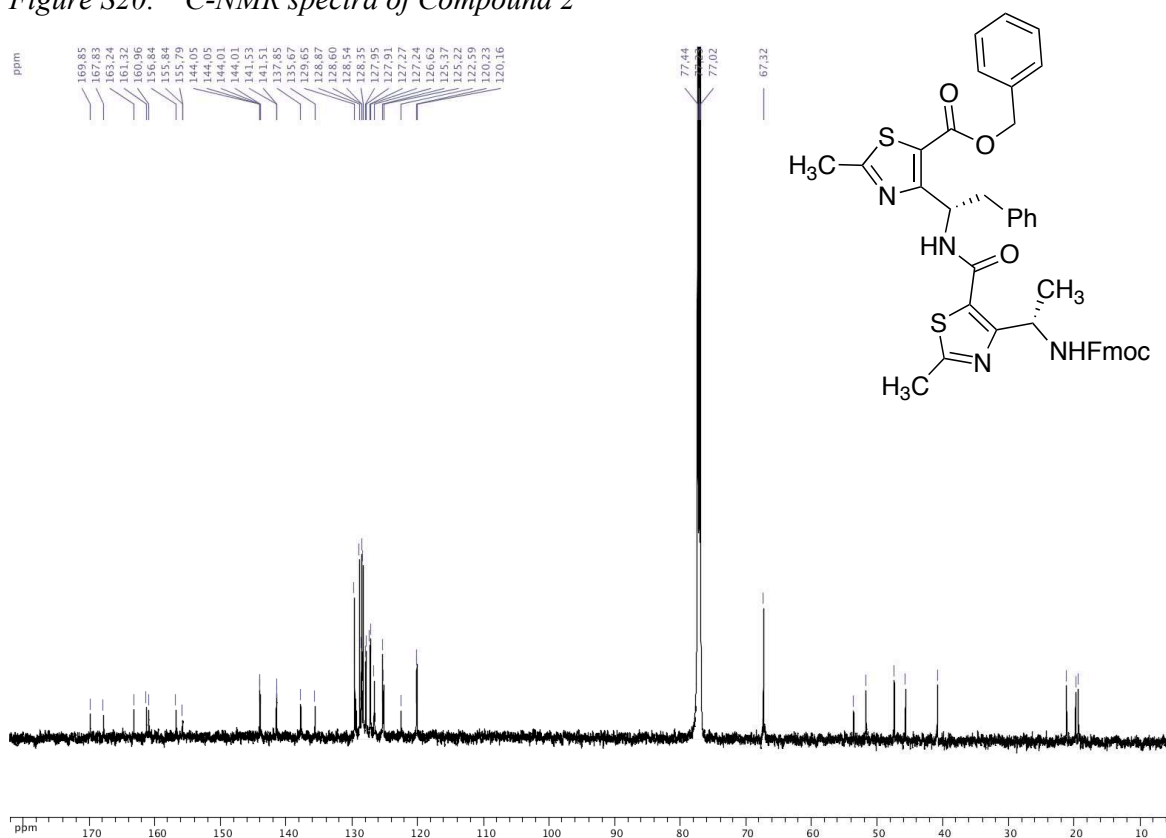


Figure S21: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of Compound 8

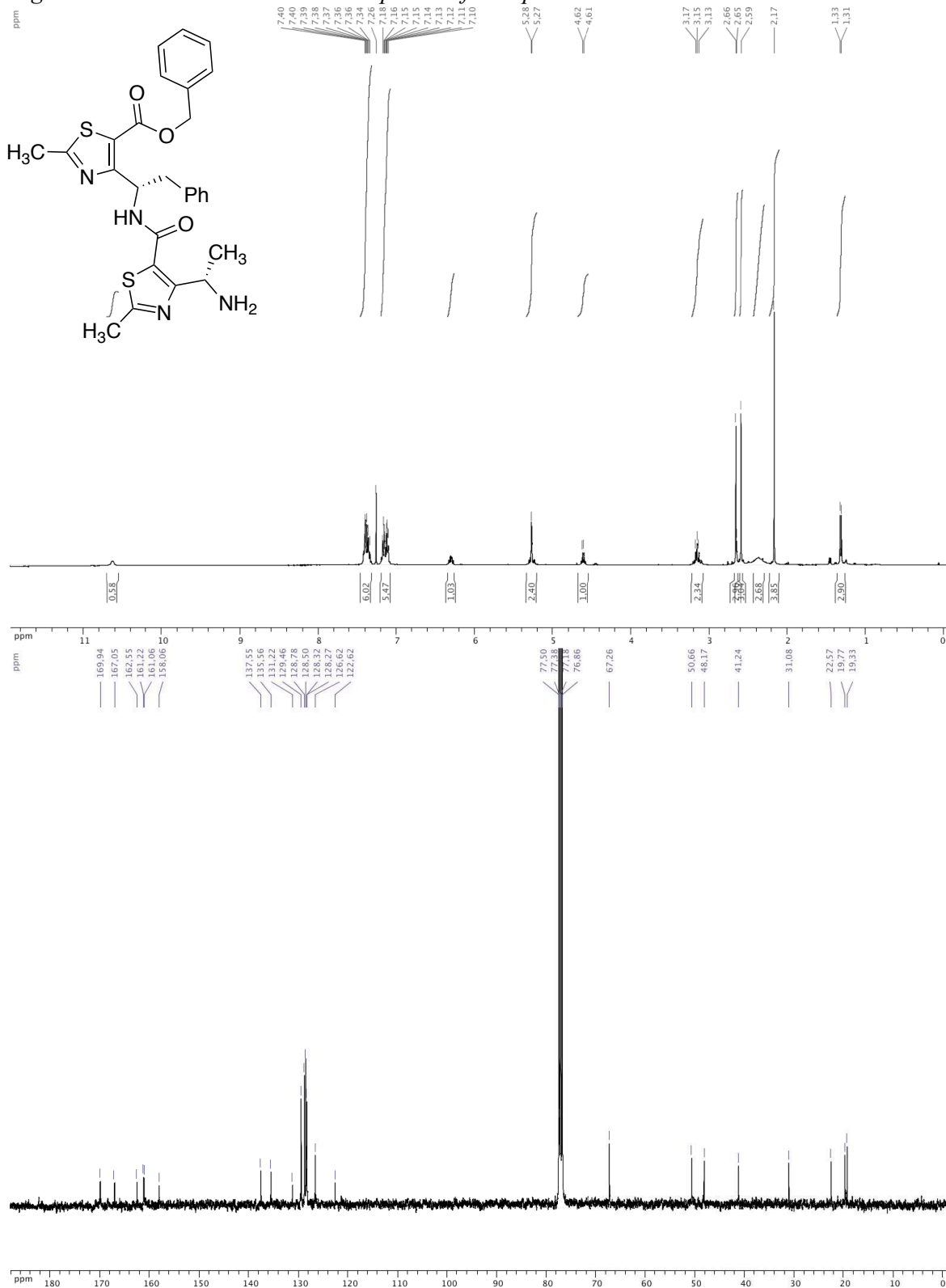
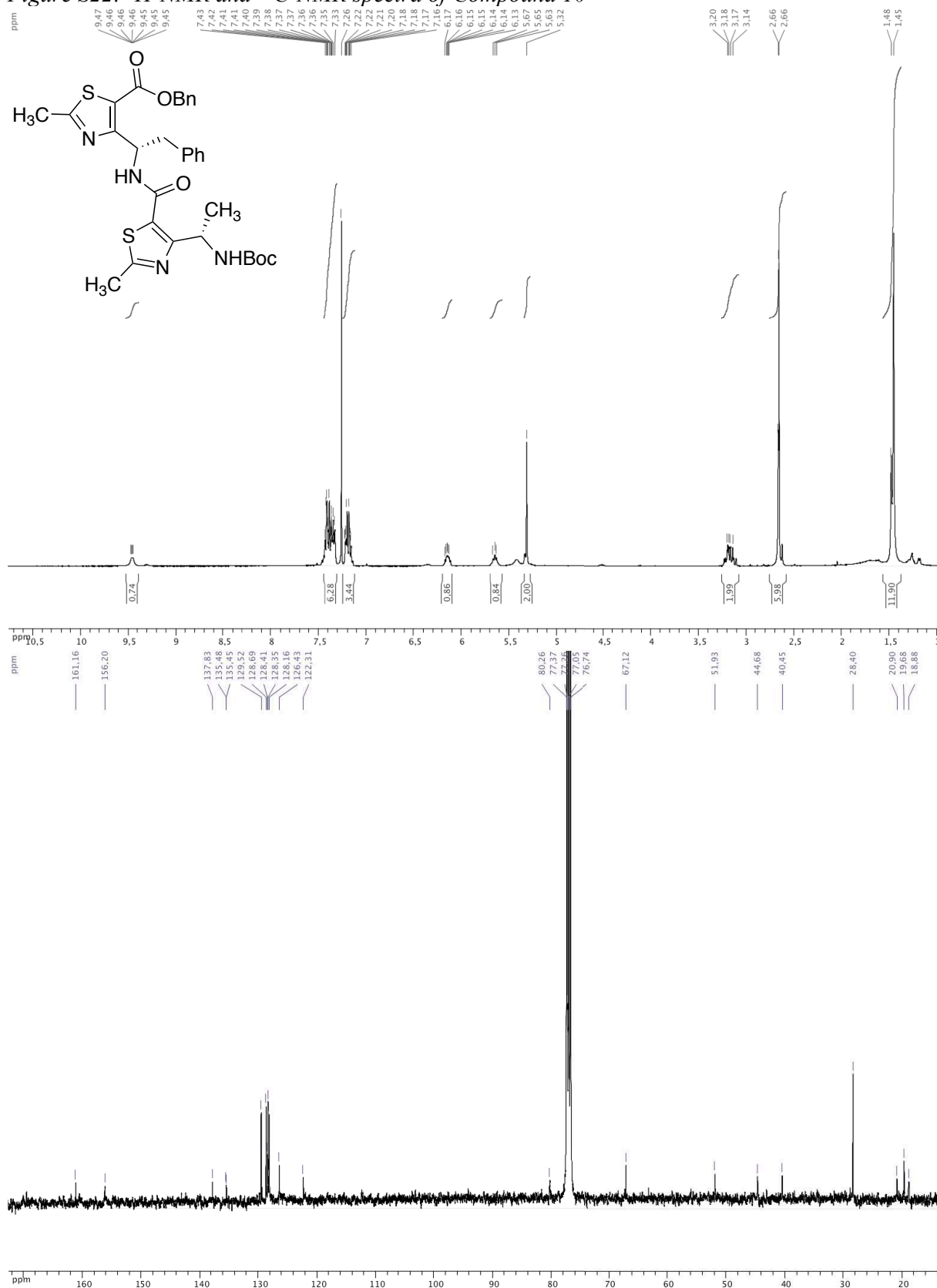


Figure S22: $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of Compound 10



**L'ATC comme mime de coude: conception d'un analogue
de la Gramicidine S**

CHEMISTRY

A European Journal

Supporting Information

© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2014

Thiazole-Based γ -Building Blocks as Reverse-Turn Mimetic to Design a Gramicidin S Analogue: Conformational and Biological Evaluation

Baptiste Legrand,^[a] Loïc Mathieu,^[a] Aurélien Lebrun,^[a] Soahary Andriamanarivo,^[a]
Vincent Lisowski,^[a] Nicolas Masurier,^[a] Séverine Zirah,^[b] Young Kee Kang,^[c] Jean Martinez,^[a]
and Ludovic T. Maillard*^[a]

chem_201402190_sm_miscellaneous_information.pdf

Supporting Information

Baptiste Legrand^{a§}, Loïc Mathieu^{a§}, Aurélien Lebrun^a, Sohary Andriamanarivo^a, Vincent Lisowski^a, Nicolas Masurier^a, Séverine Zirah^b, Young Kee Kang^c, Jean Martinez^a, Ludovic T. Maillard^{a*}

*Corresponding author: Ludovic T. Maillard. Tel.: + (33) 4 11 75 96 04,
Fax: + (33) 4 11 75 96 41, e-mail: ludovic.maillard@univ-montp1.fr

I. NMR data and NMR solution structures of 3a and 3b	2
Tables S1-S4: ¹ H, ¹³ C and ¹⁵ N NMR chemical shifts for 3a, 3b in DMSO- <i>d</i> ₆ and CD ₃ OH.....	2
Tables S5-S6: ¹ H NMR chemical shifts variations ($\Delta\delta$) between 3a and 3b in DMSO- <i>d</i> ₆ and CD ₃ OH ($\Delta\delta = \Delta\delta_{3b} - \Delta\delta_{3a}$, in ppm).....	3
Figure S1: Superimposition of the amide region of the ROESY spectra of 3a and 3b.....	4
Tables S7: Coupling Constants ³ J(NH, ¹³ CH) of 3a and 3b (in Hz) in DMSO- <i>d</i> ₆ and CD ₃ OH at 298 K.	4
Tables S8: Amide protons chemical shift temperature coefficients of 3a and 3b (in ppb/K).....	5
Figure S2: Variable Temperature NMR data for compound 3a (d ₆ -DMSO, 1 mM)	5
Figure S3: Variable Temperature NMR data for compound 3b (d ₆ -DMSO, 1 mM)	6
Figure S4: Solvent dependence of NH chemical shifts at varying concentration of DMSO- <i>d</i> ₆ in CDCl ₃	6
Tables S9-S10: Unambiguous inter-residue NOEs assigned in the ROESY spectra of 3a and 3b....	7
Table S11: Root Mean Square Deviations (RMSD, Å) of the 20 lowest energy NMR structures of 3a and 3b.....	8
Table S12: Backbone torsion angles of 3a and 3b of the 20 lowest NMR.....	8
Table S13: Hydrogen bonding pattern statistical analysis on the 20 lowest NMR structures of 3a and 3b ($d_{O-N} < 3.5$ Å and N-H-O angle $> 120^\circ$).....	8
II. NMR data of gramicidin S and 4	9
Tables S14-S15: ¹ H, ¹³ C and ¹⁵ N NMR chemical shifts of gramicidin S and 4 in DMSO- <i>d</i> ₆	9
Table S16: Coupling Constants ³ J(NH, ¹³ CH) of gramicidin S and 4 (in Hz) in DMSO- <i>d</i> ₆ at 333 K.	9
Table S17: Amide protons chemical shift temperature coefficients of gramicidin S and 4 (in ppb/K).....	10
Tables S18-S19: Unambiguous inter-residue NOEs assigned in the ROESY spectra of GS and 4. 10	10
Tables S20-S21: Backbone dihedral angle values for 4.....	12
Table S22: Hydrogen bonding occupancies in 3a and 3b ($d_{O-N} < 3.5$ Å and N-H-O angle $> 120^\circ$) after restrained molecular dynamic (rMD) and unrestrained MD.	13
Figure S5: (a) Backbone root mean square deviations (RMSD) and (b) Root mean square fluctuation (RMSF) of backbone heavy atoms of 3a (green) and 3b (blue) along the rMD (light) and the MD (dark) simulations in a methanol box.	14
Figure S6: Distributions of the backbone dihedral angle values (°) of 3a (green) and 3b (blue) sampled during the 50 ns MD (dark) and rMD (light) simulations.....	15
III. Comparison of the backbone torsion angles of 3a and 3b determined from the 20 lowest energy NMR structure, over the 50 ns of the MD simulations and DFT calculation	16
Table S23: Backbone torsion angles of 3a and 3b (°).....	16
IV. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra	18
V. HPLC analysis and mass spectra	24

I. NMR data and NMR solution structures of 3a and 3b

Tables S1-S4: ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR chemical shifts for 3a, 3b in DMSO- d_6 and CD_3OH .

Table S1-S2: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts for 3a in DMSO- d_6 and CD_3OH at 298 K.

- DMSO- d_6

Residue	NH	$H_{\alpha/\gamma}$	$H_{\beta/\delta}$	Others
Ac	-	1.86	-	
Val	7.71	4.16 ^(α)	1.87 ^(β)	CH_3 0.71, 0.69
ATC	8.58	5.31 ^(γ)	1.39 ^(δ)	CH_3 2.59
Ile	9.32	4.31 ^(α)	1.89 ^(β)	$^{\gamma 1}\text{CH}_2$ 1.46, 1.20 $^{\delta}\text{CH}_3$ 0.83 $^{\gamma 2}\text{CH}_3$ 0.91
Ala	7.97	4.22 ^(α)	1.21 ^(β)	
NH_2	7.24, 6.94	-	-	

Residue	C=O	N	$C_{\alpha/\gamma}$	$C_{\beta/\delta}$	Others
Ac	169.1	-	22.4	-	
Val	171.8	118.9	57.1 ^(α)	30.2 ^(β)	CH_3 18.1
ATC	170.0	131.1	44.0 ^(γ)	20.0 ^(δ)	$^{\alpha}\text{C}$ 128.1 $^{\beta}\text{C}$ 155.5 CH_3 18.8
Ile	160.8	122.7	58.0 ^(α)	36.1 ^(β)	$^{\gamma 1}\text{CH}_2$ 24.2 $^{\delta}\text{CH}_3$ 11.1 $^{\gamma 2}\text{CH}_3$ 15.4
Ala	174.0	123.2	47.9 ^(α)	17.9 ^(β)	
NH_2	-	103.2	-	-	

- CD_3OH

Residue	NH	$H_{\alpha/\gamma}$	$C_{\beta/\delta}$	Others
Ac	-	1.98	-	
Val	7.94	4.18 ^(α)	1.95 ^(β)	CH_3 0.76, 0.83
ATC	8.54	5.37 ^(γ)	1.50 ^(δ)	CH_3 2.64
Ile	9.72	4.37 ^(α)	2.00 ^(β)	$^{\gamma 1}\text{CH}_2$ 1.60, 1.30 $^{\delta}\text{CH}_3$ 0.93 $^{\gamma 2}\text{CH}_3$ 1.02
Ala	8.21	4.38 ^(α)	1.37 ^(β)	
NH_2	7.47, 6.93	-	-	

Residue	C=O	N	$C_{\alpha/\gamma}$	$C_{\beta/\delta}$	Others
Ac	173.2	-	22.4	-	
Val	173.7	121.2	59.7 ^(α)	32.0 ^(β)	CH_3 19.3, 18.5
ATC	173.2	132.0	45.8 ^(γ)	20.0 ^(δ)	$^{\alpha}\text{C}$ 129.7 $^{\beta}\text{C}$ 157.0 CH_3 18.9
Ile	163.8	124.9	60.6 ^(α)	38.0 ^(β)	$^{\gamma 1}\text{CH}_2$ 26.1 $^{\delta}\text{CH}_3$ 11.5 $^{\gamma 2}\text{CH}_3$ 15.9
Ala	177.3	124.9	50.1 ^(α)	18.3 ^(β)	
NH_2	-	101.1	-	-	

Table S3-S4: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts for 3b in DMSO- d_6 and CD_3OH at 298 K.

- DMSO- d_6

Residue	NH	$H_{\alpha/\gamma}$	$H_{\beta/\delta}$	Others
Ac	-	1.84	-	
Val	7.81	4.30 ^(α)	1.89 ^(β)	CH_3 0.84, 0.82
ATC	8.92	5.14 ^(γ)	1.38 ^(δ)	CH_3 2.63
Ile	9.3	4.26 ^(α)	1.91 ^(β)	$^{\gamma 1}\text{CH}_2$ 1.51, 1.20 $^{\delta}\text{CH}_3$ 0.83 $^{\gamma 2}\text{CH}_3$ 0.91
Ala	7.96	4.22 ^(α)	1.22 ^(β)	
NH_2	7.27, 6.99	-	-	

Residue	C=O	N	C _{α/γ}	C _{β/δ}	Others
Ac	169.1	-	22.5	-	
Val	171.8	119.4	56.9 ^(α)	31.1 ^(β)	CH ₃ 18.8, 18.3
ATC	170.0	132.4	44.2 ^(γ)	20.3 ^(δ)	^α C 128.6 ^β C 155.1 CH ₃ 18.9
Ile	160.8	122.5	58.4 ^(α)	36.3 ^(β)	^γ 1CH ₂ 24.8 ^δ CH ₃ 11.1 ^γ 2CH ₃ 15.6
Ala	174	122.5	48.0 ^(α)	18.1 ^(β)	
NH ₂	-	103.6	-	-	

- CD₃OH

Residue	NH	H _{α/γ}	H _{β/δ}	Others
Ac	-	1.95	-	
Val	8.04	4.28 ^(α)	2.04 ^(β)	CH ₃ 0.95, 0.93
ATC	8.78	5.20 ^(γ)	1.50 ^(δ)	CH ₃ 2.64
Ile	9.94	4.37 ^(α)	2.02 ^(β)	^γ 1CH ₂ 1.64, 1.31 ^δ CH ₃ 0.94 ^γ 2CH ₃ 1.03
Ala	8.25	4.41 ^(α)	1.39 ^(β)	
NH ₂	7.48, 6.98	-	-	

Residue	C=O	N	C _{α/γ}	C _{β/δ}	Others
Ac	173.0	-	22.4	-	
Val	173.7	120.6	59.3 ^(α)	32.7 ^(β)	CH ₃ 19.4, 18.4
ATC	173.2	131.9	46.2 ^(γ)	20.2 ^(δ)	^α C 130.4 ^β C 156.2 CH ₃ 18.9
Ile	163.9	123.5	60.8 ^(α)	38.2 ^(β)	^γ 1CH ₂ 26.5 ^δ CH ₃ 11.5 ^γ 2CH ₃ 16.1
Ala	177.3	124.2	50.2 ^(α)	18.3 ^(β)	
NH ₂	-	101.1	-	-	

Tables S5-S6: ¹H NMR chemical shifts variations ($\Delta\delta$) between 3a and 3b in DMSO-*d*₆ and CD₃OH ($\Delta\delta = \Delta\delta_{3b} - \Delta\delta_{3a}$, in ppm). $\Delta\delta > 0.05$ ppm are indicated in red.

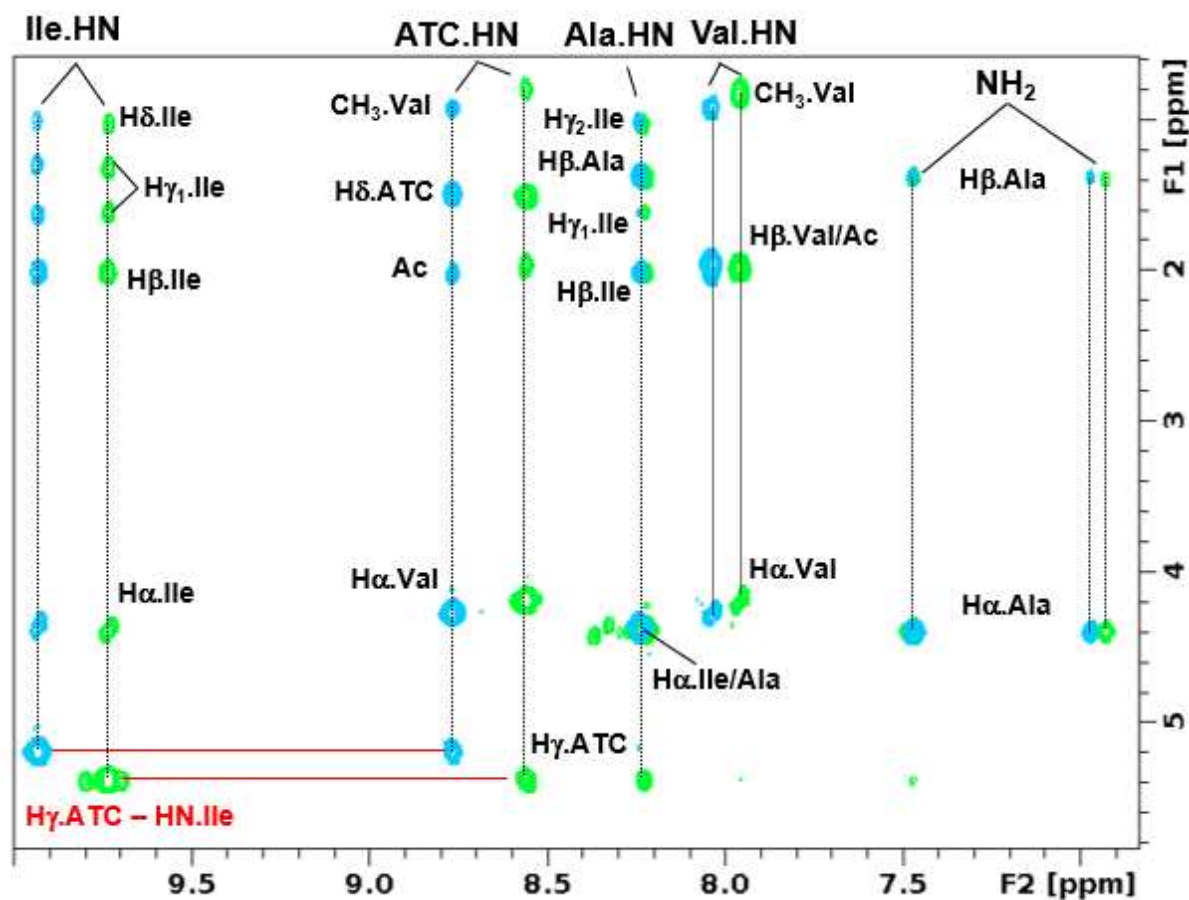
- DMSO-*d*₆

Residue	NH	H _{α/γ}	H _{β/δ}	Others
Ac	-	0.02	-	
Val	0.1	0.14 ^(α)	0.02 ^(β)	CH ₃ 0.13
ATC	0.34	-0.15 ^(γ)	-0.01 ^(δ)	CH ₃ 0.04
Ile	-0.02	0.05 ^(α)	0.02 ^(β)	^γ 1CH ₂ 0.05, 0 ^δ CH ₃ 0 ^γ 2CH ₃ 0
Ala	-0.01	0 ^(α)	0.01 ^(β)	
NH ₂	0.03, 0.05	-	-	

- CD₃OH

Residue	NH	H _{α/γ}	H _{β/δ}	Others
Ac	-	-0.03	-	
Val	-0.1	0.1 ^(α)	0.09 ^(β)	CH ₃ 0.14
ATC	0.24	-0.17 ^(γ)	0 ^(δ)	CH ₃ 0
Ile	0.22	0 ^(α)	0.02 ^(β)	γ ¹ CH ₂ 0.04, 0.01 δCH ₃ 0.01 γ ² CH ₃ 0.01
Ala	0.04	0.03 ^(α)	0.02 ^(β)	
NH ₂	0.24, 0.04	-	-	

Figure S1: Superimposition of the amide region of the ROESY spectra of 3a (green) and 3b (blue).



Tables S7: Coupling Constants $^3J(\text{NH}, \gamma\text{CH})$ of 3a and 3b (in Hz) in DMSO-*d*₆ and CD₃OH at 298 K.

Residue	3a		3b	
	DMSO- <i>d</i> ₆	CD ₃ OH	DMSO- <i>d</i> ₆	CD ₃ OH
Val	8.9	9.2	8.5	8.5
ATC	6.5	6.7	6.3	6.8
Ile	7.8	8.2	7.5	7.9
Ala	7.3	7.3	6.9	7.0

Tables S8: Amide protons chemical shift temperature coefficients of 3a and 3b (in ppb/K)

Residue	3a		3b	
	$\Delta\delta / \Delta T$ (ppb/K)		$\Delta\delta / T$ (ppb/K)	
	DMSO- d_6	CD $_3$ OH	DMSO- d_6	CD $_3$ OH
Val	-5.2	-7.4	-5.5	-7.2
ATC	-6.2	-7.5	-7.0	-8.1
Ile	-6.7	-8.4	-5.2	-8.2
Ala	-4.9	-7.4	-4.6	-7.4
NH2 a	-4.2	-5.9	-3.5	-5.2
NH2 b	-4.0	-6.2	-4.0	-6.5

Figure S2: Variable Temperature NMR data for compound 3a (d6-DMSO, 1 mM)

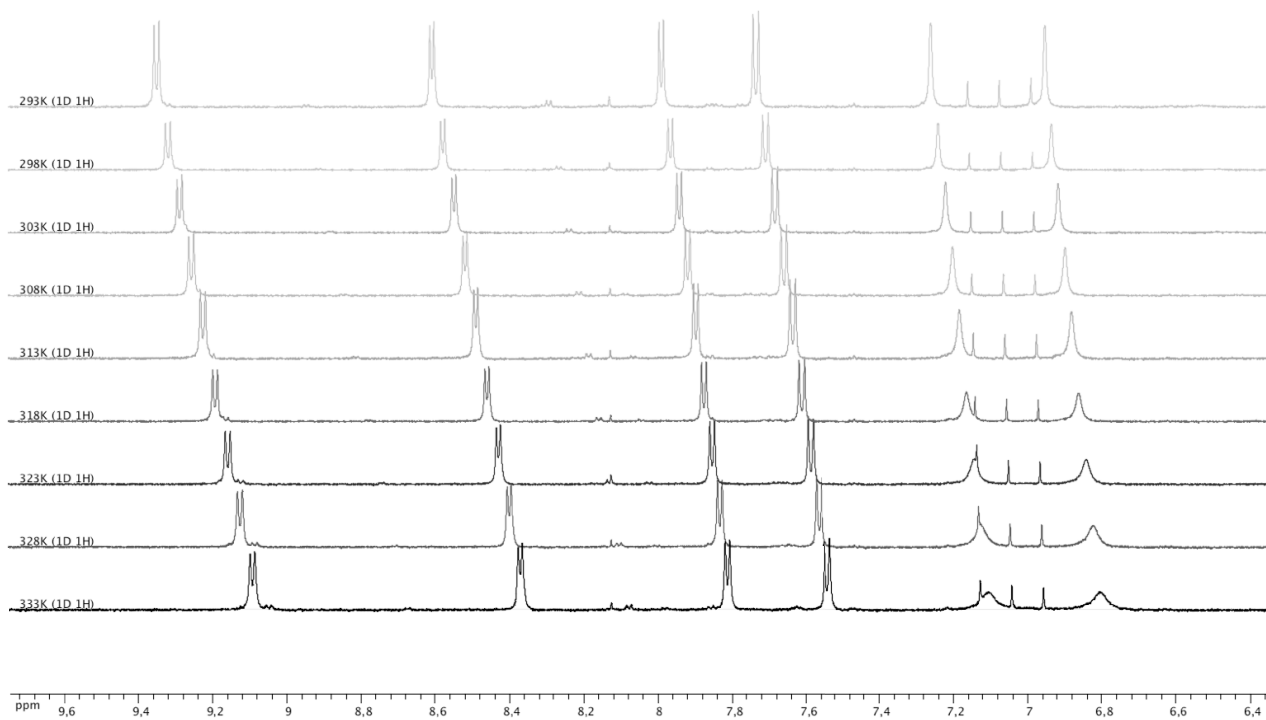


Figure S3: Variable Temperature NMR data for compound 3b (d6-DMSO, 1 mM)

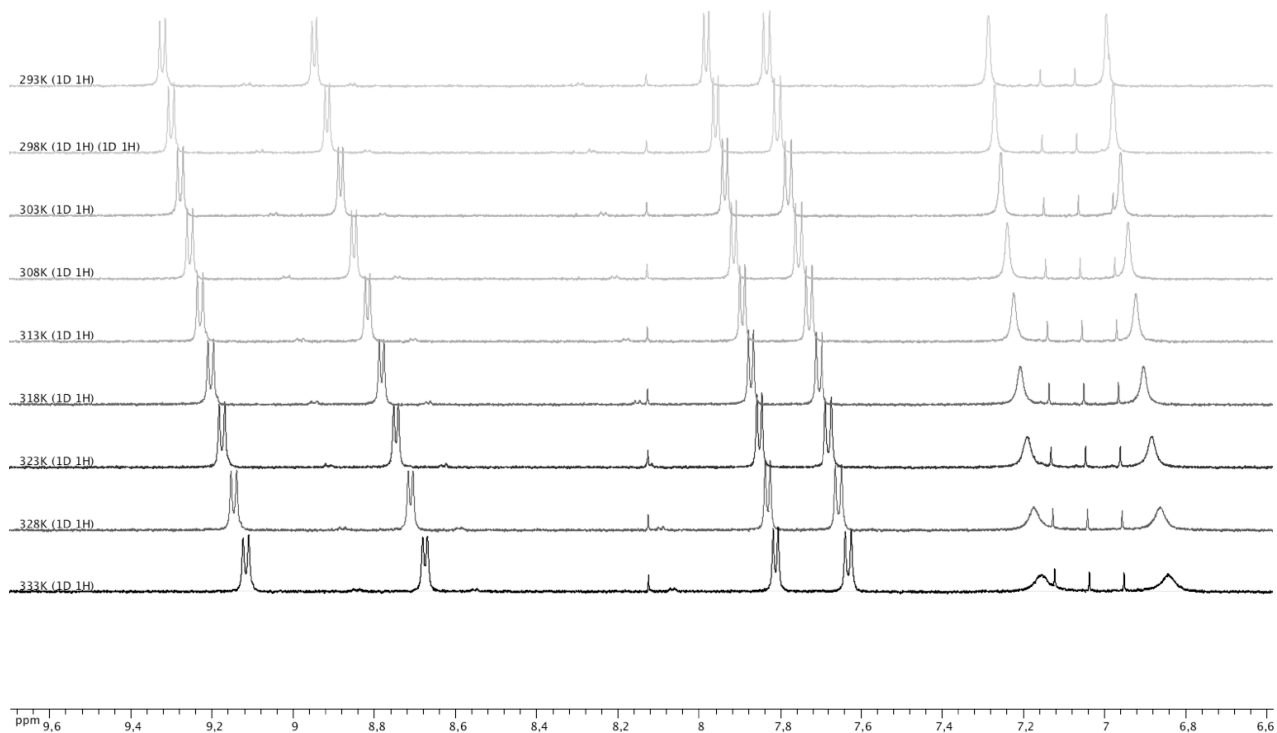
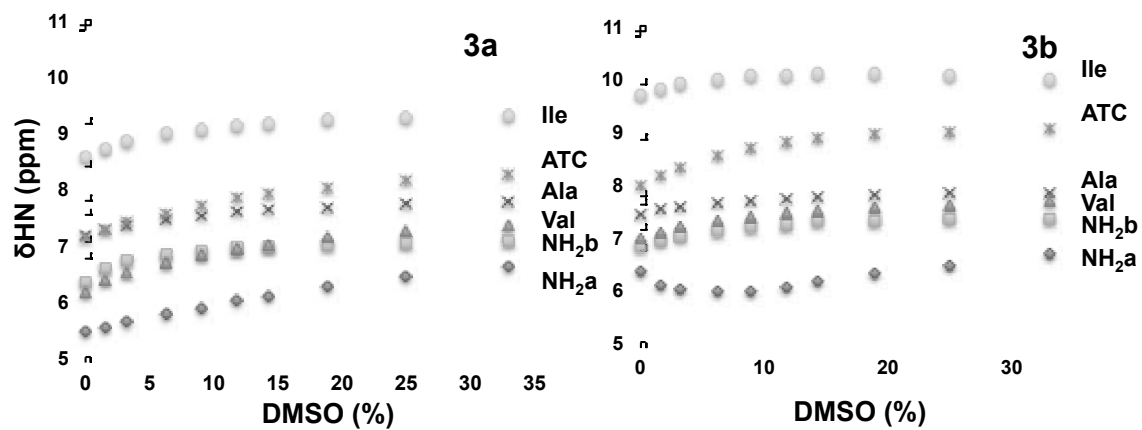


Figure S4: Solvent dependence of NH chemical shifts at varying concentration of DMSO-d₆ in CDCl₃.



Tables S9-S10: Unambiguous inter-residue NOEs assigned in the ROESY spectra of 3a and 3b.

Strong “s” < 2.7 Å; medium “m” < 3.3 Å; weak “w” < 5.0 Å.

Table S9: NOEs correlations observed in the ROESY spectrum of 3a in CD₃OH at 298 K.

The typical NOE peak for the C₉H-bond is in italic, the correlation in bold is the only NOE which is not present in both 3a and 3b. In red, the correlations which are not compatible with a reverse turn conformation for 3a.

Name of the NOE correlation	NOE (DMSO/MeOH)	Type
1.HN-2.HN	m/w	Sequential
1.HA-2.HN	s/s	Sequential
1.HA-2.HB	w/w	Sequential
1.HB-2.HN	m/w	Sequential
<i>2.HA-3.HN</i>	<i>s/s</i>	<i>Sequential</i>
2.HA-4.HN	m/w	Long range
2.HA-3.HB	w/w	Sequential
2.HA-3.HG'	w/m	Sequential
2.HA-3.HG	w/m	Sequential
3.HN-4.HN	m/m	Sequential
3.HB-4.HN	m/w	Sequential
3.HG'-4.HN	w/w	Sequential
3.HG-4.HN	w/w	Sequential
4.HN-NH2	w/w	Sequential
4.HA-NH2	w/w	Sequential

Table S10: Inter-residue NOEs correlations observed in the ROESY spectrum of 3b in CD₃OH at 298 K.

The typical NOE peak for the C₉H-bond is in italic. In red, the correlations which are not compatible with a ‘twist’ turn conformation for 3b.

Name of the NOE correlation	NOE	Type
1.HN-2.HN	w/w	Sequential
1.HA-2.HN	s/s	Sequential
1.HA-2.HB	w/w	Sequential
1.HB-2.HN	m/w	Sequential
<i>2.HA-3.HN</i>	<i>s/s</i>	<i>Sequential</i>
2.HA-3.HA*	w/-	Sequential
2.HA-3.HB	w/w	Sequential
2.HA-3.HG'	m/m	Sequential
2.HA-3.HG	m/m	Sequential
3.HN-4.HN	m/m	Sequential
3.HB-4.HN	m/w	Sequential
3.HG'-4.HN	w/w	Sequential
3.HG-4.HN	m/w	Sequential
4.HN-NH2	w/w	Sequential
4.HA-NH2	w/w	Sequential

*This peak is superimposed on the 3a ROESY spectrum.

Table S11: Root Mean Square Deviations (RMSD, Å) of the 20 lowest energy NMR structures of 3a and 3b.

Compounds	3a	3b
all atoms	1.30	0.65
all heavy atoms	0.91	0.25
backbone heavy atoms	0.68	0.22
Backbone heavy atoms omitting the Val 1 residue	0.25	0.18
Backbone heavy atoms omitting the Ala 4 residue	0.58	0.04
ATC 2 and Ile 3 backbone heavy atoms	0.06	0.02

Table S12: Backbone torsion angles of 3a and 3b of the 20 lowest NMR.

	Val		ATC residue				Ile		Ala	
	ϕ_1	ψ_1	ϕ_2	θ_2	ζ_2	ψ_2	ϕ_3	ψ_3	ϕ_4	ψ_4
Average values measured on the 20 lowest energy NMR structures										
3a	d	d	$-54 \pm 2^\circ$	$113 \pm 5^\circ$	$-3 \pm 1^\circ$	$-14 \pm 3^\circ$	$-48 \pm 2^\circ$	$-1 \pm 10^\circ$	d	$-8 \pm 14^\circ$
3b	$-68 \pm 1^\circ$	$39 \pm 2^\circ$	$57 \pm 2^\circ$	$-105 \pm 2^\circ$	$3 \pm 2^\circ$	$9.0 \pm 2^\circ$	$-71 \pm 6^\circ$	$-18 \pm 1^\circ$	$-86 \pm 27^\circ$	$-1 \pm 10^\circ$

d: disordered, large variations were measured for these angle values.

Table S13: Hydrogen bonding pattern statistical analysis on the 20 lowest NMR structures of 3a and 3b ($d_{O-N} < 3.5 \text{ \AA}$ and N-H-O angle $> 120^\circ$).

Hydrogen bonds	Pseudocycles	Occurrence	
		3a	3b
Ac.CO...HN.ATC 2	C ₇	10/20	20/20
Val 1.CO...HN.Ile 3	C ₉	20/20	20/20
Val 1.CO...HN.Ala 4	C ₇	-	20/20
ATC 2.CO...HN.Ala 4	C ₇	17/20	-
ATC 2.CO...HN.NH ₂	C ₁₀	18/20	17/20
Ile 3.CO...HN.NH ₂	C ₇	2/20	-

II. NMR data of gramicidin S and 4

Tables S14-S15: ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR chemical shifts of gramicidin S and 4 in DMSO- d_6 .

Table S14: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts of gramicidin S in DMSO- d_6 at 298 K.

Residue	NH	H_α	H_β	Others
Pro	-	4.31	1.51	$^{\gamma}\text{CH}_2$ 1.96, 1.48; $^{\delta}\text{CH}_2$ 3.61, 2.46
Phe	9.06	4.37	2.99, 2.84	
Leu	8.34	4.59	1.34, 1.30	$^{\gamma}\text{CH}$ 1.42 $^{\delta}\text{CH}_3$ 0.80, 0.81
Orn	8.72	4.77	1.78, 1.53	$^{\gamma}\text{CH}_2$ 1.62 $^{\delta}\text{CH}_2$ 2.86, 2.75
Val	7.25	4.4	2.09	CH_3 0.78, 0.82

Residue	C=O	N	C_α	C_β	Others
Pro	169.6	-	59.9	23	CH_2 29.0 CH_2 46.0
Phe	171.1	127.9	53.8	35.5	
Leu	171.5	123.9	49.3	40.8	$^{\gamma}\text{CH}$ 23.8 $^{\delta}\text{CH}_3$ 22.7, 22.4
Orn	170	125.7	50.6	29.5	$^{\gamma}\text{CH}_2$ 22.9 $^{\delta}\text{CH}_2$ 38.6
Val	170.8	113.1	56.8	30.9	CH_3 18.8, 17.9

Table S15: ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts of 4 in DMSO- d_6 at 298 K.

Residue	NH	$H_{\alpha/\gamma}$	$H_{\beta/\delta}$	Others
ATC	9.38	5.13 ^(γ)	3.16, 2.96 ^(δ)	
Leu	6.81	4.49 ^(α)	1.14 ^(β)	$^{\gamma}\text{CH}$ 1.20 $^{\delta}\text{CH}_3$ 0.67, 0.73
Orn	8.4	4.18 ^(α)	1.87, 1.53 ^(β)	$^{\gamma}\text{CH}_2$ 1.57 $^{\delta}\text{CH}_2$ 2.76
Val	9.28	4.14 ^(α)	2.14 ^(β)	CH_3 0.94

Residue	C=O	N	$C_{\alpha/\gamma}$	$C_{\beta/\delta}$	Others
ATC	161.0	127.9	51.2 ^(γ)	39.3 ^(δ)	$^{\alpha}\text{C}$ 130.7 $^{\beta}\text{C}$ 152.7
Leu	172.4	114.9	49.9 ^(α)	43.4 ^(β)	$^{\gamma}\text{CH}$ 23.7 $^{\delta}\text{CH}_3$ 22.5, 22.3
Orn	170.2	120.4	51.2 ^(α)	25.8 ^(β)	$^{\gamma}\text{CH}_2$ 23.6 $^{\delta}\text{CH}_2$ 38.3
Val	171.3	119.4	59.1 ^(α)	29.4 ^(β)	CH_3 19.6, 17.6

Table S16: Coupling Constants $^3J(\text{NH}, ^{\gamma}\text{CH})$ of gramicidin S and 4 (in Hz) in DMSO- d_6 at 333 K.

Residue	Gramicidin S	4
	NH	NH
Phe/ATC	3.3	6.8
Leu	9.1	8.5
Orn	9.3	8.0
Val	9.3	8.0

Table S17: Amide protons chemical shift temperature coefficients of gramicidin S and 4 (in ppb/K)

	Gramicidin S	4
Residue	$\Delta\delta / \Delta T$ (ppb/K)	$\Delta\delta / \Delta T$ (ppb/K)
Phe/ATC	-7.2	-3.8
Leu	-2.9	0.0
Orn	-5.0	-3.8
Val	-1.8	-2.5

Tables S18-S19: Unambiguous inter-residue NOEs assigned in the ROESY spectra of GS and 4. Strong “s” < 2.7 Å; medium “m” < 3.3 Å; weak “w” < 5.0 Å.

Table S18: Inter-residue NOE correlations observed in the ROESY spectrum of gramicidin S in DMSO-d₆ at 333 K.

Name of the NOE correlation	NOE	Type
1.HN-10.HA	m	Sequential
1.HN-10.HD	m/w	Sequential
1.HA-2.HN	s	Sequential
1.HB-2.HN	m	Sequential
1.HB-8.HN	w	Long range
1.HB-8.HB	w	Long range
2.HA-3.HN	s	Sequential
2.HB-3.HA	w	Sequential
2.HG-3.HN	w	Sequential
2.HG-3.HA	w	Sequential
2.HG-4.HN	w	Long range
3.HA-4.HN	s	Sequential
3.HA-4.HB	w	Sequential
3.HN-6.HB	w	Long range
3.HB-6.HB	w	Long range
4.HA-5.HD	s	Sequential
4.HA-5.HG	s	Sequential
4.HB-5.HA	w	Sequential
5.HA-6.HN	m	Sequential
5.HD-6.HN	m/w	Sequential
6.HA-7.HN	s	Sequential
6.HB-7.HN	m	Sequential
7.HA-8.HN	s	Sequential
7.HB-8.HA	w	Sequential
7.HG-8.HN	w	Sequential
7.HG-8.HA	w	Sequential
7.HG-9.HN	w	Long range
8.HA-9.HN	s	Sequential
8.HA-9.HB	w	Sequential
9.HA-10.HD	s	Sequential
9.HB-10.HA	w	Sequential

Table S19: Inter-residue NOE correlations observed in the ROESY spectrum of 4 in DMSO-d₆ at 298 K.

Name of the NOE correlation	NOE	Type
1.HN-2.HN	w	Sequential
<i>1.HN-8.HA</i>	<i>s</i>	<i>Sequential</i>
1.HN-8.HB	w	Sequential
1.HN-8.HD	w	Sequential
1.HN-7.HN	w	Long range
1.HN-7.HA	w	Long range
1.HB-7.HB	w	Long range
1.HB-7.HG	w	Long range
1.HA-2.HN	m	Sequential
1.HB-2.HN	w	Sequential
2.HN-3.HN	w	Sequential
2.HN-3.HG	w	Sequential
2.HA-3.HN	m	Sequential
3.HA-4.HN	s	Sequential
3.HB-4.HN	w	Sequential
3.HG-4.HN	w	Sequential
3.HA-4.HB	w	Sequential
3.HB-4.HA	w	Sequential
3.HG-4.HA	w	Sequential
3.HN-5.HB	m	Long range
4.HA-5.HA	w	Sequential
4.HA-5.HB	w	Sequential
<i>4.HA-5.HN</i>	<i>s</i>	<i>Sequential</i>
4.HB-5.HN	w	Sequential
5.HN-6.HN	w	Sequential
<i>5.HN-4.HA</i>	<i>s</i>	<i>Sequential</i>
5.HN-4.HB	w	Sequential
5.HN-4.HD	w	Sequential
5.HN-3.HN	w	Long range
5.HN-3.HA	w	Long range
5.HB-3.HB	w	Long range
5.HB-3.HG	w	Long range
5.HA-6.HN	m	Sequential
5.HB-6.HN	w	Sequential
6.HN-7.HN	w	Sequential
6.HN-7.HG	w	Sequential
6.HA-7.HN	m	Sequential
7.HA-8.HN	s	Sequential
7.HB-8.HN	w	Sequential
7.HG-8.HN	w	Sequential
7.HA-8.HB	w	Sequential
7.HB-8.HA	w	Sequential
7.HG-8.HA	w	Sequential

Tables S20-S21: Backbone dihedral angle values for 4.

Residue	Torsion angles
$\phi_{1/5}$	$-93 \pm 6.0^\circ / -93 \pm 4^\circ$
$\psi_{1/5}$	$123 \pm 24^\circ / 115 \pm 25^\circ$
$\phi_{2/6}$	$-122 \pm 9^\circ / -120 \pm 11^\circ$
$\psi_{2/6}$	$7 \pm 14^\circ / 17 \pm 15^\circ$
$\phi_{3/7}$	$-127 \pm 12^\circ / -129 \pm 12^\circ$
$\psi_{3/7}$	$132 \pm 4^\circ (200^\circ \pm 2^\circ) / 129 \pm 8^\circ (198^\circ \pm 1^\circ)^*$
$\phi_{4/8}$	$137 \pm 5^\circ (47^\circ \pm 7^\circ) / 138 \pm 5^\circ (54^\circ \pm 12^\circ)^*$
$\theta_{4/8}$	$-86 \pm 8^\circ / -85 \pm 8^\circ$
$\zeta_{4/8}$	$3 \pm 4^\circ / 3 \pm 4^\circ$
$\psi_{4/8}$	$9 \pm 4^\circ / 8 \pm 4^\circ$

* Two clusters were observed in a ratio of 90% and 10%. Dihedral angles of the minor cluster are in brackets.

Table S22: Hydrogen bonding occupancies in 3a and 3b ($d_{O-N} < 3.5 \text{ \AA}$ and N-H-O angle $> 120^\circ$) after restrained molecular dynamic (rMD) and unrestrained MD.

Hydrogen bonds	Pseudocycles	Occupancy			
		3a		3b	
		rMD	MD	rMD	MD
Ac.CO...HN.ATC 2	C ₇	10 %	1 %	-	-
Val 1.CO...HN.Ile 3	C₉	63 %	94 %	99 %	94 %
Val 1.CO...HN.Ala 4	C ₇	-	88 %	93 %	84 %
Val 1.CO...HN.NH ₂	C ₁₅	-	-	16 %	22 %
ATC 2.CO...HN.Ala 4	C ₇	2 %	-	-	-
ATC 2.CO...HN.NH ₂	C ₁₀	75 %	-	-	-
Ile 3.CO...HN.NH ₂	C ₇	1 %	-	11 %	2 %
Ala 4.CO...HN.Val 1	C ₁₆	-	-	16 %	-

Figure S5: (a) Backbone root mean square deviations (RMSD) and (b) Root mean square fluctuation (RMSF) of backbone heavy atoms of 3a (green) and 3b (blue) along the rMD (light) and the MD (dark) simulations in a methanol box.

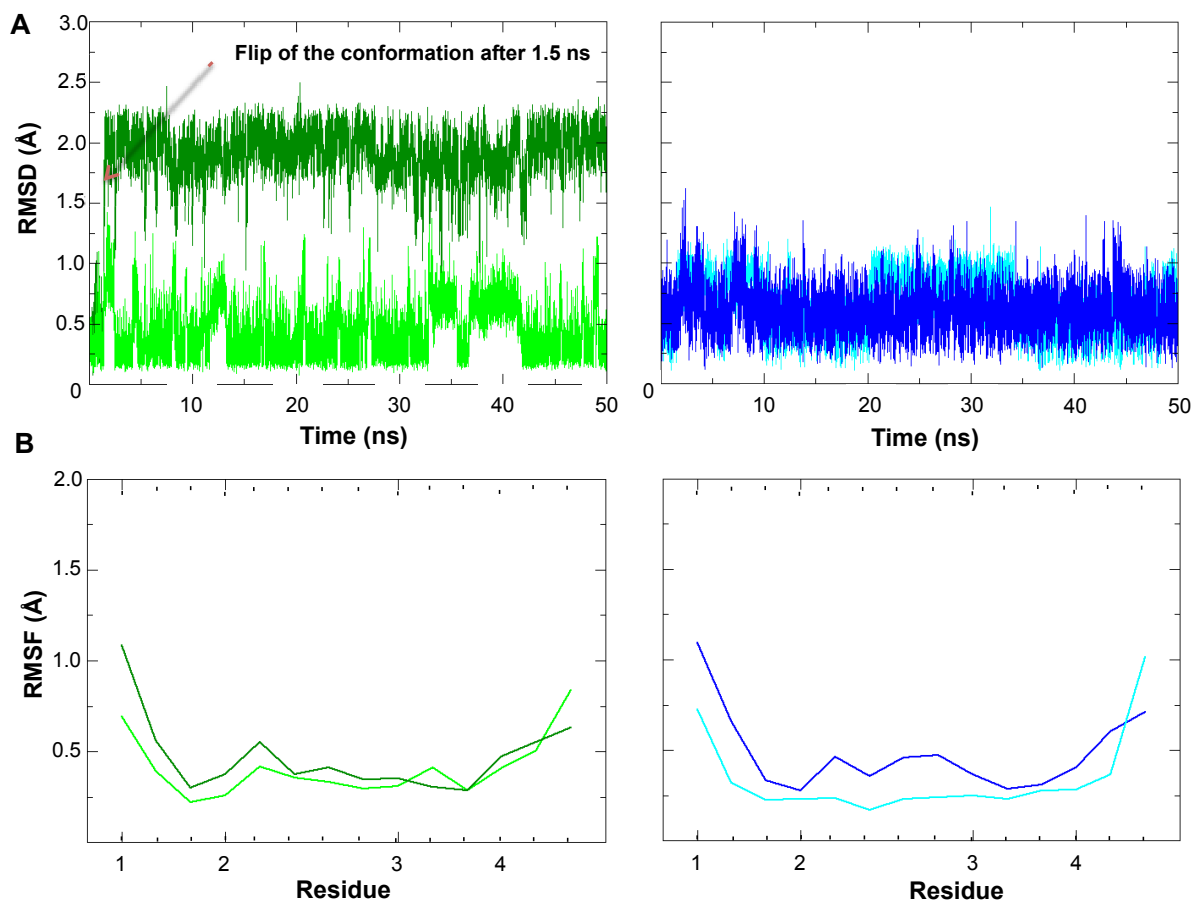
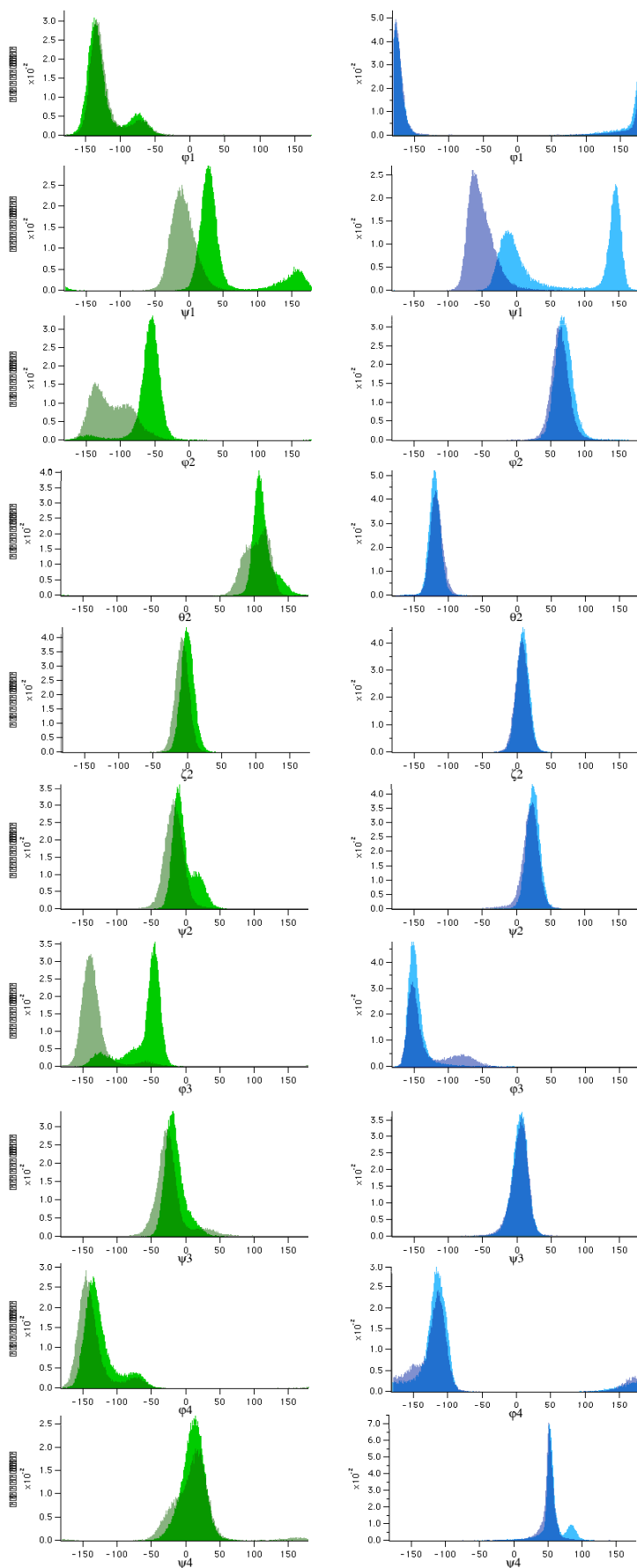


Figure S6: Distributions of the backbone dihedral angle values ($^{\circ}$) of 3a (green) and 3b (blue) sampled during the 50 ns MD (dark) and rMD (light) simulations.



III. Comparison of the backbone torsion angles of 3a and 3b determined from the 20 lowest energy NMR structure, over the 50 ns of the MD simulations and DFT calculation

Table S23: Backbone torsion angles of 3a and 3b (°).

Val		ATC residue				Ile		Ala		
ϕ_1	ψ_1	ϕ_2	θ_2	ζ_2	ψ_2	ϕ_3	ψ_3	ϕ_4	ψ_4	
Average values measured on the 20 lowest energy NMR structures										
3a	d	d	-54 ± 2	113 ± 5	-3 ± 1	-14 ± 3	-48 ± 2	-1 ± 10	d	-8 ± 14
3b	-68 ± 1	39 ± 2	57 ± 2	-105 ± 2	3 ± 2	9.0 ± 2	-71 ± 6	-18 ± 1	-86 ± 27	-1 ± 10
Average values based on rMD simulations										
3a	-123 ± 25	29 ± 12	-58 ± 22	113 ± 14	1 ± 9	-2 ± 16	-59 ± 27	-15 ± 14	-124 ± 23	11 ± 16
3b	-180 ± 16	-3 ± 24 (144 ± 9)	70 ± 12	-119 ± 8	9 ± 9	25 ± 9	-147 ± 12	5 ± 11	-124 ± 26	58 ± 15
Average values based on MD simulations										
3a	-123 ± 24	-7 ± 28	-112 ± 28	104 ± 17	-4.7 ± 9	-16 ± 13	-135 ± 18	-23 ± 20	-135 ± 25	10 ± 30
3b	-176 ± 12	-51 ± 18	65 ± 13	-117 ± 9	8 ± 9	21 ± 11	-131 ± 31	6 ± 12	-132 ± 29	51 ± 10
Values measured on the lowest energy NMR structure optimized by DFT										
3a	-83	59	-81	117	0	-32	-73	-13	-108	15
3b	-83	65	75	-119	1	41	-71	-14	-107	15

* Two clusters were observed. Dihedral angles of the minor cluster are in brackets.

Figure S7: CD spectra of 3a and 3b in MeOH at 20°C and 50°C

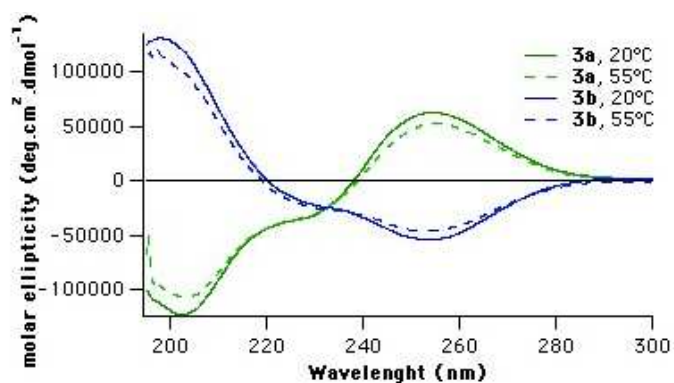


Figure S8: CD spectra of GS in MeOH at 20°C and 50°C

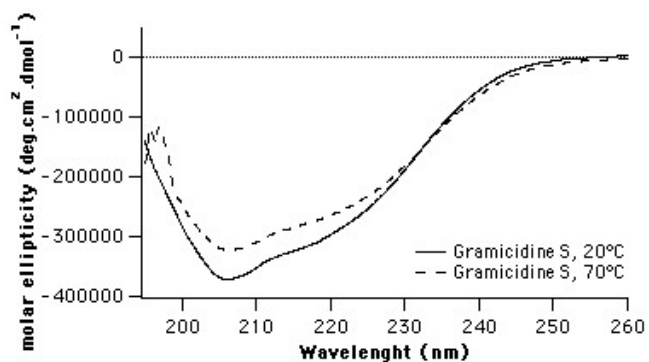
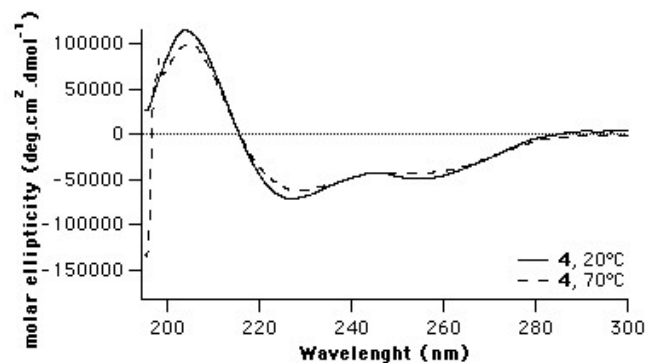
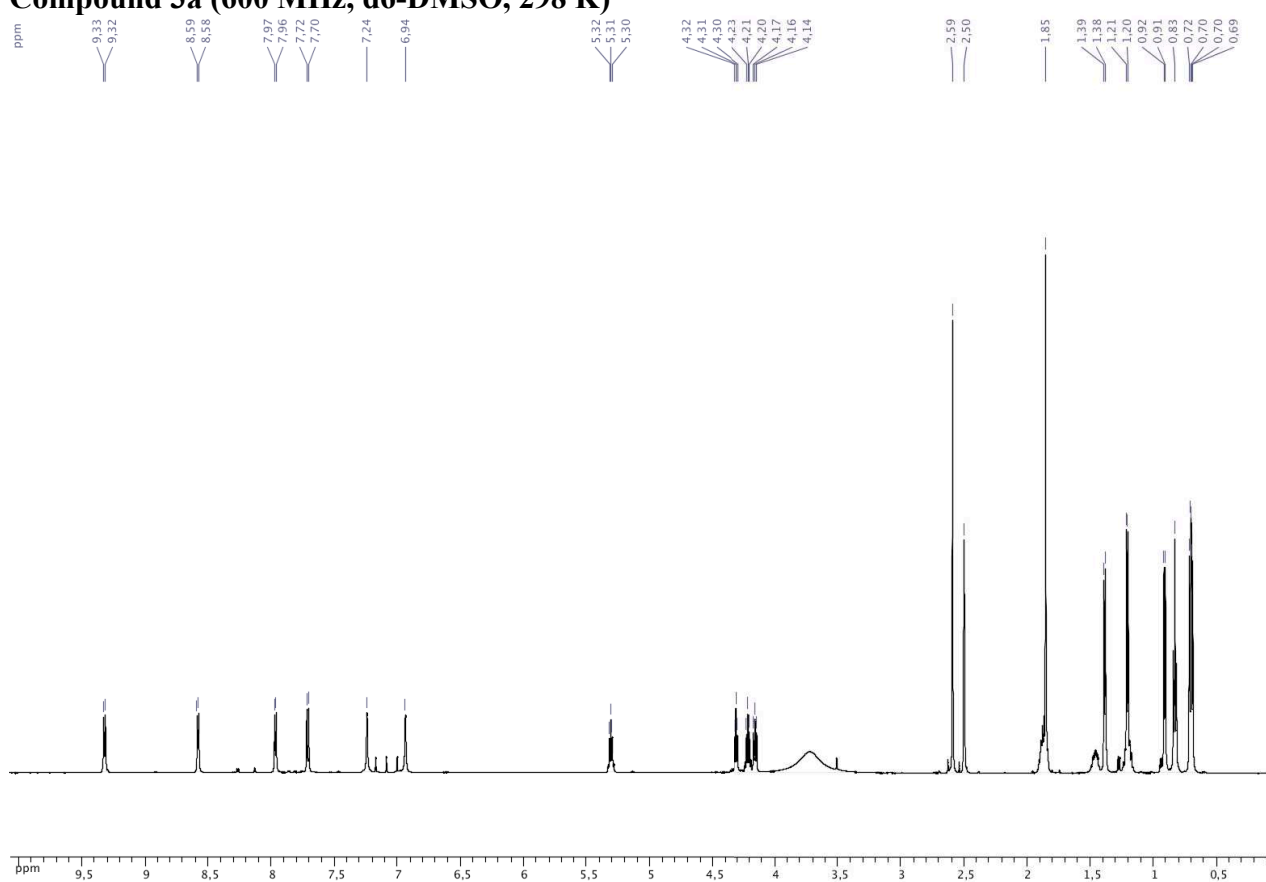
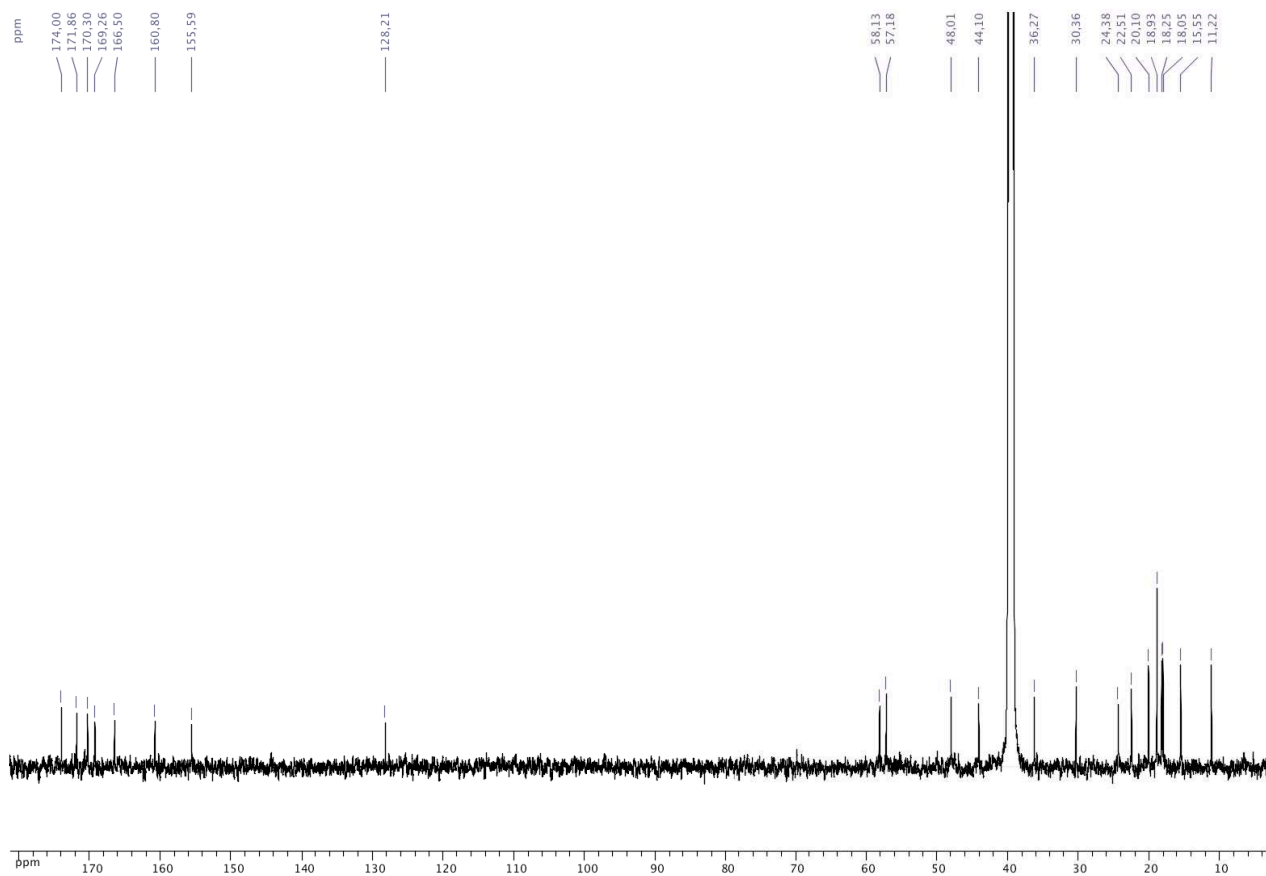


Figure S9: CD spectra of 4 in MeOH at 20°C and 50°C

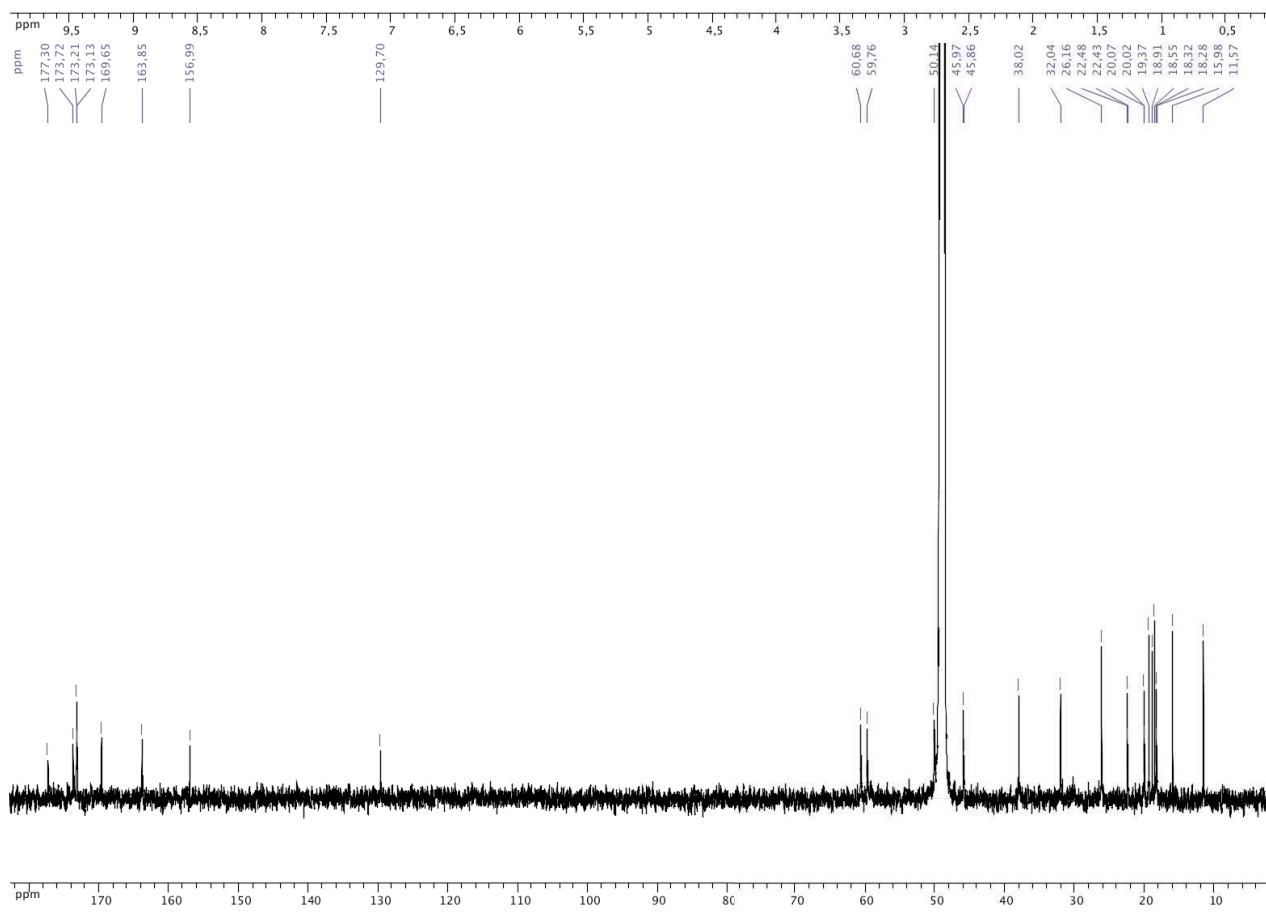
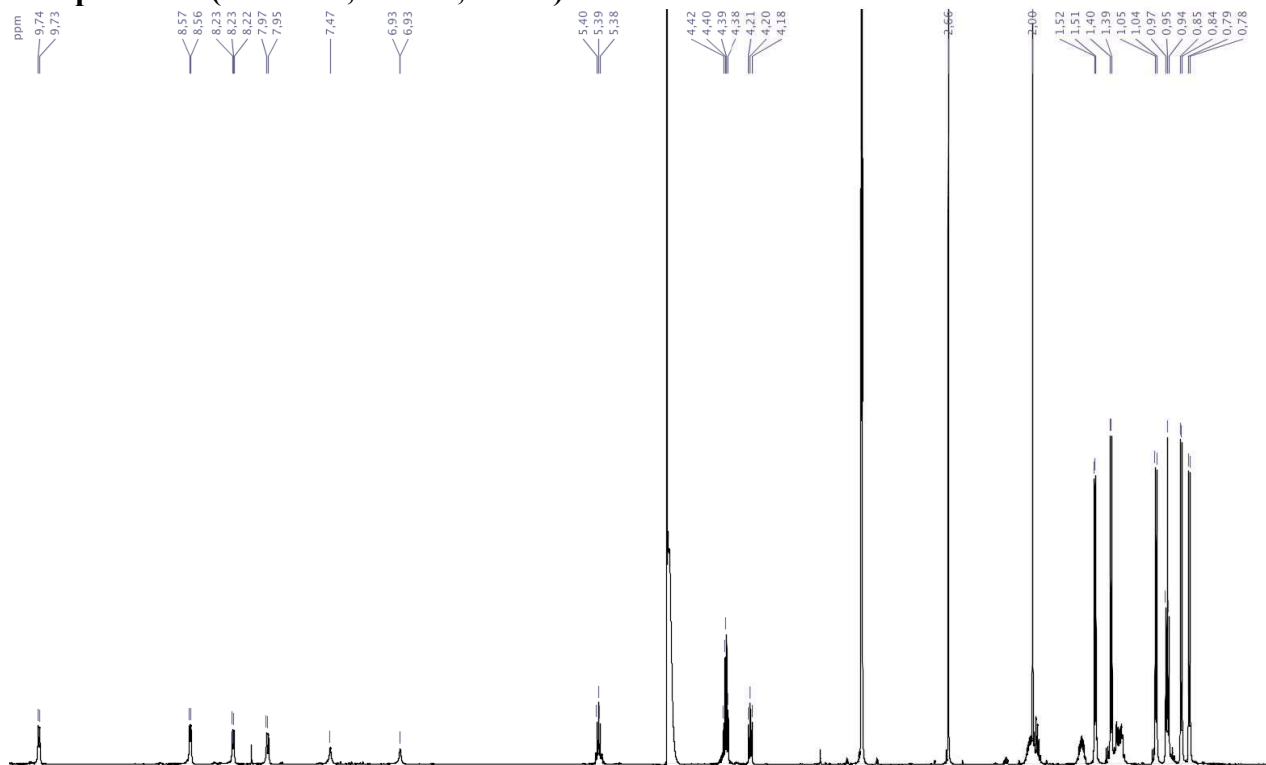


IV. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra
Compound 3a (600 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$, 298 K)

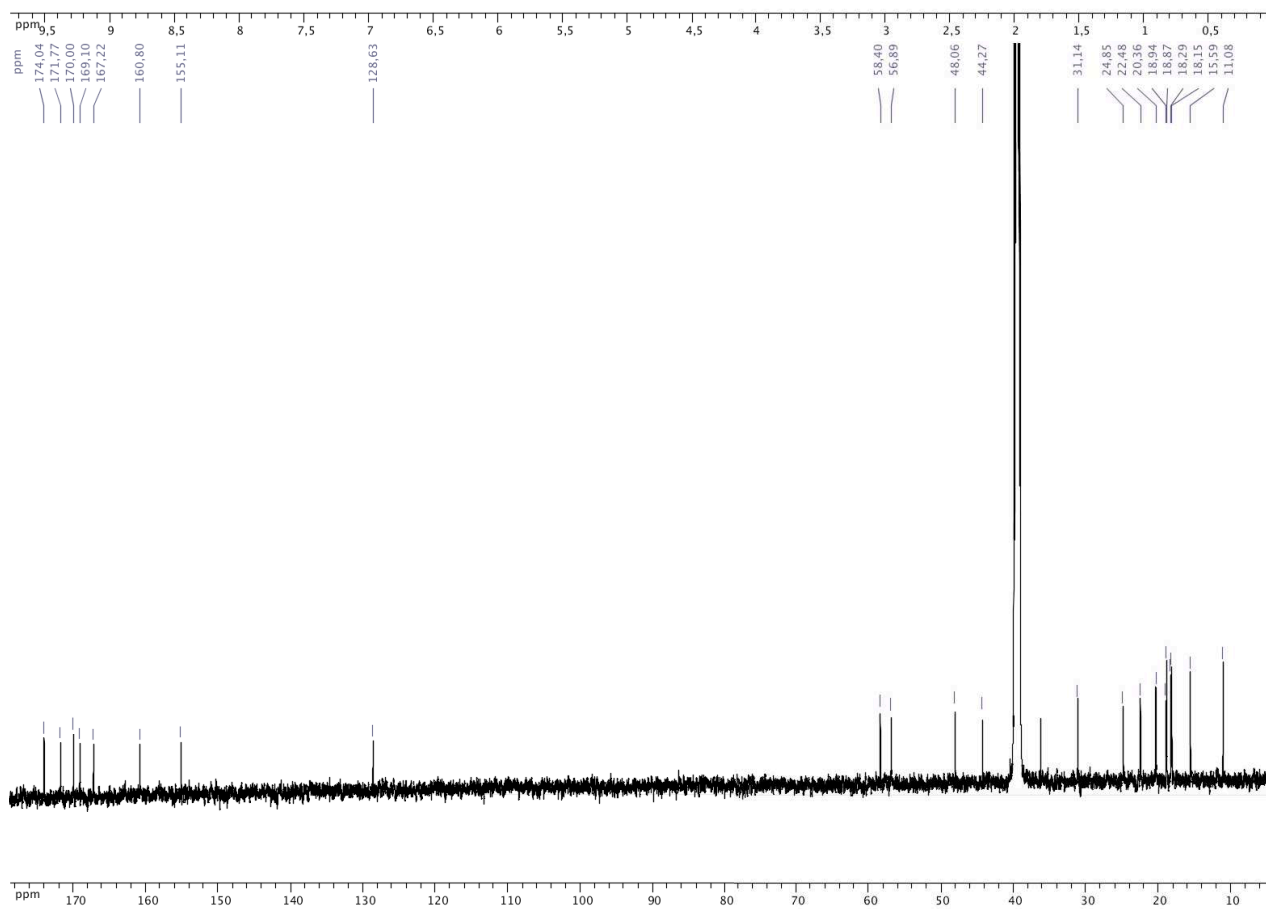
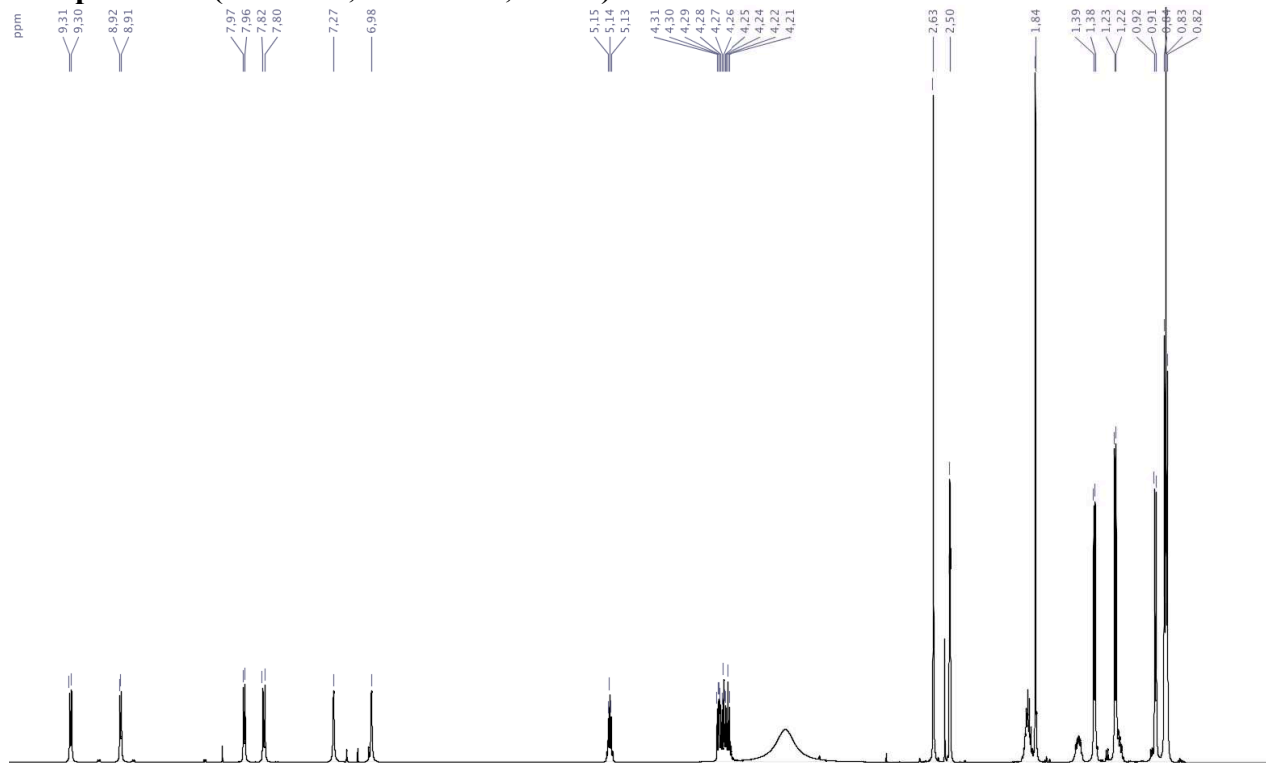




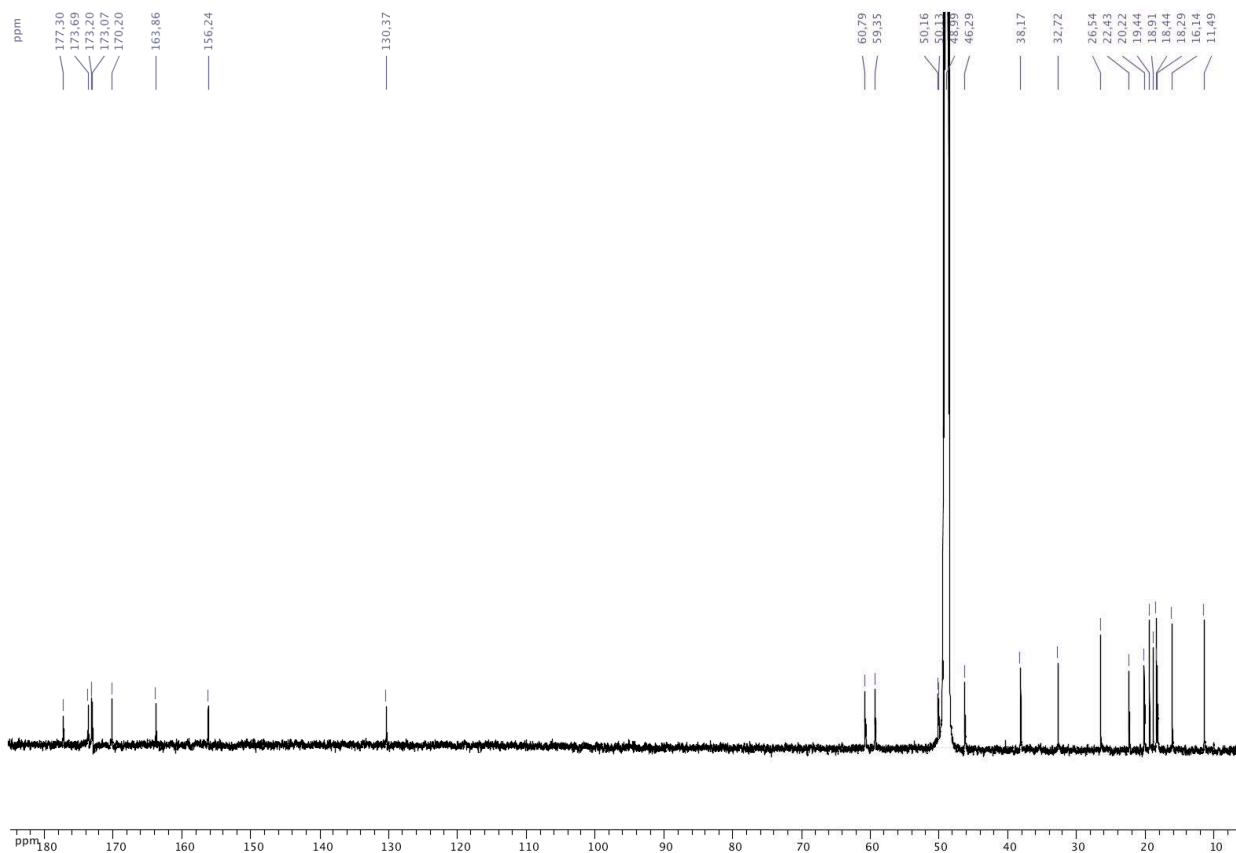
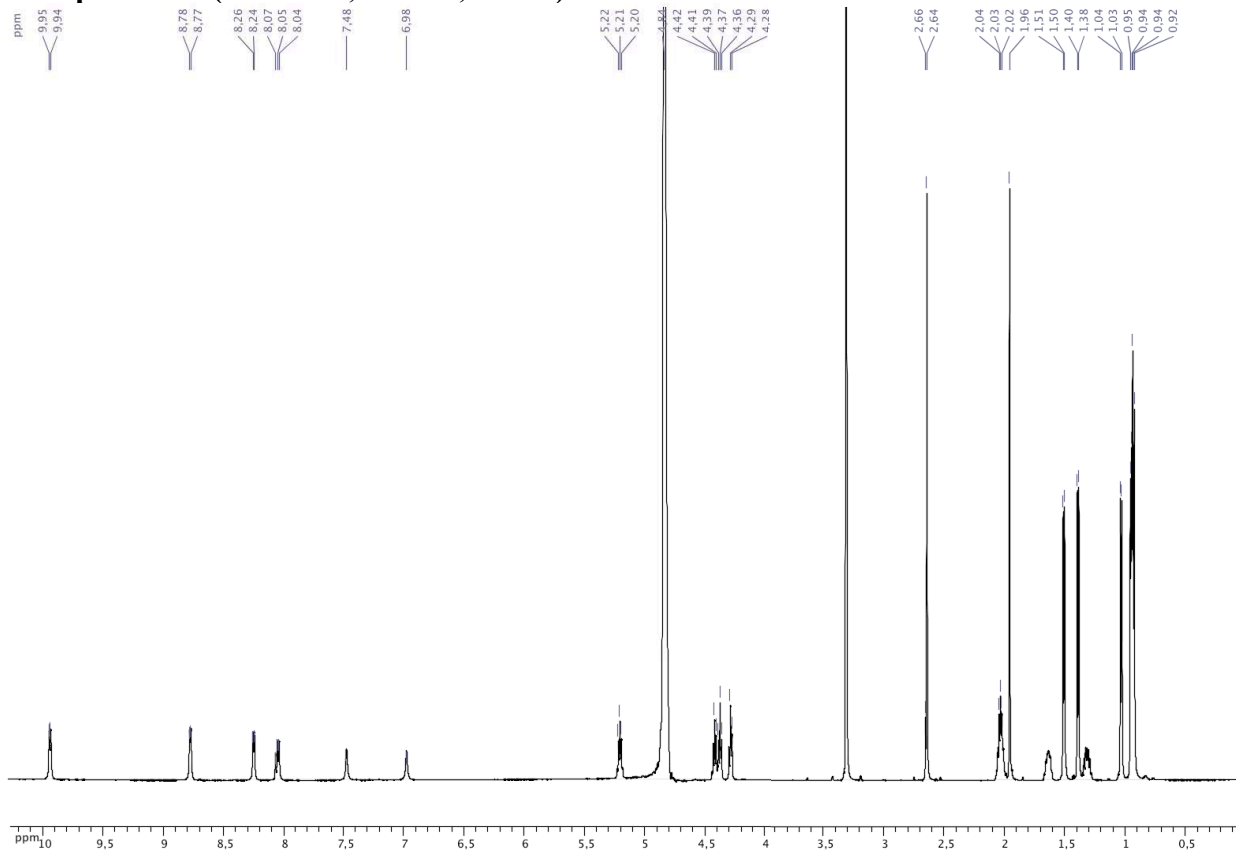
Compound 3a (600 MHz, MeOH, 298 K)



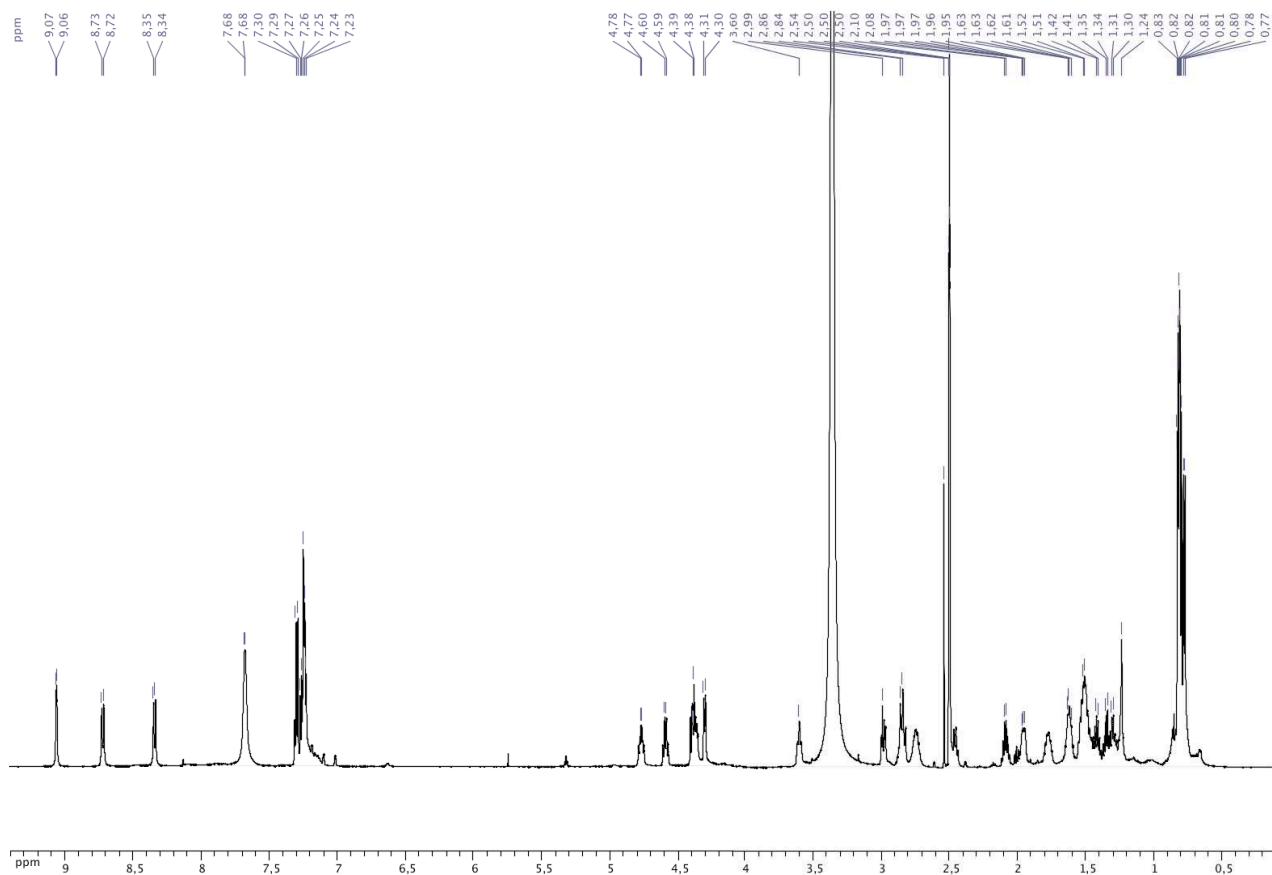
Compound 3b (600 MHz, d6-DMSO, 298 K)



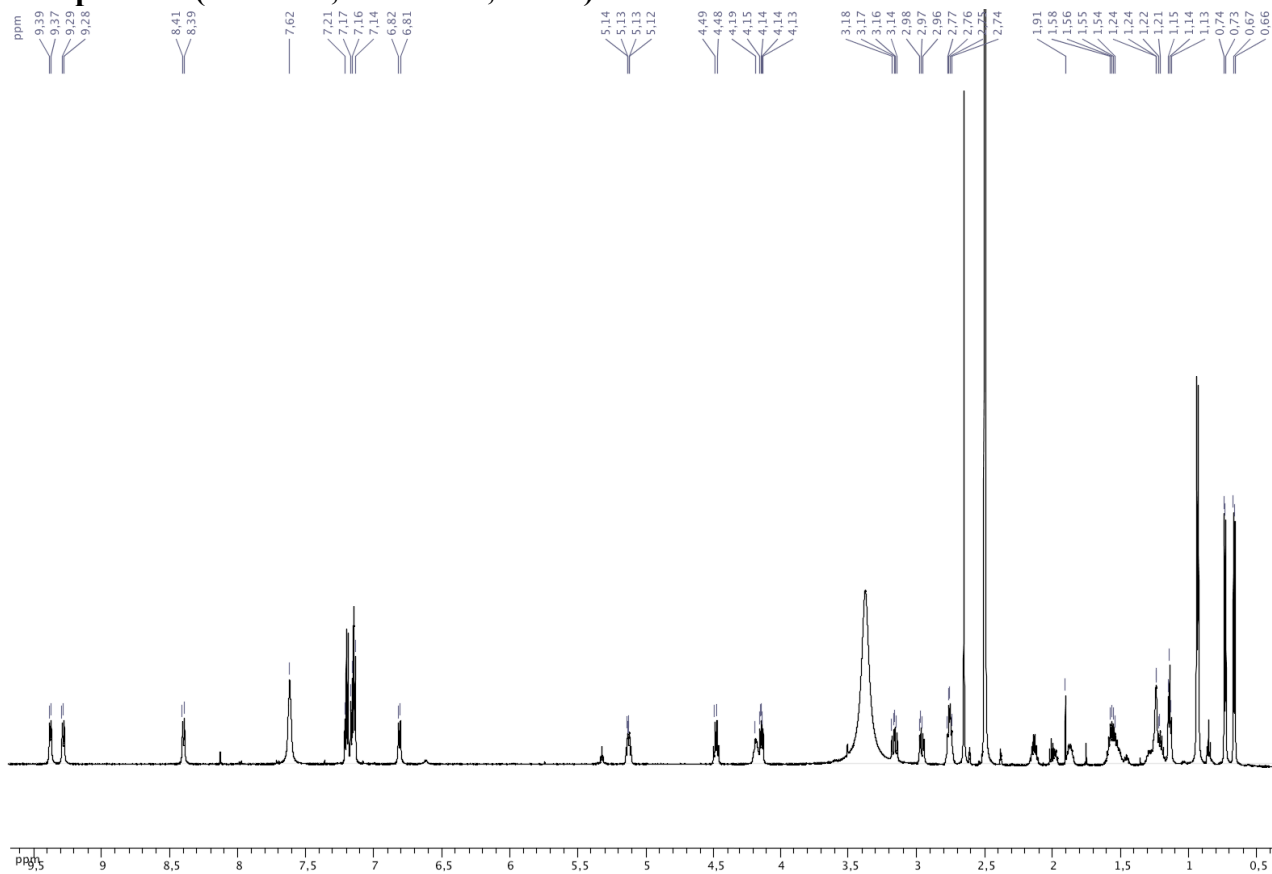
Compound 3b (600 MHz, MeOH, 298 K)



Gramicidin S (600 MHz, d6-DMSO, 298 K)

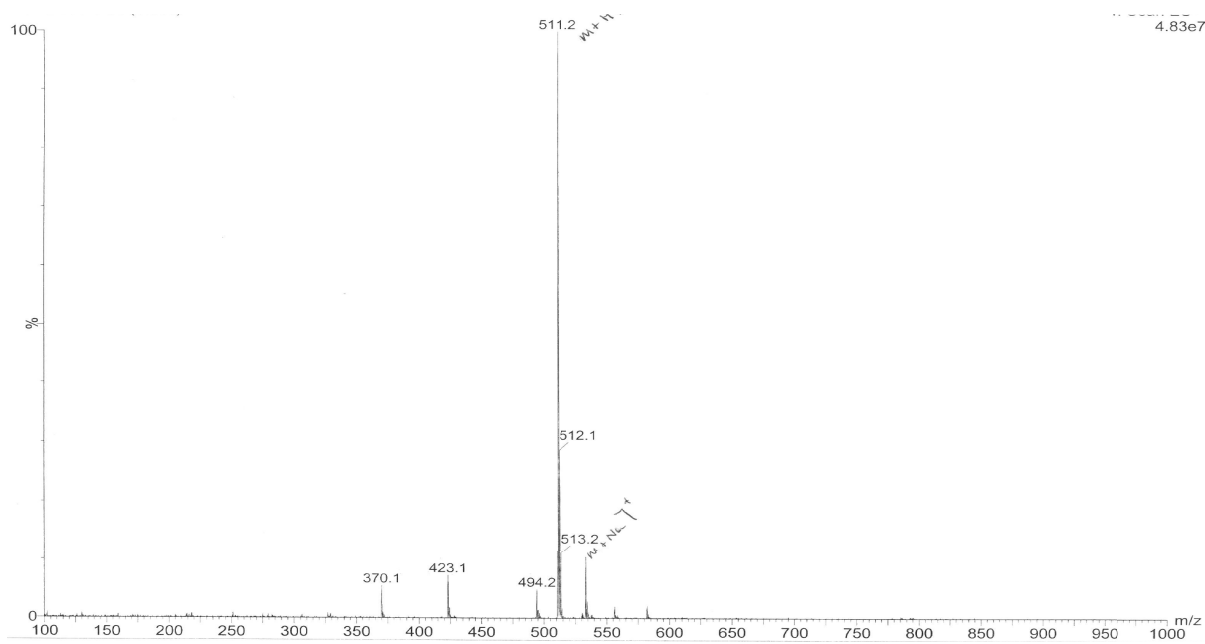
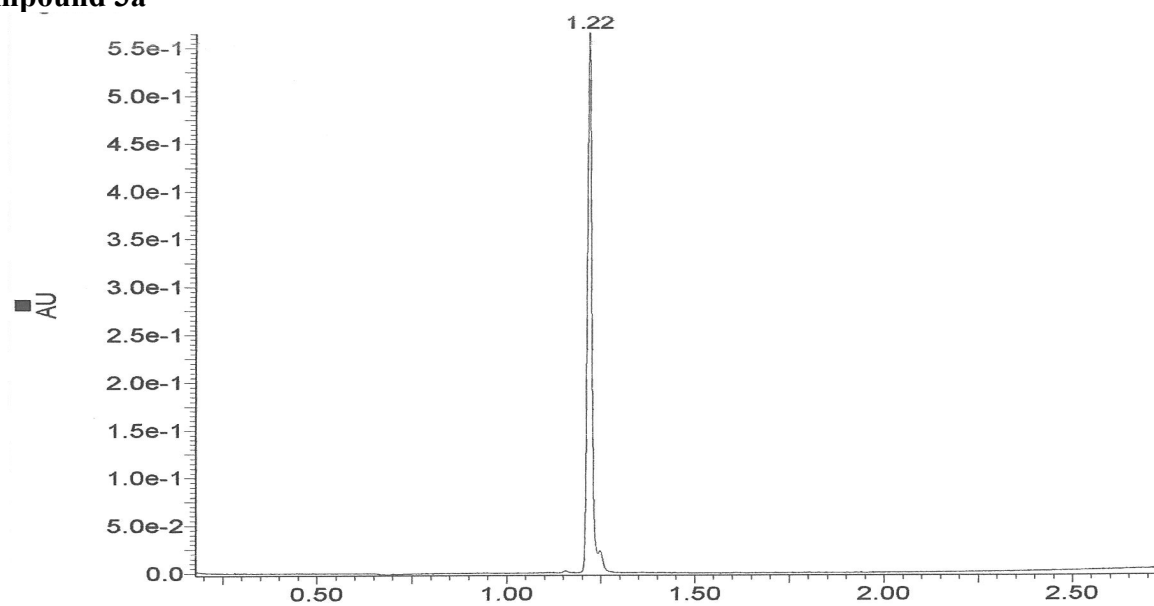


Compound 4 (600 MHz, d6-DMSO, 298 K)

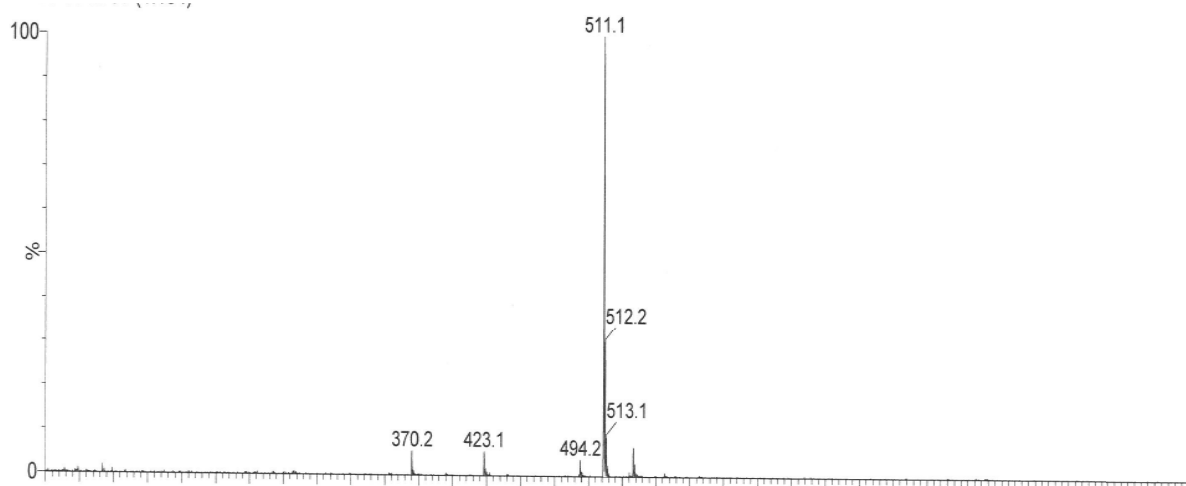
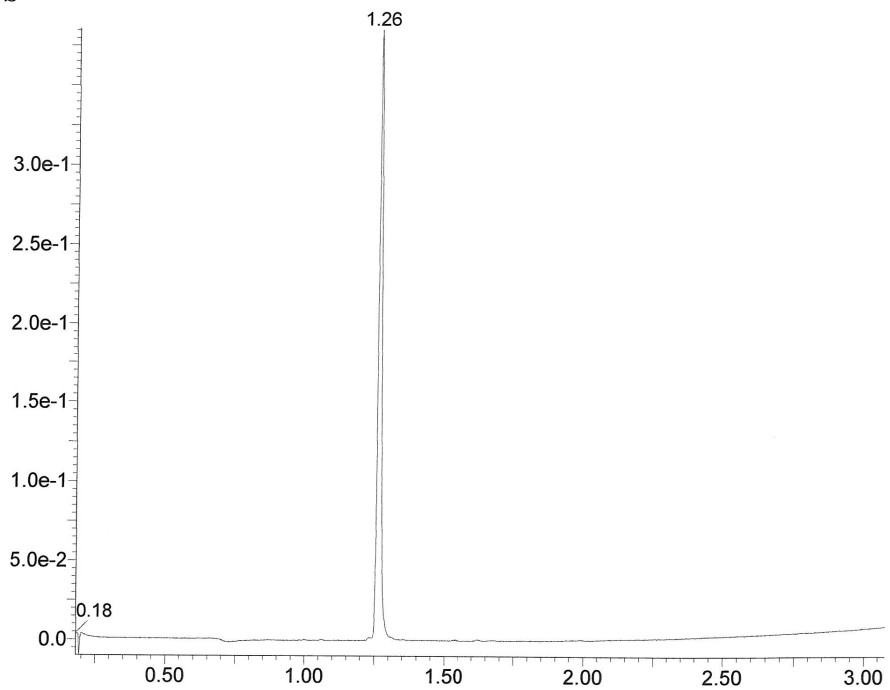


V. HPLC analysis and mass spectra

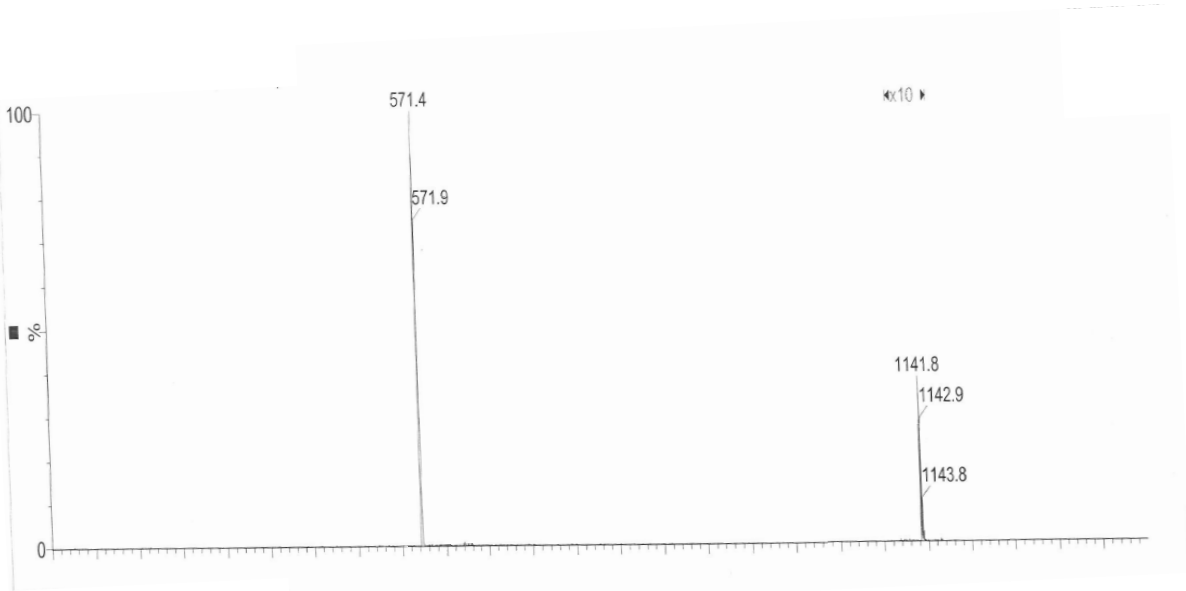
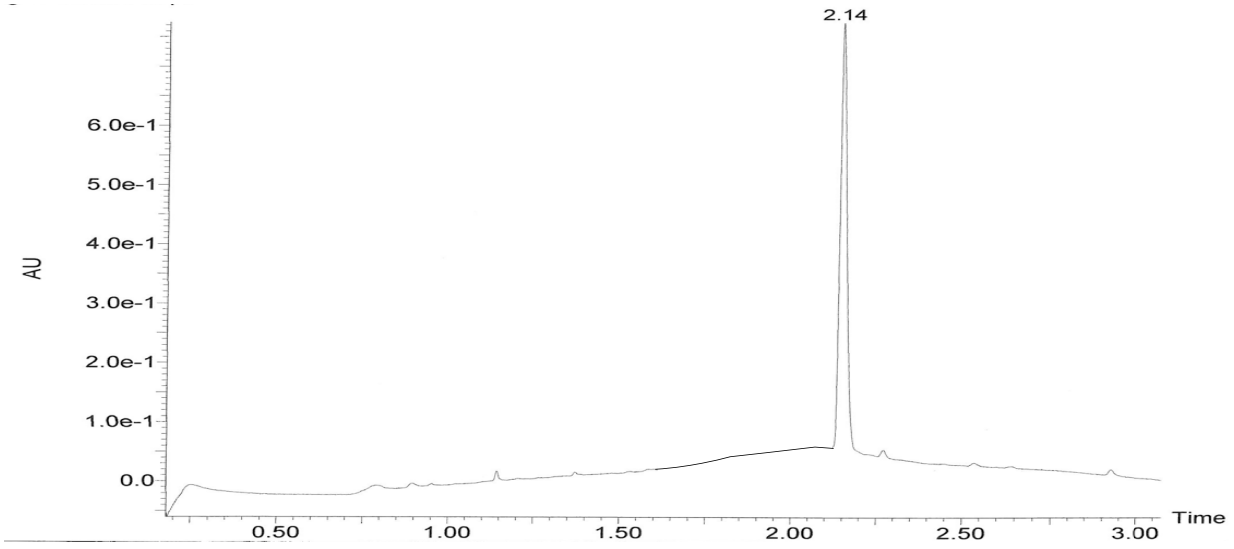
Compound 3a



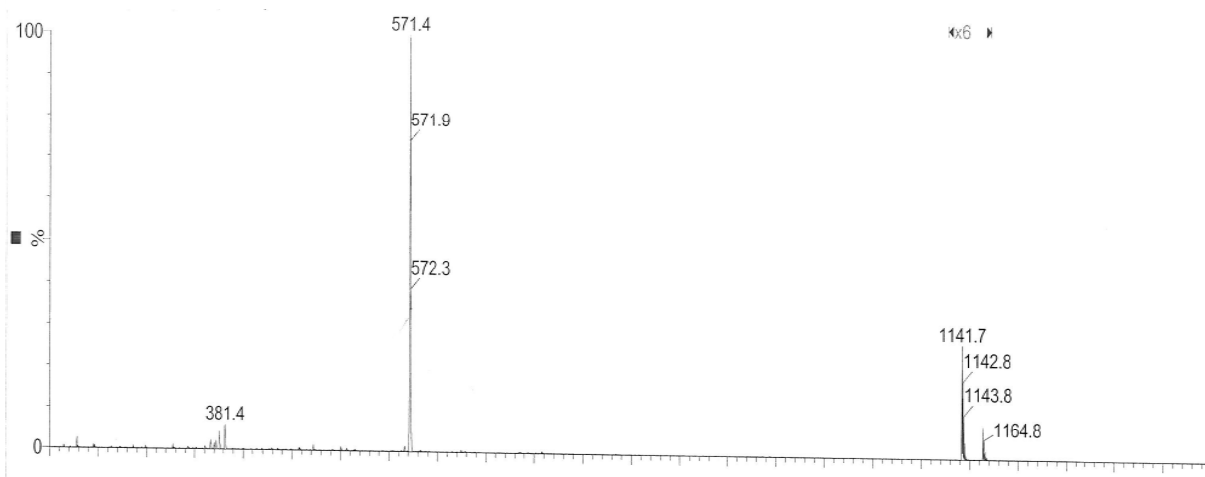
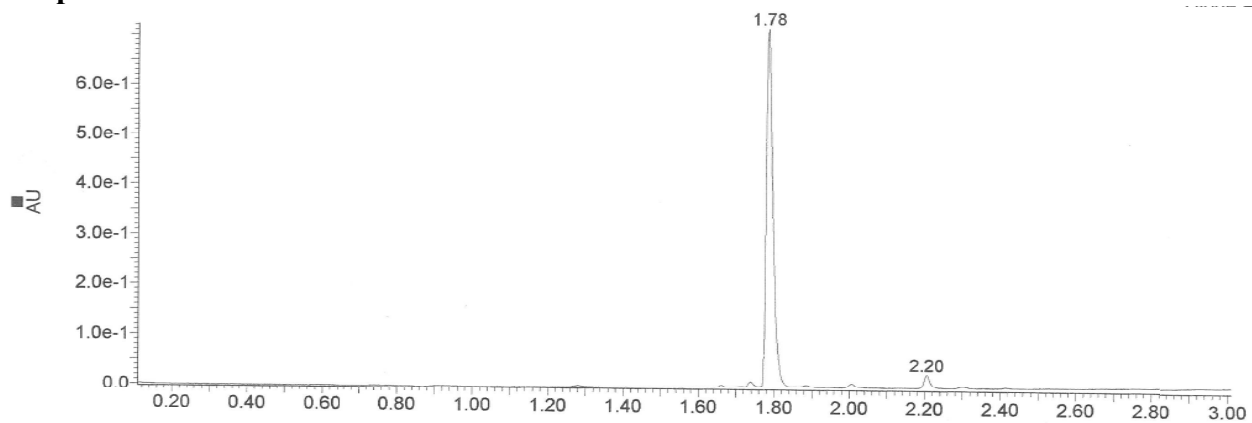
Compound 3b



Gramicidin S



Compound 4



Production de NCoA-1, synthèse des séquences 25 et 26 et tests d'activité

I- Synthèse des séquences 25 et 26 :

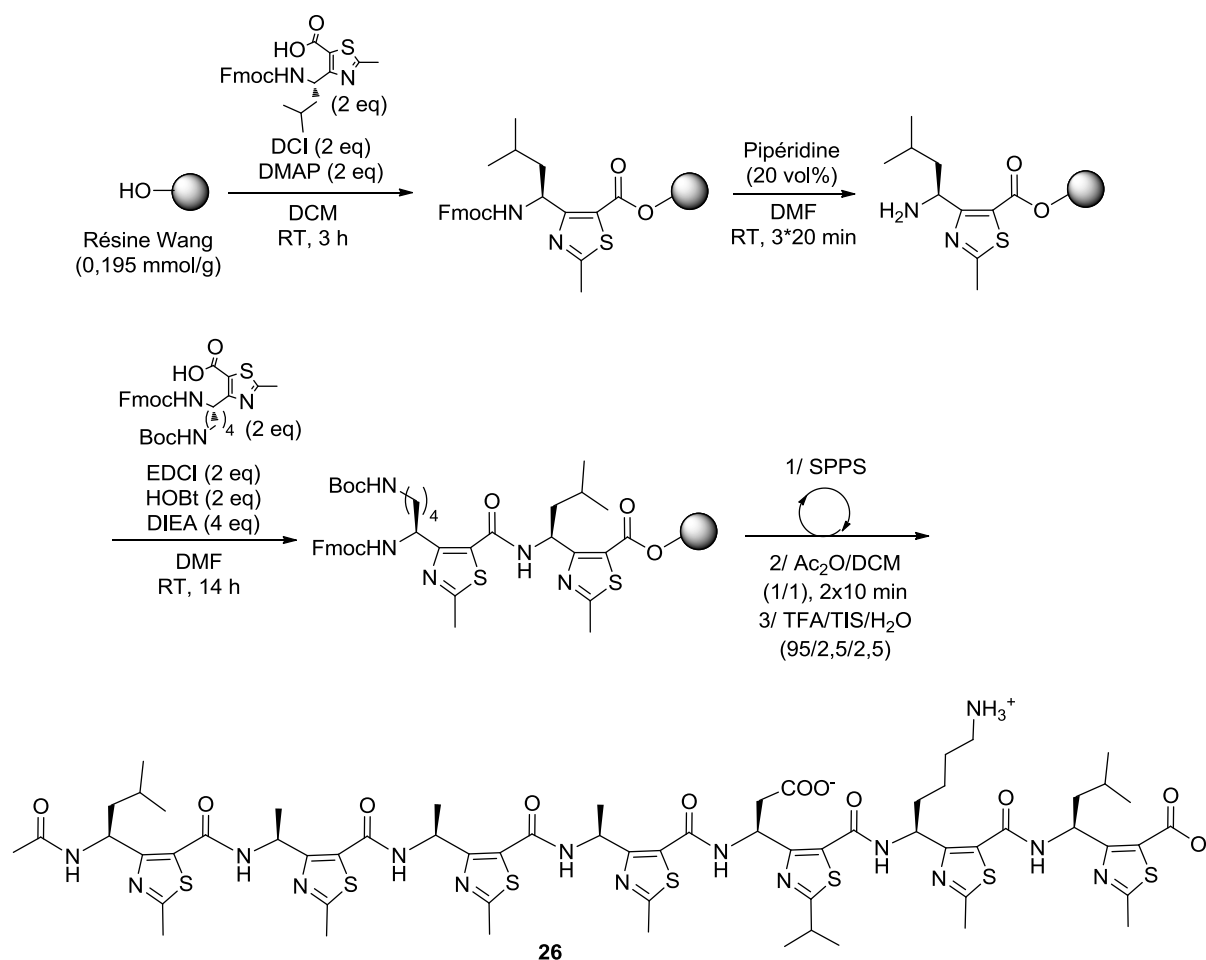


Schéma SI 1 : Synthèse des séquences candidates **25** et **26** (illustration avec le composé **26**)

La séquence α/γ **25** et le γ -heptapeptide **26** ont été synthétisés en phase solide sur résine Wang (taux de greffage théorique : 0,7 mmol/g, 1 g).

Greffage du premier résidu ATC sur la résine :

Le premier ATC, synthétisé *via* la voie de synthèse optimisée (seconde voie), a été chargé sur la résine par estérification dans le dichlorométhane (10 mL) en présence de DIC (2 eq) et de DMAP (2 eq) à température ambiante pendant trois heures. Les sites de la résine n'ayant pas réagi ont été acétylés par l'anhydride acétique en solution dans le DCM (1:1). Le lavage de la résine a été réalisé avec 3 solvants (3xDCM, 3xMeOH, 3xDMF puis DCM, MeOH, DMF). Les mêmes cycles de lavage ont été réalisés entre chaque étape. Greffage réel (déterminé par déprotection en milieu basique puis dosage UV à 301 nm de l'adduit Fmoc): 0,195 mmol/g

Cycles de déprotection du Fmoc :

La déprotection des groupements Fmoc a été réalisée par une solution de pipéridine à 20% (vv) dans le DMF ; 3 cycles de 20 min ont été requis.

Cycles de couplage peptidique :

L'élongation de la séquence **26** a été réalisée avec 2 eq de Fmoc-ATC-OH, 2 eq d'EDCI, 2 eq d'HOBT et 4 eq de DIEA dans le DMF (20 mL) à température ambiante pendant 16 h.

L'élongation de la séquence **25** a été réalisée avec 2 eq de Fmoc-ATC-OH, 2 eq d'EDCI, 2 eq d'HOBT et 4 eq de DIEA dans le DMF (20 mL) à température ambiante pendant 16 h. La partie peptidique a été obtenue par couplages successifs de 4 eq de Fmoc-AA-OH, 4 eq d'EDCI, 4 eq d'HOBT et 8 eq de DIEA dans le DMF (20 mL) à température ambiante pendant 16h.

Acétylation de la position N-terminale et clivage de la résine :

Les amines terminales des séquences **25** et **26** ont été acétylées en présence d'anhydride acétique (mélange 1:1 dans le DCM) lors de deux cycles de 10 minutes. Le clivage des séquences par un cocktail composé de TFA, de TIS (triisopropylsilane) et d'eau (95/2,5/2,5) a conduit, après évaporation, aux composés **25** et **26**.

Suivi des synthèses :

A chaque étape de la synthèse (couplage ou déprotection), un échantillon de résine a été prélevé et mis en suspension dans un mélange TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5). La solution a ensuite été évaporée sous flux d'azote puis analysée par LC-MS (ESI+) sur colonne Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm (5 µm, 50 x 4,6 mm ; débit de 5 mL/min, gradient linéaire allant de 100/0 à 0/100, éluants A/B en 2,5 min, où A = H₂O/TFA (0,1%, vv) et B = CH₃CN/TFA (0,1%, vv).

Purification par HPLC préparative :

Colonne Delta Park, C18 (15 µm, 40 x 100 mm ; solvant A : eau/TFA (0,1%, vv) ; solvant B : acétonitrile/TFA (0,1%, vv), débit 50 mL/min

Composé **25** : gradient linéaire de 75/25 à 55/45 en 40 minutes

Composé **26** : gradient linéaire de 55/45 à 25/75 en 30 minutes

Les rendements après purification s'élèvent à 7% pour **25** et 5% pour **26**.

Analyses LC-MS :

Les deux séquences ont été analysées par LC-MS (ESI+) sur colonne Chromolith Speed Rod RP-C18 185 Pm (5 µm, 50 x 4,6 mm ; débit de 5 mL/min, gradient linéaire allant de 100/0 à 0/100, éluants A/B en 2,5 min, où A = H₂O/TFA (0,1%, vv) et B = CH₃CN/TFA (0,1%, vv),

tr = 1,33 min (composé **25**) et 1,68 min (composé **26**). Les détections ont été faites à 214 nm et 254 nm à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes.

Composé **25** :

LC-MS (ESI +), tr = 1,33 min, $m/z = 759$ ($[M+2H]^{2+}$) 100%, 1514,6 ($[M+H]^+$) 10%

Composé **26** :

LC-MS (ESI +), tr = 1,68 min, $m/z = 484$ ($[M+3H]^{3+}$) 30%, 726 ($[M+2H]^{2+}$) 100%

II Production de NCoA-1 His-tag

Les essais de production de NCoA-1 ont été réalisés en utilisant comme support la méthode développée par Markus Seitz et coll.¹ à partir d'un clone fourni par le Prof. J. Robinson. Le gène synthétique codant le domaine de NCoA-1 compris entre les résidus 257 à 385 auquel a été ajouté un hexa-His-tag, a été intégré dans un vecteur pET14b entre les sites de restrictions *NCOI* et *BamHI*. L'expression de la protéine a été ensuite réalisée sur une souche transformée de bactéries *E. coli* BL21-(DE3)pLysS contenant le plasmide pOCI845.

Le clone a été mis en culture (37°C) en milieu LB (10 mL) contenant deux antibiotiques, l'ampicilline et le chloramphénicol. Lorsque densité optique mesurée à 600 nm a atteint 0,6, la production de protéine a été induite par ajout d'IPTG (750 mg) dans le milieu de culture. L'incubation a été poursuivie en fermenteur (volume 3L) à 25°C et à 200 tours/min pendant 20 h. Après centrifugation, le surnageant est éliminé, les cellules ont été lavées par du tampon phosphate (50 mM phosphate, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, pH 7,0) permettant de récupérer un culot de 50 g.

Etapes de purification de NCoA-1 His-tag, clivage du Tag et purification de NCoA-1

Tampons utilisés :

TpA : 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 2 mM BME (β -mercaptoéthanol), pH 7,0

TpB : TpA + 500 mM Imidazole, pH 7,0.

TpC : 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, pH 7,4

¹ Seitz, M., Maillard, L. T., Obrecht, D. & Robinson, J. A. Molecular Characterization of the NCoA-1-STAT 6 Interaction. *ChemBioChem* **9**, 1318–1322 (2008)

Lyse des bactéries

3,2 g de culot ont été repris dans 25 mL de Tampon Lyse (25 mL de Tampon A + 1 pastille du cocktail antiprotéase RocheTM +150 µL de DNase à 1 mg/mL + 75 µL MgCl₂ à 1 M).

Les bactéries ont été lysées par sonication dans un bain de glace :

Amplitude = 60%, Pulse « On » = 2 s, Pulse « Off » = 2 s (2 cycles de 6 min chacun). Le lysat a été incubé 10 min supplémentaires à 4°C pour laisser agir la DNase

Purification de NCoA-1 sur colonne Ni-NTA

Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 24 000 g pendant 30 minutes à 4°C puis le surnageant a été filtré sur seringue double-filtre (5 µm surmonté d'un filtre de 0,45 µm). A été ensuite additionné à l'échantillon le tampon TpA/TpB (4% de Tampon B en volume final soit une concentration finale de 20 mM d'imidazole). Une première étape de purification a été réalisée par chromatographie sur résine HisTrap (nickel supporté sur billes d'agarose, à 50% dans l'éthanol, 3 mL de résine) préalablement lavée et conditionné par 30 mL de TpA/TpB (20 mM d'imidazole). Du tampon B a été ajouté à l'échantillon pour atteindre la valeur de 20 mM d'imidazole. Celui-ci a ensuite été déposé sur la colonne, puis la phase stationnaire lavée par 25 mL de TpA puis 10 mL TpA/TpB (20 mM d'imidazole) et enfin avec 3 mL TpA/TpB (100 mM d'imidazole). L'élution a ensuite été réalisée avec 4 x 4 mL TpA/TpB (300 mM imidazole) avec un temps de contact tampon/résine de 3 min à chaque passage.

L'éluat a été dessalé par chromatographie d'exclusion stérique (colonne HiPrep) et son tampon a été remplacé par le TpA pur afin d'éliminer l'imidazole (facteur 2 de dilution en sortie de colonne).

Les fractions ont été rassemblées puis filtrées sur filtre 0,22 µm. La concentration en NCoA-1 His-tag s'élevait à environ **0,13 mg/mL**. Le volume de la solution a été ramené à environ **8 mL** par centrifugation sur Centricon (seuil de coupure : 5 000 Da). La solution a ensuite été filtrée sur filtre 0,22 µm puis analysée par mesure de son absorbance UV à 280 nm ($\epsilon = 12\ 950\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Les **8 mL** de solution contenaient **8 mg** de protéine, [NCoA-1 His-tag] = **1,0 mg/mL**.

Le clivage de l'étiquette poly-histidine (His-tag) a été réalisé *via* l'ajout de **0,5 mg** de TEV protéase (fraîchement purifiée) à **22°C** pendant **2h30** (bain-marie sans agitation).

Après équilibration de la colonne, l'échantillon a été engagé dans une purification par Gel Filtration. Cette étape a également permis de changer le tampon de la protéine par le tampon C.

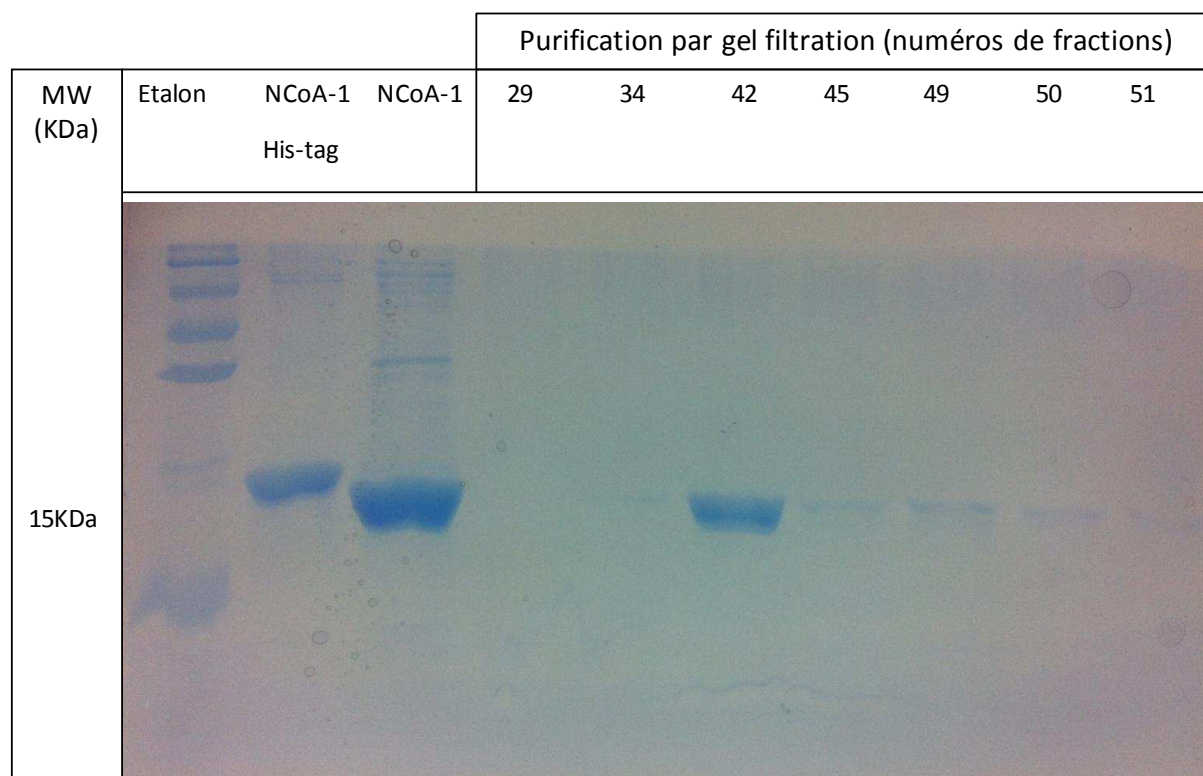


Figure SI 1 : Suivi des étapes finales de purification par électrophorèse

La fraction 42 correspondant au sommet du pic a été dosée : $[\text{NCoA-1}] = 0,13 \text{ mg/mL}$. Les fractions allant de 35 à 48 ont été rassemblées et concentrées sur Centricon :

Dosage intermédiaire UV (280 nm, $\epsilon = 11460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $V = 5 \text{ mL}$; $[\text{NCoA-1}] = 0,6 \text{ mg/mL}$

Dosage final UV : $V = 2,7 \text{ mL}$; $[\text{NCoA-1}] = 1,1 \text{ mg/mL}$ soit environ **3,0 mg**

(Rapport ADN/Protéine, $260/280 = 0,83$)

Rendement de gel filtration : $3,0/8,0 = 38\%$

III- Protocole de validation de l'activité de NCoA-1

Solution-mère de FluoSTAT6 : $10 \mu\text{M}$ dans le tampon C contenant 10% de DMSO, vv

Solution-mère de NCoA-1 : $50 \mu\text{M}$ dans le tampon C

Solution-mère de STAT6 794-814 : 1 mM dans le tampon C contenant 10% de DMSO, vv

Solution-mère de **25** et **26** : concentrations variables dans le tampon C contenant 10% de DMSO, vv.

L'ensemble des tests par polarisation de fluorescence ont été réalisés en plaques 96 puits (Corner Black) sur un volume final de 100 μL , en présence d'une concentration finale de 1 μM en FluoSTAT6.

IV-Protocole de titration de NCoA-1 par FluoSTAT6 : mesure de l'affinité du complexe

Ont été ajoutés successivement dans chaque puits, 10 μL de solution-mère de FluoSTAT6 (concentration finale 1 μM), le tampon C et des quantités croissantes de NCoA-1 (concentrations finales : 0 – 25 μM), pour un volume total de 100 μL . Les mélanges ont été homogénéisés par aspiration-refoulement, puis la plaque a été incubée à 30°C pendant 5 minutes. La lecture de la polarisation de polarisation de fluorescence a été réalisée à 515 nm (excitation à 490 nm). La constante d'affinité a été déterminée en utilisant l'*Equation 6* :

$$B = \frac{1}{2[R_t]} \left[(L_t + R_t + K_D) - \sqrt{(L_t + R_t + K_D)^2 - (4L_tR_t)} \right]$$

dans laquelle B représente la fraction de la sonde liée à la protéine, et L_t et R_t les concentrations totales en protéine et en sonde. K_D est la constante de dissociation du complexe.

V-Protocole de compétition de FluoSTAT6 par STAT6 794-814:

Ont été ajoutés successivement dans chaque puits, 10 μL de solution-mère de FluoSTAT6 (concentration finale, 1 μM), 10 μL de solution de STAT6 794-814 (concentrations finales 0 – 100 μM), 70 μL de tampon C contenant 10% de DMSO et 10 μL de solution-mère de NCoA-1 (concentration finale, 5 μM), pour un volume total de 100 μL . Les mélanges ont été homogénéisés par aspiration-refoulement, puis la plaque a été incubée à 30°C pendant 5 minutes. La lecture de la polarisation de polarisation de fluorescence a été réalisée à 515 nm (excitation à 490 nm). La valeur d' IC_{50} a été déterminée en utilisant une fonction sigmoïdale. Le calcul de la constante d'inhibition K_i a été effectué à partir de la valeur d' IC_{50} en utilisant l'équation de Cheng-Prusoff généralisée par Nikolovska-Coleska.

VI-Protocole de compétition de FluoSTAT6 par les séquence 25 et 26 :

Ont été ajoutés successivement dans chaque puits, 10 μL de solution-mère de FluoSTAT6 (concentration finale, 1 μM), 10 μL de solution de séquence candidate (concentrations finales 0 – 1 000 μM), 70 μL de tampon C contenant 10% de DMSO et 10 μL de solution-mère de NCoA-1 (concentration finale, 5 μM), pour un volume total de 100 μL . Les mélanges ont été homogénéisés par aspiration-refoulement, puis la plaque a été incubée à 30°C pendant 5 minutes. La lecture de la polarisation de fluorescence a été réalisée à 515 nm (excitation à 490 nm). La valeur d'IC₅₀ a été déterminée en utilisant une fonction sigmoïdale. Le calcul de la constante d'inhibition K_i a été effectué à partir de la valeur d'IC₅₀ en utilisant l'équation de Cheng-Prusoff généralisée par Nikolovska-Coleska.

Annexes

Paramètres de la protéine NCoA-1 His-tag (extraits de la base de données ExPASy)

NCoA-1 His-tag

Séquence :

MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMTGVESFMTKQD TTGKIISIDTSSLRAAGRTGWEDL
VRKCIYAFFQPQGREPSYARQLFQEVMTTRGTASSPSYRFILNDGTMLSAHTKCKLCYP
QSPDMQPFIMGIHIIDREHSGLS PQDDTNSGMSIPR

Nombre d'amino acides : 151

Masse moléculaire : 16977,0 Da

pI théorique : 7,15

Coefficient d'extinction molaire :

$$\epsilon_{280\text{nm}} = 13075 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Abs 0,1% (=1 g/l) 0,770, en considérant toutes les paires de cystéines

$$\epsilon_{280\text{nm}} = 12950 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Abs 0,1% (=1 g/l) 0,763, en considérant que toutes les paires de cystéines sont réduites

Nombre total de résidus charges négativement (Asp + Glu): 14

Nombre total de résidus charges positivement (Arg + Lys): 14

Formule: C₇₃₆H₁₁₃₄N₂₁₆O₂₂₆S₁₁

Nombre total d'atomes : 2323

Estimation de la demi-vie:

Le groupement en N-ter étant considéré comme M (Met).

La demi-vie estimée est de 30 heures (dans les réticulocytes de mammifères, *in vivo*).

> 20 heures (*levures, in vivo*).

> 10 heures (*Escherichia coli, in vivo*).

Indice d'instabilité:

L'indice d'instabilité (II) est calculé à 45,79

Ceci classe la protéine comme instable.

Index aliphatique: 56,23

Moyenne d'hydrophobicité (GRAVY): -0,592

NCoA-1

Séquence :

GHMTGVESFMTKQDTTGKIIISIDTSSLRAAGRTGWEDLVRKCIYAFFQPQGREPSYAR
QLFQEVMTTRGTASSPSYRFILNDGTMLSAHTKCKLCYPQSPDMQPFIMGIHIIDREHS
GLSPQDDTNSGMSIPR

Nombre d'amino acides : 132

Masse moléculaire: 14765.7 Da

Formule: C₆₄₁H₁₀₀₇N₁₈₃O₁₉₈S₁₀

Nombre total d'atomes: 2039

pI théorique: 7,93

Coefficient d'extinction molaire :

$$\epsilon_{280 \text{ nm}} = 11585 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Abs 0,1% (=1 g/l) 0,785, en considérant toutes les paires de cystéines

$$\epsilon_{280 \text{ nm}} = 11460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Abs 0,1% (=1 g/l) 0,776, en considérant que toutes les paires de cystéines sont réduites

Nombre total de résidus charges négativement (Asp + Glu): 13

Nombre total de résidus charges positivement (Arg + Lys): 14

Estimation de la demi-vie:

Le groupement en N-ter étant considéré comme G (Gly).

La demi-vie estimée est de 30 heures (dans les réticulocytes de mammifères, *in vivo*).

> 20 heures (*levures, in vivo*).

> 10 heures (*Escherichia coli*, *in vivo*).

Indice d'instabilité:

L'indice d'instabilité (II) est calculé à 48,60

Ceci classifie la protéine comme instable.

Index aliphatique: 61,36

Moyenne d'hydrophobicité (GRAVY): -0,477

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25.1. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3–26 (2001).
2. Lipinski, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **44**, 235–249 (2000).
3. Overington, J. P., Al-Lazikani, B. & Hopkins, A. L. How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 993–996 (2006).
4. Kim, M.-S. *et al.* A draft map of the human proteome. *Nature* **509**, 575–581 (2014).
5. Dunham, I. *et al.* An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57–74 (2012).
6. Keskin, O., Gursoy, A., Ma, B. & Nussinov, R. Principles of Protein–Protein Interactions: What are the Preferred Ways For Proteins To Interact? *Chem. Rev.* **108**, 1225–1244 (2008).
7. Henchey, L. K., Jochim, A. L. & Arora, P. S. Contemporary strategies for the stabilization of peptides in the alpha-helical conformation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 692–697 (2008).
8. Estieu-Gionnet, K. & Guichard, G. Stabilized helical peptides: overview of the technologies and therapeutic promises. *Expert Opin. Drug Discov.* **6**, 937–963 (2011).
9. Seebach, D. & Gardiner, J. β -Peptidic Peptidomimetics. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1366–1375 (2008).
10. Appella, D. H., Christianson, L. A., Karle, I. L., Powell, D. R. & Gellman, S. H. β -Peptide foldamers: robust helix formation in a new family of β -amino acid oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 13071–13072 (1996).

11. Hill, D. J., Mio, M. J., Prince, R. B., Hughes, T. S. & Moore, J. S. A Field Guide to Foldamers. *Chem. Rev.* **101**, 3893–4012 (2001).
12. Hecht, S., Huc, I. & Wiley InterScience (Online service). *Foldamers structure, properties, and applications*. (Wiley-VCH, 2007).
13. Guichard, G. & Huc, I. Synthetic foldamers. *Chem. Commun.* **47**, 5933 (2011).
14. Seebach, D. & Matthews, J. L. β -Peptides: a surprise at every turn. *Chem. Commun.* 2015–2022 (1997).
15. Seebach, D. *et al.* β -Peptides: Synthesis by Arndt-Eistert homologation with concomitant peptide coupling. Structure determination by NMR and CD spectroscopy and by X-ray crystallography. Helical secondary structure of a β -hexapeptide in solution and its stability towards pepsin. *Helv. Chim. Acta* **79**, 913–941 (1996).
16. Gademann, K., Hintermann, T. & Schreiber, J. V. Beta-peptides: twisting and turning. *Curr. Med. Chem.* **6**, 905–925 (1999).
17. Cheng, R. P., Gellman, S. H. & DeGrado, W. F. β -Peptides: From Structure to Function. *Chem. Rev.* **101**, 3219–3232 (2001).
18. Fülöp, F., Martinek, T. A. & Tóth, G. K. Application of alicyclic β -amino acids in peptide chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 323 (2006).
19. Violette, A. *et al.* N, N' -Linked Oligoureas as Foldamers: Chain Length Requirements for Helix Formation in Protic Solvent Investigated by Circular Dichroism, NMR Spectroscopy, and Molecular Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 2156–2164 (2005).
20. Bouillère, F., Thétiot-Laurent, S., Kouklovsky, C. & Alezra, V. Foldamers containing γ -amino acid residues or their analogues: structural features and applications. *Amino Acids* **41**, 687–707 (2011).
21. Kothari, A., Qureshi, M. K. N., Beck, E. M. & Smith, M. D. Bend-ribbon forming γ -peptides. *Chem. Commun.* 2814 (2007).

22. Qureshi, M. K. N. & Smith, M. D. Parallel sheet structure in cyclopropane γ -peptides stabilized by C-H...O hydrogen bonds. *Chem. Commun.* 5006 (2006).
23. Seebach, D., Schaeffer, L., Brenner, M. & Hoyer, D. Design and Synthesis of γ -Dipeptide Derivatives with Submicromolar Affinities for Human Somatostatin Receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 776–778 (2003).
24. Hanessian, S., Luo, X., Schaum, R. & Michnick, S. Design of Secondary Structures in Unnatural Peptides: Stable Helical γ -Tetra-, Hexa-, and Octapeptides and Consequences of α -Substitution. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 8569–8570 (1998).
25. Linderstrom-Lang, K. U. & Shellman, J. A. *Protein structure and enzyme activity in 'The Enzymes'*. (2nd ed, 443-510 Boyer, Lardy, Myrbäck Eds. Academic Press, New York, Vol. 1, 1959).
26. Hansson, H., Berglund, G., Andersson, E., Sandgren, M. & Selmer, M. Introduction to Swiss Pdb Viewer: The structure levels in proteins. (2011). at http://xray.bmc.uu.se/kurs/BSBX2/practicals/practical_2/practical_2.html
27. Venkatraman, J., Shankaramma, S. C. & Balaram, P. Design of Folded Peptides. *Chem. Rev.* **101**, 3131–3152 (2001).
28. Richardson, J. S. The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure. at <http://kinemage.biochem.duke.edu/teaching/anatax/html/anatax.1b.html>
29. Liskamp, R. M. J., Rijkers, D. T. S., Kruijtzter, J. A. W. & Kemmink, J. Peptides and Proteins as a Continuing Exciting Source of Inspiration for Peptidomimetics. *ChemBioChem* **12**, 1626–1653 (2011).
30. Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. in *Advances in Protein Chemistry* **23**, 283–437 (Elsevier, 1968).
31. Chou, P. Y. & Fasman, G. D. Prediction of beta-turns. *Biophys. J.* **26**, 367–383 (1979).

32. Némethy, G. & Scheraga, H. A. Stereochemical requirements for the existence of hydrogen bonds in β -bends. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 320–327 (1980).
33. Guruprasad, K. & Rajkumar, S. β - and γ -turns in proteins revisited: A new set of amino acid turn-type dependent positional preferences and potentials. *J. Biosci.* **25**, 143–156 (2000).
34. Quinkert, G., Egert, E. & Griesinger, C. *Peptides: synthesis, structures, and applications*. (Academic Press, 1995).
35. Pauling, L., Corey, R. B. & Branson, H. R. The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **37**, 205–211 (1951).
36. Adzhubei, A. A., Sternberg, M. J. E. & Makarov, A. A. Polyproline-II Helix in Proteins: Structure and Function. *J. Mol. Biol.* **425**, 2100–2132 (2013).
37. André, C. Structures hélicoïdales d'oligomères dirigées par un β -aminoacide bicyclique. (Université de Montpellier II, 2012).
38. Zirah, S. Rôle de la région N-terminale 1-16 du peptide amyloïde A β dans la déposition amyloïde associée à la maladie d'Alzheimer: Plasticité conformationnelle, modifications liées au vieillissement protéique et interaction avec les ions Zn²⁺. (Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2004). at <<http://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00170474/>>
39. Seebach, D., Schreiber, J. V., Abele, S., Daura, X. & van Gunsteren, W. F. Structure and Conformation of β -Oligopeptide Derivatives with Simple Proteinogenic Side Chains: Circular Dichroism and Molecular Dynamics Investigations. *Helv. Chim. Acta* **83**, 34–57 (2000).
40. Williamson, M. P., Havel, T. F. & Wüthrich, K. Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J. Mol. Biol.* **182**, 295–315 (1985).

41. Wüthrich, K. *NMR of proteins and nucleic acids*. (Wiley, 1986).
42. Aue, W. P., Karhan, J. & Ernst, R. R. Homonuclear broad band decoupling and two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **64**, 4226–4227 (1976).
43. Braunschweiler, L. & Ernst, R. R. Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1969** **53**, 521–528 (1983).
44. Bax, A. & Davis, D. G. MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1969** **65**, 355–360 (1985).
45. Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. & Ernst, R. R. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **71**, 4546 (1979).
46. Kumar, A., Ernst, R. R. & Wüthrich, K. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1–6 (1980).
47. Bodenhausen, G. & Freeman, R. Correlation of proton and carbon-13 NMR spectra by heteronuclear two-dimensional spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1969** **28**, 471–476 (1977).
48. Bax, A., Griffey, R. H. & Hawkins, B. L. Correlation of proton and nitrogen-15 chemical shifts by multiple quantum NMR. *J. Magn. Reson.* **1969** **55**, 301–315 (1983).
49. Mueller, L. Sensitivity enhanced detection of weak nuclei using heteronuclear multiple quantum coherence. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 4481–4484 (1979).
50. Bodenhausen, G. & Ruben, D. J. Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **69**, 185–189 (1980).
51. Bax, A. & Marion, D. Improved resolution and sensitivity in ¹H-detected heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1969** **78**, 186–191 (1988).

52. Bax, A. & Summers, M. F. Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2093–2094 (1986).
53. Kessler, H. Conformation and Biological Activity of Cyclic Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **21**, 512–523 (1982).
54. Wagner, G. & Wüthrich, K. Dynamic model of globular protein conformations based on NMR studies in solution. *Nature* **275**, 247–248 (1978).
55. Wagner, G. & Wüthrich, K. Amide proton exchange and surface conformation of the basic pancreatic trypsin inhibitor in solution. Studies with two-dimensional nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.* **160**, 343–361 (1982).
56. Grzesiek, S., Cordier, F. & Dingley, A. J. in *Methods in Enzymology* **338**, 111–133 (Elsevier, 2002).
57. Altmayer-Henzien, A. *et al.* Fast-pulsing NMR techniques for the detection of weak interactions: successful natural abundance probe of hydrogen bonds in peptides. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 7611 (2013).
58. Marion, D. & Wüthrich, K. Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ^1H - ^1H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**, 967–974 (1983).
59. Rance, M. *et al.* Improved spectral resolution in COSY ^1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 479–485 (1983).
60. Ramachandran, G. N., Chandrasekaran, R. & Kopple, K. D. Variation of the NH-CH coupling constant with dihedral angle in the NMR spectra of peptides. *Biopolymers* **10**, 2113–2131 (1971).

61. Cung, M. T., Marraud, M. & Neel, J. Experimental Calibration of a Karplus Relationship in Order to Study the Conformations of Peptides by Nuclear Magnetic Resonance. *Macromolecules* **7**, 606–613 (1974).
62. Bystrov, V. F. Spin—spin coupling and the conformational states of peptide systems. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **10**, 41–82 (1976).
63. Pardi, A., Billeter, M. & Wüthrich, K. Calibration of the angular dependence of the amide proton- C_α proton coupling constants, $^3\text{JHN}_\alpha$, in a globular protein. *J. Mol. Biol.* **180**, 741–751 (1984).
64. Balaram, H., Prasad, B. V. V. & Balaram, P. Multiple conformational states of a Pro-Pro peptide. Solid-state and solution conformations of Boc-Aib-Pro-Pro-NHMe. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 4065–4071 (1983).
65. Gellman, S. H. Foldamers: a manifesto. *Acc. Chem. Res.* **31**, 173–180 (1998).
66. Martinek, T. A. & Fülöp, F. Peptidic foldamers: ramping up diversity. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 687 (2012).
67. Seebach, D. *et al.* Probing the Helical Secondary Structure of Short-Chain β -Peptides. *Helv. Chim. Acta* **79**, 2043–2066 (1996).
68. Kritzer, J. A., Stephens, O. M., Guarracino, D. A., Reznik, S. K. & Schepartz, A. β -Peptides as inhibitors of protein–protein interactions. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 11–16 (2005).
69. Hamuro, Y., Schneider, J. P. & DeGrado, W. F. De Novo Design of Antibacterial β -Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 12200–12201 (1999).
70. Rosés, C. *et al.* Cell-penetrating γ -peptide/antimicrobial undecapeptide conjugates with anticancer activity. *Tetrahedron* **68**, 4406–4412 (2012).
71. Newman, M. S. & Lednicer, D. The Synthesis and Resolution of Hexahelicene¹. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4765–4770 (1956).

72. Martin, R. H. & Marchant, M. J. Thermal racemisation of hepta-, octa-, and nonahelicene: Kinetic results, reaction path and experimental proofs that the racemisation of hexa- and heptahelicene does not involve an intramolecular double Diels-Alder reaction. *Tetrahedron* **30**, 347–349 (1974).
73. Kiupel, B., Niederal, C., Nieger, M., Grimme, S. & Vögtle, F. ‘Geländer’ Helical Molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 3031–3034 (1998).
74. Semetey, V., Moustakas, D. & Whitesides, G. M. Synthesis and Conformational Study of Water-Soluble, Rigid, Rodlike Oligopiperidines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 588–591 (2006).
75. Kwok-Keung Ho, P. & others. Monohelical quinquopyridine complexes of rhenium-(I) and -(III). *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1411–1417 (1996).
76. Kim, H.-J., Zin, W.-C. & Lee, M. Anion-Directed Self-Assembly of Coordination Polymer into Tunable Secondary Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 7009–7014 (2004).
77. Yashima, E., Maeda, K., Iida, H., Furusho, Y. & Nagai, K. Helical Polymers: Synthesis, Structures, and Functions. *Chem. Rev.* **109**, 6102–6211 (2009).
78. Steiner, T. The hydrogen bond in the solid state. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 48–76 (2002).
79. Desiraju, G. R. & Steiner, T. *Weak hydrogen Bond*. (Oxford University Press New York, 2001). at <<http://www.icmr.ucsb.edu/programs/archive/documents/Desiraju2.pdf>>
80. Gong, B. *et al.* Creating nanocavities of tunable sizes: Hollow helices. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11583–11588 (2002).
81. Plante, J. *et al.* Synthesis of functionalised aromatic oligamide rods. *Org. Biomol. Chem.* **6**, 138 (2008).
82. Saraogi, I. & Hamilton, A. D. α -Helix mimetics as inhibitors of protein–protein interactions. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1414 (2008).

83. Jiang, H., Léger, J.-M. & Huc, I. Aromatic δ -Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3448–3449 (2003).
84. 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* **59**, 8365–8374 (2003).
85. Schmitt, J.-L., Stadler, A.-M., Kyritsakas, N. & Lehn, J.-M. Helicity-encoded molecular strands: efficient access by the hydrazone route and structural features. *Helv. Chim. Acta* **86**, 1598–1624 (2003).
86. Ding, Y., Mei, Y., Zhang, J. Z. H. & Tao, F.-M. Efficient bond function basis set for π - π interaction energies. *J. Comput. Chem.* **29**, 275–279 (2008).
87. Krebs, F. C. & Jørgensen, M. Synthesis and Structural Characterization of New Stiff Rod Oligomeric Domains by X-ray Crystallography and NMR. *J. Org. Chem.* **67**, 7511–7518 (2002).
88. Sessler, J. L., Weghorn, S. J., Lynch, V. & Fransson, K. 5, 15, 25-tris-nor-Hexapyrrin: the first structurally characterized linear hexapyrrin. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1289–1290 (1994).
89. Hill, D. J. & Moore, J. S. Helicogenicity of solvents in the conformational equilibrium of oligo (m-phenylene ethynylene)s: Implications for foldamer research. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 5053–5057 (2002).
90. Moehle, K. & Hofmann, H.-J. Peptides and peptoids - A quantum chemical structure comparison. *Biopolymers* **38**, 781–790 (1996).
91. Armand, P. *et al.* Chiral *N*-substituted glycines can form stable helical conformations. *Fold. Des.* **2**, 369–375 (1997).
92. Wu, C. W. *et al.* Structural and Spectroscopic Studies of Peptoid Oligomers with α -Chiral Aliphatic Side Chains. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13525–13530 (2003).

93. Kirshenbaum, K. *et al.* Sequence-specific polypeptoids: a diverse family of heteropolymers with stable secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 4303–4308 (1998).
94. Gorske, B. C., Bastian, B. L., Geske, G. D. & Blackwell, H. E. Local and Tunable $n \rightarrow \pi^*$ Interactions Regulate Amide Isomerism in the Peptoid Backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 8928–8929 (2007).
95. Gorske, B. C., Stringer, J. R., Bastian, B. L., Fowler, S. A. & Blackwell, H. E. New Strategies for the Design of Folded Peptoids Revealed by a Survey of Noncovalent Interactions in Model Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 16555–16567 (2009).
96. Hinderaker, M. P. & Raines, R. T. An electronic effect on protein structure. *Protein Sci.* **12**, 1188–1194 (2003).
97. Wu, C. W., Sanborn, T. J., Zuckermann, R. N. & Barron, A. E. Peptoid Oligomers with α -Chiral, Aromatic Side Chains: Effects of Chain Length on Secondary Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2958–2963 (2001).
98. Wu, C. W., Sanborn, T. J., Huang, K., Zuckermann, R. N. & Barron, A. E. Peptoid Oligomers with α -Chiral, Aromatic Side Chains: Sequence Requirements for the Formation of Stable Peptoid Helices. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6778–6784 (2001).
99. Armand, P. *et al.* NMR determination of the major solution conformation of a peptoid pentamer with chiral side chains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 4309–4314 (1998).
100. 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.* **114**, 10646–10647 (1992).
101. Paul, B. *et al.* *N*-Naphthyl Peptoid Foldamers Exhibiting Atropisomerism. *Org. Lett.* **14**, 926–929 (2012).

102. Szekely, T., Caumes, C., Roy, O., Faure, S. & Taillefumier, C. α -Peptoïdes et composés apparentés: synthèse et contrôle de la conformation. *Comptes Rendus Chim.* **16**, 318–330 (2013).
103. 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* **63**, 12–20 (2002).
104. Miller, S. M. *et al.* Comparison of the proteolytic susceptibilities of homologous L-amino acid, D-amino acid, and *N*-substituted glycine peptide and peptoid oligomers. *Drug Dev. Res.* **35**, 20–32 (1995).
105. Miller, S. M. *et al.* Proteolytic studies of homologous peptide and *N*-substituted glycine peptoid oligomers. *Bioorg. Chem. Lett.* **4**, 2657–2662, (1994)
106. Seo, J. *et al.* *In Vivo* Biodistribution and Small Animal PET of ^{64}Cu -Labeled Antimicrobial Peptoids. *Bioconjug. Chem.* **23**, 1069–1079 (2012).
107. Alluri, P. G., Reddy, M. M., Bachhawat-Sikder, K., Olivos, H. J. & Kodadek, T. Isolation of Protein Ligands from Large Peptoid Libraries. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13995–14004 (2003).
108. Astle, J. M. *et al.* Seamless Bead to Microarray Screening: Rapid Identification of the Highest Affinity Protein Ligands from Large Combinatorial Libraries. *Chem. Biol.* **17**, 38–45 (2010).
109. Hancock, R. E. Peptide antibiotics. *The Lancet* **349**, 418–422 (1997).
110. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389–395 (2002).
111. Hancock, R. E. W. & Sahl, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1551–1557 (2006).

112. Chongsiriwatana, N. P. *et al.* Peptoids that mimic the structure, function, and mechanism of helical antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 2794–2799 (2008).
113. Ge, Y. *et al.* In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 782–788 (1999).
114. Frecer, V. QSAR analysis of antimicrobial and haemolytic effects of cyclic cationic antimicrobial peptides derived from protegrin-1. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 6065–6074 (2006).
115. Park, Y. *et al.* Design of novel analogues with potent antibiotic activity based on the antimicrobial peptide, HP (2-9)-ME (1-12). *Biotechnol. Lett.* **26**, 493–498 (2004).
116. Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M. & Bienert, M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *Febs Lett.* **501**, 146–150 (2001).
117. Feder, R., Dagan, A. & Mor, A. Structure-Activity Relationship Study of Antimicrobial Dermaseptin S4 Showing the Consequences of Peptide Oligomerization on Selective Cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **275**, 4230–4238 (2000).
118. Kustanovich, I., Shalev, D. E., Mikhlin, M., Gaidukov, L. & Mor, A. Structural Requirements for Potent Versus Selective Cytotoxicity for Antimicrobial Dermaseptin S4 Derivatives. *J. Biol. Chem.* **277**, 16941–16951 (2002).
119. Hintermann, T. & Seebach, D. Synthesis of a β -Hexapeptide from (*R*)-2-Aminomethyl-alkanoic Acids and Structural Investigations. *Synlett* **1997**, 437–438 (1997).
120. Banerjee, A. & Balaram, P. Stereochemistry of peptides and polypeptides containing omega amino acids. *Curr. Sci.* **73**, 1067 (1997).
121. Kovacs, J., Ballina, R., Rodin, R. L., Balasubramanian, D. & Applequist, J. Poly- β -L-aspartic Acid. Synthesis through Pentachlorophenyl Active Ester and Conformational Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 119–120 (1965).

122. Bestian, H. Poly- β -amides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **7**, 278–285 (1968).
123. Chen, F., Lepore, G. & Goodman, M. Conformational Studies of Poly[(S)- β -aminobutyric acid]. *Macromolecules* **7**, 779–783 (1974).
124. Fernández-Santín, J. M., Aymamí, J., Rodríguez-Galán, A., Muñoz-Guerra, S. & Subirana, J. A. A pseudo α -helix from poly(α -isobutyl-L-aspartate), a nylon-3 derivative. *Nature* **311**, 53–54 (1984).
125. Yuki, H. & Taketani, Y. Poly- β -(α -isobutyl L-aspartate). *J. Polym. Sci. [B]* **10**, 373–378 (1972).
126. Seebach, D., Beck, A. K. & Bierbaum, D. J. The world of β -and γ -peptides comprised of homologated proteinogenic amino acids and other components. *Chem. Biodivers.* **1**, 1111–1239 (2004).
127. Bode, K. A. & Applequist, J. Poly (β -amino acid) helices. Theoretical π - π^* absorption and circular dichroic spectra. *Macromolecules* **30**, 2144–2150 (1997).
128. Bella, J., Aleman, C., Fernández-Santín, J. M., Alegre, C. & Subirana, J. A. Conformation of the helical polyamide poly(α -isobutyl L-aspartate). *Macromolecules* **25**, 5225–5230 (1992).
129. Appella, D. H. *et al.* Residue-based control of helix shape in β -peptide oligomers. *Nature* **387**, 381–384 (1997).
130. Gademann, K. *et al.* Temperature-Dependent NMR and CD Spectra of β -Peptides: On the Thermal Stability of β -Peptide Helices - Is the Folding Process of β -Peptides Non-cooperative? *Helv. Chim. Acta* **82**, 1–11 (1999).
131. Guichard, G., Abele, S. & Seebach, D. Preparation of N-Fmoc-Protected β^2 -and β^3 -Amino Acids and their use as building blocks for the solid-phase synthesis of β -peptides. *Helv. Chim. Acta* **81**, 187–206 (1998).

132. Seebach, D. *et al.* β^2 - and β^3 -Peptides with Proteinaceous Side Chains: Synthesis and solution structures of constitutional isomers, a novel helical secondary structure and the influence of solvation and hydrophobic interactions on folding. *Helv. Chim. Acta* **81**, 932–982 (1998).
133. Wu, Y.-D. & Wang, D.-P. Theoretical Studies of β -Peptide Models. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 13485–13493 (1998).
134. Seebach, D., Hook, D. F. & Glättli, A. Helices and other secondary structures of β - and γ -peptides. *Biopolymers* **84**, 23–37 (2006).
135. Barchi, J. J. *et al.* Solution Conformations of Helix-Forming β -Amino Acid Homooligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2711–2718 (2000).
136. Applequist, J., Bode, K. A., Appella, D. H., Christianson, L. A. & Gellman, S. H. Theoretical and experimental circular dichroic spectra of the novel helical foldamer poly [(1R, 2R)-trans-2-aminocyclopentanecarboxylic acid]. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 4891–4892 (1998).
137. Claridge, T. D. *et al.* 10-Helical conformations in oxetane β -amino acid hexamers. *Tetrahedron Lett.* **42**, 4251–4255 (2001).
138. Gademann, K., Häne, A., Rueping, M., Jaun, B. & Seebach, D. The Fourth Helical Secondary Structure of β -Peptides: The (P)- 2_8 -Helix of a β -Hexapeptide Consisting of (2R, 3S)-3-Amino-2-hydroxy Acid Residues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 1534–1537 (2003).
139. Salaün, A., Potel, M., Roisnel, T., Gall, P. & Le Grel, P. Crystal Structures of Aza- β^3 -peptides, A New Class of Foldamers Relying on a Framework of Hydrazinoturns. *J. Org. Chem.* **70**, 6499–6502 (2005).
140. Yang, D. *et al.* Novel Turns and Helices in Peptides of Chiral α -Aminoxy Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 589–590 (1999).

141. Seebach, D. *et al.* 'Mixed' β -Peptides: A unique helical secondary structure in solution. Preliminary communication. *Helv. Chim. Acta* **80**, 2033–2038 (1997).
142. Rueping, M., Schreiber, J. V., Lelais, G., Jaun, B. & Seebach, D. Mixed β^2/β^3 -Hexapeptides and β^2/β^3 -Nonapeptides Folding to (P)-Helices with Alternating Twelve- and Ten-Membered Hydrogen-Bonded Rings. *Angew. Chem. Int. Ed.* **85**, 2577–2593 (2002).
143. Seebach, D. *et al.* Preparation and Structure of β -Peptides Consisting of Geminally Disubstituted $\beta^{2,2}$ - and $\beta^{3,3}$ -Amino Acids: A Turn Motif for β -Peptides. *Helv. Chim. Acta* **81**, 2218–2243 (1998).
144. André, C. *et al.* (S)-ABOC: A Rigid Bicyclic β -Amino Acid as Turn Inducer. *Org. Lett.* **14**, 960–963 (2012).
145. Mayne, L. *et al.* Stabilizing Effect of a Multiple Salt Bridge in a Prenucleated Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 10643–10645 (1998).
146. Scholtz, J. M., Qian, H., Robbins, V. H. & Baldwin, R. L. The energetics of ion-pair and hydrogen-bonding interactions in a helical peptide. *Biochemistry (Mosc.)* **32**, 9668–9676 (1993).
147. Cheng, R. P. & DeGrado, W. F. De Novo Design of a Monomeric Helical β -Peptide Stabilized by Electrostatic Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5162–5163 (2001).
148. Arvidsson, P. I., Rueping, M. & Seebach, D. Design, machine synthesis, and NMR-solution structure of a β -heptapeptide forming a salt-bridge stabilised 3_{14} -helix in methanol and in water. *Chem. Commun.* 649–650 (2001).
149. Kritzer, J. A. *et al.* Relationship between Side Chain Structure and 14-Helix Stability of β^3 -Peptides in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 167–178 (2005).
150. Rydon, H. N. 260. Polypeptides. Part X. The optical rotatory dispersion of poly- γ -D-glutamic acid. *J Chem Soc* 1328–1333 (1964).

151. Detar, D. F. The Calculation of Parameters of the Moffitt Equation for Rotatory Dispersion Data. *Biophys. J.* **6**, 505–512 (1966).
152. Baldauf, C., Günther, R. & Hofmann, H.-J. Helix Formation and Folding in γ -Peptides and Their Vinylogues. *Helv. Chim. Acta* **86**, 2573–2588 (2003).
153. Seebach, D., Brenner, M., Rueping, M. & Jaun, B. γ^2 -, γ^3 -, and $\gamma^{2,3,4}$ -Amino Acids, Coupling to γ -Hexapeptides: CD Spectra, NMR Solution and X-ray Crystal Structures of γ -Peptides. *Chem. - Eur. J.* **8**, 573–584 (2002).
154. Brenner, M. & Seebach, D. Enantioselective Preparation of γ -Amino Acids and γ -Lactams from Nitro Olefins and Carboxylic Acids, with the Valine-Derived 4-Isopropyl-5,5-diphenyl-1,3-oxazolidin-2-one as an Auxiliary. *Helv. Chim. Acta* **82**, 2365–2379 (1999).
155. Hintermann, T., Gademann, K., Jaun, B. & Seebach, D. γ -Peptides Forming More Stable Secondary Structures than α -Peptides: Synthesis and helical NMR-solution structure of the γ -hexapeptide analog of H-(Val-Ala-Leu)₂-OH. *Helv. Chim. Acta* **81**, 983–1002 (1998).
156. Sharma, G. V. M. *et al.* A Left-Handed 9-Helix in γ -Peptides: Synthesis and Conformational Studies of Oligomers with Dipeptide Repeats of C-Linked Carbo- γ^4 -amino Acids and γ -Aminobutyric Acid. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 2944–2947 (2006).
157. Seebach, D., Brenner, M., Rueping, M., Schweizer, B. & Jaun, B. Preparation and determination of X-ray-crystal and NMR-solution structures of $\gamma^{2,3,4}$ -peptides. *Chem. Commun.* 207–208 (2001).
158. Aravinda, S., Ananda, K., Shamala, N. & Balaram, P. α - γ Hybrid Peptides that Contain the Conformationally Constrained Gabapentin Residue: Characterization of Mimetics of Chain Reversals. *Chem. - Eur. J.* **9**, 4789–4795 (2003).

159. Ananda, K. *et al.* Stereochemistry of gabapentin and several derivatives: Solid state conformations and solution equilibria. *Curr. Sci.* **85**, 1002–1011
160. Vasudev, P. G., Shamala, N., Ananda, K. & Balaram, P. C₉ Helices and Ribbons in γ -Peptides: Crystal Structures of Gabapentin Oligomers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 4972–4975 (2005).
161. Farrera-Sinfreu, J. *et al.* A New Class of Foldamers Based on *cis*- γ -Amino-L-proline^{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6048–6057 (2004).
162. Jones, C. R. *et al.* A Nonpeptidic Reverse Turn that Promotes Parallel Sheet Structure Stabilized by C-H \cdots O Hydrogen Bonds in a Cyclopropane γ -Peptide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 7099–7102 (2008).
163. Watterson, M. P. *et al.* Synthesis of all diastereomeric methyl 2,5-anhydro-3-deoxyhexonates: precursors to C-2-deoxynucleosides and THF-templated γ - and δ -amino acids. *Tetrahedron Lett.* **44**, 5853–5857 (2003).
164. Edwards, A. A. *et al.* Synthesis of 4-aminomethyl-tetrahydrofuran-2-carboxylates with 2,4-*cis* and 2,4-*trans* relationships. *Tetrahedron* **62**, 4110–4119 (2006).
165. Edwards, A. A., Sanjayan, G. J., Hachisu, S., Tranter, G. E. & Fleet, G. W. J. A novel series of oligomers from 4-aminomethyl-tetrahydrofuran-2-carboxylates with 2,4-*cis* and 2,4-*trans* stereochemistry. *Tetrahedron* **62**, 7718–7725 (2006).
166. Semetey, V. *et al.* Stable Helical Secondary Structure in Short-Chain *N,N'*-Linked Oligoureas Bearing Proteinogenic Side Chains. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 1893 (2002).
167. Hemmerlin, C. *et al.* Helix-Forming Oligoureas: Temperature-Dependent NMR, Structure Determination, and Circular Dichroism of a Nonamer with Functionalized Side Chains. *Helv. Chim. Acta* **85**, 3692–3711 (2002).

168. Fischer, L. & Guichard, G. Folding and self-assembly of aromatic and aliphatic urea oligomers: Towards connecting structure and function. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 3101 (2010).
169. Tanatani, A. *et al.* Helical Structures of *N*-Alkylated Poly(*p*-benzamide)s. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 8553–8561 (2005).
170. Yamaguchi, K. *et al.* Aromatic architecture. Use of the *N*-methanamide structure as a molecular splint. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 5474–5475 (1991).
171. Masu, H. *et al.* Aromatic Foldamers with Iminodicarbonyl Linkers: Their Structures and Optical Properties. *J. Org. Chem.* **70**, 1423–1431 (2005).
172. Tanatani, A. *et al.* Helical aromatic urea and guanidine. *Tetrahedron Lett.* **38**, 4425–4428 (1997).
173. Tanatani, A. *et al.* *N*-Methylated Diphenylguanidines: Conformations, Propeller-Type Molecular Chirality, and Construction of Water-Soluble Oligomers with Multilayered Aromatic Structures. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6433–6442 (1998).
174. Dannecker, W., Kopf, J. & Rust, H. Crystal structure of *N,N'*-diphenylurea. *Cryst. Struct. Commun.* **8**, 429–432 (1979).
175. Ganis, P., Avitabile, G., Benedetti, E., Pedone, C. & Goodman, M. Crystal and Molecular Structure of *N,N'*-Diethyl-*N,N'*-Diphenylurea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **67**, 426–433 (1970).
176. Violette, A. *et al.* Mimicking Helical Antibacterial Peptides with Nonpeptidic Folding Oligomers. *Chem. Biol.* **13**, 531–538 (2006).
177. Fischer, L. *et al.* The Canonical Helix of Urea Oligomers at Atomic Resolution: Insights Into Folding-Induced Axial Organization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 1067–1070 (2009).
178. Pendem, N. *et al.* Helix-Forming Propensity of Aliphatic Urea Oligomers Incorporating Noncanonical Residue Substitution Patterns. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 4884–4892 (2013).

179. Seebach, D. *et al.* Synthesis of β -Hexa- and β -Heptapeptides Containing Novel $\beta^{2,3}$ -Amino Acids with Two Serine or Two Cysteine Side Chains - CD- and NMR-Spectroscopic Evidence for 3_{14} -Helical Secondary Structures in Water. *Helv. Chim. Acta* **83**, 2115–2140 (2000).
180. Raguse, T. L., Porter, E. A., Weisblum, B. & Gellman, S. H. Structure–Activity Studies of 1_4 -Helical Antimicrobial β -Peptides: Probing the Relationship between Conformational Stability and Antimicrobial Potency. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12774–12785 (2002).
181. Raguse, T. L., Lai, J. R. & Gellman, S. H. Environment-Independent 1_4 -Helix Formation in Short β -Peptides: Striking a Balance between Shape Control and Functional Diversity. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 5592–5593 (2003).
182. Vasudev, P. G., Chatterjee, S., Shamala, N. & Balaram, P. Structural Chemistry of Peptides Containing Backbone Expanded Amino Acid Residues: Conformational Features of β -, γ -, and Hybrid Peptides. *Chem. Rev.* **111**, 657–687 (2011).
183. Goodman, C. M., Choi, S., Shandler, S. & DeGrado, W. F. Foldamers as versatile frameworks for the design and evolution of function. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 252–262 (2007).
184. James, W. H. *et al.* Single-Conformation and Diastereomer Specific Ultraviolet and Infrared Spectroscopy of Model Synthetic Foldamers: α/β -Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 6574–6590 (2009).
185. Baldauf, C., Günther, R. & Hofmann, H.-J. Control of Helix Formation in Vinylogous γ -Peptides by (*E*)- and (*Z*)-Double Bonds: A Way to Ion Channels and Monomolecular Nanotubes. *J. Org. Chem.* **70**, 5351–5361 (2005).
186. Zhang, Y. & Wang, J. Recent development of reactions with α -diazocarbonyl compounds as nucleophiles. *Chem. Commun.* 5350 (2009). doi:10.1039/b908378b

187. Harris, B. D., Bhat, K. . & Joullié, M. M. Synthetic studies of didemmins. II. Approaches to statine diastereomers. *Tetrahedron Lett.* **28**, 2837–2840 (1987).
188. Hoffman, R. V. & Tao, J. A simple, stereoselective synthesis of ketomethylene dipeptide isosteres. *Tetrahedron* **53**, 7119–7126 (1997).
189. Honda, Y., Katayama, S., Kojima, M., Suzuki, T. & Izawa, K. An efficient synthesis of γ -amino β -ketoester by cross-Claisen condensation with α -amino acid derivatives. *Tetrahedron Lett.* **44**, 3163–3166 (2003).
190. Tomioka, K., Kanai, M. & Koga, K. An expeditious synthesis of dolastatin 10. *Tetrahedron Lett.* **32**, 2395–2398 (1991).
191. Zhang, J. *et al.* The efficient synthesis of (3R,4R,5R)-3-amino-4,5-dimethyl-octanoic acid, a chiral β -amino acid with potent affinity for the $\alpha 2\delta$ protein. *Tetrahedron Lett.* **50**, 1167–1170 (2009).
192. Hoffman, R. V., Maslouh, N. & Cervantes-Lee, F. Highly Stereoselective Syntheses of *syn*- and *anti*-1,2-Amino Alcohols. *J. Org. Chem.* **67**, 1045–1056 (2002).
193. Maibaum, J. & Rich, D. H. A facile synthesis of statine and analogs by reduction of β -ketoesters derived from Boc-protected amino acids. HPLC analyses of their enantiomeric purity. *J. Org. Chem.* **53**, 869–873 (1988).
194. Schuda, P. F., Greenlee, W. J., Chakravarty, P. K. & Eskola, P. A short and efficient synthesis of (3S,4S)-4-[(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino]-5-cyclohexyl-3-hydroxypentanoic acid ethyl ester. *J. Org. Chem.* **53**, 873–875 (1988).
195. Theberge, C. R. & Zercher, C. K. Chain extension of amino acid skeletons: preparation of ketomethylene isosteres. *Tetrahedron* **59**, 1521–1527 (2003).
196. Mathieu, L. *et al.* Helical Oligomers of Thiazole-Based γ -Amino Acids: Synthesis and Structural Studies. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 6006–6010 (2013).

197. Seo, M.-D., Won, H.-S., Kim, J.-H., Mishig-Ochir, T. & Lee, B.-J. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. *Molecules* **17**, 12276–12286 (2012).
198. Epand, R. M. & Vogel, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1462**, 11–28 (1999).
199. Horne, W. S. & Gellman, S. H. Foldamers with Heterogeneous Backbones. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1399–1408 (2008).
200. Mann, E. & Kessler, H. New Oxazole-Based Peptidomimetics: Useful Building Blocks for the Synthesis of Orthogonally Protected Macrocyclic Scaffolds. *Org. Lett.* **5**, 4567–4570 (2003).
201. Kondejewski, L. H., Farmer, S. W., Wishart, D. S., Hancock, R. E. W. & Hodges, R. S. Gramicidin S is active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Pept. Protein Res.* **47**, 460–466 (2009).
202. Prenner, E. J., Lewis, R. N. A. & McElhaney, R. N. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1462**, 201–221 (1999).
203. Llamas-Saiz, A. L., Grotenbreg, G. M., Overhand, M. & van Raaij, M. J. Double-stranded helical twisted β -sheet channels in crystals of gramicidin S grown in the presence of trifluoroacetic and hydrochloric acids. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **63**, 401–407 (2007).
204. Legrand, B. *et al.* Thiazole-Based γ -Building Blocks as Reverse-Turn Mimetic to Design a Gramicidin S Analogue: Conformational and Biological Evaluation. *Chem. - Eur. J.* **20**, 6713–6720 (2014).
205. Foster. STAT6: an intracellular target for the inhibition of allergic disease: STAT6. *Clin. Exp. Allergy* **29**, 12–16 (1999).

206. Razeto, A. *et al.* Structure of the NCoA-1/SRC-1 PAS-B Domain Bound to the LXXLL Motif of the STAT6 Transactivation Domain. *J. Mol. Biol.* **336**, 319–329 (2004).
207. Litterst, C. M. & Pfitzner, E. An LXXLL Motif in the Transactivation Domain of STAT6 Mediates Recruitment of NCoA-1/SRC-1. *J. Biol. Chem.* **277**, 36052–36060 (2002).
208. Seitz, M., Maillard, L. T., Obrecht, D. & Robinson, J. A. Molecular Characterization of the NCoA-1-STAT 6 Interaction. *ChemBioChem* **9**, 1318–1322 (2008).
209. Nikolovska-Coleska, Z. *et al.* Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization. *Anal. Biochem.* **332**, 261–273 (2004).

Résumé

Le travail décrit dans ce manuscrit est consacré à la synthèse et à la caractérisation structurale d'une nouvelle famille de γ -amino acides hétérocycliques contraints, les ATCs (acides 4-Amino-(méthyl)-1,3-Thiazole-5-Carboxyliques). Ces monomères sont construits autour d'un noyau thiazole inséré entre les carbones C α -C β permettant de limiter la valeur de l'angle dièdre ζ à 0°. La présence de deux points de substitution, sur le carbone γ asymétrique et en position 2 du noyau aromatique, autorise une large diversification structurale des ATCs. Des séries d'oligomères, i.e. dimères, tétramères et hexamères solubles dans les solvants organiques halogénés, dans les alcools et dans l'eau ont été synthétisées par couplages peptidiques. La conformation adoptée par ces séquences a été déterminée en solution par RMN 1D et 2D associées à des techniques de modélisation sous contraintes RMN. Nous avons montré que les oligomères d'ATCs s'arrangeaient en hélices 3₁, droites, présentant un pas de 11,8 Å. La conformation hélicoïdale est stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène de type CO(*i*)...NH(*i*+2) s'établissant tout au long de la séquence, faisant entrer les oligomères d'ATCs dans le monde des foldamères. Des mesures de dichroïsme circulaire ont permis d'apprécier la stabilité conformationnelle des édifices et l'analyse à l'état solide par diffraction des rayons X a confirmé l'arrangement observé par RMN. Dans une seconde partie nous avons étudié le rôle structurant d'un motif ATC placé au sein d'une petite séquence peptidique. Nous montrons au travers d'expériences RMN et de calculs théoriques que la configuration du monomère d'ATC conditionne la conformation de peptides hybrides $\alpha\gamma\alpha\alpha$ en solution. En termes d'application nous décrivons l'utilisation du motif ATC comme mime de coude pour concevoir un analogue fonctionnel de la gramicidine S, un cyclodécapeptide symétrique antibactérien. La dernière partie de ce travail concerne nos efforts pour développer, à partir des connaissances acquises quant à la structure tridimensionnelle des oligomères d'ATCs, des inhibiteurs de l'interaction protéine-protéine STAT6-NCoA-1.

SYNTHESES AND STRUCTURAL ANALYSES OF ATCS OLIGOMERS - A NEW FAMILY OF HETEROCYCLIC γ -AMINOACIDS FOR FOLDAMERS CONCEPTION

Summary

The work described herein is devoted to the synthesis and the structural characterization of a new family of heterocyclic constrained γ -amino acids, named ATCs (4-Amino-(methyl)-1,3-Thiazole-5-Carboxylic acids). These building-blocks are built around a thiazole ring inserted between the C α -C β carbons allowing the limitation of the ζ dihedral angle value to 0°. The presence of two diversification points both on the γ asymmetric carbon and on the position 2 of the aromatic ring, allows a large structural diversification of the ATCs. Series of oligomers consisting in dimers, tetramers and hexamers soluble in halogenated solvents, alcohols and water have been synthesized according to peptide chemistry. The conformations of the sequences have been studied by various NMR experiments associated to modelling studies led under NMR constraints. The ATC oligomers adopt a right 3₁ helical shape, owning a pitch of 11.8 Å which has been confirmed by crystallography. The helix is stabilized by a conserved hydrogen bond pattern between CO(*i*)...NH(*i*+2) occurring all along the sequence axis. Circular dichroism measures have been done to check the conformational stability of the architectures. In the second part of the manuscript, we demonstrate by NMR and theoretical computing that when included in a short peptide sequence, ATCs could act as turns. The derived application consists in optimizing the biological behaviour of the ATC moiety as a turn mimetic thanks to the design and the antibacterial evaluation of a gramicidin S analogue. Based on our knowledge about the three-dimensional structure of ATC oligomers, the last part of this work deals with our efforts to develop inhibitors of protein-protein interaction STAT6-NCoA-1.

Keywords:

Constrained γ -amino acids, foldamers, peptidomimetics, turns mimetics, helical structures, hydrogen bonds