



**HAL**  
open science

# Synthèse d'oligomères de mimes contraints de dipeptides pour la vectorisation intracellulaire de molécules bioactives

Vincent Martin

## ► To cite this version:

Vincent Martin. Synthèse d'oligomères de mimes contraints de dipeptides pour la vectorisation intracellulaire de molécules bioactives. Chimie organique. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2014. Français. NNT : 2014MON20168 . tel-01811034

**HAL Id: tel-01811034**

**<https://theses.hal.science/tel-01811034>**

Submitted on 8 Jun 2018

**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 **Université Montpellier II**

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences chimiques  
Balard  
Et de l'unité de recherche Institut des biomolécules Max  
Mousseron, UMR 5247

Spécialité : **Ingénierie Moléculaire**

Présentée par **Vincent Martin**

**Synthèse d'oligomères de mimes contraints  
de dipeptides pour la vectorisation  
intracellulaire de molécules bioactives.**

Soutenue le 19 décembre 2014 devant le jury composé de

Mme Nadia PATINO, Professeur, Université Nice Sophia Antipolis	Rapporteur
M. Steven BALLEET, Professeur, Vrije Universiteit Brussel	Rapporteur
M. Jean MARTINEZ, Professeur, Université Montpellier I	Examineur
Mme Rébecca DEPRez-POULAIN Professeur, Université Lille 2	Examineur
Mme Muriel AMBLARD, Directeur de recherche CNRS, Université Montpellier I	Directeur de thèse



## Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont le fruit de trois années de travaux menés au sein de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron, dans l'équipe « *Chimie des Acides Aminés, Peptides, Hétérocycles et Chimie Supportée* » dirigée par le Professeur Jean Martinez.

Avant toute chose, je tiens à adresser mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Jean Martinez qui m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire et m'a permis de mener ces recherches.

Je remercie le Professeur Nadia Patino et le Professeur Steven Ballet pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Je désire aussi exprimer ma gratitude au Professeur Jean Martinez et au Professeur Rébecca Deprez-Poulain qui ont accepté de participer à mon jury.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans le soutien, les conseils et les encouragements de mon directeur de thèse, le Directeur de Recherche Muriel Amblard. Je tiens à la remercier pour m'avoir encadré durant mon stage de fin d'études et m'avoir proposé ce sujet de thèse sur une thématique qui me tenait particulièrement à cœur.

Deux personnes ont été particulièrement présentes durant ces années de travail, le Docteur Lubomir Vezekov qui m'a encadré lors de mon arrivée et m'a formé à la synthèse peptidique et le Docteur Baptiste Legrand qui a réalisé toutes les analyses structurales et qui a été un acteur important dans les récompenses obtenues durant ma thèse. Sans leur aide, cette thèse n'aurait pas été la même.

Je souhaite remercier chaleureusement l'équipe du Docteur Marcel Garcia, et particulièrement le Docteur Marie Maynadier et le Docteur Virginie Bellet qui ont mené toutes les études biologiques. Je me souviendrai avec plaisir des repas partagés et de l'ambiance.

Je remercie le Professeur Jean-Louis Bantignies et David Maurin pour l'aide qu'ils m'ont apportée lors des études infrarouge.

Un grand merci à tous ceux qui ont pu m'aider de près ou de loin durant ces trois années, Monique Calmès, Christine Enjalbal, Jean-Alain Fehrentz, Gilles Subra, Pascal Verdié, Luc Brunel, Pierre Sanchez, et bien d'autres encore...

Ces trois années ne se sont pas résumées à de la recherche, il y a aussi eu les soirées jeux, les séances d'escalade et les sorties avec le laboratoire qui ont rendu ces trois années si agréables et je vous en remercie.

Mes amis, qu'ils soient vieux de quinze ans ou plus récents, d'ici ou d'ailleurs, trop nombreux pour que je vous cite tous. Je pense aux soirées JDR, jamais assez nombreuses, les brunchs, les voyages à Toulouse, Lyon ou Gap, merci à vous tous.

Un immense merci à ma famille et une pensée particulière pour ma mère, à qui ce manuscrit est dédié. A mon père qui a toujours été présent et au reste de ma famille, mes sœurs et ma tante. Je n'oublie pas mon parrain et ma marraine ainsi que ma seconde famille, qui a rendu les dimanches soirs tellement moins moroses.

Enfin, un merci tout particulier à Elise, qui a marché à mes côtés durant ces longues années de thèse pour finir avec une belle longueur d'avance. Merci à toi pour ton soutien et pour m'avoir aidé à devenir quelqu'un de meilleur.

## Abréviations

2-BrZ : 2-Bromo benzyloxycarbonyl

Ac : Acétyle

ACBC : Acide *trans*-aminocyclobutane carboxylique

ACHC : Acide 2-aminocyclohexane carboxylique

ACN : Acétonitrile

ACPC : Acide 2-aminocyclopentane carboxylique

ADN : Acide désoxyribonucléique

Agl :  $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactame

Aib : Acide 2-aminoisobutyrique

AMPA : Acide 2-aminométhyl-phényl-acétique

APC : Acide 3-aminopyrrolidine-4-carboxylique

aPy : Acide 4-aminopyroglutamique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ARNr : Acide ribonucléique ribosomale

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ATC : Acide 4-amino-(methyl)-1,3-thiazole-5-carboxylique

Bn : Benzyl

Boc : *tert*-butoxycarbone

BOP : Benzotriazoloxyl-tris-(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate

Cath D : Cathepsine D

CCM : Chromatographie sur couche mince

CD : Dichroïsme circulaire

COSY : Correlation spectroscopy

COSY-DFQ : Correlation spectroscopy-double quantum filtered

CPP : Cell-penetrating peptide

$\Delta\delta$  : Variation de déplacement chimique

DBT : (3S)-Amino-5-carbonylméthyl-2,3-dihydro-1,5-benzothiazépine-4(5H)-one

DBU : 1,8-Diazabicycloundec-7-ène

DCC : Dicyclocarbodiimide

DCM : Dichlorométhane

DIEA : Diisopropyléthylamine

DMF : Diméthylformamide

Eq : Equivalents

Et<sub>2</sub>O : Diéthyléther

FAA : Furanoïde- $\beta$ -aminoacide

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

Fmoc : 9-Fluorenylmethoxycarbonyle

GAG : Glycosaminoglycane

HBTU : Hexafluorophosphate de O-(1H-Benzotriazol-1-yne)-1,1,3,3-tétraméthyluronium

HMPT : Hexaméthyl phosphorotriamide

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

HS : Héparane sulfate

IRTF : Spectroscopie infra-rouge à transformation de Fourier

Ival : Isovaléryl

LiOH : Hydroxide de lithium

M6P : Mannose 6-phosphate

MCD : Mimes contraint de dipeptides

NMM : N-méthylmorpholine

NMP : N-méthyl-2- pyrrolidone

NOE : Nuclear overhauser effect

NOESY : Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy

Nspe : (S)-N-(1-phenylethyl)glycine

PC : Phosphatidylcholine

proCath D : Procathepsine D

PE : Phosphatidyléthanolamine

PG : Protéoglycans

PPI : Interaction protéine-protéine

PPII : Polyproline de type II

PS : Phosphatidylsérine

RE : Réticulum endoplasmique

REM : Receptor mediated endocytosis

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROESY : Rotating frameOverhauser enhancement spectroscopy

RX : Cristallographie aux rayons X

SAP : Sweet arrow peptide

SAP(E) : Sweet arrow peptide glutamic acid

SM : Sphingomyéline

SPPS : Synthèse peptidiques sur phase solide

Sta : Statine

TEA : Triéthylamine

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

TOCSY : Total correlation spectroscopy

Remerciements

Abréviations

Sommaire

Introduction générale

## CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.	Les peptides et les protéines .....	17
I.1.	Qu'est-ce qu'une protéine? .....	18
I.2.	Les rôles des protéines .....	20
I.3.	Structure des protéines .....	21
II.	Les structures secondaires des protéines .....	23
II.1.	Les hélices .....	26
II.1.1.	Les hélices $\alpha$ .....	29
II.1.2.	Les hélices $3_{10}$ .....	29
II.1.3.	Les hélices $\pi$ .....	31
II.1.4.	Les hélices polyproline de types II (ou PPII).....	31
II.2.	Les feuillets $\beta$ .....	32
II.2.1.	Les feuillets $\beta$ parallèles .....	32
II.2.2.	Les feuillets $\beta$ antiparallèles .....	33
II.3.	Les coudes.....	35
II.3.1.	Le coude $\gamma$ .....	35
II.3.2.	Le coude $\beta$ .....	36
II.3.3.	Les coudes $\alpha$ .....	38
II.3.4.	Les coudes $\pi$ .....	39
II.4.	Stratégie thérapeutique : de l'importance d'imiter les structures secondaires .....	40
III.	Les foldamères.....	42
III.1.	Généralités.....	42
III.2.	Les foldamères peptidomimétiques .....	42
III.2.1.	Les peptides homologués .....	44
III.2.2.	Les $\beta$ -peptides .....	46
III.2.3.	Les $\gamma$ -peptides.....	51
III.2.4.	Les $\delta$ -peptides.....	55

III.3.	Les peptoïdes et les oligomères de motifs contraints .....	58
III.3.1.	Les peptoïdes ou polyglycines N-substituées .....	58
III.3.2.	Les oligomères de motifs contraints .....	59
III.4.	Propriétés des foldamères.....	61
III.4.1.	Les foldamères antimicrobiens.....	61
III.4.2.	Foldamères inhibiteurs d'interactions protéines/protéines .....	62
III.5.	Conclusion .....	64
IV.	Traverser la membrane cellulaire : la vectorisation.....	65
V.	Les peptides pénétrants .....	69
V.1.	Travaux pionniers.....	69
V.2.	Les CPP cationiques .....	71
V.3.	Les CPP amphipatiques.....	73
V.3.1.	Les CPP amphipatiques primaires .....	73
V.3.2.	Les CPP amphipatiques secondaires.....	74
V.3.3.	Les CPP hydrophobes .....	76
V.4.	Conclusion .....	77
VI.	Les foldamères pénétrants .....	78
VI.1.	Les peptidomimétiques : une famille de vecteurs variée.....	78
VI.2.	Les foldamères : des vecteurs prometteurs.....	79
VI.3.	Conclusion .....	81
VII.	Les mécanismes d'internalisation des CPP .....	82
VII.1.	Internalisation directe .....	82
VII.2.	L'endocytose .....	82
VII.3.	Conclusion .....	84
VIII.	La cathepsine D .....	86
VIII.1.	La Cathepsine D : expression et maturation.....	86
VIII.2.	Mécanisme enzymatique et structure de la cathepsine D .....	89
VIII.3.	Rôle physiologique de la cathepsine D.....	90
VIII.4.	Rôles de la cathepsine D dans les pathologies .....	92
IX.	Le ciblage de la cathepsine D comme stratégie anticancéreuse.....	93
IX.1.	Les inhibiteurs de la cathepsine D.....	93
IX.2.	Les molécules synthétiques .....	93
IX.3.	Les analogues de substrats synthétiques.....	94
IX.4.	Les inhibiteurs naturels .....	94
IX.5.	Un inhibiteur efficace de la cathepsine D : la pepstatine A .....	95

## CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET ANALYSES STRUCTURALES

X.	La synthèse peptidique.....	117
X.1.	Principe général de la synthèse peptidique .....	117
X.2.	Stratégie de synthèse.....	117
X.3.	Réaction secondaire - Epimérisation .....	118
X.4.	Les protections.....	119
X.5.	Les agents de couplage .....	121
X.6.	Le milieu de synthèse.....	122
X.6.1.	La synthèse en solution.....	122
X.6.2.	La synthèse en phase solide .....	123
XI.	Les techniques d'analyses spectroscopiques .....	126
XI.1.	La diffraction des rayons X (RX).....	126
XI.2.	La résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	127
XI.3.	Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (IR-TF) .....	128
XI.4.	Le dichroïsme circulaire (CD).....	129
XII.	Oligomères de mimes contraints de dipeptides : Synthèse et Etudes structurales.....	131
XII.1.	Oligomères de (3S)-amino-5-carbonylméthyl-2,3-dihydro-1,5-benzothiazépine-4(5H)-one] (DBT) .....	133
XII.1.1.	Introduction.....	133
XII.1.2.	Synthèse du monomère DBT et son oligomérisation .....	134
XII.1.3.	Etudes structurales des polyDBT .....	136
XII.1.4.	Analyses par diffraction des rayons X.....	138
XII.1.5.	Analyses en solution par RMN.....	140
XII.1.6.	Etudes de dichroïsme circulaire .....	146
XII.1.7.	Conclusion.....	147
XII.2.	Synthèse d'oligomères d' $\alpha$ -amino $\gamma$ -lactame .....	149
XII.2.1.	Stratégie de synthèse d'oligomères de poly-Agl .....	150
XII.2.2.	Développement d'une nouvelle stratégie de synthèse de poly-Agl.....	151
XII.2.3.	Contrôle de l'épimérisation .....	155
XII.3.	Analyses structurales d'oligomères d'Agl-AA aromatiques .....	158
XII.3.1.	Analyses par spectromètre infrarouge à transformée de Fourier .....	159
XII.3.2.	La diffraction des rayons X .....	163
XII.3.3.	Analyses RMN.....	165
XII.3.4.	Etudes par dichroïsme circulaire.....	168
XII.4.	Etudes structurales d'oligomères d'Agl-AA hydrosolubles .....	169
XII.4.1.	Analyses de dichroïsme circulaire des oligomères hydrosolubles .....	170

XII.4.2. Conclusion.....	173
XII.5. Conclusion générale des études structurales .....	175
CHAPITRE III : ETUDES BIOLOGIQUES	
XIII. Les poly $\alpha$ -amino $\gamma$ -lactames comme oligomères pénétrants .....	182
XIII.1. Généralités.....	182
XIII.2. Synthèse d'oligomères fluorescents .....	182
XIII.3. Imagerie confocale et co-localisation.....	189
XIII.4. Nouveaux oligomères pour la vectorisation .....	190
XIII.5. Conclusion .....	193
XIV. L'inhibition de la cathepsine D pour la thérapie anticancéreuse.....	195
XIV.1. Synthèse d'un nouveau bio-conjugué.....	198
XIV.2. Etudes d'inhibition et de cytotoxicité .....	200
XV. Etude de l'effet de l'inhibition de la cathepsine D <i>in vivo</i> .....	203
XV.1. Synthèse de la pepstatine A vectorisée par l'AMPA <sub>4</sub> .....	203
XV.1.1. Transfert N-O acylique.....	203
XV.1.2. Estérification de la statine .....	204
XV.2. Etudes <i>in vivo</i> .....	204
XV.2.1. Evolution du volume tumoral.....	205
XV.2.2. Evaluation de l'impact du traitement sur les souris.....	206
XV.3. Conclusion .....	207

Conclusion Générale

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériels et méthodes

Le développement d'un traitement pour une pathologie implique de nombreuses étapes. Un certain nombre de verrous doivent être levés durant la phase de recherche avant de pouvoir atteindre une phase préclinique. Il est nécessaire de comprendre les mécanismes biologiques et de définir les acteurs dont les fonctions sont altérées avant de synthétiser un principe actif capable de les cibler. De plus, des composés très efficaces *in vitro* peuvent se révéler inactifs *in cellulo* ou *in vivo*. En effet, quel que soit l'efficacité d'un composé *in vitro*, son effet thérapeutique est directement lié à sa biodisponibilité. La molécule active doit être stable *in vivo* et atteindre sa cible, ce qui est d'autant plus complexe quand son site d'action est intracellulaire. Dans ce cas, elle devra être capable de traverser des barrières difficilement franchissables comme la membrane plasmique ou la barrière hématoencéphalique dont le passage est conditionné par la taille et les propriétés physicochimiques des molécules. Depuis plusieurs décennies, de nombreuses recherches visent à développer des technologies permettant la délivrance de principes actifs (appelés cargos) qui ne traversent pas ou difficilement les barrières de l'organisme.

Différents types de vecteurs ont été développés dont les liposomes, les nanoparticules, les polymères, les virus et les peptides pénétrants (CPP). Les CPP ont été découverts à la fin des années 80 de l'observation que certaines protéines étaient capables de passer à travers les membranes cellulaires. Depuis, de nombreuses études ont permis la découverte d'un grand nombre de CPP et apporté des informations sur les mécanismes d'internalisation (endocytose et translocation pour les deux principaux). On peut noter l'importance de la présence de charges positives et de leur répartition spatiale dans des études relations structure-activité. Les CPP constituent des systèmes de délivrance de composés actifs particulièrement attractifs et de nombreux CPP synthétiques ont été développés. Néanmoins, bien que les CPP soient des vecteurs prometteurs, ils sont sensibles aux protéases et les séquences doivent être relativement longues pour qu'ils adoptent des conformations stables.

Pour dépasser ces limitations, des CPP incorporant des acides aminés non protéinogéniques (aminoacides de configuration D par exemple) ou basés sur des séquences peptidomimétiques sont développés. Dans ce contexte, la technologie foldamère est particulièrement adaptée grâce à la capacité de ces molécules à adopter des structures stables, bien définies et prédictibles pour des séquences très courtes. La grande majorité des foldamères incorporent différents motifs, principalement dérivés d'acides aminés comme les acides  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$ -aminés et adoptent des structures hélicoïdales ou en feuillet mimant les structures secondaires des protéines. Des motifs contraints tels que les coudes  $\beta$  peuvent aussi être utilisés pour la construction rationnelle de systèmes moléculaires organisés. La

particularité de ces systèmes repose sur le fait que chaque motif monomérique conserve sa conformation intrinsèque dans l'oligomère. Ainsi, leur structure est orchestrée par une répétition itérative de coudes conduisant à des oligomères en ruban de type  $\beta$ . Ces rubans permettent de positionner de manière prédictive et organisée diverses fonctions de part et d'autres de leur axe.

Ma thèse se situe à l'interface de la chimie, de l'analyse structurale et de la biologie. Durant ces trois années, je me suis intéressé à la synthèse de nouveaux oligomères de mimes contraints de dipeptides, à leur étude structurale ainsi qu'à leurs propriétés biologiques et plus particulièrement à leur capacité à traverser les membranes cellulaires afin d'y délivrer des principes actifs.

Mon travail s'est concentré sur trois types de foldamères à différents stades de leur étude et de leur développement.

Des études antérieures à ma thèse ont montré que des oligomères de (3S)-amino-5-carboxylméthyl-2,3-dihydro-1,5-benzothiazépine-4(5H)-one (**DBT**) sont capables de pénétrer efficacement à l'intérieur des cellules. Durant ma thèse, l'étude structurale de ces oligomères a été réalisée. Elle a montré qu'ils sont capables d'adopter des structures stables et définies en ruban, correspondant à des enchaînements périodiques de coudes  $\beta$ .

En se basant sur ces structures, nous avons sélectionné un nouveau mime de coude, des dérivés d' $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames, permettant d'accéder à des systèmes beaucoup plus versatiles. Leurs caractéristiques structurales intrinsèques (coude  $\beta$  comme les DBT) et la versatilité apportée par les aminoacides qui les constituent, nous ont parues deux propriétés particulièrement attractives pour la construction de nouveaux foldamères. Une stratégie de synthèse originale a été développée à cet effet. Elle consiste en la conversion directe de séquences peptidiques alternant des résidus méthionine avec n'importe quel autre aminoacide en oligomères d' $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames (oligomères **Agl-AA**). Dans cette nouvelle série d'oligomères, la modulation et le positionnement spatial des groupes fonctionnels sont directement contrôlés par la séquence peptidique native. Différents oligomères d'Agl-AA ont été synthétisés : des oligomères hydrophobes, cationiques et amphipatiques. La structure de tous ces édifices moléculaire a été étudiée par différentes techniques physicochimiques (RMN, RX, CD et IR). Ces oligomères ont été également testés pour leur capacité à traverser les membranes cellulaires. Cette étude nous a permis d'identifier certains composés avec une forte capacité d'internalisation.

Dans un autre volet de mon travail, je me suis attaché à l'utilisation d'oligomères d'acide amino-méthylphénylacétique (**AMPA**) et d'Agl-AA pour la délivrance d'un puissant inhibiteur de la cathepsine D, une enzyme surexprimée et sécrétée par de nombreuses tumeurs solides. Les résultats très prometteurs de l'étude *in vivo* d'un des conjugués seront présentés dans la dernière partie de ma thèse.



Mes travaux de thèse pluridisciplinaires se sont articulés autour de plusieurs domaines de recherche. Ils ont porté sur la synthèse et l'étude structurale d'oligomères capables d'adopter des structures secondaires compactes et bien définies à l'instar des protéines, les **foldamères**. Ces travaux ont également porté sur l'étude biologique de ces oligomères notamment leur capacité à traverser la membrane cellulaire (**vecteurs de pénétration intracellulaire**) afin de délivrer dans les cellules cancéreuses un inhibiteur de la **Cathepsine D**, une aspartyl protéase surexprimée dans de nombreuses tumeurs solides. Ces différents domaines de recherche sont vastes, c'est la raison pour laquelle je ne présenterai seulement qu'une partie des éléments bibliographiques les concernant.

## I. Les peptides et les protéines

Les processus biologiques reposent sur 4 familles de macromolécules, les acides nucléiques, les oligosaccharides, les lipides et les protéines. Chacune d'entre elles jouent un rôle dans la machinerie cellulaire :

- Les acides nucléiques participent au stockage et au traitement de l'information génétique. Les acides désoxyribonucléiques (ADN) la stockent, les acides ribonucléiques messagers (ARNm) la transcrivent et les acides ribonucléiques de transfert (ARNt) et ribosomiaux (ARNr) la traduisent en protéines. Ils forment le transcriptome.
- Les saccharides (ou sucres) constituent une réserve énergétique pour la cellule et sont impliqués dans des rôles structuraux et métaboliques. Ces saccharides, lorsqu'ils sont conjugués à des protéines (protéoglycanes, glycoprotéines) ou des lipides (glycolipides), interviennent dans les processus de reconnaissance et de communication cellulaire.
- Il existe deux types de lipides. Les lipides dits « de réserve » qui sont une autre réserve d'énergie et les lipides dits « de structure » qui forment la bicouche lipidique. Cette dernière s'associe au cholestérol pour former les membranes biologiques délimitant les cellules ou les organites cellulaires. D'autres types de lipides ont des rôles plus fonctionnels qui ne seront pas détaillés ici.
- Les protéines sont le produit de l'expression des gènes, et sont impliquées dans la majorité des processus biologiques.

## I.1. Qu'est-ce qu'une protéine?

Une protéine est un polymère linéaire constitué d'acides  $\alpha$ -aminés. Il existe 20 acides aminés protéogéniques pour l'ensemble des organismes eucaryotes qui diffèrent par la nature de leur chaîne latérale R portée par le carbone ( $C\alpha$ ) en position  $\alpha$  de la fonction acide carboxylique. Ce carbone est asymétrique et tous les acides aminés naturels sont de configuration L. Ils sont représentés dans la figure 1 où ils sont regroupés selon la nature de leur chaîne latérale : hydrophobe (rouge), polaire non chargée (bleu), cationique (vert) et anionique (rose).

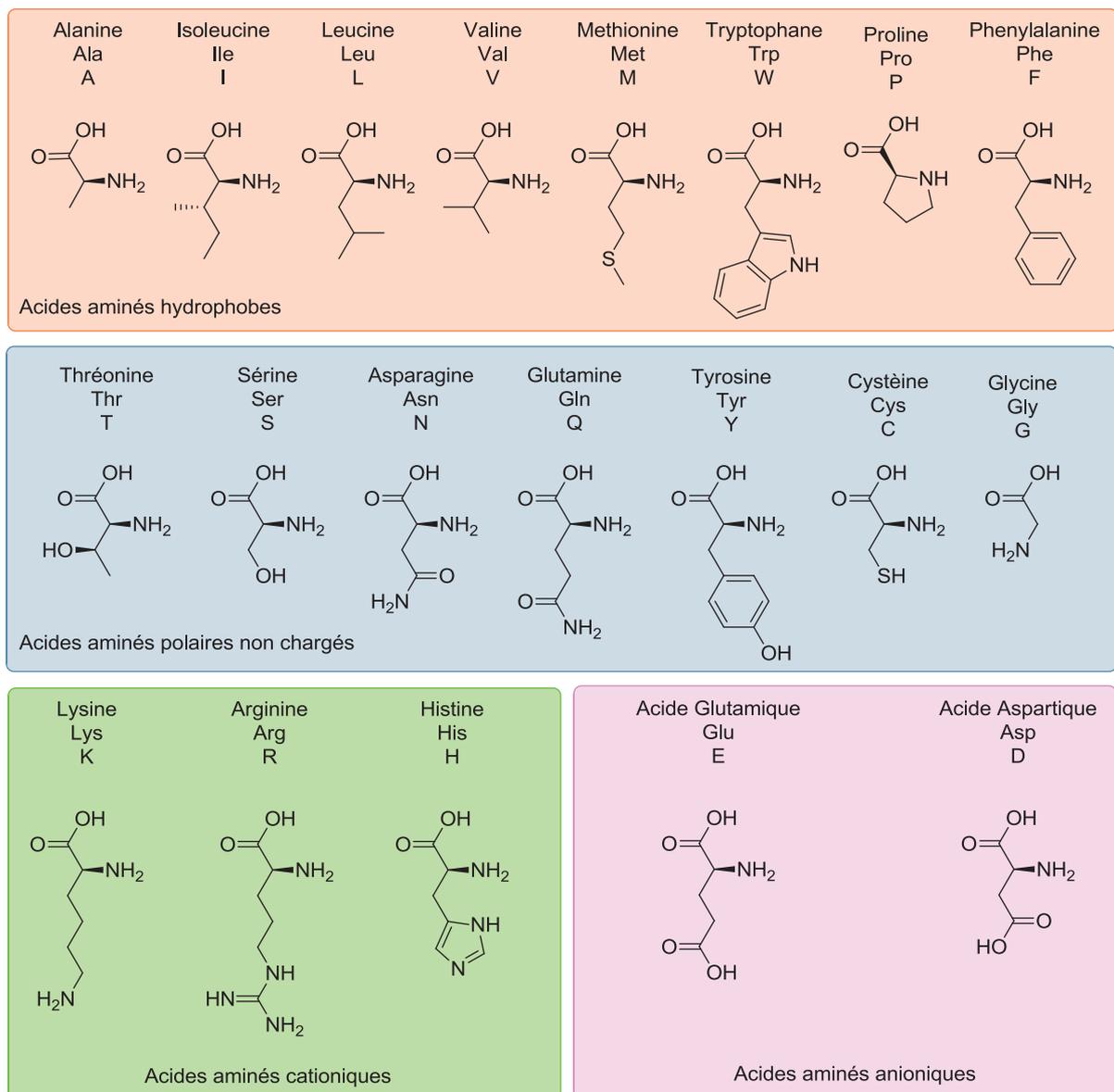


Figure 1 : Les acides aminés classés en fonction de leur polarité.

Les acides aminés sont liés entre eux par des liaisons amides ou liaisons peptidiques sous formes d'oligomères de tailles variables. Dans la littérature, on parle de peptides pour

des oligomères de moins de 15 résidus, de polypeptides pour ceux incorporant entre 15 et 50 résidus et de protéines pour ceux qui sont constitués d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques de masse supérieure à  $2000 \text{ g.mol}^{-1}$

Les différentes chaînes latérales des acides aminés permettent la formation d'un grand nombre de protéines différentes. Les nombreuses fonctions des protéines dépendent directement de cette variabilité.

## I.2. Les rôles des protéines

Les séquences des protéines sont très variées et leurs confèrent de nombreuses fonctions biologiques<sup>1</sup>. Celles-ci sont présentées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 1 : Exemples de fonctions des protéines dans les organismes.**

Protéines	Fonction
Structurales	Ces protéines sont impliquées dans l'architecture des organismes. Elles sont responsables de l'élasticité (élastine) ou la résistance (collagène) des tissus.
Enzymatiques	Les protéines enzymatiques sont parmi les plus nombreuses et les plus spécialisées. Elles agissent comme catalyseur dans la majorité des réactions biologiques.
Régulatrices	Ce sont les protéines qui contrôlent l'activité physiologique d'autres protéines. La cycline régule, par exemple, la division cellulaire.
De Transport	Elles permettent le transport des composés spécifiques d'une partie de l'organisme à une autre. Par exemple, la myoglobine transporte l'oxygène dans le muscle, tandis que les protéines canaux situées dans les membranes cellulaires assurent le transport de molécules chimiques d'un côté à l'autre de la membrane.
De Stockage	Elles interviennent dans le « stockage » de substances indispensables à l'organisme. Par exemple, la ferritine agit comme un « réservoir » de fer pour l'organisme.
D'identification	Les membranes cellulaires comportent des glycoprotéines qui permettent au système immunitaire de reconnaître ses propres cellules.
Protectrices	Ces protéines protègent l'organisme. Une certaine partie forme le système immunitaire qui défend l'organisme contre des molécules étrangères (virus, bactéries). D'autres, comme les agents de coagulation sanguine (thrombine et fibrinogène), empêchent la perte de sang lorsqu'un vaisseau est endommagé.

Pour chaque protéine, sa fonction est intimement liée à sa structure tridimensionnelle.

### I.3. Structure des protéines

La structure d'une protéine dépend de sa composition en acides aminés et peut être définie selon les quatre degrés suivants.

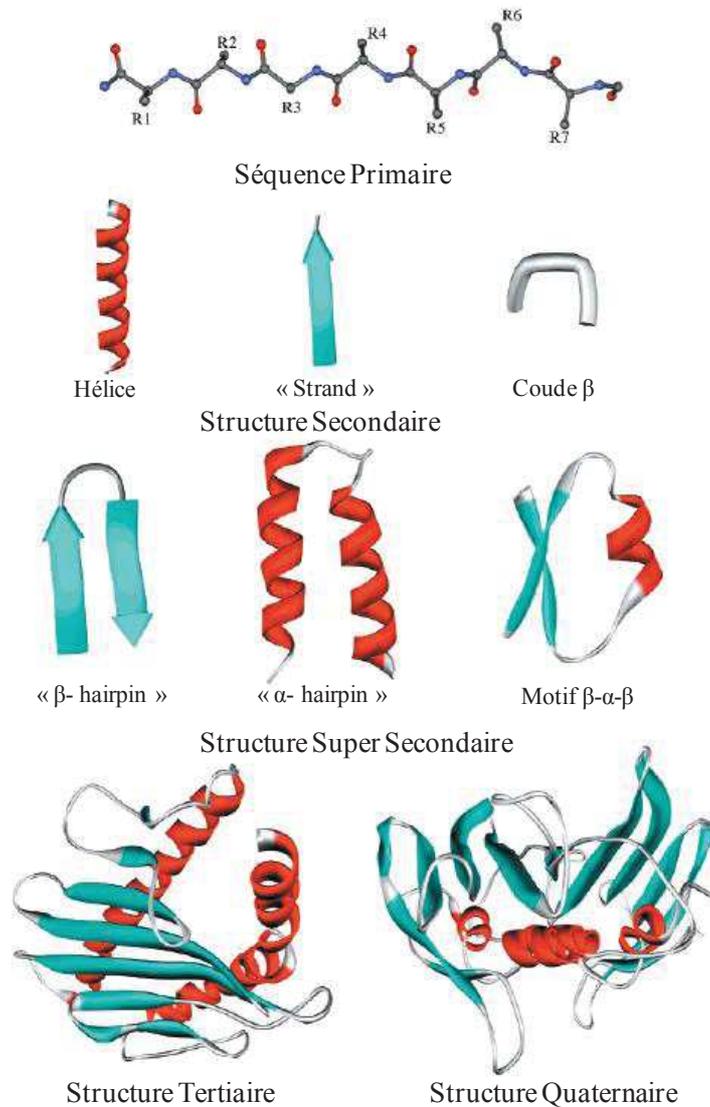


Figure 2 : Représentation des quatre ordres de structuration des protéines<sup>2</sup>.

La structure primaire ou séquence, est l'enchaînement linéaire des acides aminés. Elle est écrite de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. La structure secondaire décrit l'arrangement local de la chaîne peptidique dans des configurations particulières et énergétiquement favorables. Ces structures sont de trois types : les hélices (en rouge), les brins (en bleu) et les coudes (en gris). Elles seront davantage décrites dans la suite de ce chapitre (paragraphe II). Des arrangements particuliers de ces structures sont régulièrement présents dans les protéines tels que l'épingle à cheveux  $\beta$  ( $\beta$ -hairpin), l'épingle à cheveux  $\alpha/\alpha$  ( $\alpha/\alpha$  hairpin) ou le motif  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  : elles sont nommées structures super secondaires. La

structure tertiaire correspond au repliement global de la chaîne peptidique, une hélice suivie d'un feuillet antiparallèle à 6 brins puis de deux hélices dans la Figure 2, par exemple. La structure quaternaire, enfin, représente l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques entre elles.

Ces structures sont stabilisées par plusieurs forces d'interaction. Celles-ci peuvent être des liaisons covalentes comme les ponts disulfures qui interviennent dans les structures tertiaires et quaternaires ou des liaisons non-covalentes comme les liaisons hydrogène, impliquées dans les structures secondaires, tertiaires et quaternaires, les interactions électrostatiques, de Van der Waals, les interactions avec le solvant ou avec l'environnement qui stabilisent les structures tertiaires et quaternaires.

Si toutes ces structures dépendent les unes des autres, les structures secondaires restent l'ordre de structuration le plus important dans la description d'une protéine. En effet, même si ces dernières dépendent de la structure primaire, l'enchaînement des structures secondaires représente le premier élément structurant d'une protéine et est utilisé pour décrire ses structures tertiaire et quaternaire. Les différentes structures secondaires seront décrites dans le paragraphe suivant.

## II. Les structures secondaires des protéines

Les structures secondaires représentent non seulement le premier élément structurant du squelette protéique mais sont aussi impliquées dans divers processus biologiques tels que les réactions enzymatiques, les interactions protéine-protéine ou la reconnaissance cellulaire<sup>3</sup>. Les longueurs et les valeurs d'angles des liaisons peptidiques sont données dans la figure 3 (renvoi) ci-dessous.

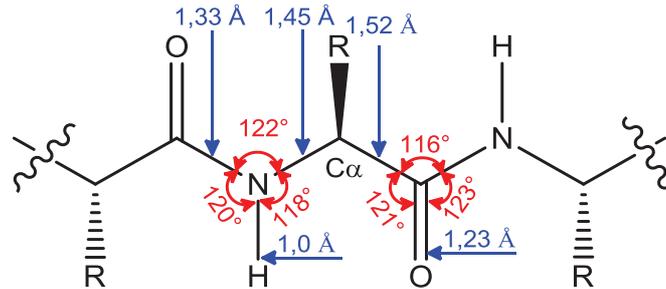


Figure 3 : Longueurs (en bleu) et valeurs d'angles des liaisons (en rouge) d'un peptide.

Ces structures secondaires sont rendues possibles par des libertés de rotation le long de trois liaisons de la chaîne polypeptidique. Ces libertés de rotations sont décrites par des valeurs d'angles entre deux plans, appelés angles dièdres  $\Phi$ ,  $\Psi$  et  $\omega$  qui sont représentés dans la Figure 4.

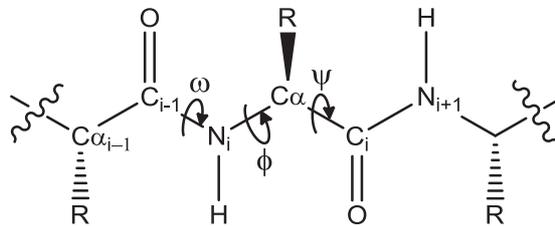


Figure 4 : Représentation des angles dièdres  $\Phi$ ,  $\Psi$  et  $\omega$ .

L'angle dièdre  $\Phi$  est calculé à partir des plans formés par les atomes C $_{i-1}$ -N $_i$ -C $\alpha$ -C $_i$  tandis que l'angle dièdre  $\Psi$  est lui calculé à partir des plans formés par les atomes N $_i$ -C $\alpha$ -C $_i$ -N $_{i+1}$ . Un dernier angle, appelé  $\omega$ , est calculé à partir des plans formés par les atomes C $\alpha_{i-1}$ -C $_i$ -N $_i$ -C $\alpha$ . Ce dernier angle n'adopte que deux valeurs : 180° (la liaison peptidique est alors *trans*) ou 0° (lorsque la liaison est *cis*). Cette dernière est beaucoup moins représentée.

Dû aux encombrements stériques, toutes les valeurs d'angles dièdres  $\Phi$  et  $\Psi$  ne sont pas énergétiquement favorables. En fonction de celles-ci, différentes structures peuvent être favorisées. L'étude des différentes valeurs d'angles adoptées dans les protéines permet la détermination d'un diagramme, le diagramme de Ramachandran, où sont représentées les

structures favorisées en fonction des valeurs d'angles  $\Phi$  (axe des abscisses :  $-180^\circ$  à  $+180^\circ$ ) et  $\Psi$  (axe des ordonnées :  $-180^\circ$  à  $+180^\circ$ ) de la chaîne peptidique<sup>4</sup>.

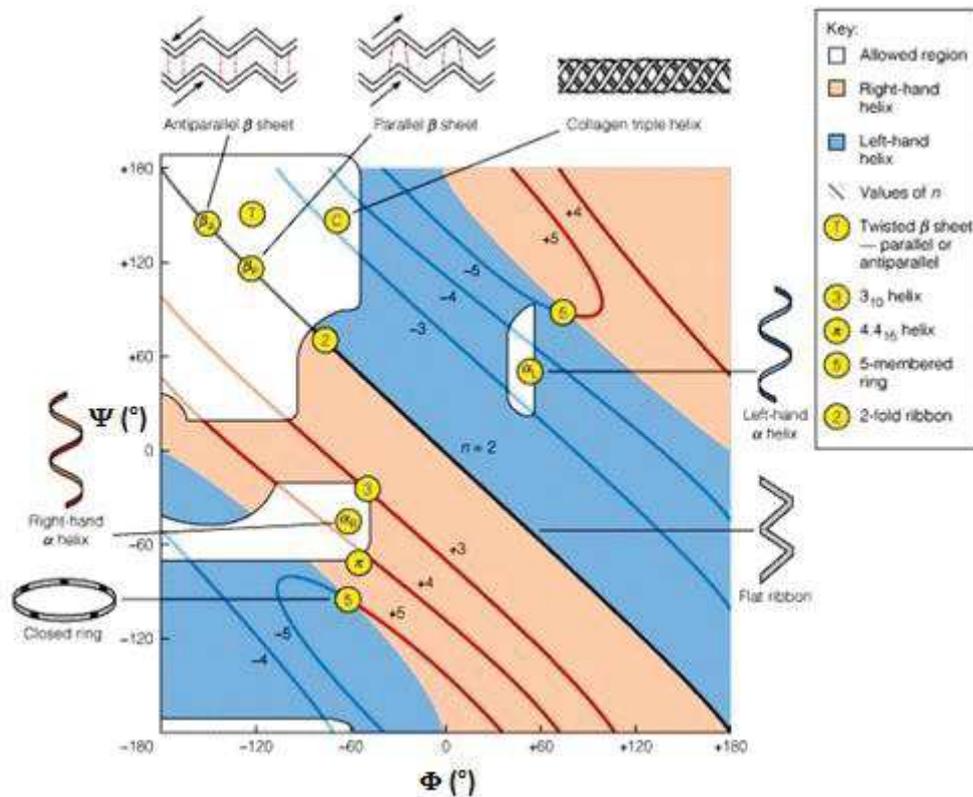


Figure 5 : Diagramme de Ramachandran<sup>5</sup>.

Les zones blanches sur le diagramme représentent les valeurs  $\Phi$  et  $\Psi$  les plus favorables énergétiquement. Les acides aminés de la chaîne peptidique possèdent généralement des valeurs d'angles se trouvant dans ces régions, mais peuvent aussi adopter des valeurs différentes de manière ponctuelle, lorsqu'elles sont stabilisées par des interactions avec d'autres résidus par exemple. Les acides aminés Gly et Pro sont des cas particuliers, la glycine n'ayant pas de chaîne latérale, ce résidu est moins contraint et peut adopter des valeurs d'angles  $\Phi$  et  $\Psi$  beaucoup plus diversifiées. Le résidu proline en revanche, est contraint par un cycle pyrrole qui réduit les valeurs d'angles  $\Phi$  et  $\Psi$  qu'il peut adopter. Les structures les plus stables ont généralement des valeurs d'angles  $\Phi$  négatives. Les valeurs d'angles  $\Psi$  favoriseront une structure en feuillet si elles sont positives (entre  $+40^\circ$  et  $+180^\circ$ ) ou en hélice si elles sont négatives (entre  $-50^\circ$  et  $-70^\circ$ ).

Les chaînes latérales des acides aminés ont une influence importante sur les angles  $\Phi$  et  $\Psi$ . Des études menées par P. Y. Chou et G. D. Fasman<sup>6</sup> sur 15 protéines contenant 2473 acides aminés ont mis en évidence la propension d'un acide aminé à se retrouver dans une structure plutôt qu'une autre. Ces préférences conformationnelles permettent de prédire,

bien que de manière incertaine, quel type de structure sera adopté en fonction des acides aminés de la séquence. La préférence conformationnelle d'un acide aminé pour une structure est calculée à partir de plusieurs protéines dont la structure est connue. La formule utilisée est donnée ci-dessous<sup>7</sup>:

$$P_{ij} = (n_{ij}/n_i) / (n_j/N).$$

où  $P_{ij}$  est la préférence conformationnelle d'un acide aminé  $i$  pour la structure secondaire  $j$ ,  $n_{ij}$  représente le nombre de résidus  $i$  présents dans la structure  $j$ ,  $n_i$  est le nombre total de résidus  $i$ ,  $n_j$  est le nombre de résidus présents dans la structure  $j$  et  $N$  le nombre de résidus total étudiés. Des valeurs  $P_{ij}$  comprises entre 0 et 2 sont ainsi obtenues. Une apparition aléatoire d'un acide aminé dans une conformation équivaut à une valeur de 1. Si un résidu possède une valeur supérieure à 1, il est considéré comme favorable à la structure, si cette valeur est inférieure à 1 il est considéré comme défavorable. D'autres équipes ont étendu cette étude à un nombre plus important de protéines. Les  $P_{ij}$  obtenues pour chaque résidu à partir de 84 protéines comportant 15270 résidus sont données dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Structure favorisée en fonction du résidu<sup>8</sup>.

Conformational Preferences of the Amino Acids			
Amino acid	Preference		
	$\alpha$ -helix	$\beta$ -strand	Reverse turn
Glu	<b>1.59</b>	0.52	1.01
Ala	<b>1.41</b>	0.72	0.82
Leu	<b>1.34</b>	1.22	0.57
Met	<b>1.30</b>	1.14	0.52
Gln	<b>1.27</b>	0.98	0.84
Lys	<b>1.23</b>	0.69	1.07
Arg	<b>1.21</b>	0.84	0.90
His	<b>1.05</b>	0.80	0.81
Val	0.90	<b>1.87</b>	0.41
Ile	1.09	<b>1.67</b>	0.47
Tyr	0.74	<b>1.45</b>	0.76
Cys	0.66	<b>1.40</b>	0.54
Trp	1.02	<b>1.35</b>	0.65
Phe	1.16	<b>1.33</b>	0.59
Thr	0.76	<b>1.17</b>	0.90
Gly	0.43	0.58	<b>1.77</b>
Asn	0.76	0.48	<b>1.34</b>
Pro	0.34	0.31	<b>1.32</b>
Ser	0.57	0.96	<b>1.22</b>
Asp	0.99	0.39	<b>1.24</b>

Le Tableau 2 résume les  $P_{ij}$  de chaque acide aminé. Ces valeurs ne sont cependant qu'approximatives, Williams et coll<sup>7</sup> indiquant une pertinence de 57% pour les trois structures. Néanmoins, ces valeurs fournissent une indication utile sur les acides aminés défavorables à une structure donnée. Ainsi, la proline et la glycine sont considérés comme particulièrement défavorables pour les structures en hélice ou en feuillet tandis que la méthionine et la phénylalanine défavorisent la formation de coude. Ces prédictions ont toutefois leurs limites, tous les acides aminés pouvant se retrouver dans toutes les structures.

Les structures secondaires induites par les valeurs d'angles dièdres  $\Phi$ ,  $\Psi$  et  $\omega$  sont particulièrement importantes et ont été très étudiées. La suite de cette partie est dédiée à ces structures.

## II.1. Les hélices

Les hélices représentent près de 35% des structures secondaires des protéines et sont la structure secondaire la plus abondante. Ces architectures sont caractérisées par plusieurs paramètres tels que le nombre de résidus par tour ( $n$ ), le pas de l'hélice ( $p$ ) qui correspond à la hauteur d'un tour complet de l'hélice et le nombre d'atomes impliqués dans le pseudo-cycle formé par les liaisons hydrogène intramoléculaires ( $C_x$ ). En fonction de son sens de rotation, une hélice est dite droite lorsqu'elle tourne dans le sens horaire (c'est le cas des hélices naturelles) et gauche dans le sens antihoraire. Il existe plusieurs types d'hélices qui sont toutes décrites par ces paramètres. La formation d'une hélice dépend de plusieurs critères :

- L'encombrement stérique des chaînes latérales des acides aminés.
- Les interactions électrostatiques entre les charges des chaînes latérales fonctionnalisées.
- Les interactions entre les chaînes latérales des acides aminés éloignés (entre les résidus  $i$  et  $i+3$  ou les résidus  $i$  et  $i+4$ )
- La présence de résidus proline.
- Le moment dipolaire électrostatique de l'hélice.

Les différents types d'hélices naturelles sont les hélices  $\alpha$ , les hélices  $3_{10}$ , les hélices  $\pi$  et les hélices polyproline de type II. Leurs paramètres ainsi que les valeurs moyennes des angles dièdres des résidus qui les composent sont répertoriés dans le Tableau 3 :

Tableau 3 : Paramètres des diverses hélices rencontrées dans les protéines.

Structure	$\phi$ (°)	$\psi$ (°)	$\omega$ (°)	n	p (Å)	C <sub>x</sub> (atomes)	Liaison H NH...O
Hélice- $\alpha$	-57	-47	180	3,6	5,4	13	i+4 $\rightarrow$ i
Hélice-3 <sub>10</sub>	-49	-26	180	3,0	6,0	10	i+3 $\rightarrow$ i
Hélice- $\pi$	-57	-70	180	4,4	5,0	16	i+5 $\rightarrow$ i
Hélice polyPro II	-78	149	180	-3	9,3	-	-

Chacune de ces hélices a été observée dans les protéines où elle adopte une conformation qui lui est propre. Elles sont représentées dans la Figure 6.

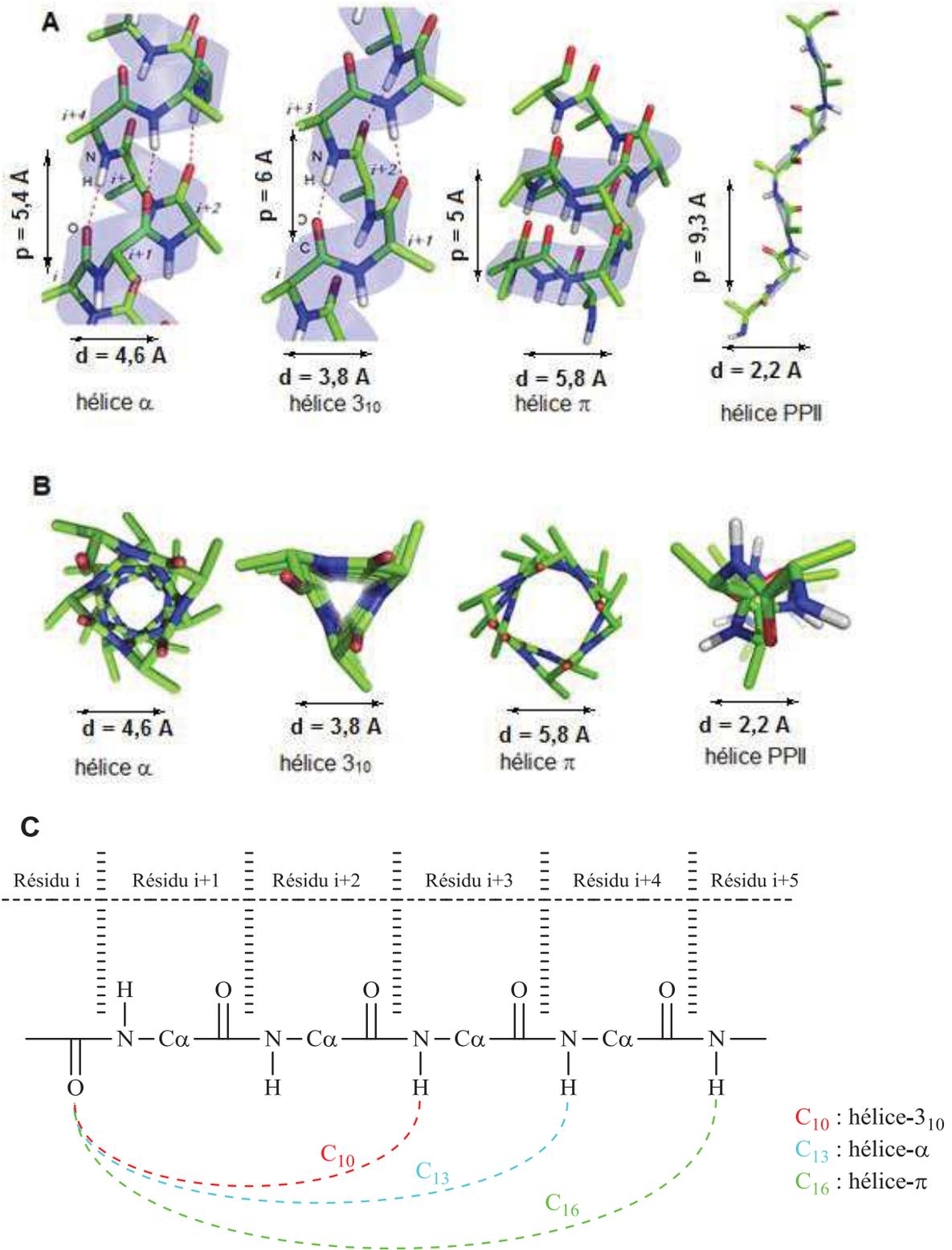


Figure 6 : Représentation des hélices existantes A) une vue équatoriale, B) une vue axiale et C) une vue schématique.

### II.1.1. Les hélices $\alpha$

Les hélices  $\alpha$  (ou hélices  $3.6_{13}$ ) sont les hélices les plus fréquentes. Ce sont les premières structures secondaires à avoir été observées et décrites par Pauling et coll.<sup>9</sup> en 1951. Les chaînes latérales d'acides aminés sont distribuées vers l'extérieur de l'hélice et toutes les liaisons hydrogène sont orientées dans le même sens, formant ainsi un macrodipôle. Un nombre minimal de résidus est généralement nécessaire pour la formation d'une hélice  $\alpha$  stable (entre 10 et 15 résidus). Un nombre de résidus inférieur favorisera plutôt une hélice de type  $3_{10}$ . Un exemple de protéines constituées d'hélices  $\alpha$  est donné ci-dessous.

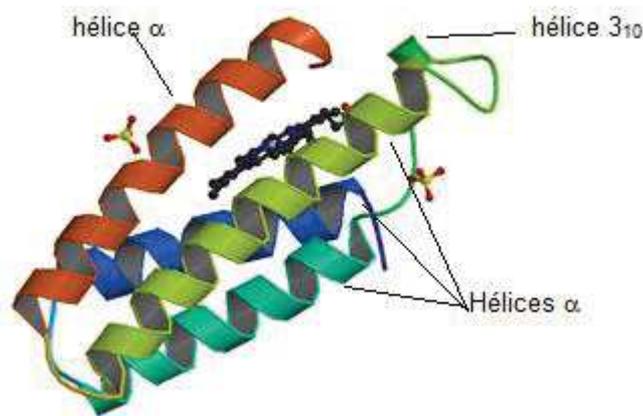


Figure 7 : Structure cristalline du cytochrome b562 (code PDB : 256B).

### II.1.2. Les hélices $3_{10}$

Les hélices  $3_{10}$ , moins fréquentes, sont des hélices droites proposées par M. L. Huggins<sup>10</sup>, plus compactes, plus fines et plus allongées que les hélices  $\alpha$ . Elles comportent généralement 4 à 6 résidus, mais des hélices comportant plus de résidus ont aussi été décrites. Si les hélices courtes sont retrouvées dans les protéines solubles, les hélices de plus de 6 résidus sont préférentiellement retrouvées dans les protéines membranaires telles que les canaux ioniques à six domaines transmembranaires. C'est le cas du canal potassique tensio-dépendant humain Kvi.1 (dont l'ouverture dépend du potentiel électrique de la membrane) qui présente dans son quatrième domaine transmembranaire S4 une hélice  $3_{10}$  de 7 résidus ; du récepteur ionotrope ligand dépendant MlotiK1 (canal ionique dont l'ouverture dépend de son interaction avec un ligand) où le quatrième domaine transmembranaire S4 adopte lui aussi une structure d'hélice  $3_{10}$  de 11 résidus<sup>11</sup>. La stabilisation de ses structures dépend d'une part de l'écrantage des charges positives situées le long de la chaîne par rapport aux régions apolaires situées dans la membrane

mais aussi de la formation d'un sillon par les autres domaines transmembranaires de la protéine. Ce sillon maintient l'intégrité de l'hélice  $3_{10}$ , lorsque celui-ci se termine, l'hélice se convertit alors en hélice  $\alpha$ .

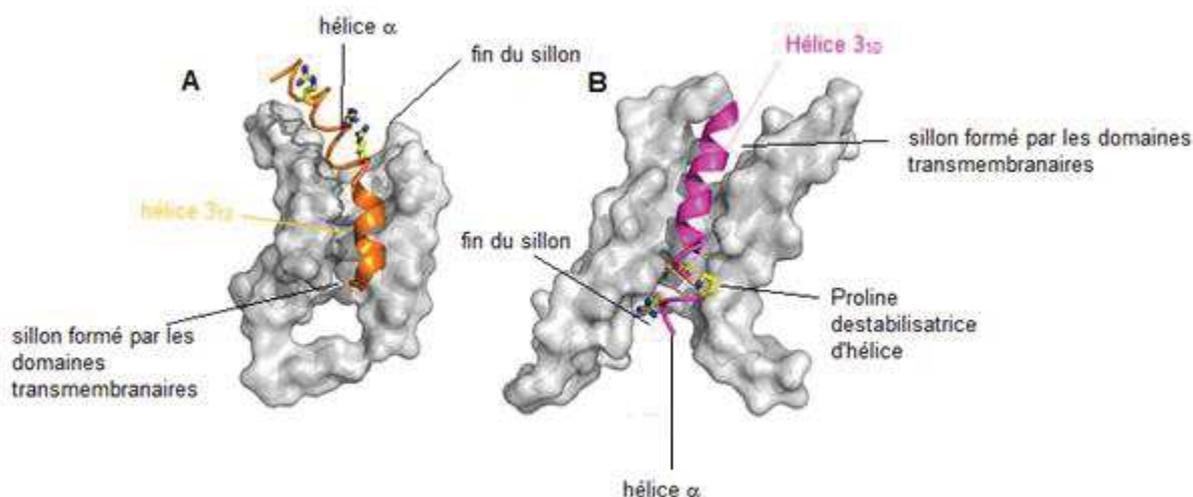


Figure 8 : Représentation d'hélice  $3_{10}$  dans des canaux à six domaines transmembranaires. A) Canal Kv1.2. (L'hélice  $3_{10}$  est représentée en ruban). B) Canal MlotiK1. (L'hélice  $3_{10}$  est représentée en rose).

Dans ces deux exemples, le sillon formé par les domaines transmembranaires maintient la structure de l'hélice  $3_{10}$ . Une fois sortie du sillon, celle-ci se convertit alors en hélice  $\alpha$ .

Une variante de l'hélice  $3_{10}$  est une structure en ruban de type  $\beta$  ( $\beta$  bend ribbon). Cette structure est observée dans les séquences de type  $(\text{Pro-Aib})_n$  ou  $(\text{Pro-X})_n$  (avec X un acide aminé différent de Pro). L'acide aminoisobutyrique (Aib), un acide aminé retrouvé dans les antibiotiques fongiques tel que l'alaméthicine, est un fort inducteur d'hélice  $3_{10}$ <sup>12</sup>. A l'inverse, la proline est généralement défavorable à la formation d'hélice (sauf lorsqu'elle est seule, auquel cas elle forme une hélice de type polyproline qui sera détaillée plus loin dans ce manuscrit). Le ruban peut être assimilé à une hélice  $3_{10}$  qui serait dépourvu de certaines de ses liaisons hydrogène. Cette hélice possède un pas  $p = 6,29 \text{ \AA}$ , un nombre de résidus par tour  $n = 3,43$ , un diamètre  $d = 1,94 \text{ \AA}$  et adopte des valeurs d'angles dièdres  $\Phi_i = -78^\circ$ ,  $\Psi_i = -10^\circ$  et  $\Phi_{i+1} = -54^\circ$  et  $\Psi_{i+1} = -40^\circ$ . De plus, les valeurs d'angle  $\omega$  varient de  $10^\circ$  par rapport à la valeur idéale de  $180^\circ$ <sup>13</sup>.

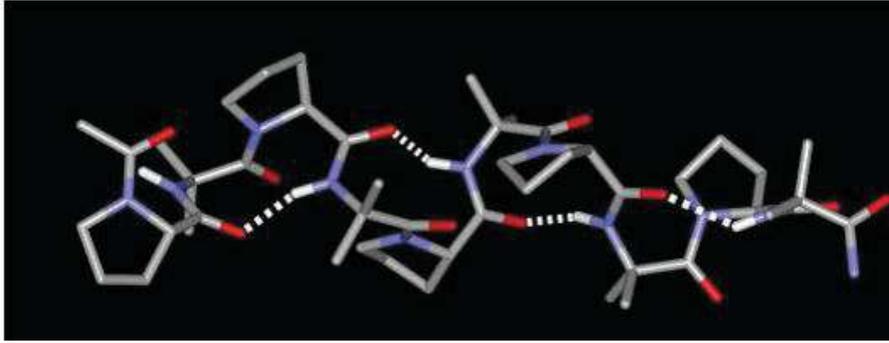


Figure 9 : Structure en ruban formée par le tripeptide (Pro-Aib)<sup>13</sup>.

Il existe quatre types de structures en ruban  $\beta$ , elles dépendent du type de coude qui les constituent ( $\beta$ I,  $\beta$ I',  $\beta$ II et  $\beta$ II'). Cette hélice est stabilisée par des liaisons hydrogène identiques à celles des coudes qui les constituent. Elle forme ainsi des pseudo-cycles  $C_{10}$  et peut être considérée comme un enchainement de coudes  $\beta$ . On retrouve cette structure principalement dans les domaines riches en leucine. C'est le cas, par exemple, des domaines extracellulaires de reconnaissance du ligand des récepteurs Hogo<sup>14</sup> et Toll<sup>15</sup>, impliqués dans l'immunité native. On retrouve également cette structure dans la forme activée de la protéine Rho<sup>16</sup> qui régule les voies de phosphorylation. .

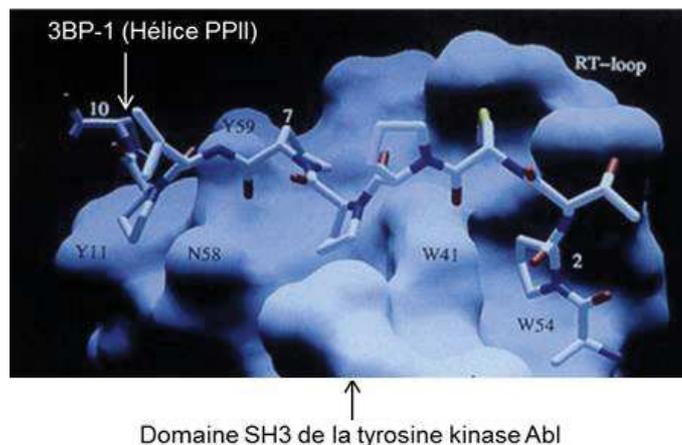
### II.1.3. Les hélices $\pi$

Les hélices  $\pi$  sont des hélices droites proposées par J. Donohue<sup>17</sup> en 1953. D'abord considérées comme rares, des études plus récentes ont démontré qu'elles représentent 15% des hélices des protéines<sup>18</sup>. Elles sont décrites comme une évolution adaptative de l'hélice  $\alpha$  due à l'insertion d'un acide aminé dans sa séquence. Cette incorporation déstabilisant l'hélice, cette structure n'est conservée que lorsque la nouvelle conformation apporte un avantage fonctionnel, comme un changement de reconnaissance du substrat par exemple. Ces hélices sont donc particulièrement présentes dans les sites actifs<sup>18</sup>.

### II.1.4. Les hélices polyproline de types II (ou PPII)

Les PPII sont des hélices gauches qui sont dépourvues de liaisons hydrogène<sup>19</sup>. Ces structures impliquent préférentiellement des Pro mais d'autres résidus peuvent aussi être incorporés comme la glycine ou l'hydroxyproline. Elles se trouvent surtout à la surface des protéines et, ayant moins de liaisons hydrogène que les autres structures, elles sont généralement plus mobiles au sein de la protéine molécule. Elles sont généralement impliquées dans les interactions protéine-protéine ou protéine-acide nucléique et jouent un rôle majeur dans la transduction des signaux cellulaires et la formation de complexes protéiques. Ces structures sont souvent retrouvées dans les sites de liaisons comme par

exemple le domaine SH3 qui est impliqué dans les protéines de régulation des voies de signalisation<sup>20</sup>.



**Figure 10 : Représentation de l'interaction entre 3BP-1 dérivé de la protéine G Rho et le domaine SH3 de la tyrosine kinase Abl (code PDB : 2ABL)<sup>21</sup>.**

Le peptide 3BP-1 (APTMPPLPP) se lie au domaine de SH3 principalement par des liaisons de Van Der Waals grâce aux multiples résidus Pro présents dans le peptide<sup>21</sup>. Un autre exemple d'hélice PPII est l'une des hélices composant la triple hélice de collagène qui adopte une structure très similaire.

## II.2. Les feuillets $\beta$

Les feuillets  $\beta$  sont un autre type de structure secondaire. Ils représentent un quart des structures régulières présentes dans les protéines. Ces feuillets peuvent être décrits comme un assemblage de plusieurs chaînes polypeptidiques appelées brins  $\beta$ . Il s'agit d'une hélice quasi plane contenant généralement entre 3 et 10 résidus. Elle possède deux résidus par tour et des valeurs d'angles dièdres  $\phi$  et  $\psi$  égales à  $-120^\circ$  et  $+120^\circ$  respectivement. Les chaînes latérales des acides aminés sont réparties de part et d'autre de la chaîne principale, perpendiculairement au feuillet lui-même. Ces architectures sont stabilisées par des liaisons hydrogène entre chaînes polypeptidiques voisines. De manière générale, les liaisons hydrogène qui stabilisent ces feuillets ne sont pas influencées par le type de chaînes latérales des résidus entre lesquelles elles sont formées. Il existe ainsi deux types de feuillets : les feuillets  $\beta$  parallèles et les feuillets  $\beta$  antiparallèles.

### II.2.1. Les feuillets $\beta$ parallèles

Dans les feuillets  $\beta$  parallèles, chaque chaîne polypeptidique est orientée dans le même sens. Les angles dièdres  $\Phi$  et  $\psi$  ont pour valeur  $-119^\circ$  et  $+113^\circ$  et les liaisons hydrogène formées ne sont pas perpendiculaires à la chaîne principale. Les feuillets  $\beta$

parallèles ne peuvent pas être consécutifs et sont donc le plus souvent reliés par une hélice  $\alpha$  qui vient se placer le long de la surface des feuillets. Ils se trouvent préférentiellement au cœur de la structure tridimensionnelle de la protéine. Les feuillets parallèles courts sont particulièrement rares. Ces feuillets sont moins stables que les feuillets antiparallèles décrits ci-après.

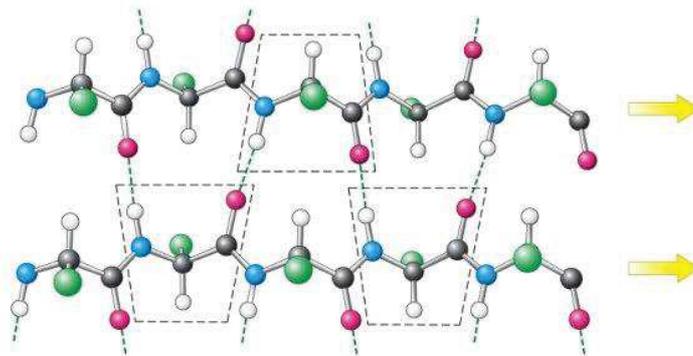


Figure 11 : Feuillet beta parallèle.

Une structure particulière des feuillets  $\beta$  parallèles sont les hélices  $\beta$ . Elles peuvent être à 2, 3 ou 4 brins et sont principalement stabilisées par des liaisons hydrogène intra brins, des interactions protéine-protéine et peuvent parfois lier des ions métalliques. Ces hélices peuvent être droites ou gauches. Un exemple d'hélice  $\beta$  gauche triple brin est représenté dans la figure ci-dessous.

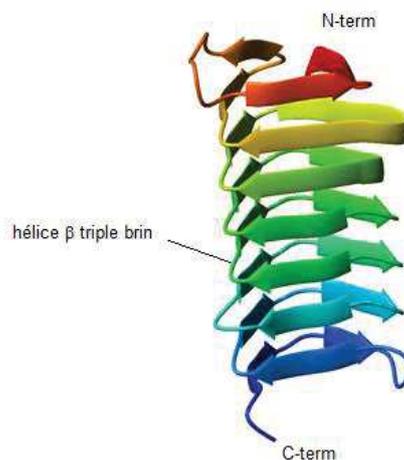


Figure 12 : Protéine antigèle de *Choristoneura fumiferana* (code PDB : 1M8N).

### II.2.2. Les feuillets $\beta$ antiparallèles

Dans les feuillets  $\beta$  antiparallèles, à l'inverse, chaque chaîne polypeptidique est orientée de manière opposée l'une par rapport à l'autre comme indiqué dans la Figure 13. Ces chaînes présentent des valeurs d'angles dièdres  $\phi$  et  $\psi$  de  $-139^\circ$  et  $+135^\circ$

respectivement et les liaisons hydrogène formées sont perpendiculaires à la chaîne principale. Ces feuillets sont liés entre eux par des coudes  $\beta$  (eux même décrits dans le paragraphe suivant) lorsqu'ils sont consécutifs. Si les feuillets appartiennent à des régions différentes de la protéine, ils peuvent être liés par des enchainements plus complexes pouvant inclure des hélices  $\alpha$ . Les brins antiparallèles se retrouvent fréquemment à la surface de la protéine. Plus stables que leurs homologues parallèles, ces feuillets sont stabilisés lorsqu'ils sont composés de 5 à 7 résidus<sup>22</sup>, l'incorporation de résidus supplémentaires ne semblant pas améliorer cette stabilité. Le nombre de brins composant le feuillet a aussi un effet stabilisateur. Ainsi, un feuillet à 4 brins est plus stable qu'un triple brins lui-même plus stable qu'un double brins<sup>23</sup>.

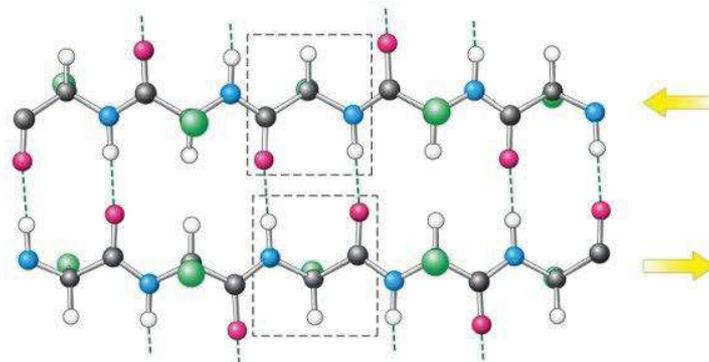


Figure 13 : Feuillet bêta antiparallèle.

Deux exemples de structures particulières des feuillets antiparallèles sont donnés dans la Figure 14 ci-dessous.

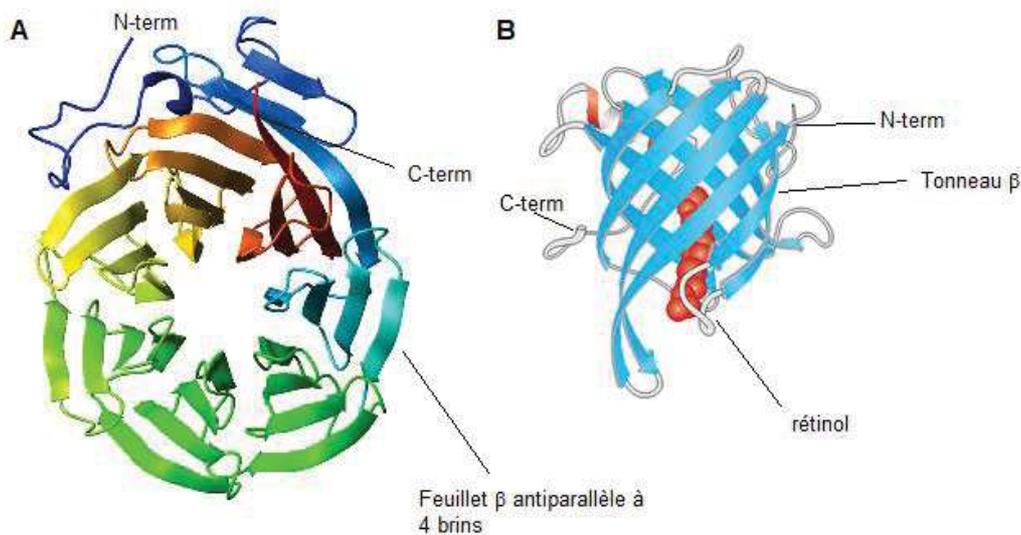


Figure 14 : Représentation de deux structures spécifiques des feuillets  $\beta$ . A) un  $\beta$ -propulseur à 7 «pales» issu du domaine C-term de Tup1<sup>24</sup> (code PDB : 1ERJ). B) Un tonneau  $\beta$  issu de la protéine de liaison du rétinol (PDB 1RLB).

Ces feuillets sont moins représentés que les hélices mais jouent des rôles tout aussi importants dont quelques exemples ont été donnés ci-dessus.

### II.3. Les coudes

Les coudes, à la différence des hélices et des feuillets, ne sont pas des structures périodiques. Ce sont des éléments de structure secondaire localisés à 3 ou 4 résidus consécutifs. Ils permettent des changements de direction ( $180^\circ$  environ) de la chaîne principale de la protéine. Ils sont souvent localisés en surface des protéines, et sont donc impliqués dans les processus de reconnaissance moléculaire entre protéines ainsi que les interactions entre les ligands peptidiques et leurs récepteurs. Les récepteurs couplés aux protéines G reconnaissent les ligands peptidiques qui adoptent une structure de type coude dans leur forme bioactive<sup>25</sup>. Il existe différents types de coudes caractérisés par le nombre de résidus impliqués dans le pseudo-cycle  $C_x$  et définis par quatre critères<sup>26</sup> :

- i) La catégorie : un coude est dit « standard » lorsqu'il forme une liaison hydrogène entre le groupement carbonyle du résidu  $i$  et le proton amide du résidu  $i+n$ . Il est dit « ouvert » lorsqu'il ne forme pas de liaison hydrogène mais que le  $C\alpha$  du résidu  $i$  et le  $C\alpha$  du résidu  $i+n$  ont une distance inférieure à 10 Å ou « inverse » lorsque la liaison hydrogène se forme entre le proton amide du résidu  $i$  et le groupement carbonyle du résidu  $i+n$ .
- ii) La classe : les coudes comportant le même nombre de résidus appartiennent à la même classe. Il existe ainsi 6 classes : les coudes  $\delta$  (2 résidus), les coudes  $\epsilon$  et  $\gamma$  (3 résidus), les coudes  $\beta$  (4 résidus), les coudes  $\alpha$  (5 résidus) et les coudes  $\pi$  (6 résidus).
- iii) La famille : la famille décrit les coudes d'un type particulier au sein de leur classe, comme le coude  $\alpha$  standard ou le coude  $\pi$  ouvert par exemple.
- iii) Le type de coude : dans une famille donnée, plusieurs types de coudes existent en fonction de la valeur des angles dièdres des résidus qui le composent.

Parmi tous les coudes étudiés jusqu'à maintenant, les coudes  $\delta$  et  $\epsilon$  n'ont pas été observés dans les protéines. C'est pourquoi nous nous concentrerons sur les coudes  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha$  et  $\pi$ .

#### II.3.1. Le coude $\gamma$

Ces coudes forment des pseudo-cycles  $C_7$  où une liaison hydrogène est formée entre le carbonyle du résidu  $i$  et l'amide du résidu  $i+2$ . Il existe deux familles de coudes  $\gamma$  : le coude  $\gamma$  standard et le coude  $\gamma$  inverse<sup>27</sup>.

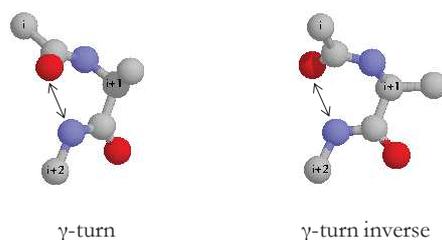


Figure 15 : Représentation d'un coude  $\gamma$  standard et inverse.

Le coude  $\gamma$  standard induit des valeurs d'angles  $\Phi_{i+1} = 70^\circ$  et  $\Psi = -57^\circ$  et les résidus Gly, His, Lys et Ser sont les résidus les plus souvent rencontrés dans cette structure. Le résidu Gly est préférentiellement situé en position  $i$  et  $i+1$  tandis que les résidus His, Lys et Ser sont plutôt situés en  $i+2$  (avec His plus fréquent que Lys plus fréquent que Ser). Le coude  $\gamma$  inverse induit, quant à lui, des valeurs d'angles  $\Phi_{i+1} = -82^\circ$  et  $\Psi = 75^\circ$  et les résidus situés en position  $i$ ,  $i+1$  et  $i+2$  sont plus variés. Ainsi la position  $i$  peut comporter les résidus Gly, Ile et Pro, la position  $i+1$  les résidus Asp, Asn et Pro et la position  $i+2$  les résidus Asn, Thr, Val et Trp.

### II.3.2. Le coude $\beta$

Ce type de coude est le plus fréquent et représente jusqu'à 40% de la structure totale des protéines. C'est un pseudo-cycle  $C_{10}$  constitué de quatre résidus et stabilisé par une liaison hydrogène entre le groupement carbonyle du résidu  $i$  et le groupement amide du résidu  $i+3$ . Ces coudes  $\beta$  se trouvent souvent entre deux brins dans un feuillet  $\beta$  antiparallèle par exemple.

Les structures cristallines des protéines ont permis de décrire huit coudes  $\beta$  différents présentés dans le Tableau 4. Chacun d'entre eux dépend de la valeur des angles dièdres des résidus  $i+1$  et  $i+2$ <sup>28</sup>. Pour les coudes  $\beta$  I, I' et II, II', leurs valeurs d'angles sont identiques et seul le signe change. Les coudes  $\beta$  peuvent être standard, ouvert ou inverse. Les coudes  $\beta$  III, IV et VII n'apparaissent pas dans le Tableau 4 pour les raisons suivantes<sup>29</sup>. Le coude  $\beta$  III peut être assimilé à une structure de type hélice  $3_{10}$  et ses valeurs d'angles dièdres idéales sont si proches des valeurs des coudes  $\beta$  I que ces coudes ne peuvent être différenciés que dans les structures particulièrement définies des protéines. Les coudes  $\beta$  VII sont des anomalies dans la chaîne protéique générées par des angles  $\Phi_{i+1} \approx 180^\circ$  et  $\Psi_{i+2} < 60^\circ$  ou  $\Phi_{i+1} < 60^\circ$  et  $\Psi_{i+2} \approx 180^\circ$ . Ces conformations sont définies seulement par la valeur de deux angles, contrairement aux autres coudes qui sont définis par la valeur de 4 angles. De plus, elles peuvent adopter des valeurs très différentes, induisant des structures

tridimensionnelle très variées qui ne justifient pas qu'une catégorie à part leur soit dédiée. Les coudes  $\beta$  IV regroupent tous les coudes  $\beta$  dont les valeurs d'angles dièdres ne permettent pas de les associer à un autre type.

Tableau 4 : Valeurs idéales d'angles dièdres des résidus  $i+1$  et  $i+2$  pour chaque type de coude  $\beta$ .

Type	$\Phi_{i+1}$	$\Psi_{i+1}$	$\Phi_{i+2}$	$\Psi_{i+2}$
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
Vla1	-60	120	-90	0*
Vla2	-120	120	-60	0*
Vlb	-135	135	-75	160*

Comme pour les coudes  $\gamma$ , certains résidus sont fréquemment retrouvés en position  $i$ ,  $i+1$ ,  $i+2$  et  $i+3$  de chacun de ces coudes. Ces préférences sont résumées dans le tableau ci-dessous<sup>27</sup>.

Tableau 5 : Position favorisée pour chaque acide aminé pour les différents types de coudes  $\beta$ .

Type	position $i$	position $i+1$	position $i+2$	position $i+3$
I	Cys, Asp, His, Asn, Pro, Ser, Thr	Asp, Glu, Lys, Pro, Ser	Asp, Asn, Ser, Thr	Cys, Gly, Asn
II	Cys, Pro	Ala, Glu, Lys, Pro	Gly, Asn	Cys, Asp, Lys, Gln, Ser, Thr
VIII	Cys, Gly, Pro	Asp, Lys, Pro	Asp, Hus, Asn, Val, Tyr	Pro, Val
I'	Phe, Val, Tyr	Asp, Gly, His, Asn	Gly	Lys, Gln, Arg, Tyr
II'	Tyr	Gly	Asp, Asn, Ser	Thr
Vla1	Lys, Leu	Pro, Tyr	Pro	Phe, Tyr
Vla2	Phe	Phe, Trp	Pro	Gly
Vlb	His, Pro	Thr, Tyr	Pro	Pro

Pour ces structures, les résidus Pro et Gly sont les plus fréquemment retrouvés et ceux quel que soit leur position dans le coude. Leurs structures sont représentées dans la Figure 16 ci-dessous.

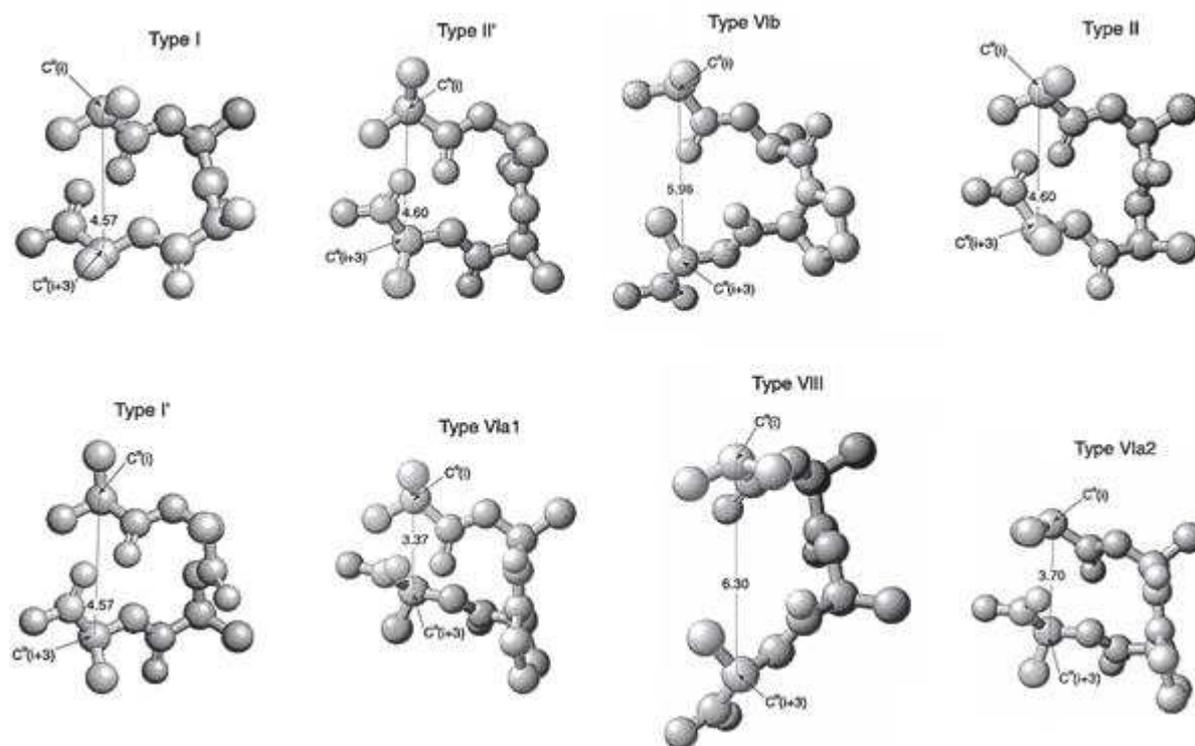


Figure 16 : Structures des différents types de coudes  $\beta$  (les distances entre le  $\text{Ca}_i$  et le  $\text{Ca}_{i+3}$  représentées en pointillés sont données en Å)<sup>30</sup>.

Parmi ces différentes structures, les coudes normaux  $\beta$  VIa1, VIa2 et VI1b doivent obligatoirement comporter un résidu proline en position  $i+2$ . Ce résidu Pro permet une valeur d'angle  $\omega_{i+1} = 0^\circ$  plutôt que  $180^\circ$  comme c'est le cas pour les autres coudes  $\beta$ . La liaison peptidique est alors orientée en *cis* et permet d'obtenir une distance  $\text{Ca}_i\text{-Ca}_{i+3} < 7 \text{ \AA}$ <sup>30</sup>.

### II.3.3. Les coudes $\alpha$

Ces coudes apparaissent moins souvent dans les protéines que les coudes  $\beta$ . La conformation de ces coudes est déterminée par les valeurs des angles dièdres des résidus  $i+1$ ,  $i+2$  et  $i+3$ . 15 types de coudes  $\alpha$  ont été déterminés à partir des valeurs  $\Phi_{i+1}$ ,  $\Psi_{i+1}$ ,  $\Phi_{i+2}$ ,  $\Psi_{i+2}$  et  $\Phi_{i+3}$ ,  $\Psi_{i+3}$ <sup>31</sup>. Certains de ces coudes sont standards et forment une liaison hydrogène entre le groupement carbonyle du résidu  $i$  et le proton amide du résidu  $i+4$  et forment un pseudo-cycle  $\text{C}_{13}$  tandis que d'autres sont ouverts et ne forment donc pas de liaisons hydrogène.

### II.3.4. Les coudes $\pi$

Les coudes  $\pi$  ont été identifiés pour la première fois par H.C. Watson<sup>32</sup> dans la structure cristalline de la myoglobine (code PDB : 1MBN). Ces coudes forment une liaison hydrogène entre les résidus  $i$  et  $i+5$  et ont des distances  $\text{Ca}_i\text{-Ca}_{i+5} < 7 \text{ \AA}$ . Ils peuvent être standards ou ouverts et peuvent incorporer des coudes  $\beta$  et  $\alpha$  dans leurs structures<sup>33</sup>.

Un motif de coude  $\pi$  particulier a été décrit en 1980 par C Schellman<sup>34</sup>. Présent dans 28% des extrémités C-terminales des hélices  $\alpha$ , ce motif fait office de terminaison d'hélice<sup>34</sup>. Dans cette conformation, le groupement carbonyle du résidu  $i$  forme une liaison hydrogène avec le proton amide du résidu  $i+5$  tandis que celui du résidu  $i+1$  forme une liaison hydrogène avec le proton amide du résidu  $i+4$ . Les acides aminés  $i+1$ ,  $i+2$  et  $i+3$  ont tous une valeur d'angle  $\Phi$  négative tandis que le résidu  $i+4$  a lui une valeur d'angle  $\Phi$  positive. Dans ce motif, les groupements amides des trois résidus  $i+3$ ,  $i+4$  et  $i+5$  forment une cavité qui permet la liaison du groupement carbonyle du résidu  $i+2$ . Cette cavité est nommée  $\text{nid}_{\text{RL}}$  (où R et L dépendent du signe de l'angle  $\Phi$  des deux premiers résidus composant le nid, celui-ci pouvant être négatif (R) ou positif (L)).

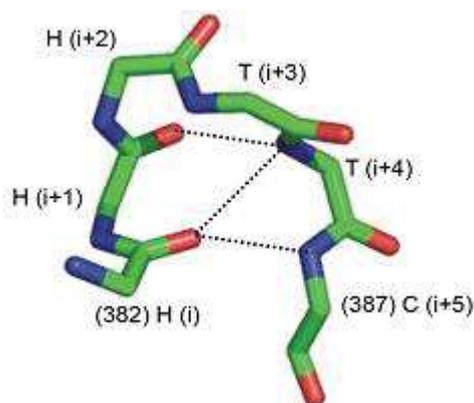


Figure 17 : Motif de Schellman (les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés). La liaison hydrogène  $i \rightarrow i+4$  est intra-hélice<sup>33</sup>.

Toutes ces structures, en plus d'être essentielles pour l'établissement de la structure tridimensionnelle des protéines, sont localement impliquées dans de nombreux processus biologiques (reconnaissance entre les protéines, protéine/ADN, protéine/ARN par exemple). Ainsi pour interférer dans les processus biologiques, en particulier lorsqu'ils sont impliqués dans certaines pathologies, le chimiste médicinal a donc cherché à les imiter afin de les utiliser comme outils thérapeutiques. Parmi ces différents éléments de structure secondaire, nous nous intéresserons ici aux hélices et à une grande famille d'architectures moléculaires permettant de les mimer : les foldamères.

## II.4. Stratégie thérapeutique : de l'importance d'imiter les structures secondaires

L'utilisation des peptides comme outils thérapeutiques ou sondes biologiques<sup>35</sup> s'est de plus en plus développée au cours des dernières années et plus de soixante sont actuellement sur le marché. Si les petites molécules représentent toujours une part très importante de la recherche et développement de l'industrie pharmaceutique, la part allouée aux peptides représente 16% de l'investissement global. Cet investissement continue de croître, désignant les peptides et leurs dérivés comme des outils thérapeutiques prometteurs.

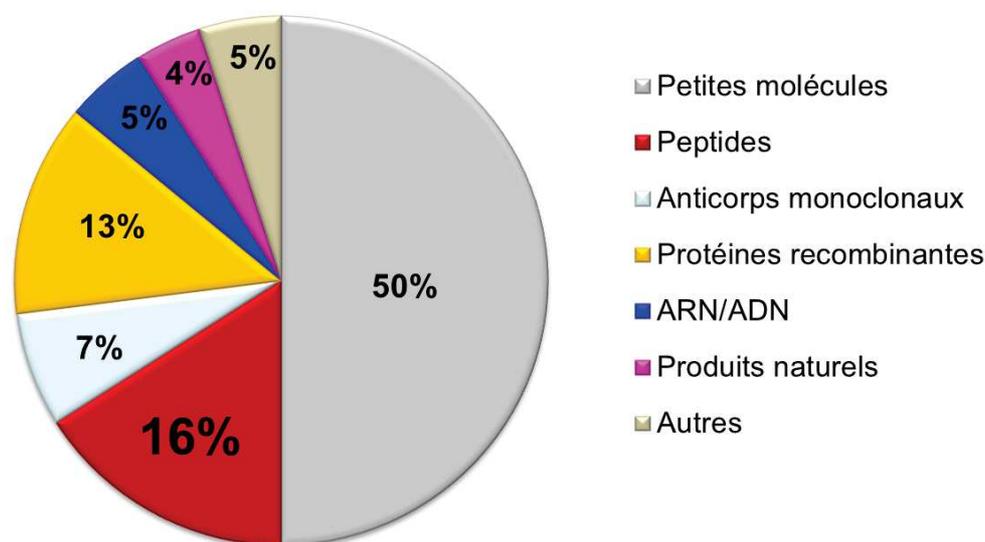


Figure 18 : Répartition de l'investissement dans la recherche et développement en Europe en 2010. (source : Ernst & Young 2010).

Cependant, les peptides possèdent des inconvénients qui limitent leur utilisation :

- Une faible biodisponibilité orale.
- Une demi-vie courte : ils sont rapidement dégradés par les protéases présentes dans le système digestif et le plasma sanguin.
- Ils sont rapidement éliminés de la circulation sanguine par les reins et le foie.
- Ils traversent difficilement les membranes plasmiques à cause de leur hydrophilie.
- Ils peuvent entraîner des effets immunogènes.
- Leurs coûts de synthèse et de production sont plus importants que ceux d'une petite molécule.

- Enfin, ils possèdent une importante flexibilité conformationnelle, ce qui peut entraîner une faible sélectivité et aboutir à l'activation de cibles différentes. En effet, il est impossible de reproduire une structure secondaire d'une protéine simplement en reproduisant sa séquence

Pour pallier ces problèmes, des dérivés de peptides ont été développés : les peptidomimétiques. Ils sont obtenus par diverses modifications de la séquence peptidique : l'utilisation d'acides aminés non protéinogéniques, incluant les acides aminés de configuration D, la modification de la liaison peptidique (liaison réduite<sup>36</sup>, peptide rétro-inverso<sup>37</sup>...), ou l'introduction de contraintes conformationnelles par la cyclisation par exemple<sup>38</sup>.

Afin d'augmenter la biodisponibilité des peptides mais aussi de stabiliser leur structure secondaire, des mimes structuraux ont été développés (mimes de coudes<sup>39</sup>, mimes de feuillets<sup>40,41</sup> ou d'hélices). Deux grandes familles de molécules, qui permettent de mimer les hélices sont au cœur de mes travaux, ce sont les stapled peptides<sup>42</sup> et les foldamères<sup>43</sup>. Dans la suite de ce manuscrit, je me concentrerai sur cette dernière famille de molécules.

### III. Les foldamères

#### III.1. Généralités

Si les structures secondaires apparaissent particulièrement attractives pour la découverte de candidats médicaments peptidiques, les désavantages liés à leur nature ont conduit au développement de systèmes non naturels capables de les imiter. Ainsi les foldamères, qui sont des oligomères artificiels capables d'adopter des structures secondaires repliées bien définies, stables et prévisibles, sont apparus. Durant ces vingt dernières années, ils ont permis de développer des outils susceptibles d'interférer avec les processus biologiques tels que des vecteurs, des inhibiteurs d'interaction protéine-protéine ou des antimicrobiens.

Le terme de foldamère (contraction du verbe to fold : « plier » en anglais et du terme polymère) a été proposé par S. Gellman pour décrire des « polymères ayant une forte propension à adopter une structuration compacte spécifique »<sup>43</sup>. Plus tard, J. S. Moore les a défini de manière plus restrictive comme étant des « oligomères qui se replient dans une configuration stable en solution »<sup>44</sup>. Ces structures sont stabilisées par une collection d'interactions non covalentes entre les unités monomériques non adjacentes. Parmi les premiers foldamères décrits, on peut citer les  $\beta$ -peptides de S. Gellman<sup>45</sup> et de D Seebach<sup>46</sup> en 1996, les poly-pyrroles/imidazoles de Hamilton en 1997<sup>47</sup> et les polyamides dérivés de pyrroles et d'imidazoles de P. B. Dervan en 1999<sup>48</sup>. Ces travaux, pionniers dans le domaine, ont démontré la capacité de ces oligomères à adopter des structures secondaires stables.

Les foldamères peuvent être divisés en deux grandes familles, d'une part les foldamères à simple brin qui ne font que se replier (comme les peptidomimétiques et leurs dérivés abiotiques) et les foldamères à brins multiples, qui vont s'associer et se replier (comme les nucléotidomimétiques et leurs dérivés abiotiques). Face à l'importante production scientifique sur le sujet, cette partie sera consacrée uniquement aux peptidomimétiques.

#### III.2. Les foldamères peptidomimétiques

Dans ce domaine, ce sont les travaux des équipes de D. Seebach, S. Gellman et S. Hanessian qui ont été déterminants en montrant que les propriétés de repliement et de diversité structurale ne sont pas limitées aux  $\alpha$ -peptides naturels mais peuvent être étendues au  $\beta$  et  $\gamma$ -peptides. Ils ont également montré qu'un petit nombre de motifs monomériques permet de former des hélices stables, des feuillettes ou des coudes. Basée sur ces premiers résultats, l'existence de différents types de foldamères dérivés de peptides a été mise en

avant. Ces oligomères peuvent être constitués d'acides  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$  aminés. Ils peuvent aussi comporter des liaisons peptidiques classiques ou modifiées (peptoïdes, oligourées, oligopyrrolinones, azatides ou aza peptides par exemple). Les premiers foldamères décrits présentent un squelette homogène, c'est-à-dire formé par la répétition d'unités monomériques d'une seule et même classe de composés (uniquement des acides  $\beta$ -aminés par exemple).

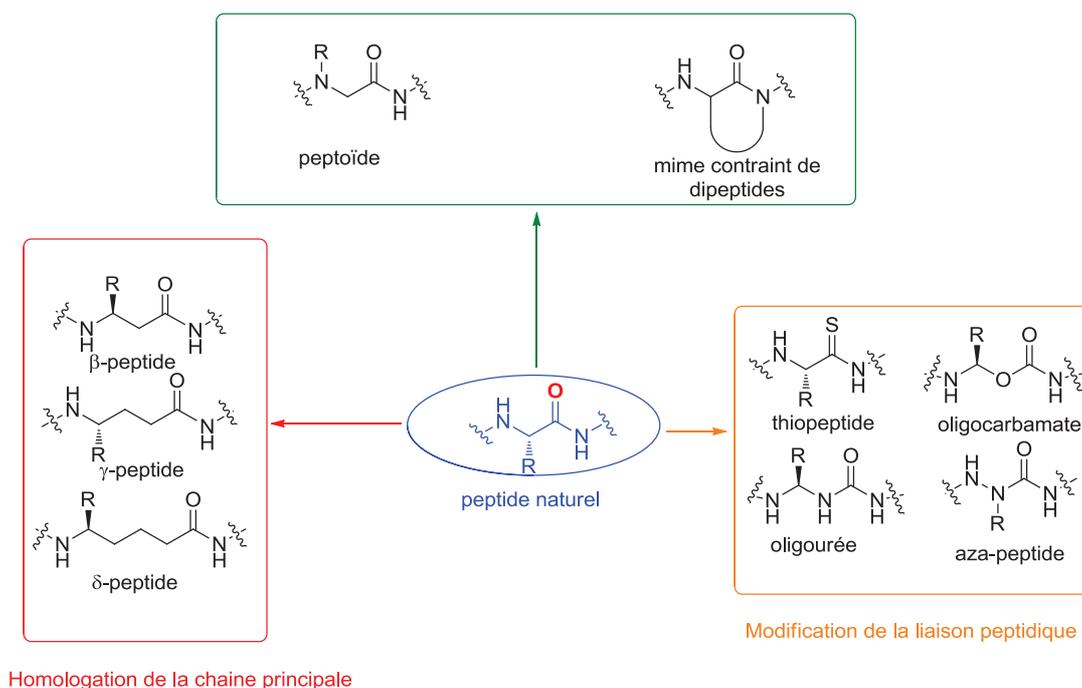


Figure 19 : Les différents types de foldamères peptidomimétiques.

Plus tard, le développement de foldamères hétérogènes, c'est-à-dire renfermant plusieurs types d'unités monomériques a permis d'augmenter considérablement la diversité des structures accessibles. Ainsi, pour ne citer que quelques exemples, des foldamères hybrides  $\alpha/\beta$ <sup>49</sup>,  $\alpha/\gamma$ <sup>50</sup>,  $\alpha/\delta$ <sup>51</sup>,  $\beta/\gamma$ <sup>52</sup> ont été rapportés. Comme pour les protéines, la structuration de ces oligomères est le fruit de nombreuses liaisons non-covalentes telles que les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques, stériques ou aromatiques, la coordination avec des ions métalliques ou encore des effets de solvants. Si ces foldamères sont capables d'imiter les différentes structures secondaires des protéines, la structure la plus fréquente est l'hélice. Plusieurs nomenclatures ont été proposées pour les décrire et sont résumées dans le Tableau 6<sup>53</sup>.

Tableau 6 : Nomenclature des structures hélicoïdales.

K.A. Bode	S. Gellman	D. Seebach	Autre nomenclature
R <sub>+2</sub>	14	(P) 3 <sub>1</sub>	3 <sub>14</sub>
R <sub>-3</sub>	12	(P) 2,5 <sub>1</sub>	2,5 <sub>12</sub>
L <sub>+2</sub>	14	(M) 3 <sub>1</sub>	3 <sub>14</sub>
L <sub>-3</sub>	12	(M) 2,5 <sub>1</sub>	2,5 <sub>12</sub>

K. A. Bode et J. Appelquist nomment les hélices en fonction de leur direction (gauche L ou droite R) et du nombre de résidus séparant ceux impliqués dans la liaison hydrogène formée entre le proton amide donneur et le groupement carbonyle accepteur. S. Gellman et coll. utilisent une nomenclature plus simple qui ne décrit que le nombre d'atomes impliqués dans le pseudo cycle formé par la liaison hydrogène. La direction de l'hélice n'est pas décrite. D. Seebach utilise lui une nomenclature mettant en jeu la symétrie de l'hélice, le nombre de résidus par tour et la topologie de l'hélice (P pour droite et M pour gauche). Une dernière nomenclature prend en compte le nombre d'atomes impliqués dans le pseudo-cycle ainsi que le nombre de résidus par tour. Dans le Tableau 6 sont représentées les nomenclatures pour des hélices droite et gauche contenant 3 résidus par tour stabilisées par un pseudo-cycle C<sub>14</sub> et celles pour des hélices droite et gauche contenant 2,5 résidus par tour stabilisées par un pseudo-cycle C<sub>12</sub><sup>53</sup>.

### III.2.1. Les peptides homologués

L'utilisation d'acides aminés homologués tels que les acides β, γ ou δ-aminés linéaires et cycliques ont permis la synthèse de nombreux oligomères structurés, à l'état solide comme en solution. Si les β-oligomères sont la classe de foldamères la plus décrite à ce jour, les γ et δ oligomères ont eux aussi été étudiés. Les résidus qui composent ces différents oligomères ne diffèrent des acides aminés naturels que par l'incorporation d'un ou plusieurs groupements méthylène dans leurs chaînes principales entre le groupement amine et le groupement acide carboxylique. La nomenclature de ces acides homologués dépend du carbone portant la chaîne latérale, ils sont représentés dans la Figure 20.

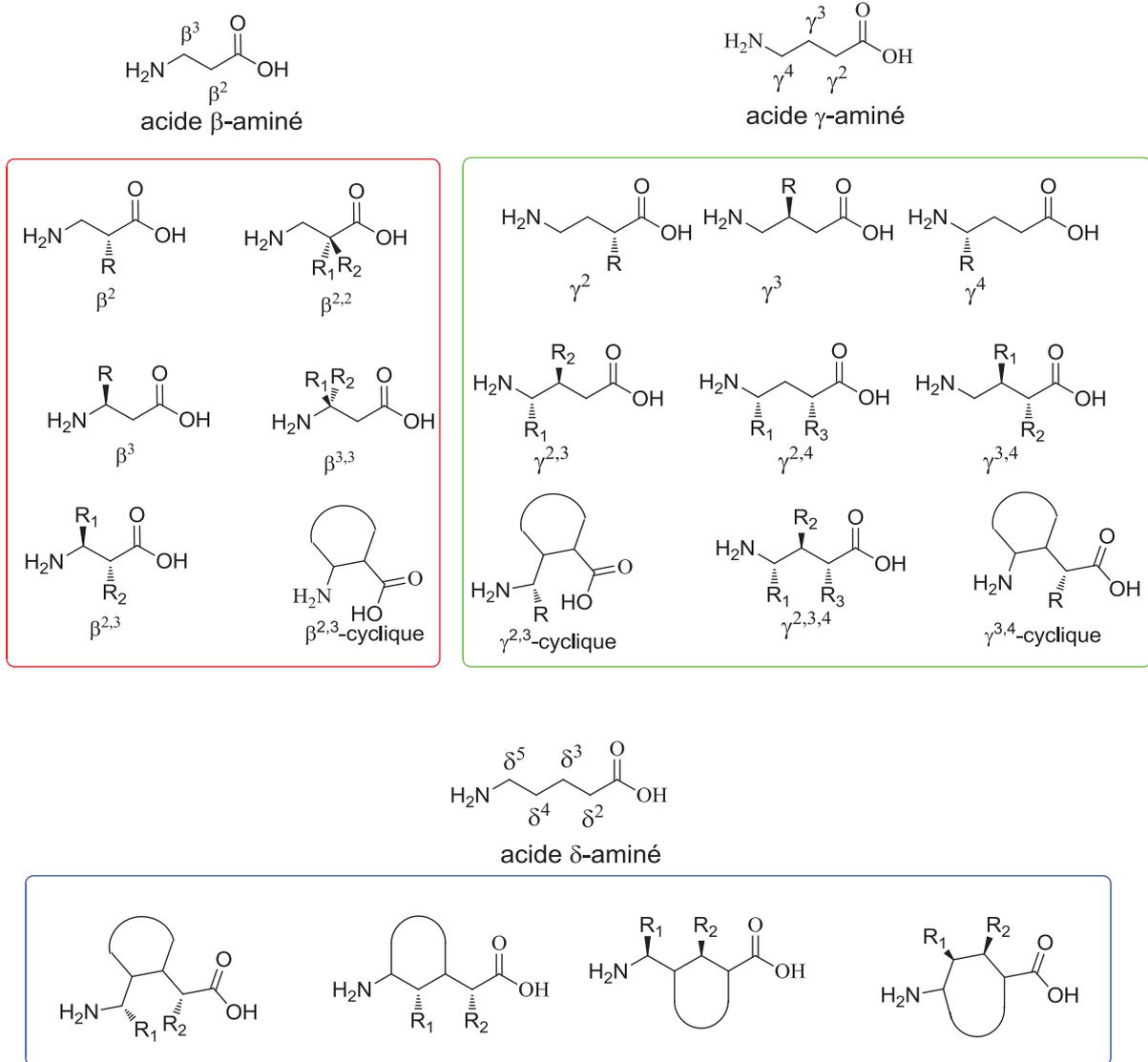


Figure 20 : Acides  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ -aminés utilisés dans la synthèse d'oligomères.

L'ajout d'une ou de plusieurs nouvelles liaisons carbone-carbone entraîne l'apparition de nouveaux angles dièdres :  $\theta$ ,  $\zeta$  et  $\rho$ .

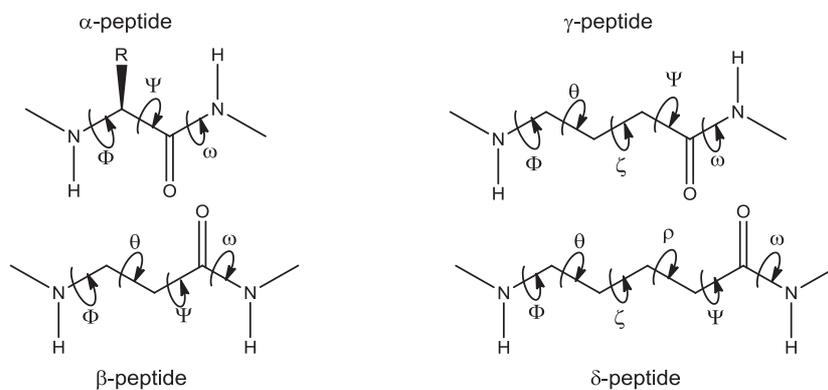


Figure 21 : Angles dièdres.

Depuis plus de 50 ans maintenant, la structure des  $\beta$ -oligomères a été étudiée, à l'état solide comme en solution. Les premiers à avoir émis l'hypothèse selon laquelle les  $\beta$ -oligomères étaient capables d'adopter une structure hélicoïdale en solution sont J. Kovacs et coll. en 1965 lors d'études sur les poly  $\beta$ -acides aspartiques<sup>54</sup>. D'abord décrit comme adoptant la structure d'une hélice 14 puis comme adoptant la structure d'un feuillet  $\beta$ , il a fallu attendre près de 20 ans pour que la structure hélicoïdale soit confirmée<sup>55</sup>. Contrairement aux premières hypothèses prédisant que l'ajout d'un groupement méthylène dans la chaîne principale augmenterait la flexibilité de l'oligomère et ne favoriserait pas la formation d'une structure stable, les  $\beta$ -peptides nécessitent moins de résidus que les  $\alpha$ -peptides pour se structurer. Par la suite, de nombreuses équipes ont continué à étudier les oligomères composés d'acides aminés d'homologation supérieure. Je vais présenter brièvement dans la suite de ce chapitre différentes hélices rencontrées dans les oligomères d'acides aminés homologues (acides  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ -aminés).

### III.2.2. Les $\beta$ -peptides

Les équipes pionnières sont celles de D. Seebach<sup>56,57</sup> et S. Gellman<sup>45,58</sup>. Elles ont démontré la propension des  $\beta$ -peptides à adopter des structures hélicoïdales stables. Jusqu'à présent, 5 structures hélicoïdales différentes ont été décrites (Figure 22).

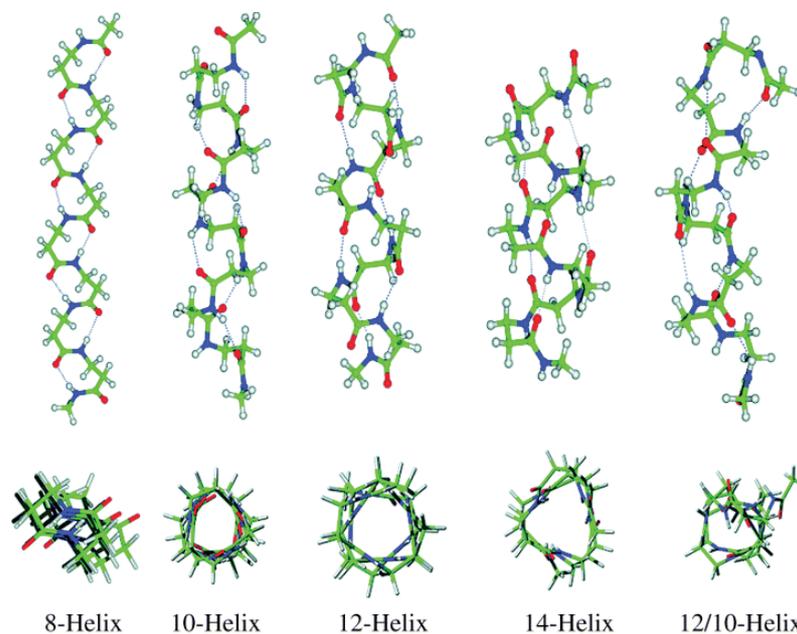


Figure 22 : Représentation des 5 types d'hélices adoptées par les  $\beta$ -oligomères.

### III.2.2.a. Les hélices 14

Le repliement en hélice 14 est le plus décrit pour les  $\beta$ -peptides. Ces hélices ont été mises en évidence au même moment par les équipes de S. Gellman<sup>45</sup> et D. Seebach<sup>46</sup> et sont représentées ci-dessous.

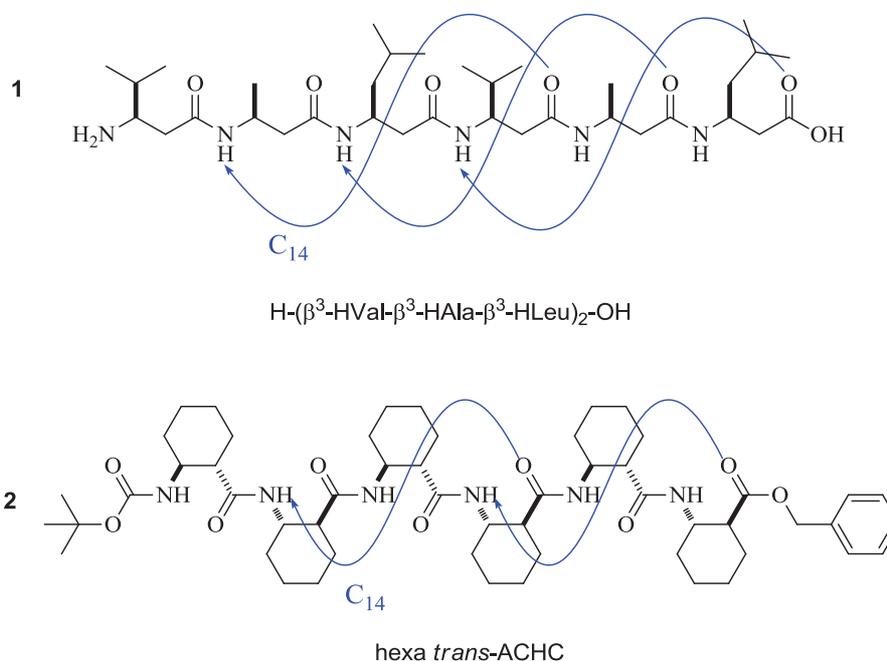


Figure 23 : Représentation de deux hélices 14.

Cette hélice gauche est stabilisée par un réseau de liaison hydrogène entre le résidu  $i$  et  $i+3$ , aligné le long de l'axe de l'hélice formant ainsi un macrodipôle. Elle possède un pas de 4,8 Å et 3 résidus par tour. L'hélice 14 adopte une structuration particulière qui limite le type de substituants autorisés en position axiale<sup>59</sup>. Ainsi, seuls les atomes H et F ou le groupement OH peuvent occuper cette position. Contrairement à l'incorporation d'Aib dans les  $\alpha$ -peptides<sup>60</sup> qui favorise l'hélicité, la formation de l'hélice dans les séquences comportant des homologues  $\beta^2$  et  $\beta^3$  d'Aib est défavorisée. Il en est de même pour des résidus tétrasubstitués<sup>61,62</sup>.

Par la suite, la synthèse d'hélices 14 solubles dans l'eau a été entreprise. L'équipe de S. Gellman a ainsi synthétisé des dérivés du *trans*-ACHC portant une fonction amine sur le cyclohexane<sup>63</sup>. L'acide *trans*-diaminocyclohexane carboxylique (*trans*-DCHC) a ensuite été incorporé dans une séquence en alternance avec le *trans*-ACHC. Les oligomères obtenus adoptent une structure en hélice 14 en milieu aqueux. Il en est de même pour les oligomères incorporant des résidus  $\beta^3$ -Lys en nombre limité (1 sur 3)<sup>64</sup>. Les groupes de D. Seebach<sup>65</sup>, W. F. Degrado<sup>66</sup> et A. Schepartz<sup>67</sup> se sont eux appuyés sur différents paramètres (formation de ponts salins, maximisation des interactions électrostatiques et incorporation de résidus  $\beta^3$

intrinsèquement favorables à la formation d'hélice) pour synthétiser des hélices 14 stables dans l'eau<sup>68</sup>.

### III.2.2.b. Les hélices 12

Ce type d'hélice a été décrit pour la première fois par S. Gellman et coll. à partir d'oligomères d'acides  $\beta$ -aminés contraints par un cycle à 5 chaînons : l'acide 2-aminocyclopentane carboxylique (ACPC)<sup>58</sup>. Elles n'ont à ce jour, jamais été retrouvées dans des oligomères d'acides  $\beta$ -aminés non contraints.

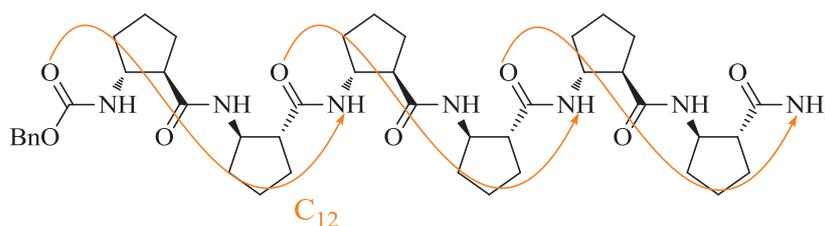


Figure 24 : Représentation d'une hélice 12.

Cette hélice est stabilisée par des liaisons hydrogène entre la fonction carbonyle du résidu  $i$  et le proton amide du résidu  $i+3$ . Elle est gauche avec des résidus ( $R,R$ )-*trans*-ACPC, possède 2,5 résidus par tour et un pas d'environ 5,5 Å. Ces premiers oligomères n'étant pas solubles dans l'eau, le groupe de S. Gellman a ensuite développé des dérivés plus hydrosolubles en utilisant des dérivés d'ACPC incorporant un azote directement dans le cycle ou porté par l'un des carbones cycliques.

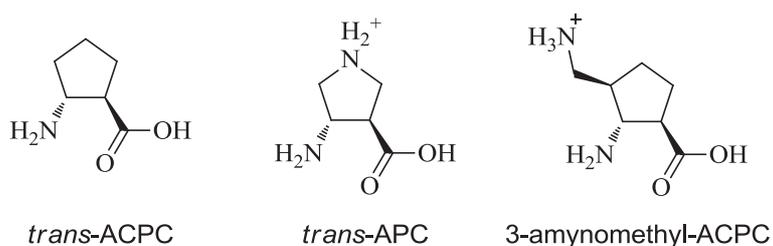


Figure 25 : Représentation du *trans*-ACPC et des dérivés hydrosolubles acide *trans*-3-aminopyrrolidine-4-carboxylique (*trans*-APC) et 3-aminométhyl-*trans*-ACPC.

Des oligomères ACPC/APC<sup>69</sup> ou ACPC/3-aminométhyl-ACPC<sup>70</sup> ont ensuite été synthétisés et les analyses structurales en milieu aqueux ont confirmé leur structuration en hélice 12. Un dérivé d'APC sulfonyle a aussi été synthétisé et incorporé dans des séquences APC/APC sulfonyle<sup>71</sup>. Cependant, ces substitutions en position 4 du *trans*-ACPC perturbent la formation de l'hélice 12. Néanmoins, l'incorporation d'un nombre limité d'acides  $\beta^2$  ou  $\beta^3$  aminés linéaires hydrophiles dans ces séquences permet de conserver la structure en hélice 12 dans l'eau.

De nouveaux acides  $\beta$ -aminés contraints ont par la suite été synthétisés et oligomérisés. L'acide *trans*-aminocyclobutane carboxylique (*trans*-ACBC)<sup>72</sup> puis le *trans*-furanoïde- $\beta$ -aminoacide (*trans*-FAA)<sup>73</sup> qui correspond au *trans*-APC où l'atome d'azote est remplacé par un atome d'oxygène.

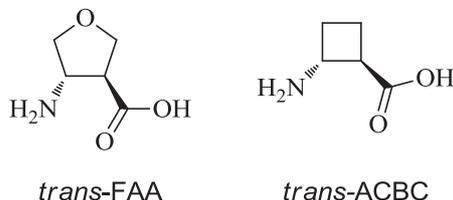


Figure 26 : Représentation du *trans*-FAA et du *trans*-ACBC.

Les oligomères de ces composés ont eux aussi adopté des structures en hélices 12. Il faut néanmoins préciser que les oligomères de *trans*-ACBC possèdent une signature dichroïque légèrement différente des *trans*-ACPC.

### III.2.2.c. Les hélices 10

D'abord décrite par l'équipe de H-J. Hofmann grâce à des calculs théoriques<sup>74</sup>, l'hélice 10 a été mise en évidence expérimentalement par le groupe de G. W. J. Fleet dans des oligomères de polyoxétane<sup>75</sup>.

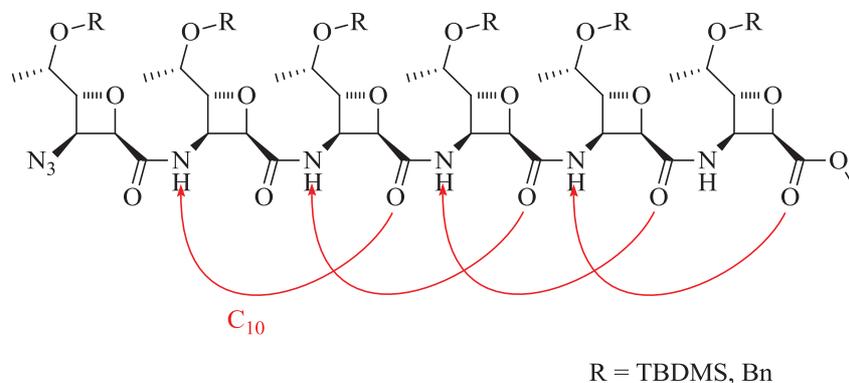


Figure 27 : Hexamère de motifs oxétanes stabilisé par des pseudo-cycles  $C_{10}$  (en rouge).

Ces hélices sont stabilisées par des liaisons hydrogène entre les groupements carbonyle du résidu  $i+1$  et les protons amides du résidu  $i$  qui forment un pseudo cycle  $C_{10}$ . Ces structures ont plus tard été décrites pour le tétramère de l'acide *trans*-2-aminocyclohexane carboxylique (ACHC) non protégé. Les oligomères protégés ou plus longs adoptent eux une structure en hélice 14<sup>76</sup>. Cette structuration différente en fonction de la longueur de l'oligomère est appelé polymorphisme conformationnel. Il est intéressant de noter que ce phénomène se produit également dans les peptides naturels entre les hélices

$3_{10}$  et  $\alpha^7$ . Il est dépendant de la longueur de la séquence ainsi que du solvant dans lequel il est étudié.

### III.2.2.d. Les hélices 10/12

L'équipe de D. Seebach a identifié cette conformation dans les oligomères alternant les acides  $\beta^2$ -aminés et  $\beta^3$ -aminés<sup>46</sup>. Ce type de structure est adopté pour les oligomères alternés de types  $\beta^2/\beta^3$ ,  $\beta^3/\beta^2$  et  $\beta^3/\beta^2/\beta^3$  ou construit en blocs  $(\beta^3)_3/(\beta^2)_3$  par exemple.

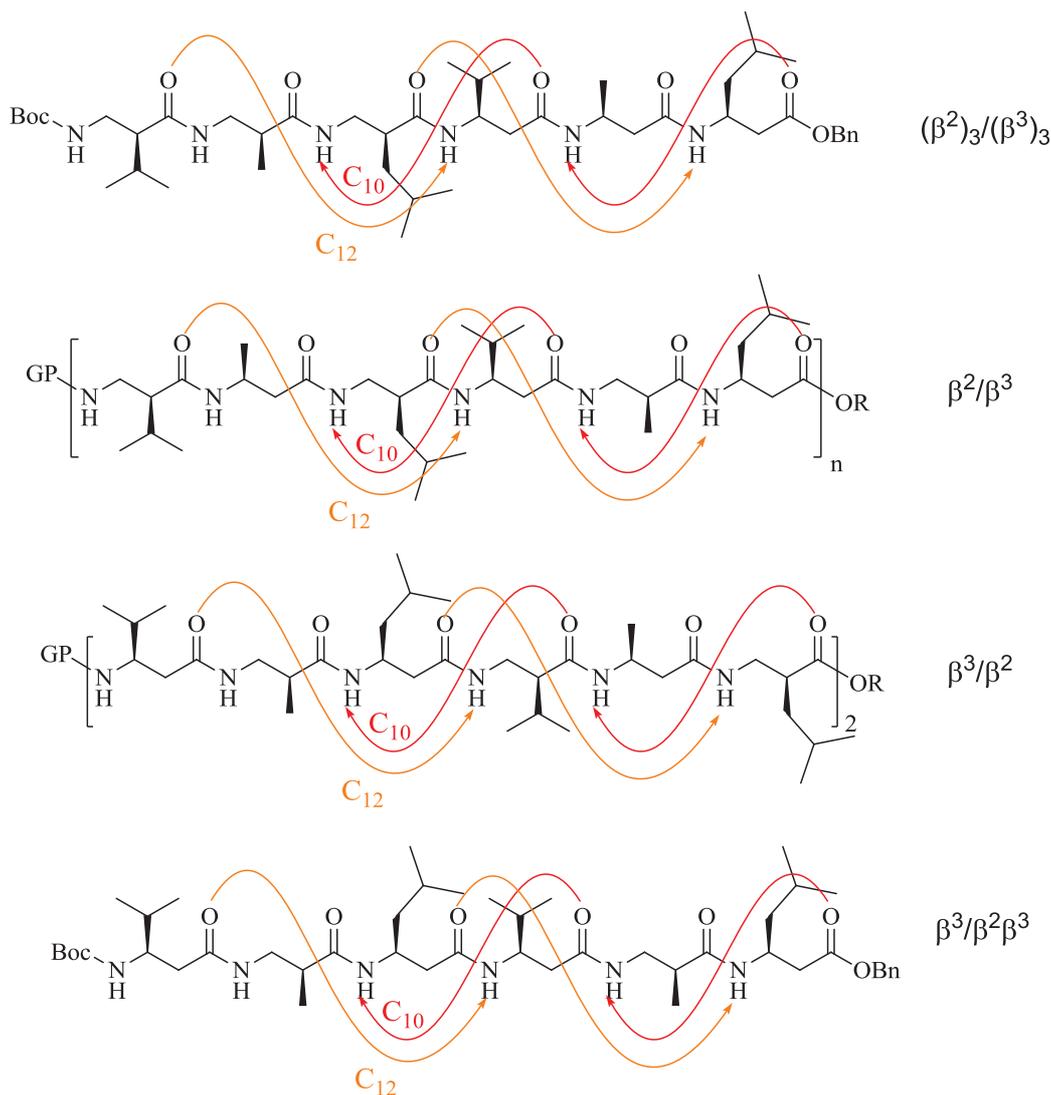


Figure 28 : Oligomères hybrides d'acides  $\beta^2$  et  $\beta^3$  aminés adoptant une structure en hélice 12/10 (pseudo-cycle  $C_{12}$  en orange et pseudo-cycle  $C_{10}$  en rouge).

Ces hélices sont stabilisées par deux types de liaisons hydrogène typiques des hélices 12 et des hélices 10 entre la fonction carbonyle du résidu  $i$  et le proton amide du résidu  $i+3$  et entre le groupement carbonyle du résidu  $i+1$  et le proton amide du résidu  $i$  respectivement. Elle possède 2,5 résidus par tour et un pas de 5,25 Å.

### III.2.2.e. Les hélices 8

Ce type d'hélice a été identifié par l'équipe de D. Seebach dans les oligomères d'acide 1-(aminométhyl)cyclopropanecarboxylique ( $\beta^{2,2}$ -Ac<sub>3</sub>C)<sup>78</sup> mais n'a jamais été observé pour des oligomères constitués d'acides aminés protéinogéniques homologués. Cette hélice droite possède des valeurs d'angles  $\Phi = -135^\circ$ ,  $\theta = +58^\circ$  et  $\Psi = +28^\circ$  et est stabilisée par des liaisons hydrogène entre la fonction carbonyle du résidu *i* et le proton amide du résidu *i*+2, formant des pseudo-cycles C<sub>8</sub>. Elle possède environ deux résidus par tour et un pas de 4,7-4,9 Å.

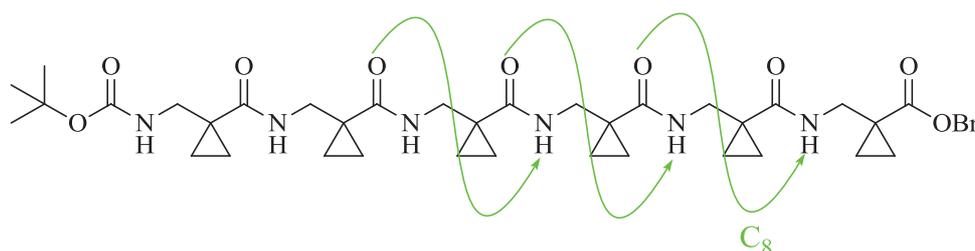


Figure 29 : Représentation du hexa  $\beta^{2,2}$ -Ac<sub>3</sub>C avec le pseudo-cycle C<sub>8</sub> stabilisant l'hélice 8 (en vert).

Ce type de structure a été confirmé par l'étude de  $\beta^{2,3}$  oligomères, possédant un groupement hydroxyle en position 2<sup>79</sup> : les acides (2*R*,3*S*)-2-hydroxy-3-alkyl-amino carboxyliques.

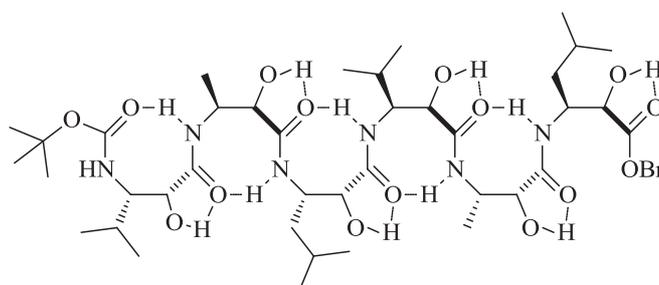


Figure 30 : Représentation d'un  $\beta$ -hexapeptide composé d'acides (2*R*,3*S*)-2-hydroxy-3-alkyl-amino carboxyliques formant des pseudo-cycles à 8-atomes.

Ces structures sont aussi adoptées par certains analogues de  $\beta$ -peptides. C'est le cas des  $\alpha$ -aminopeptides<sup>80,81</sup> et des aza- $\beta^3$ -peptides<sup>82</sup> qui ne seront cependant pas traités dans ce manuscrit.

### III.2.3. Les $\gamma$ -peptides

Les foldamères synthétisés à partir d'acides  $\gamma$ -aminés ont été moins étudiés que leurs homologues inférieurs, les  $\beta$ -peptides, bien qu'ils présentent des propriétés intéressantes. Comme je l'ai évoqué précédemment, les acides  $\gamma$ -aminés comportent une homologation

supplémentaire. Ce groupement méthylène supplémentaire augmente le nombre de conformation possible et réduit le nombre de liaison hydrogène possible. Cependant, les  $\gamma$ -peptides sont capables d'adopter des structures bien définies. De plus, il est intéressant de noter que les  $\gamma$ -peptides nécessitent moins de résidus que les  $\beta$ -oligomères pour se structurer et peuvent adopter une conformation de type hélice 14 ou hélice 9.

### III.2.3.a. Les hélices 14

Le groupe de D. Seebach a étudié la structure d'un  $\gamma^4$ -hexapeptide, le H-( $\gamma^4$ Val- $\gamma^4$ Ala- $\gamma^4$ Leu)<sub>2</sub>-OH. Celui-ci adopte une structure en hélice-14 identique à celle décrite pour les  $\beta$ -oligomères.

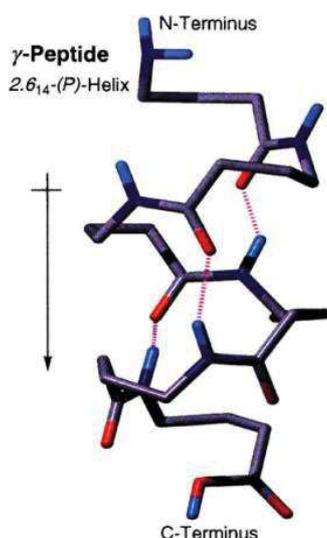


Figure 31 : Structure hélicoïdale d'un hexa  $\gamma^4$ -peptides<sup>83</sup>.

Le groupe de S. Hanessian a, pour sa part, étudié les tétra, hexa et octa-  $\gamma^4$ -peptides et les tétra et hexa  $\gamma^4$ -peptides  $\alpha$ -méthylés<sup>84</sup>. Il a démontré que ces oligomères adoptent des structures hélicoïdales et que cette structuration dépend de la configuration du C $\alpha$ . Si les oligomères (S, $\alpha$ ) méthylés adoptent une structure en hélice 14, les oligomères (R, $\alpha$ ) méthylés, en revanche, n'adoptent pas de structure secondaire hélicoïdale. Ils ont ensuite étudié des oligomères d'acides  $\gamma^{2,4}$  aminés afin d'évaluer l'importance de la configuration du C $\alpha$  pour la structuration. Ils ont démontré que les  $\gamma^{2R,4R}$ -peptides adoptent une conformation de coude inversé en solution tandis que les  $\gamma^{2S,4R}$ -peptides adoptent une structure en hélice 14<sup>85</sup>.

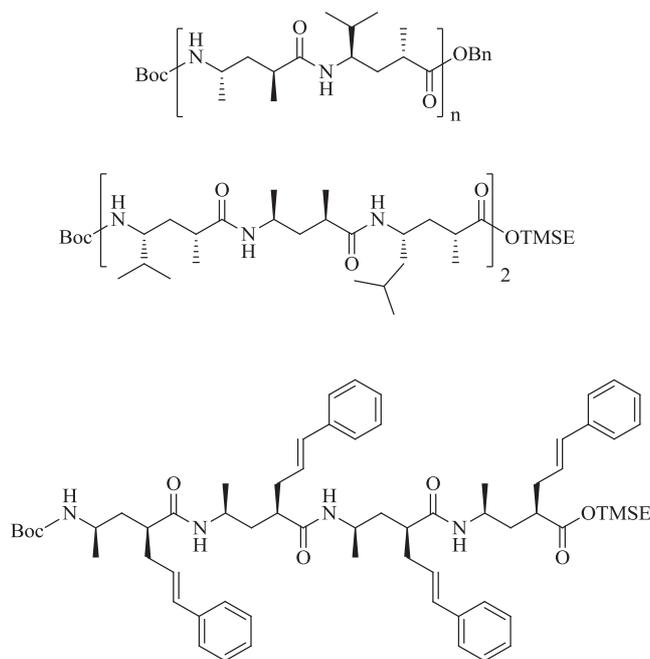


Figure 32 : Représentation des différents  $\gamma^{2,4}$ -oligomères.

### III.2.3.b. Les hélices 9

Prédites par l'équipe de H.-J. Hofmann<sup>86,87</sup> pour des acides  $\gamma$ -aminés vinyliques, ces structures en hélices 9 ont ensuite été confirmées avec des oligomères alternant des acides  $\gamma$ -amino butyrique (GABA) et des résidus monosubstitués en position  $\gamma^4$  par un groupement saccharidique.

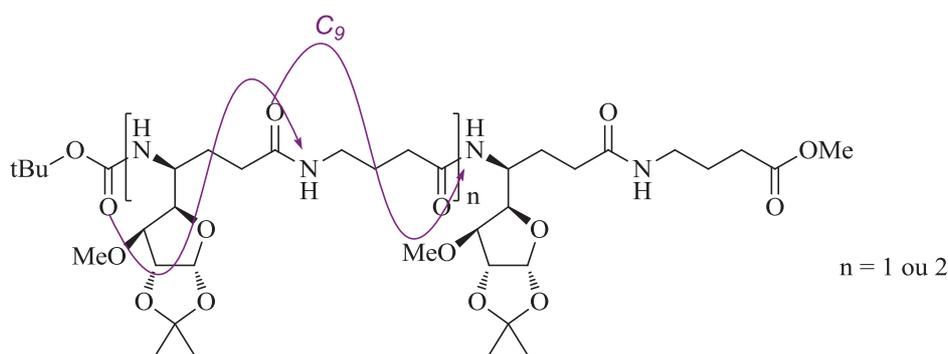


Figure 33 :  $\gamma^4$ -oligomères stabilisés en hélice par un pseudo-cycle  $C_9$ .

Ces structures ont aussi été décrites au sein de notre laboratoire avec des oligomères d'acides  $\gamma$ -aminés dérivés de thiazole : l'acide 4-amino-(méthyl)-1,3-thiazole-5-carboxylique (ATC)<sup>88</sup>.

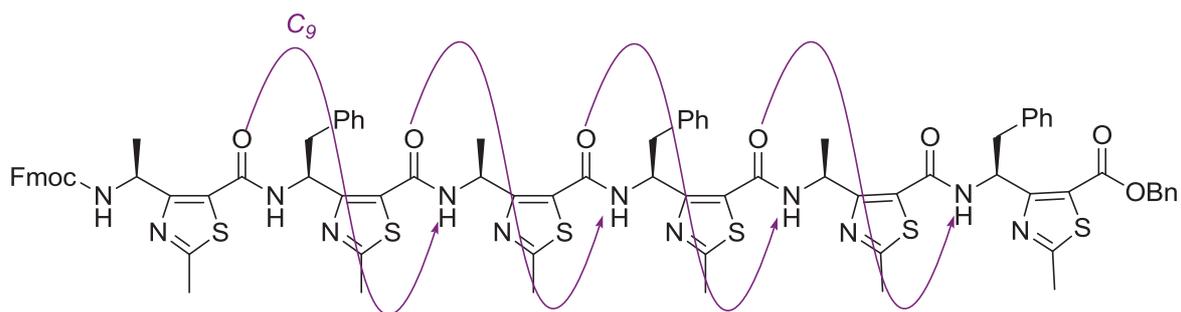


Figure 34 : Représentation de l'hexa-ATC stabilisé par des pseudo-cycles  $C_9$  (en violet).

Un autre type de structure a été décrit par l'équipe de M. D. Smith à partir d'oligomères incorporant des acides (1R,2R)-2-(aminométhyl)cyclopropanecarboxylique. Ces  $\gamma$ -peptides contraints par un cyclopropane sur les carbones  $\gamma^{2,3}$  adoptent à l'état solide une structure en feuillets  $\beta$  parallèles qui sont stabilisés par des liaisons hydrogène bifides entre la fonction carbonyle, le proton amide et le proton du carbone  $\alpha$ <sup>89</sup>.

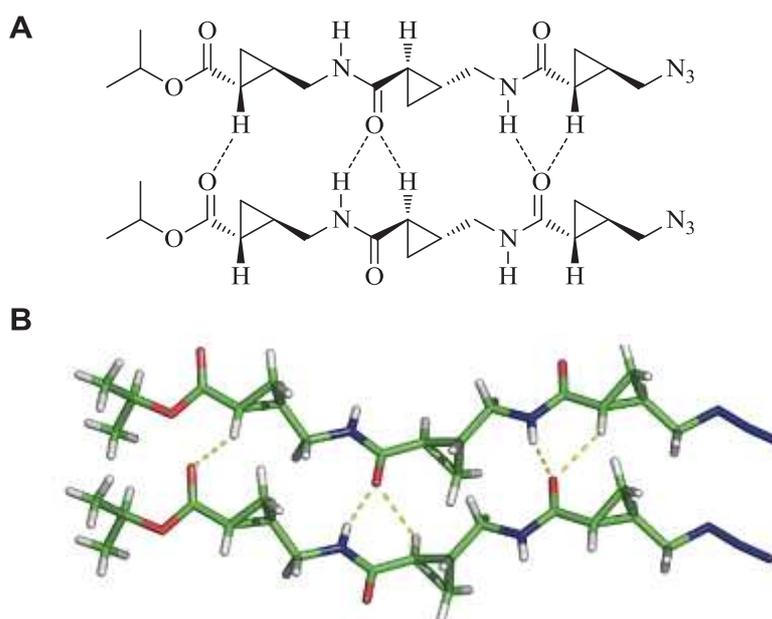


Figure 35 : A) Oligomères de *trans*- $\gamma^{2,3}$ -cyclopropane stabilisés en feuillet  $\beta$  parallèle par des liaisons hydrogène bifides. B) Structure cristallographique<sup>89</sup>.

Les  $\gamma$ -peptides offrent de multiples possibilités pour la synthèse de foldamères. Les diverses conformations adoptées dépendent de la substitution des résidus. Les structures peuvent être modulées par la taille, la position et la flexibilité des cycles pour les résidus contraints ou par la configuration et la position des substituants pour les résidus linéaires.

### III.2.4. Les $\delta$ -peptides

#### III.2.4.a. Introduction

Les  $\delta$ -peptides restent une classe de foldamères moins étudiée que les analogues de longueurs inférieures tels que les  $\beta$  ou  $\gamma$  peptides. Les acides  $\delta$ -aminés sont des isostères de dipeptides qui présentent un intérêt, à la fois comme mimes de coudes et comme unités pour la synthèse de foldamères.

Ces acides aminés diffèrent de leurs homologues dipeptidiques entre autre par un degré de liberté plus important sur la liaison isostère de la liaison amide (angle  $\zeta$ ). Afin de mieux contrôler l'orientation de cette liaison carbone-carbone, certains groupes l'ont substituée par une liaison alcène *trans*<sup>90, 91</sup>.

#### III.2.4.b. Les premiers $\delta$ -peptides

Tous les oligomères appelés  $\delta$ -peptides décrits ici ne dérivent pas de blocs peptidiques. Les premiers types de  $\delta$ -peptidomimétiques développés furent des carbopeptoides, préparés à partir de furanoses ou pyranoses. Dans un premier temps utilisés comme mimes de coudes  $\beta$ , leur utilisation comme unités monomériques pour la synthèse de foldamères s'est développée. J. Gervay et son équipe ont ainsi développé des oligomères d'acides sialiques, les sialooligomères. Les études structurales par RMN et dichroïsme circulaire de ces composés ont montré qu'ils adoptent en solution des structures hélicoïdales, et ce à partir d'oligomères comportant seulement trois résidus<sup>92</sup>.

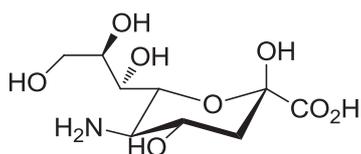


Figure 36 : Acide neuraminique.

Pour les oligomères de taille plus importante (à partir de sept résidus) un polymorphisme conformationnel a été observé. Les oligomères comportant quatre, cinq ou six résidus adopteraient préférentiellement la structure d'une hélice 16 tandis que ceux comportant huit résidus adopteraient préférentiellement celle d'une hélice 22. L'heptamère, oscillerait quant à lui entre les deux types de structures. Les différentes hélices sont représentées ci-dessous<sup>93</sup>.

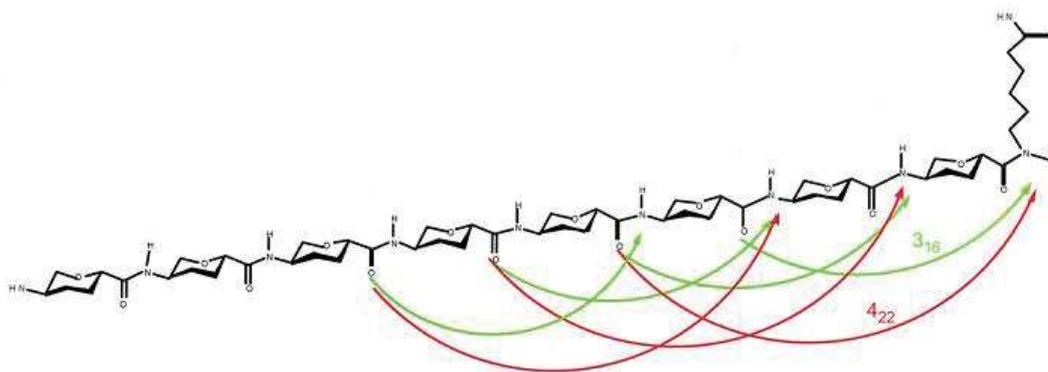


Figure 37 : Liaisons hydrogène des structures d'hélices 16 et 22.

L'équipe de G. W. J. Fleet a décrit plusieurs oligomères de furanoses dont la structure secondaire dépend à la fois de la stéréochimie de la chaîne principale mais aussi de celle des groupements sur le cycle furanique<sup>94</sup>. Deux types d'oligomères ont été mis en avant : les oligomères liés par des liaisons 1,4-*cis* qui adoptent une conformation de ruban (Figure 38), formant des pseudo-cycles  $C_{10}$  avec une liaison hydrogène entre le carbonyle du résidu  $i$  et le proton de la fonction amide du résidu  $i+2$ . En revanche, les oligomères liés par des liaisons 1,4-*trans* de longueur suffisamment importante (octamère) adoptent eux une conformation d'hélice gauche avec un pseudo-cycle  $C_{16}$  et des liaisons hydrogène entre le carbonyle du résidu  $i$  et le proton amide du résidu  $i+3$  (Figure 38)<sup>95</sup>.

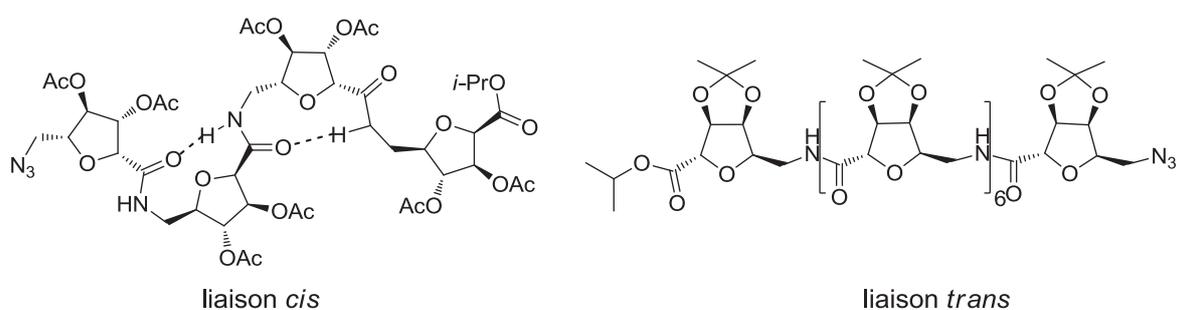


Figure 38 : *cis* et *trans*-furanosialooligomères.

Des résidus contraints par des cycles (comme pour les acides  $\beta$  ou  $\gamma$  aminés) ont ensuite été utilisés pour la synthèse de  $\delta$ -oligomères.

### III.2.4.c. Les acides $\delta$ -aminés contraints

Divers acides  $\delta$ -aminés contraints aromatiques non dérivés d'acides aminés protéinogéniques ont permis de développer un certain nombre de systèmes hélicoïdaux, tels que les oligomères de quinoline, développés et intensivement étudiés par l'équipe de Y.

Huc<sup>96</sup>. Les études RMN et cristallographiques de ces oligomères ont montré qu'une liaison hydrogène se forme entre le proton amide et les deux azotes des quinolines adjacentes.

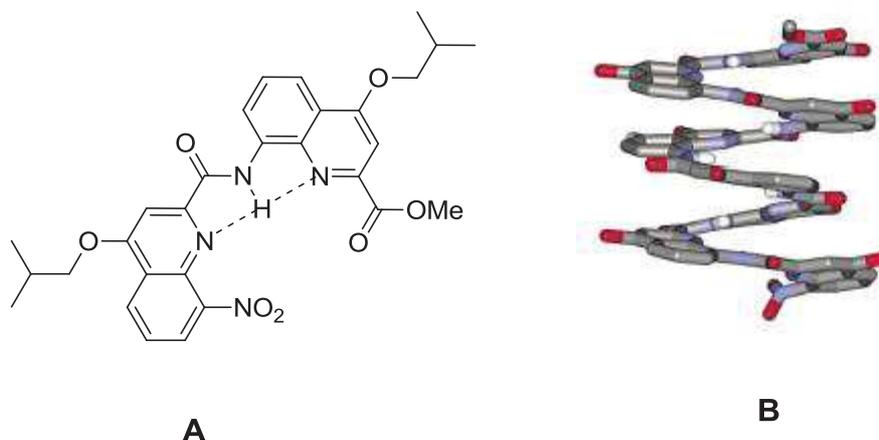


Figure 39 : A) Oligoamides de quinoline B) structure cristallographique d'un octamère<sup>96</sup>.

Des oligomères d'acide 2-aminophenoxy acétique ont été synthétisés par l'équipe de K. Ogura<sup>97</sup>. Ils adoptent une structure d'hélice  $2_1$  stabilisée par des liaisons hydrogène entre l'atome d'oxygène de la fonction éther et les protons des deux fonctions amides adjacentes (Figure 40).

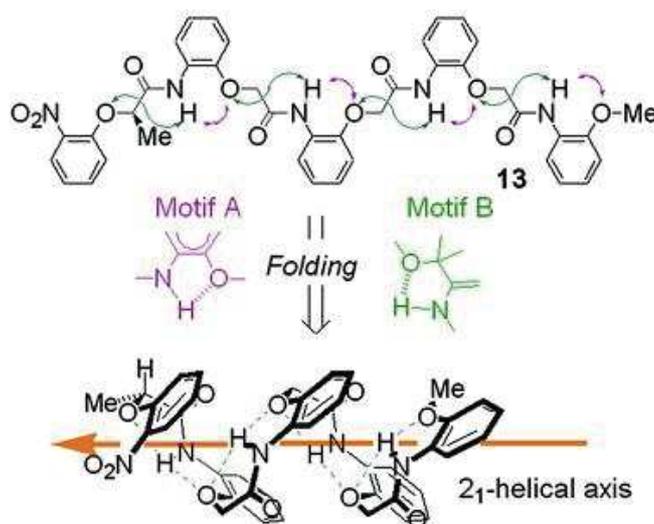


Figure 40 : Repliement de l'oligomère stabilisé par deux motifs de liaisons hydrogène différents<sup>97</sup>.

Des oligomères d'acide 2-(aminométhyl)phénylacétique<sup>98</sup> (AMPA, Figure 41, A) ont été développés au sein de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron. Les études par

dichroïsme circulaire, infrarouge et RMN ont montré qu'ils adoptent une structure d'hélice droite avec un pas de 3,36 Å et 3,8 résidus par tour. Cette hélice est stabilisée par des liaisons hydrogène entre le carbonyle du résidu  $i$  et le proton amide du résidu  $i+2$  (Figure 41, B).

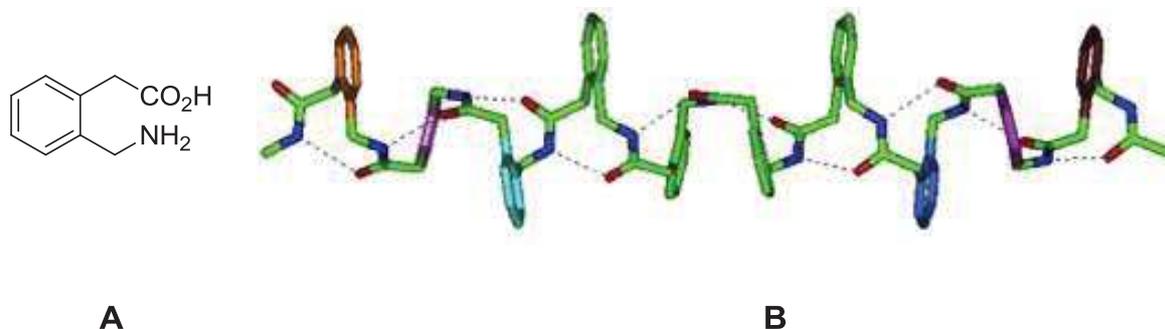


Figure 41 : AMPA et oligomère d'AMPA.

Contrairement aux  $\beta$  et  $\gamma$ -foldamères, les  $\delta$ -foldamères décrits à ce jour sont constitués uniquement de résidus contraints.

### III.3. Les peptoïdes et les oligomères de motifs contraints

#### III.3.1. Les peptoïdes ou polyglycines N-substituées

Ces oligomères sont des analogues de peptides où la chaîne latérale n'est plus portée par le carbone  $\alpha$  mais par le NH  $\alpha$  de la liaison peptidique. Cette modification a deux conséquences : d'une part la disparition de la stéréochimie de la chaîne principale et d'autre part, l'impossibilité de former des liaisons hydrogène intramoléculaires. Malgré l'absence de liaison hydrogène dans cette famille de composés, ils sont capables d'adopter des structures secondaires stables et bien définies. Dans ce domaine, l'équipe de A. E. Barron<sup>99</sup> a montré que des peptoïdes portant des chaînes latérales aromatiques adoptent une structure hélicoïdale stable à partir de 5 résidus avec environ 3 résidus par tour et un pas d'hélice de 6 Å.

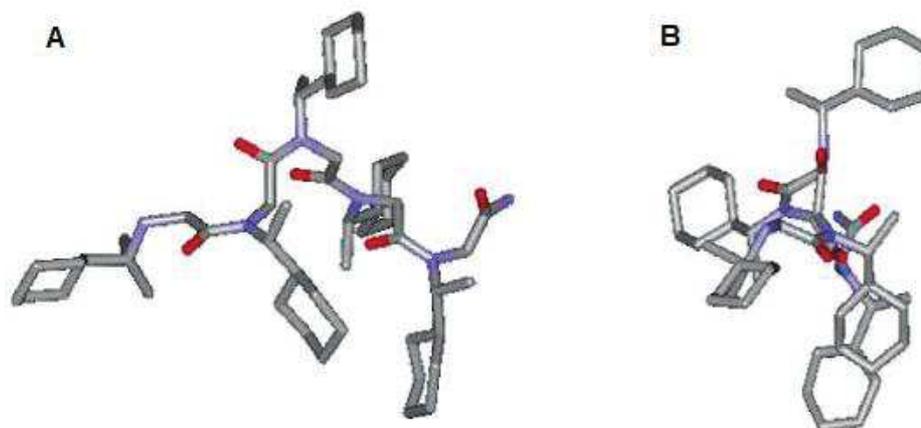


Figure 42 : Structure cristalline du penta (R)-N-(1-cyclohexylethyl)glycine (Nrch<sub>5</sub>)<sup>99</sup>.

Un cas très particulier a été décrit pour le nona-oligomère de (R)-N-(1-phényléthyl)glycine. Alors que les oligomères plus courts ou plus longs adoptent une structure hélicoïdale identique, celui-ci adopte une structure particulière en boucle tissée<sup>100</sup> (Figure 43).

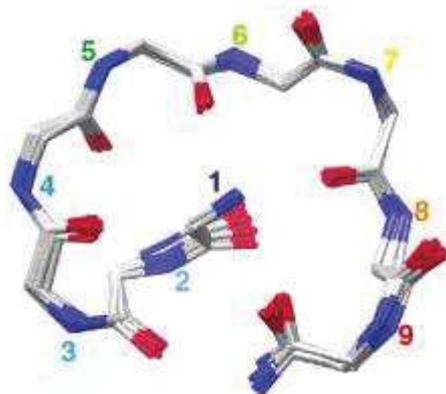


Figure 43 : Structure en solution de l'oligomère Nspe<sub>9</sub><sup>100</sup>.

### III.3.2. Les oligomères de motifs contraints

#### III.3.2.a. Les oxazolidin-ones

L'équipe de C. Tomasini a développé des oligomères incorporant des acides aminés cycliques : les 5-méthyl trans-(4S,5R)-4-carboxybenzyloxazolidin-2-one (Oxd)<sup>101</sup>. Ce monomère comporte un cycle à 5 chaînons entre l'amine et le C $\alpha$ , la 2-oxazolidinone.

Les oligomères mixtes de type (AA-D-Oxd)<sub>n</sub> adoptent une structure de type ruban. Les différentes analyses spectrales montrent que cette structure est adoptée à partir du pentamère (n=5) et se stabilise avec l'augmentation du nombre de motifs oligomérisés<sup>102</sup>. La

structure la plus stable a été calculée et est représentée ci-dessous. Cette structure est en accord avec les mesures spectrales et représente une structure en ruban.

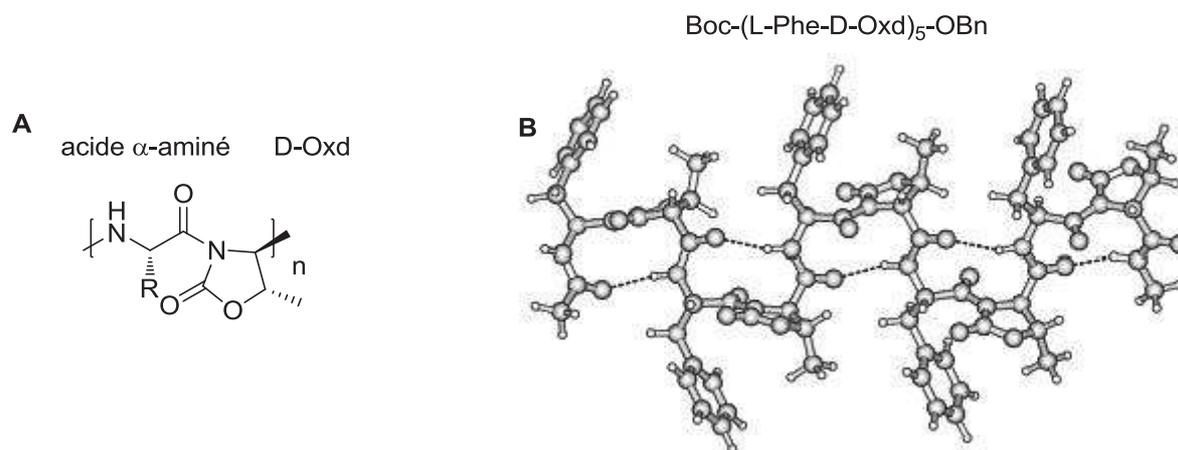


Figure 44 : Oligomères d'oxazolidinone<sup>102</sup>.

### III.3.2.b. Les acides pyroglutamiques (pGlu)

L'équipe de C. Tomasini<sup>101</sup> a aussi employé des acides pyroglutamiques pour la synthèse d'oligomères. Ces motifs contraints par un  $\gamma$ -lactame adoptent une structure hélicoïdale de type PPII lorsqu'ils sont oligomérisés.

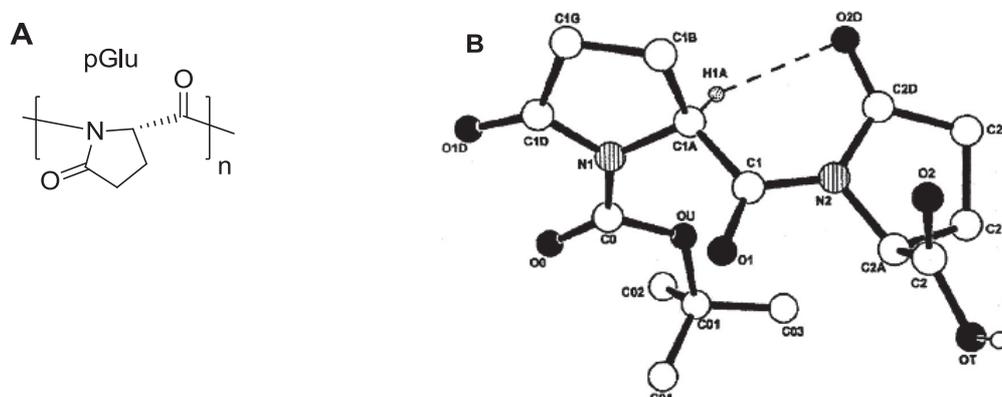


Figure 45 : Oligomères de pGlu. A) poly acide pyroglutamique. (pGlu) B) Structure cristalline du dimère Boc-(L-pGlu)<sub>2</sub>-OH<sup>101</sup>.

### III.3.2.c. Le motif $\gamma$ -lactame

Outre les pGlu et Oxd décrits ci-dessus, un autre type de  $\gamma$ -lactame a été employé par l'équipe de C. Toniolo : l'acide 4-aminopyroglutamique (aPy)<sup>103</sup>. La liaison amide du lactame est de configuration *cis* et son incorporation dans la séquence induit une conformation *trans* dans les autres liaisons amides de la chaîne principale. Cette alternance

*trans/cis* aboutit à la formation d'un oligomère rigide qui adopte une structure en croissant en milieu solide (Figure 46,B).

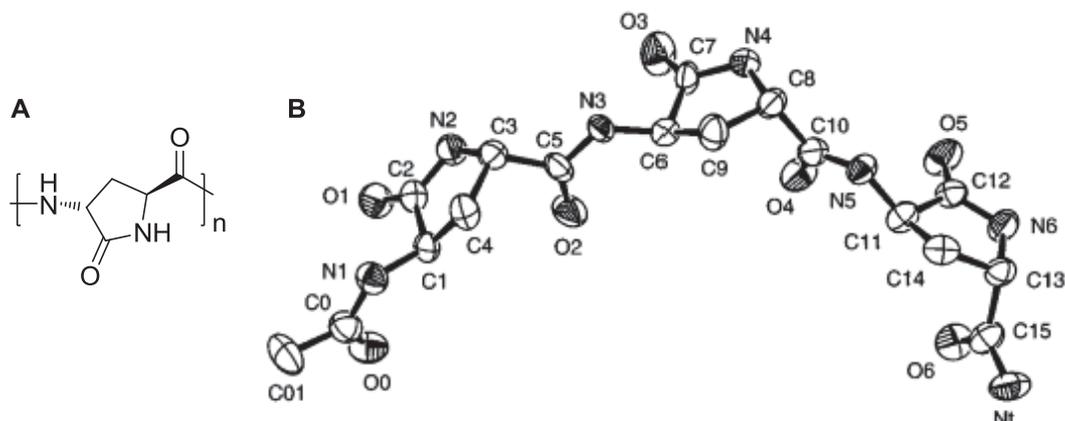


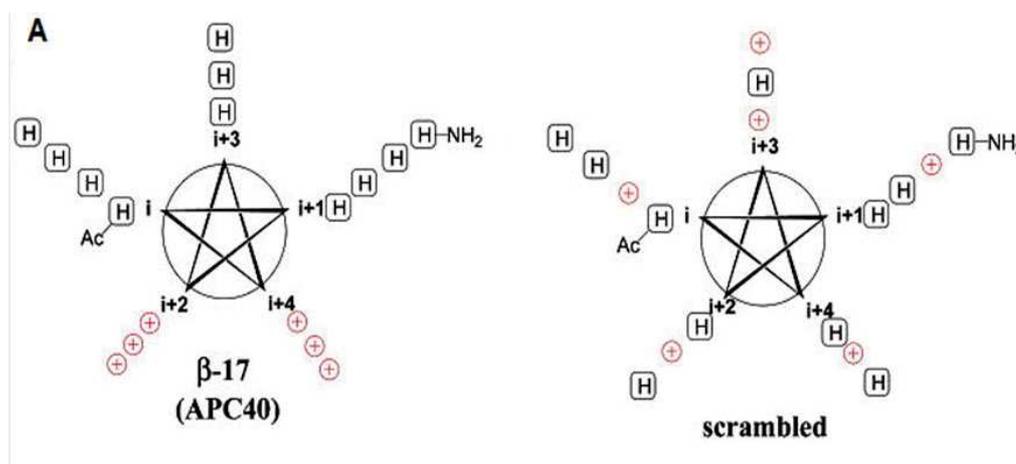
Figure 46 : Représentation de A) l'acide 4-aminopyroglutamique (aPy) et B) de la structure cristalline du trimère Ac-[(S,R)-aPy]<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub><sup>103</sup>.

### III.4. Propriétés des foldamères

Les foldamères offrent des outils précieux pour mieux comprendre les mécanismes de repliements des protéines et d'interaction entre protéines (PPI), protéines/ADN,...<sup>104,105</sup>. Ils constituent aussi une famille de molécules attractives en chimie médicinale pour développer de façon rationnelle, par exemple, des antimicrobiens (sur la base de peptides amphipatiques), des inhibiteurs et activateurs de PPI ou encore des vecteurs de pénétration intracellulaire.

#### III.4.1. Les foldamères antimicrobiens

Les peptides des défenses naturelles, tels que les magainines<sup>106</sup> et cécropines<sup>107</sup>, sont des antibiotiques qui adoptent une structure hélicoïdale amphipatique avec une face lipophile opposée à une face hydrophile. Aussi, les oligomères capables d'adopter une structure similaire sont de bons candidats pour développer des antimicrobiens. Plusieurs exemples de composés présentant ces caractéristiques confirment le potentiel antimicrobien des foldamères. L'équipe de S. Gellman a décrit une première génération de foldamères antimicrobiens basés sur des  $\beta$ -peptides<sup>108</sup> (Figure 47) et une seconde génération sur des peptides hybrides ( $\alpha/\beta$ -peptides)<sup>109</sup>. Si le caractère amphipatique apparaît comme déterminant pour l'effet antimicrobien des  $\beta$ -peptides, cette caractéristique n'est pas nécessaire pour les peptides hybrides ( $\alpha/\beta$ -peptides)<sup>109</sup>.



**Figure 47 :** A) Représentation en roue hélicoïdale de  $\beta$ -peptides de ACPC/APC (H correspond au résidu hydrophobe ACPC et + au résidu hydrophile APC) B) comparaison de la concentration minimale d'inhibition (en  $\mu\text{g/mL}$ ) de la Ala<sup>8,13,18</sup>-magainine II (un dérivé de la magainine) avec un oligomère ACPC/APC amphipatique et mélangé<sup>108</sup>.

L'équipe de G. Guichard a décrit des oligourées courtes (7 à 8 résidus) possédant des propriétés antibactériennes prometteuses<sup>110</sup>. Plus récemment, ils ont aussi mis en avant les propriétés antibactériennes d'oligomères dont la chaîne principale comporte un mélange de liaisons urées et amides<sup>111</sup>.

### III.4.2. Foldamères inhibiteurs d'interactions protéines/protéines

Les PPI jouent un rôle prépondérant dans la majorité des processus biologiques et sont donc des cibles thérapeutiques de première importance. Les foldamères, grâce à leur capacité à imiter les différentes structures secondaires des protéines et à répartir de manière contrôlée les chaînes latérales des acides aminés essentiels à l'interaction, sont des outils adaptés pour développer des modulateurs/inhibiteurs de PPI.

A. Schepartz et coll. ont développé divers  $\beta$ -peptides hélicoïdaux capables d'inhiber les interactions entre la protéine apoptotique p53 et la protéine HDM2 (responsable de son inhibition)<sup>112</sup> ainsi que hDMX. Certains ont, de plus, montré des capacités d'internalisation sur des cellules de cancer du côlon HCT-116<sup>113</sup>.

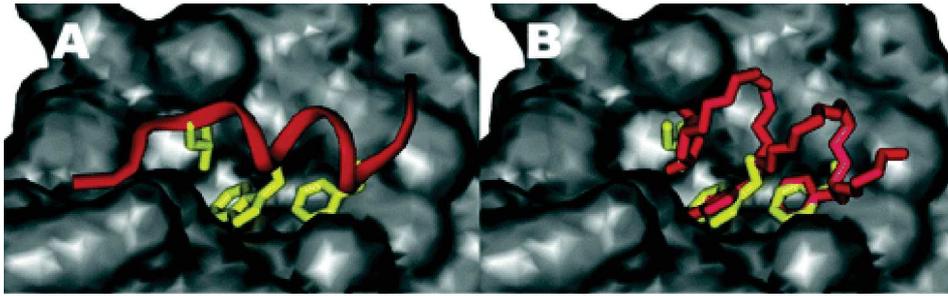


Figure 48 : A) Structure cristalline du peptide lié au site d'interaction de hDM2. Les chaînes latérales de F19, W23 et L26 sont en jaune. B) Modélisation d'un  $\beta$ -peptide (rouge) lié au même domaine, les chaînes latérales du peptide naturel en jaune sont conservées pour comparaison<sup>112</sup>.

L'équipe de A. D. Hamilton a également développé des inhibiteurs de PPI de protéines impliquées dans l'apoptose (bak BH3/ Bcl-xL) basés sur des oligoamides<sup>114</sup> et des oligomères de terphenyl<sup>115, 116</sup>. Plus récemment, des oligomères de benzoylurée ont été utilisés par la même équipe pour cibler la zone d'interaction Bcl/Bak<sup>117</sup>.

L'équipe de S. Gellman a développé un foldamère hybride  $\alpha/\beta$  peptide capable de se lier à la protéine Bcl-xL avec une bonne affinité<sup>118</sup>.

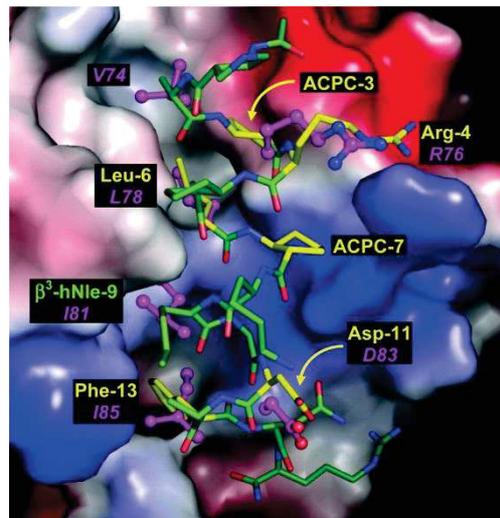


Figure 49 : Modélisation d'un foldamère hybride ( $\alpha/\beta+\alpha$ ) (vert foncé) dans le site de reconnaissance à BH3 de Bcl-xL. Les chaînes latérales, dont la substitution par Ala ou ACPC a entraîné une perte d'affinité, sont représentées en jaune. Les chaînes latérales clés de Bak BH3 sont représentées en magenta<sup>119</sup>.

D'autres foldamères sont également capables de moduler les interactions entre ces protéines<sup>120</sup>. Ces dernières années, les foldamères ont permis d'identifier des inhibiteurs d'interactions protéine-protéine sur d'autres cibles thérapeutique comme la  $\gamma$ -secrétase<sup>121</sup>, une protéine impliquée dans la synthèse du peptide  $\beta$ -amyloïde (Alzheimer) ou le complexe gp120/gp41 (VIH).

### III.5. Conclusion

Les foldamères sont une classe de composés aux multiples facettes. Leur capacité à reproduire la structure secondaire des protéines ainsi que leur résistance accrue aux protéases leur permet d'avoir de nombreuses applications. Ils sont utilisés comme inhibiteurs de PPI, antimicrobiens ou machines moléculaires<sup>122</sup> entre autre. Ils permettent ainsi d'étudier de manière plus poussée les interactions entre protéines et ligands ou le repliement des protéines. Parmi les multiples propriétés qu'ils offrent, l'habilité à traverser les membranes cellulaires et ainsi à agir comme vecteurs de pénétration intracellulaire est, elle aussi, un sujet particulièrement étudié. En effet, traverser la membrane cellulaire est un mécanisme complexe et de nombreuses molécules thérapeutiques sont incapables de le faire seule. La vectorisation est la réponse du chimiste médicinal pour permettre à ces molécules de passer cette barrière. L'objectif de cette thèse étant de développer de nouveaux foldamères pénétrants, le prochain chapitre de cette partie est dédié à la vectorisation.

## **IV. Traverser la membrane cellulaire : la vectorisation**

La membrane plasmique est une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées des protéines de manière intégrale ou partielle, des molécules de cholestérol et des oligosaccharides. Cette bicouche forme le socle de la membrane et constitue une barrière vis-à-vis des molécules hydrophiles. Néanmoins, la membrane cellulaire n'est pas qu'une barrière imperméable avec un rôle de compartimentation, elle assure diverses fonctions notamment via les protéines et les oligosaccharides qui la composent (ségrégation de composés chimiques, échanges de matière, support d'activités enzymatiques, ...). Les protéines membranaires permettent le transport de molécules spécifiques (protéines canaux) et la transduction de signaux chimiques entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme (récepteurs membranaires). La surface extérieure de cette membrane est, de plus, recouverte d'un revêtement fibreux composé d'oligosaccharides, appelé glycocalyx (enveloppe de sucre) ou manteau cellulaire qui joue plusieurs rôles. Ce revêtement constitue un « ciment » de 10 à 20 nm d'épaisseur, toujours présent entre deux cellules. Il constitue une structure lâche et poreuse, facilement traversée par l'eau, les ions ou les petites molécules. Les polysaccharides qui constituent ce manteau sont liés de manière covalente à des lipides (glycolipides) ou des protéines (glycoprotéines ou protéoglycanes lorsque la masse en saccharides et dérivés représente plus de 90% du poids total de la molécule).

La membrane cellulaire est asymétrique, la couche lipidique du côté extracellulaire n'ayant pas les mêmes fonctions ni la même composition que celle du côté intracellulaire (Figure 50).

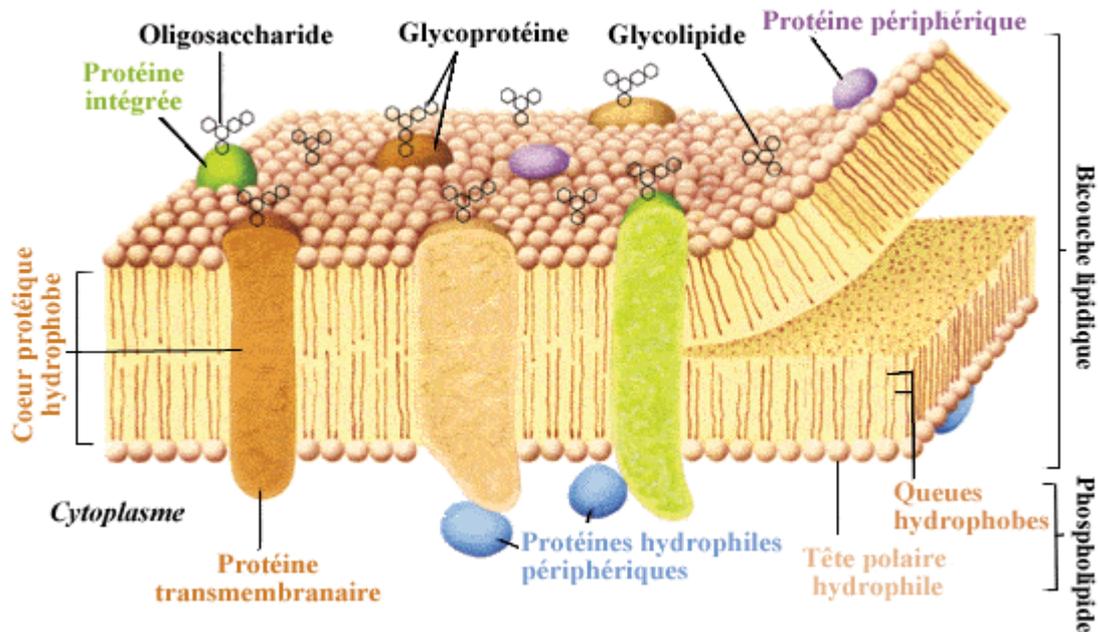


Figure 50 : Coupe transversale de la membrane cellulaire.

Ce schéma illustre l'asymétrie de la membrane cellulaire, où toutes les molécules glycosylées (glycoprotéines, glycolipides et oligosaccharides) sont situées du côté extracellulaire. Trois sortes de protéines sont représentées, les protéines intrinsèques ou intégrales qui forment des liens forts bien que non covalents avec les lipides et traversent la membrane de part et d'autre. Elles peuvent interagir à la fois avec le milieu extra et intracellulaire et sont nommées protéines transmembranaires. Une autre sorte de protéines intrinsèques, ne dépassant de la membrane cellulaire que du côté extra ou intracellulaire, sont nommées protéines intrinsèques externes ou internes respectivement. Enfin les protéines extrinsèques ou périphériques qui n'entrent pas directement en contact avec la bicouche mais sont liées par des liaisons faibles aux protéines qui la composent. De manière identique, on distingue les protéines extrinsèques internes et externes.

Les lipides sont des molécules amphiphiles avec une tête hydrophile polaire qui peut être chargée ou non chargée, liée à une ou plusieurs queues hydrophobes constituées de chaînes carbonées saturées ou insaturées. La bicouche lipidique se structure sous la forme d'une double rangée de lipides orientant leurs têtes hydrophiles vers l'extérieur et leurs queues hydrophobes vers l'intérieur de la bicouche<sup>123</sup>. Cette orientation permet de minimiser les interactions entre le milieu aqueux et les queues hydrophobes. Ces lipides peuvent être neutres : phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), sphingomyéline (SM) ou chargés : phosphatidylsérine (PS)<sup>124</sup>. De plus, ils sont répartis de manière inégale, la PC et la SM étant situées dans la couche extracellulaire tandis que la PE et la PS sont préférentiellement localisées dans la couche intracellulaire.

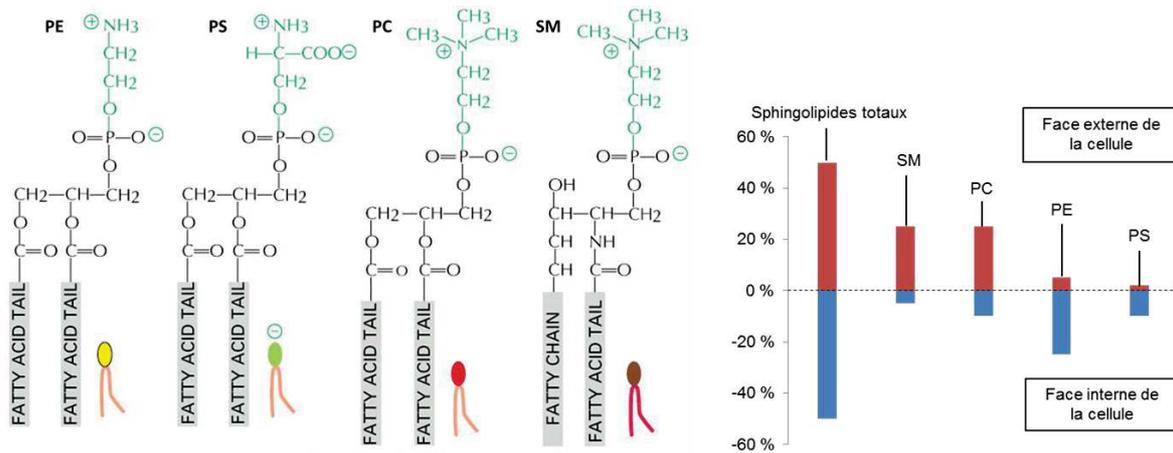


Figure 51 : Principaux types de phospholipides<sup>123</sup> et leur répartition dans les membranes.

Outre ces différents lipides, le cholestérol joue un rôle primordial dans la constitution de la bicouche lipidique et représente 25% des lipides présents dans la membrane. Que ce soit les protéines, les lipides ou le cholestérol, leurs positions dans la membrane ne sont pas figées. En effet, étant uniquement liés par des liaisons non-covalentes, ces molécules sont susceptibles de se déplacer latéralement le long de la bicouche lipidique, ou dans le cas de certains lipides ou glycolipides, de passer de la couche externe à la couche interne et inversement. Ce mécanisme appelé flip-flop reste cependant très rare pour ce type de molécule, étant donné qu'il implique la traversée du cœur hydrophobe de la bicouche par la tête hydrophile des lipides ou des glycolipides. En revanche, le cholestérol qui comporte un domaine polaire plus réduit circule beaucoup plus aisément entre les bicouches. La membrane plasmique est donc perpétuellement en mouvement et est décrite comme une mosaïque fluide.

Outre les lipides, ces couches sont constituées d'autres biomolécules. Ainsi la membrane extracellulaire contient des protéines fibreuses (le collagène qui confère une résistance mécanique à l'étirement et l'élastine qui à l'inverse octroie des propriétés élastiques importantes), des protéoglycanes (PG) et des glycoprotéines non collagèneuses<sup>125</sup>. Les protéoglycanes sont des glycoprotéines membranaires constituées d'une très forte proportion de résidus saccharidiques (95% de leurs poids). Le corps protéique est lié à une ou plusieurs chaînes polysaccharidiques linéaires ou polysulfatées, appelés glycosaminoglycanes (GAG). Ces GAG sont classées selon quatre familles :

- le sulfate de chondroïtine et le dermatane sulfate
- l'héparane sulfate (HS) et l'héparine
- le kératane sulfate

- l'acide hyaluronique (qui n'est pas classifiée comme une composante des PGs)<sup>126</sup>.

Ces PG jouent un rôle important dans la régulation des microdomaines de la surface cellulaire<sup>127</sup>. Les glycoprotéines quant à elles, jouent un rôle dans la reconnaissance cellulaire et interviennent dans les interactions cellules-cellules.

La membrane plasmique constitue une barrière difficilement franchissable pour de nombreuses molécules à fort potentiel thérapeutique qui sont alors écartées à cause de leur taille et de leurs propriétés physico-chimiques. La délivrance de certains principes actifs à l'intérieur des cellules est donc un véritable enjeu en chimie médicinale. Ainsi pour permettre à ces molécules d'atteindre leur cible à l'intérieur des cellules, un certain nombre de systèmes de délivrance ont été développés, parmi lesquels peuvent être cités les liposomes<sup>128</sup>, les vecteurs viraux<sup>129</sup>, les polymères<sup>130</sup> et les peptides pénétrants.

Les vecteurs doivent être dépourvus d'effet thérapeutique et capables de traverser la membrane cellulaire. Le composé d'intérêt ou cargo qui doit traverser la membrane est lié au vecteur de manière covalente ou non. Le cargo peut être de différente nature et de taille variée : petite molécule bioactive, agent de contraste, acide nucléique, peptide, protéine. Dans l'idéal, un vecteur doit présenter les caractéristiques suivantes :

- être spécifique
- offrir un bon compromis entre une résistance à la dégradation métabolique et une élimination aisée
- offrir une meilleure biodisponibilité
- ne pas induire une réponse immunitaire

Parmi les différentes classes de vecteurs, nous nous sommes particulièrement attachés aux peptides pénétrants que je vais brièvement décrire dans la suite de ce manuscrit.

## V. Les peptides pénétrants

### V.1. Travaux pionniers

L'origine des peptides pénétrants (cell-penetrating peptides, CPP) remonte aux observations faites par A. D. Frankel et C. O. Pabo en 1988 sur les propriétés transductrices de la protéine TAT du virus d'immunodéficience humaine (VIH-1)<sup>131,132</sup>. Cette protéine s'est révélée capable de traverser les membranes cellulaires efficacement, contrairement aux autres protéines. En 1991, l'équipe de A. Prochiantz a décrit un phénomène identique avec l'homéodomaine de la protéine Antennapedia de la Drosophile, internalisé dans des cellules neuronales<sup>133</sup>. Cette même équipe a reporté, en 1994, le premier domaine de transduction de protéine, un peptide de 16 acides aminés **RQIKIWFQNRRMKWKK** dérivé de la troisième hélice de l'homéodomaine d'Antennapedia appelé pAntp ou Pénétratine<sup>134</sup>. Trois ans plus tard, le groupe de B. Lebleu a identifié un second CPP : un peptide de 13 acides aminés dérivé de TAT capable de traverser les membranes cellulaires avec des résultats équivalents à la protéine entière<sup>135</sup>.

Depuis ces premières découvertes, le nombre de publications s'attachant à l'identification de nouveaux CPPs, leur mécanisme d'internalisation et les applications biologiques de ces peptides n'a cessé de croître. De nombreuses revues ont été publiées et permettent de rappeler leur évolution et l'apport qu'ils ont eu pour la chimie médicinale<sup>136,127,137,138</sup>. Les CPPs disposent de caractéristiques communes : ce sont des peptides courts (rarement plus de 35 résidus) capables de traverser les membranes cellulaires et qui ont une faible toxicité.

Les CPPs peuvent être classés selon différents critères :

- 1) Leur origine :
  - o les peptides naturels dérivés de domaines de transduction de protéines spécifiques,
  - o les CPPs formés par la fusion de deux séquences naturelles (peptides chimères),
  - o les CPPs synthétiques issus des MAP (peptides amphiphiles modèles) ou conçus sur la base d'études de relation structure-activité (les peptides polycationiques par exemple).
- 2) Leurs caractéristiques physico-chimiques : les CPPs cationiques, les amphipatiques, les anioniques ou les hydrophobes. Une revue récente classe les

différents CPPs décrits dans la littérature selon ces critères<sup>137</sup>. C'est cette classification qui est adoptée dans cette thèse.

Les CPPs ont été utilisés pour le transport à l'intérieur des cellules de différents cargos tel que les petites molécules actives, les peptides, les protéines, les acides nucléiques ou les agents pour l'imagerie (figure 52). Les cargos sont liés aux CPPs de façon covalente ou non covalente. La grande majorité des CPPs ne présente pas de sélectivité cellulaire ou tissulaire et malgré la diversité des séquences décrites à ce jour, il est possible de les classer en trois grandes catégories : les CPPs cationiques, amphipatiques et hydrophobes.

Les CPPs cationiques et amphipatiques ont une séquence primaire riche en résidus arginine (Arg). Les fonctions guanidinium portées par l'Arg jouent un rôle clé dans l'internalisation car elles permettent d'établir la première liaison avec la membrane cellulaire via des interactions électrostatiques avec les charges négatives des glycosamidoglycanes localisés à sa surface. Pour certains CPPs, leur capacité à pénétrer dans les cellules est également sous le contrôle d'autres facteurs. Ainsi, la présence de résidus hydrophobes, comme le tryptophane dans la Pénétratine est crucial pour l'internalisation. Le caractère amphipatique et la structure secondaire, en particulier en hélice  $\alpha$ , de certains CPPs jouent un également un rôle essentiel pour leur pénétration intracellulaire.

Les CPPs cationiques et amphipatiques constituent la grande majorité des CPPs décrits à ce jour dans la littérature. Cependant, une autre classe de CPPs, les CPPs hydrophobes, moins décrits, a également été identifiée. Ces CPPs peuvent être issus de protéines ou synthétiques.

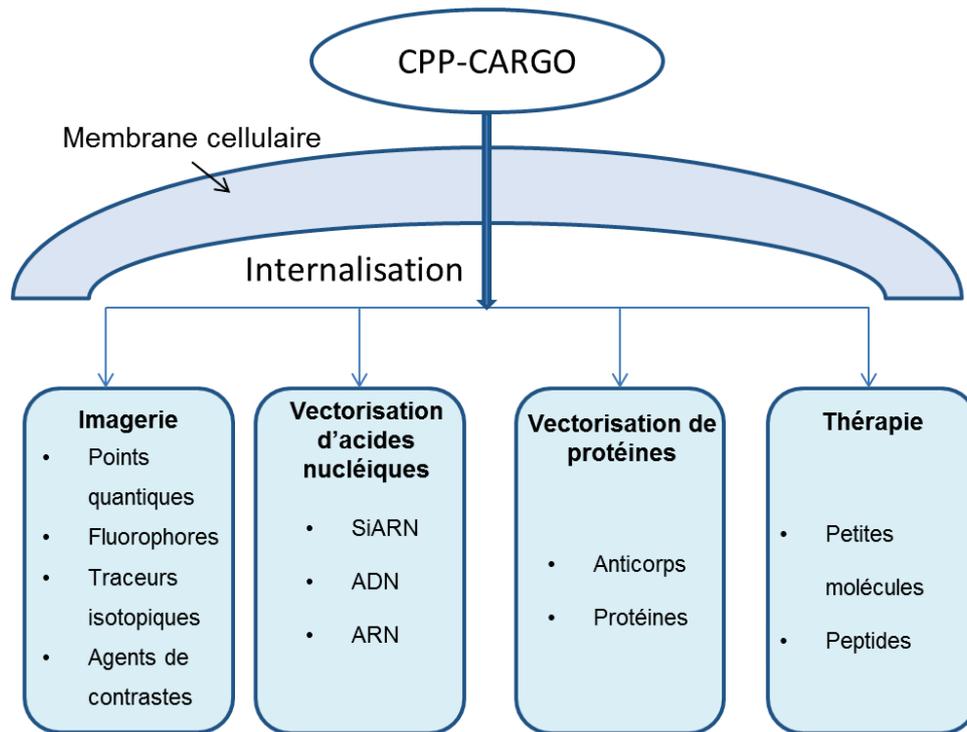


Figure 52 : Les différentes applications des CPP pour la vectorisation

## V.2. Les CPP cationiques

Les CPP cationiques sont des peptides dont les propriétés d'internalisation dépendent de leur caractère polycationique. Les plus représentatifs de cette famille mais aussi les plus utilisés sont le TAT, la Pénétratine et les polyarginines. Le peptide TAT incorpore dans sa séquence 8 résidus cationiques sur 13 (GRKKRRQRRRPPQ) et la Pénétratine en incorpore 7 sur 16 (RQIKIWFQNRRMKWKK). Si les résidus cationiques dans la séquence de la Pénétratine sont répartis de manière aléatoire (Figure 53), des études ont montré que ce CPP adopte une structure en hélice lors de son interaction avec les phospholipides chargés négativement présent sur les membranes cellulaires<sup>139</sup>.

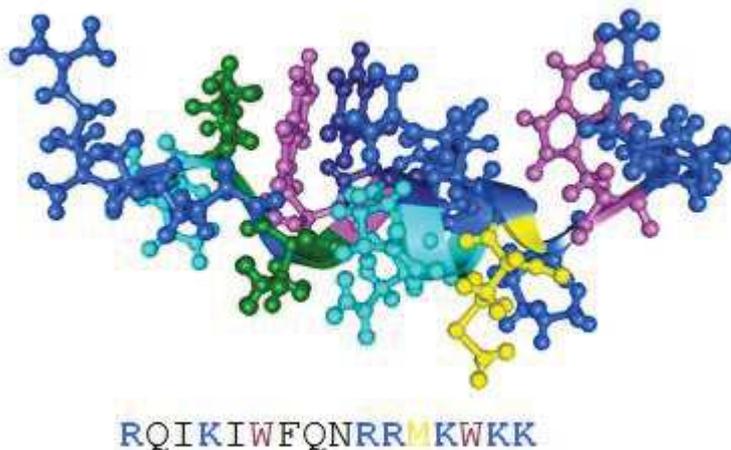


Figure 53 : Structure tridimensionnelle de la Pénétratine en solution (code PDB : 1KZ0)

Cependant, la répartition des charges positives n'est pas le seul critère favorisant la pénétration intracellulaire. En effet, le nombre et la densité des charges cationiques sur les CPP de cette famille sont également deux facteurs déterminants pour leur internalisation. Sur la base de ces caractéristiques, les équipes de S. Futaki et P. Wender ont développé des CPP uniquement constitués de résidus cationiques : les poly Arginines<sup>140</sup>. Lors de cette étude, ils ont déterminé que le nombre optimal de résidus Arg pour l'internalisation est de 8 résidus. L'équipe de G. Tünnemann a mené une étude avec des polyArg et des polyLys ; pour déterminer l'influence de résidus basiques sur l'internalisation. Elle a mis en évidence le rôle crucial des groupements guanidinium par rapport aux groupements amine pour l'efficacité de l'internalisation. En effet, contrairement aux polyArg, les polyLys ne sont que très faiblement internalisés<sup>141</sup>. Si le nombre de résidus cationiques est important, d'autres résidus peuvent aussi influencer l'internalisation des CPP. Par exemple, des études sur la Pénétratine ont montré que la substitution du Trp14 en Phe diminuait de manière considérable l'internalisation du CPP<sup>142</sup>. A partir de cette étude, des nouveaux CPP inspirés de la Pénétratine ont été développés : le (W/R) hexadecapeptide<sup>143</sup> et nonapeptide<sup>144</sup>.

Si un grand nombre d'autres CPP cationiques ont été développé, le TAT, la Pénétratine et les polyArg restent aujourd'hui les plus utilisés pour la vectorisation de principes actifs. Ils représentent à eux trois plus de 50% de la production scientifique.

Tableau 7 : Peptides pénétrant cationiques

CPP	Séquence	Origine
Pénétratine	RQIKIWFQNRRMKWKK	homéodomaine d'Antennapedia
(Arg) <sub>9</sub>	RRRRRRRRRR	Synthétique
TAT	GRKKRRQRRRPPQ	Domaine TAT du VIH
(R/W) <sub>9</sub>	RRWRRRWR	Synthétique

### V.3. Les CPP amphipatiques

Parmi les CPP décrits à ce jour, les amphipatiques sont les plus nombreux (44%). Il en existe deux types, selon le caractère amphipathique qui les caractérise : les CPP amphipatiques primaires et les CPP amphipatiques secondaires. Dans les premiers l'amphiphilie provient de la structure primaire du peptide qui est un assemblage séquentiel de domaines composés d'acides aminés hydrophiles et de domaines composés d'acides aminés hydrophobes. Dans les seconds, l'amphiphilie provient de la structure secondaire du peptide qui permet un positionnement d'acides aminés hydrophiles et hydrophobes sur des faces opposées.

#### V.3.1. Les CPP amphipatiques primaires

Parmi ces CPP, certains sont des peptides chimères composés d'un domaine hydrophobe qui favorise le ciblage de la membrane et d'une séquence de localisation nucléaire (NLS) qui cible les protéines vers le noyau. C'est le cas du MPG (GALFLGFLGAAGSTMGAWSQP~~KKR~~KV) et de Pep-1 (KET~~WWET~~WTEWSQP~~KKR~~KV). Ils contiennent tous les deux la séquence NLS du virus simien 40 ou (SV40), PKKRKV. Le domaine hydrophobe de MPG est dérivé de la protéine HIV gp 41, et celui de Pep1 correspond à un domaine riche en résidus tryptophane qui possède une haute affinité pour les membranes. D'autres CPP amphipatiques primaires sont directement inspirés de protéines, comme ARF(1-22) qui est issu du domaine N-terminal de la protéine de suppression tumorale p14ARF ou BPrPr (1-28) qui correspond au peptide signal de la protéine du prion lié au motif ~~KKR~~PKP. Ce motif correspond à la séquence N-terminale de la protéine après le clivage du peptide signal.

Tableau 8 : Peptides pénétrant amphipatiques primaires.

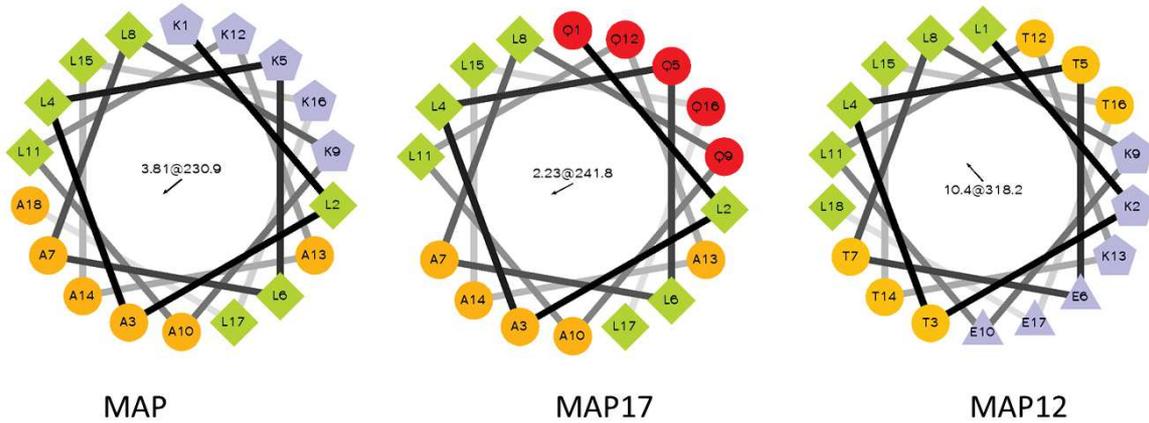
CPP	Séquence	Origine
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKRKV	Synthétique (NLS+ partie hydrophobe)
ARF(1-22)	MVRRFLVTLRIRRACGPPRVRV	Protéine de suppression tumorale
BPrPr(1-30)	MVKSKIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKP	Peptide signal de la protéine du prion

### V.3.2. Les CPP amphipatiques secondaires

Les CPP amphipatiques secondaires sont donc des peptides structurés, où les chaînes latérales hydrophobes et hydrophiles sont réparties de part et d'autre de la structure. Habituellement, ils adoptent une conformation en hélice  $\alpha$ , mais des conformations en feuillet  $\beta$  ou hélices de type polyproline (PPII) peuvent être également observées dans cette classe de CPP.

#### V.3.2.a. Les hélices $\alpha$

L'hélice  $\alpha$  amphipatique est une structure secondaire fréquemment rencontrée dans les peptides et les protéines qui sont capables de se lier aux membranes cellulaires. Cette structure permet la répartition des acides aminés hydrophobes et hydrophiles sur deux faces opposées. Elle a servi d'inspiration à la conception de nombreux CPP amphipatiques secondaires. Bien que la plupart d'entre eux ait une face cationique, l'internalisation, contrairement à celle des CPP cationiques, n'est pas dépendante de la présence de charge positives mais du caractère amphipatique du composé. Les études sur le peptide amphipatique modèle MAP (KLALKLALKALKAAALKLA)<sup>145</sup> et les dérivés neutre MAP17 (QLALQLALQALQAALQL)<sup>146</sup> et anionique MAP12 (LKTLETLETKELTKLTEL)<sup>147</sup> en sont des exemples probants. Il doit être rappelé que tous les peptides amphipatiques ne sont pas des CPP, ce constat confirmé par plusieurs études de CPP dont les capacités d'internalisation sont diminuées après la suppression ou la mutation d'un résidu malgré une amphipatie conservée<sup>146</sup>.



**Figure 54 :** Représentation en roue hélicoïdale du CPP MAP12. Le moment amphipatique est représenté par un vecteur (flèche). Le type de résidu est indiqué par sa forme (hydrophile sont représentés par des ronds, les hydrophobes par des losanges, les cationiques par des pentagones et les anioniques par des triangles). Les résidus hydrophobes sont colorés en vert et les résidus en jaune sont ceux non-hydrophobes. Les composés hydrophiles sont colorés en rouge et les composés chargés sont colorés en bleu pâle. Ces projections ont été générées par le site <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>.

On distingue sur chacun de ces CPP une face hydrophile qui peut être cationique (MAP), neutre (MAP17) ou anionique (MAP12) et une face hydrophobe et apolaire constituée principalement de leucine et d'alanine (MAP et MAP17) ou de leucine et de thréonine (MAP12).

### V.3.2.b. Les feuillets $\beta$

Les exemples sont moins fréquents, mais des CPP dont les séquences sont basées sur des peptides adoptant une structure en feuillet  $\beta$  ont été reportés<sup>148</sup>. En effet, la capacité du CPP VT5 (DPKGD $\beta$ PKGVTVTVTVTGKGD $\beta$ PKPD) à adopter une structure en feuillet  $\beta$  apparaît comme déterminante pour son internalisation. En effet, un peptide dérivé de VT5 incorporant des résidus d'acides aminés de configuration D et incapable d'adopter cette structure, a montré une internalisation beaucoup plus faible<sup>148</sup>.

### V.3.2.c. Les hélices de type polyproline

Des CPP incorporant des motifs riches en résidus proline ont été décrits. Ils sont soit inspirés de protéines comme la Bactérecine ou Bac7<sup>149</sup>, un peptide antimicrobien, soit synthétiques (ProProArg)<sub>n</sub> et (ProArgArg)<sub>n</sub> (n=3,4,5 ou 6)<sup>150</sup>. L'équipe d'E. Giralto a décrit des CPP dérivés du domaine N-terminal de la  $\gamma$ -zéine, une protéine végétale. Son domaine N-terminal contient une séquence riche en proline (VHLPPP)<sub>8</sub> qui a inspiré la synthèse de CPP cationiques (SAP, (VRLPPP)<sub>3</sub>)<sup>151</sup> et anioniques (SAP(E), (VELPPP)<sub>3</sub>)<sup>152</sup>.

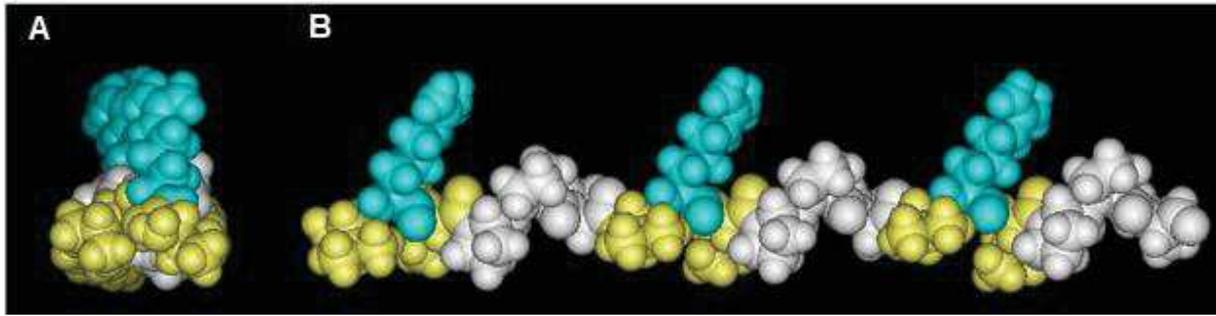


Figure 55 : Structure du CPP SAP A) Représenté avec une vue axiale ou B) latérale. Les résidus Pro sont représentés en gris, les résidus hydrophiles en bleu et hydrophobe en jaune<sup>152</sup>.

### V.3.3. Les CPP hydrophobes

A la différence des deux autres classes de CPP, peu de CPP hydrophobes ont été identifiés à ce jour. Ils peuvent être constitués d'acides aminés naturels ou d'acides aminés modifiés. Ces CPP regroupent les peptides dont la séquence déterminante pour l'internalisation est constituée de résidus hydrophobes. Ils peuvent être dérivés de protéines comme les pentapeptides dérivés d'un inhibiteur de Bax, la protéine anti-apoptotique Ku70<sup>153</sup> ou le peptide PFVYLI<sup>154</sup> inspiré du peptide C105Y correspondant au domaine 359-374 de l' $\alpha$ 1-antitrypsine, un inhibiteur de sérine protéase. Un screening de 24,000 peptides réalisés par J. R. Marks et coll. a permis de mettre en avant 12 CPP majoritairement hydrophobes avec des résidus cationiques à des positions spécifiques<sup>155</sup> (Tableau 9).

Tableau 9 : CPP classés en fonction du nombre de résidus cationiques dans leur séquence.

Nb de résidus cationiques	1	2	3	4
Séquences	PLILLFKLL-GQF PLGYLFLLR-GQF PLIYPFLRL-GQF	PLILLRLLR-GQF PLIYLRLLR-GQF	RLILLFRRL-GQF RLIRLFLLR-GQF PLRLLRLLR-GQF RRILLQLLR-GQF PLRLRFLLR-GQF RLIYLRLLR-GQF	RKILLRLLR-GQF

Ces séquences de 12 résidus contiennent entre 1 et 4 résidus cationiques (arginine et/ou lysine), principalement situés en position 6 et 9 (6 séquences sur 12) et au moins 50% de résidus hydrophobes. La position des résidus cationiques conservée dans la majorité des séquences soulignent l'importance de la répartition des résidus cationiques le long de celles-ci. En revanche, leur nombre ou le caractère amphipatique des CPP n'a aucune influence notable sur leur internalisation.

## V.4. Conclusion

Les CPP constituent une classe de vecteurs très diversifiée. Ils sont capables de traverser différentes barrières (membrane cellulaire, barrière hématoencéphalique, paroi intestinale) et peuvent transporter différents types de cargos (protéines, acides nucléiques, petites molécules). Une partie des applications des CPP sont représentées dans la Figure 56.

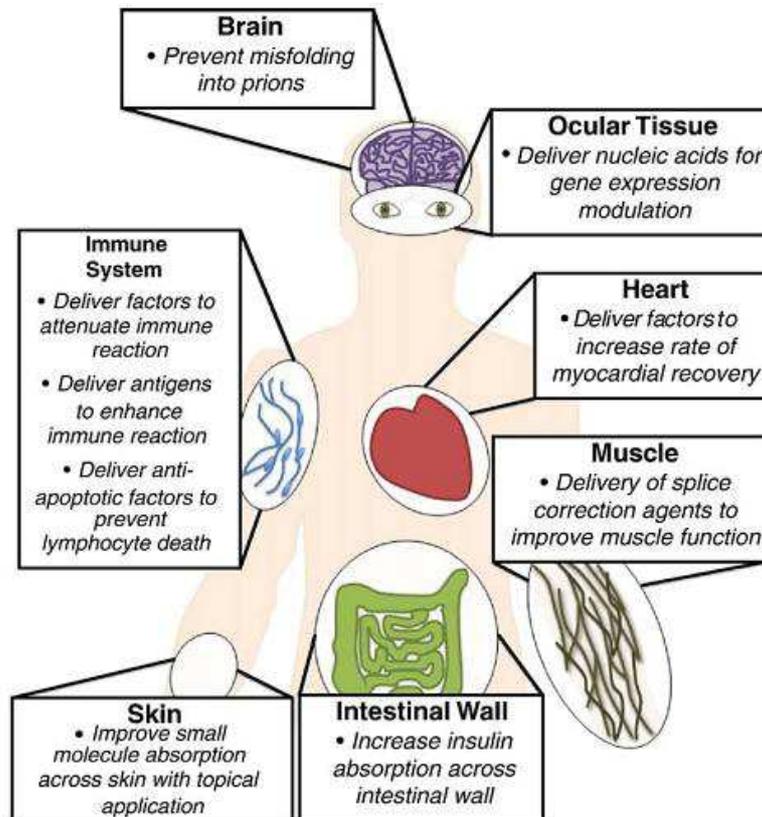


Figure 56 : Représentation des différentes cibles et applications dans la littérature pour les CPP<sup>156</sup>.

Cependant, ils possèdent des inconvénients que nous avons déjà évoqués au début de la partie 2.4 (p40). Particulièrement, une faible demi-vie due à la dégradation par les protéases et une flexibilité conformationnelle qui peut entraîner une diminution de l'internalisation pour les CPP amphipatiques secondaires. Pour pallier ces divers problèmes, des vecteurs inspirés des CPP, mais constitué de résidus non naturels ont été développés : les peptidomimétiques pénétrants.

## VI. Les foldamères pénétrants

### VI.1. Les peptidomimétiques : une famille de vecteurs variée

Depuis quelques années, différentes équipes s'intéressent à la synthèse de séquences pseudopeptidiques ou peptidomimétiques inspirées de CPP et capables de traverser la membrane cellulaire mais plus résistantes aux protéases. Je donnerai ici quelques exemples de cette famille de CPP.

L'équipe de P. Wender, après avoir montré la forte capacité d'internalisation des polyarginines, a développé différents oligomères pénétrants appelés transporteur moléculaire riche en guanidinium (guanidinium-rich molecular transporter)<sup>157</sup>. Parmi eux, des peptoïdes<sup>158</sup>, des oligocarbamates<sup>159</sup> ou des oligocarbonates<sup>160</sup> (Figure 57) sont capables de traverser la membrane cellulaire avec une efficacité comparable ou supérieure aux polyarginines. Il est intéressant de noter que les oligocarbonates<sup>160</sup> sont dégradés plus facilement une fois internalisés.

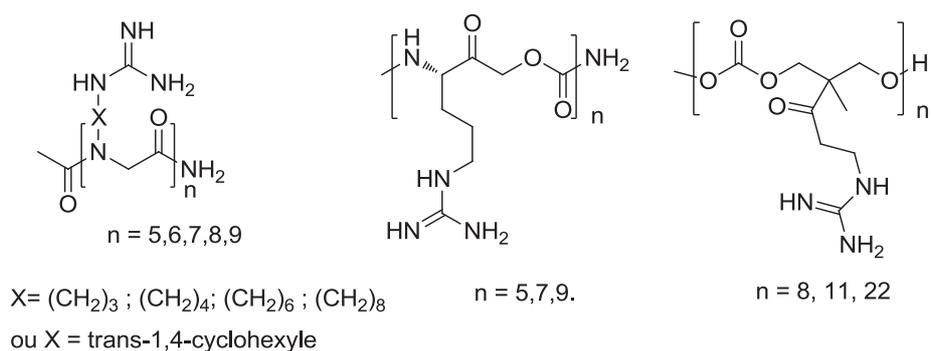
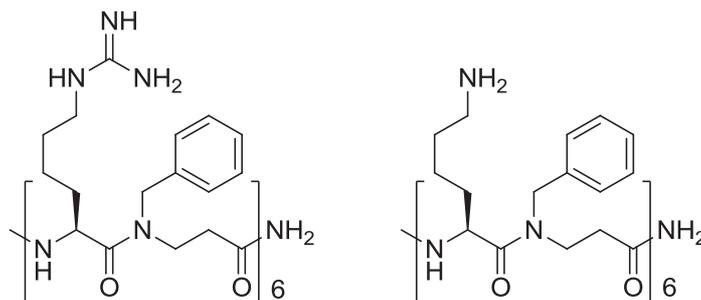


Figure 57 : Oligopeptoïdes<sup>158</sup>, oligocarbamates<sup>159</sup> et oligocarbonates<sup>160</sup>.

C. Foged et coll. ont pour leur part synthétisé des oligomères hybrides d'acides aminés et de  $\beta$ -peptoïdes, analogues des CPP polycationiques classiques (polyarginine et polylysine). Ces composés ont montré une internalisation équivalente à leurs homologues naturels mais avec une stabilité accrue face aux protéases (Figure 58)<sup>161</sup>.

Figure 58 : Hybride acides aminés/ $\beta$ -peptoides.

## VI.2. Les foldamères : des vecteurs prometteurs

Comme nous l'avons déjà expliqué, la structure secondaire est déterminante pour l'internalisation de certains CPP (les CPP amphipatiques secondaires). Les foldamères ayant des structures secondaires bien définies et prévisibles, ils constituent des plateformes adaptées pour la synthèse de molécules amphipatiques en permettant un contrôle de la répartition des chaînes latérales. De plus, leur plus grande stabilité vis-à-vis des processus de dégradation par les protéases leur confère une meilleure biodisponibilité. Tous ces avantages font des foldamères de bons candidats pour le développement de vecteurs de pénétration intracellulaire. Dans ce contexte, plusieurs équipes ont développé des vecteurs associant les caractéristiques physico-chimiques des CPP aux caractéristiques structurales des foldamères.

L'équipe de D. Seebach a développé différents  $\beta$ -peptides avec des capacités d'internalisation notables. Ils ont montré que les oligomères de  $\beta^3$ -Arg sont internalisés aussi efficacement que les polyarginines, avec cependant une meilleure stabilité<sup>162</sup>. Parmi ces  $\beta$ -oligoarginines, les heptamères sont internalisés dans le noyau de fibroblastes humains après 5 minutes d'incubation avec les cellules et dans le nucléole après 40 minutes d'incubation. Le décimère est internalisé de la même façon dans les cellules HeLa alors que le tétramère est incapable de franchir la membrane cellulaire<sup>163</sup>. Plus récemment, cette équipe a synthétisé des oligomères de  $\beta^3$ -Pro capable de traverser les membranes cellulaires mais plus lentement que les oligomères cationiques<sup>164</sup>.

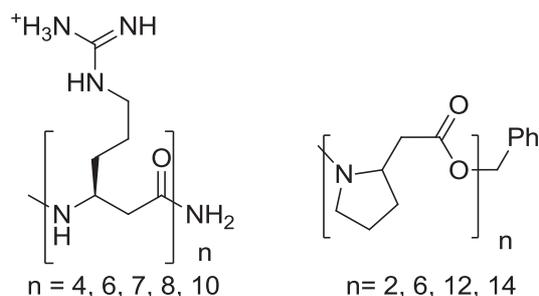


Figure 59 : Représentation des  $\beta$ -oligoarginines<sup>162</sup> et des  $\beta$ -oligoprolines<sup>164</sup>.

J. Chmielewski et son équipe ont synthétisé des hélices de type polyproline décorées de groupes hydrophobes ou cationiques<sup>165</sup>. Ces oligomères adoptent une structure en hélice de type PPII (Figure 60) qui augmente l'internalisation par rapport au peptide non structuré.

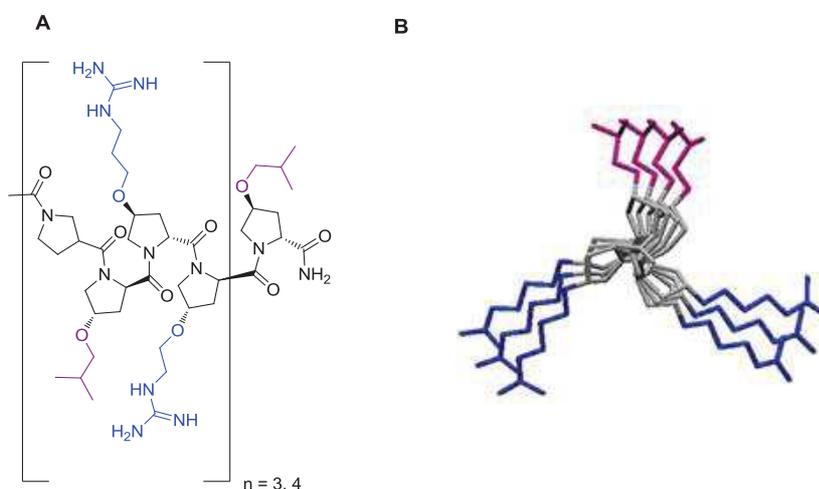


Figure 60 : A) Représentation de polyproline modifiées et B) modélisation de la polyproline (n=3). Les groupements cationiques sont représentés en bleu et les groupements hydrophobes en violet<sup>164</sup>.

Les oligomères de quinolines modifiées développés par Y. Huc et coll. ont montré une internalisation efficace sur diverses lignées cellulaires. L'internalisation de ces composés dépend non seulement de leur longueur, mais aussi du nombre de charges cationiques présentes le long de l'oligomère. Des analyses de cytotoxicité montrent que les composés contenant 4 et 6 blocs n'ont pas d'effet cytotoxique même à 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Quant à l'octamère, il n'est cytotoxique qu'à la concentration la plus haute ( 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )<sup>166</sup>.

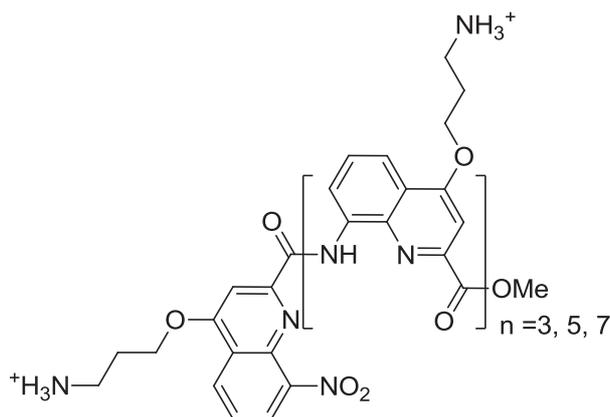


Figure 61 : Représentation d'oligoquinoline modifiée<sup>166</sup>.

Notre équipe a développé différents oligomères de mimes contraints de dipeptides avec des capacités d'internalisation importantes<sup>167</sup>. Un des oligomères a été utilisé avec succès pour la vectorisation intracellulaire d'un inhibiteur de la protéase cathepsine D (Cath D), une aspartyl protéase surexprimée par de nombreuses tumeurs solides<sup>168</sup>. Ces résultats sont le fruit des travaux de thèse du Dr. L. Vezekov<sup>169</sup> et le développement de nouveaux oligomères de mimes contraints de dipeptides pénétrants est l'objectif principal de ma thèse.

### VI.3. Conclusion

Ces multiples exemples confirment l'alternative viable que représentent les foldamères pénétrants par rapport aux CPP, avec une internalisation supérieure et une meilleure biodisponibilité en général. Il faut néanmoins prendre en considération que leur synthèse est généralement plus coûteuse et complexe que pour les CPP, hormis quelques exceptions<sup>160</sup>. Si l'efficacité de ces vecteurs n'est plus à démontrer, leurs mécanismes d'internalisation sont pour certains encore mal compris. Comprendre ces mécanismes est néanmoins déterminant pour le développement de nouveaux vecteurs ou pour améliorer ceux déjà existants. La suite de ce chapitre s'attachera à la description des mécanismes d'internalisation reportés dans la littérature.

## VII. Les mécanismes d'internalisation des CPP

Bien que les mécanismes de pénétration de CPP dans les cellules soient encore sujets à controverse, les travaux scientifiques publiés à ce jour s'accordent pour dire que l'internalisation des CPP ne dépend pas d'un seul mais de plusieurs mécanismes différents : l'internalisation directe et l'endocytose. Quel que soit le processus d'internalisation du CPP, son interaction avec la membrane plasmique constitue la première étape d'internalisation. Cette étape est décisive pour le franchissement de la membrane puisqu'elle va déterminer le mécanisme d'internalisation.

### VII.1. Internalisation directe

L'internalisation directe est un mécanisme passif indépendant de l'endocytose, de l'énergie ou d'un récepteur spécifique. Les CPP qui empruntent ce mécanisme rentrent dans les cellules via une translocation directe due à une déstabilisation de la membrane. Dans un premier temps évoqué comme le mécanisme d'internalisation des CPP, il a ensuite été considéré comme un artefact dû à la fixation des cellules avant les expériences de microscopie confocale. Le mécanisme d'internalisation directe a depuis été validé grâce à des expériences par fluorescence sur cellules vivantes, par quantification de l'internalisation à basse température ou encore par l'appauvrissement des membranes en ATP, rendant impossible le mécanisme d'endocytose. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la translocation directe des CPP au travers de la membrane plasmique parmi lesquelles la formation de micelles inverses<sup>170</sup>, la formation de pores<sup>171</sup> ou la translocation passive<sup>172</sup>.

### VII.2. L'endocytose

L'endocytose est une invagination de la membrane cytoplasmique pour former une petite vésicule membranaire : l'endosome. L'endocytose se déroule en deux étapes : l'endocytose qui permet au CPP d'atteindre le milieu intracellulaire puis sa sortie de l'endosome. Cette dernière étape est cruciale pour permettre au cargo d'atteindre les cibles situées dans le cytoplasme. Le CPP peut être internalisé par plusieurs mécanismes :

- Grâce au cycle de recyclage des protéoglycans, qui sont internalisés régulièrement.
- En déclenchant l'endocytose par formation d'un groupe de protéoglycans.
- Par activation des signaux intracellulaires.
- Ou par remodelage de l'actine.

Différentes voies d'endocytose peuvent être empruntées par les CPP. Les plus courantes sont :

- La macropinocytose, qui correspond à la formation d'une vésicule hétérogène de grande taille (entre 0,5 et 5 µm) appelé macropinosome. Ce processus entraîne l'entrée dans la cellule d'un volume important du milieu extracellulaire ainsi que de la surface membranaire.
- L'endocytose dépendant de la clathrine, qui représente la majeure partie de l'endocytose en phase fluide (40 à 50%). Ce mécanisme implique l'auto-association des molécules de clathrine, permettant ainsi la formation de vésicule par invagination de la membrane. Ce mécanisme permet l'internalisation de récepteurs de manière constitutive (sans que celui-ci ne soit lié à son ligand) ou après que le ligand et le récepteur soient liés.
- L'internalisation par formation de cavéoles ou microdomaines lipidiques (rafts). C'est la composition lipidique spécifique de la membrane qui permet la formation d'une vésicule dite cavéole ou raft. Elle est constituée de cholestérol, glycosphingolipides, sphingomyélines et glycérophospholipides insaturés et de protéines lié par glycosyl phosphate inositol. L'internalisation de ces vésicules est beaucoup plus lente que pour les mécanismes décrits précédemment. Elle dépend du cytosquelette d'actine et peut être induite par certains virus ou bactéries, ou par la concentration de glypicans inséré dans la membrane.
- Une autre voie, indépendante des rafts, de la clathrine ou des cavéoles existe, elle n'a cependant pas pu être mise en évidence autrement que par l'inhibition de toutes les autres voies d'endocytose décrites plus haut.

Ces différentes voies sont résumées par la Figure 62.

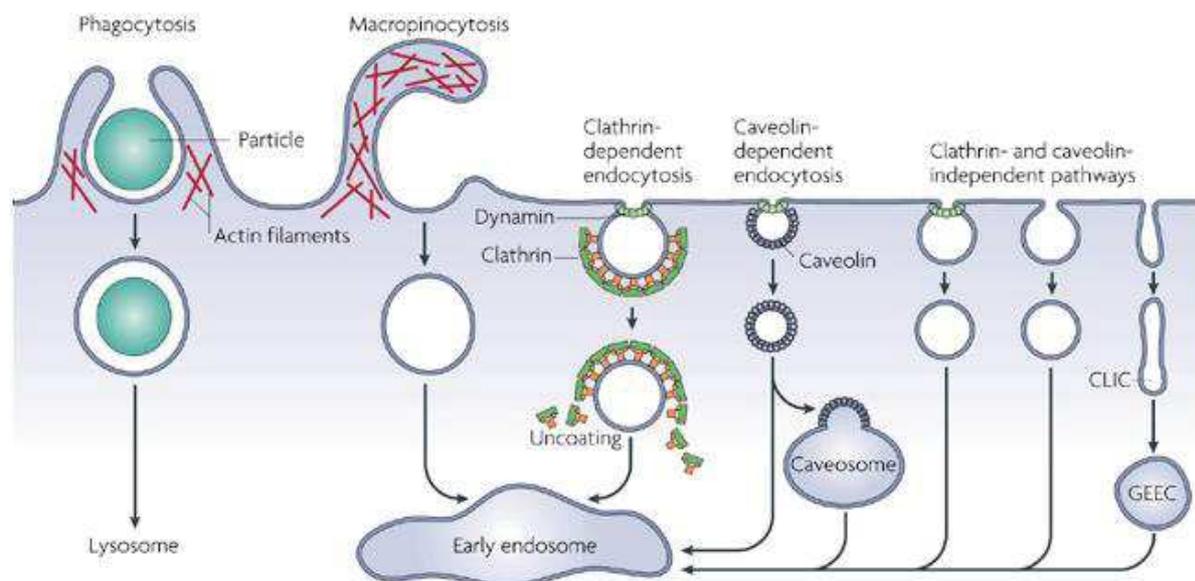


Figure 62 : Les différentes voies impliquées dans l'endocytose<sup>173</sup>.

Si les différentes études semblent montrer que ces mécanismes sont tous impliqués à divers degrés dans l'internalisation des CPP et des oligomères pénétrants, il faut néanmoins préciser que de nombreuses publications avancent des résultats encore contradictoires. De plus, même si la nature du CPP a une influence déterminante sur le mode d'internalisation, d'autres paramètres comme la taille du cargo, la nature du lien entre le CPP et le cargo, la lignée cellulaire utilisée dans les tests, etc... peuvent influencer ce mécanisme.

Comme nous venons de le voir, les CPP internalisés par translocation directe atteignent directement le cytoplasme alors que ceux internalisés par endocytose se retrouvent dans les vésicules endosomales. Ils devront en sortir pour atteindre le cytoplasme, sauf si les cibles d'intérêts se trouvent dans le système endolysosomal. Dans le contexte de ma thèse, la cible biologique étant majoritairement située dans les lysosomes, des vecteurs permettant l'adressage de principes actifs vers ce compartiment ont été développés.

### VII.3. Conclusion

Permettre à des molécules d'intérêt de traverser la membrane cellulaire représente une problématique au cœur de la chimie médicinale et la vectorisation y apporte une réponse. Parmi les multiples méthodes de vectorisation décrite plus haut, les foldamères offrent de nombreuses possibilités. Durant la thèse du Dr. L. Vezekov, les polyAMPA ont

ainsi été utilisés comme vecteurs couplé à un inhibiteur de protéase. Cette protéase, la Cathepsine D, est impliquée dans de nombreux processus pathologique, dont le cancer et représente une cible thérapeutique intéressante. La partie suivante de ce chapitre s'attachera à la présenter.

## VIII. La cathepsine D

La cathepsine D (Cath D) comme la plupart des cathepsines est une protéase lysosomale, active à pH acide. Il existe une quinzaine de cathepsines qui diffèrent par leur structure tridimensionnelle, leur mécanisme catalytique ou leur cible. La plupart des cathepsines sont des protéases à thiol. Seules les cathepsines A et G sont des protéases à sérine et les cathepsines D et E sont des protéases aspartiques.

Elles jouent un rôle essentiel dans la régénération cellulaire, par conséquent leur surexpression ou la dérégulation de leur activité enzymatique est impliquée dans de nombreuses pathologies comme des cancers, des maladies auto-immunes ou cardiaques. Dans le cadre de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressé à la cathepsine D. Avant d'exposer les travaux qui ont concerné son inhibition, je vais brièvement décrire cette aspartyl protéase et les pathologies qui lui sont associées.

### VIII.1. La Cathepsine D : expression et maturation

La cathepsine D ou Cath D (E.C. 3.4.23.5, 48 kDa) est encodée par le gène *CTSD* qui contient 9 exons et est localisé sur le bras court du 11<sup>ème</sup> chromosome. Elle est exprimée sur le réticulum endoplasmique rugueux (RER) sous forme de pré-pro-enzyme qui possède 412 résidus avec un peptide signal (S) de 20 résidus suivi d'un pro-peptide (P) de 44 résidus. Différentes étapes de maturation sont nécessaires pour arriver à l'enzyme mature active (Figure 63).

1) La pré-pro-enzyme devient la pro-cathepsine D (proCath D, 52 kDa) après clivage du peptide signal, cette forme est composée de 392 résidus et est inactive.

2) Après clivage du peptide signal, deux oligosaccharides sont attachés sur les résidus Asn 70 et 199 de la proCath D qui est ensuite adressée vers l'appareil de Golgi.

3), 4) Les résidus mannoses des deux oligosaccharides sont phosphorylés sur leur position 6 en mannose 6-phosphate (M6P). Les groupements M6P sont reconnus par les récepteurs M6P cation-indépendant présents sur l'appareil de Golgi, permettant l'accumulation de la proCath D dans le réseau *trans-golgien*, puis son passage dans les endosomes tardifs et donc les lysosomes grâce au transport vésiculaire.

5) Une fois dans le compartiment endolysosomal, la proCath D subit plusieurs processus protéolytiques pour devenir la Cath D mature et active. Dans un premier temps, le pH acide des endosomes tardifs va permettre la dissociation de la proCath D des récepteurs M6P et la déphosphorylation du mannose.

6) L'intermédiaire est ensuite clivé par la cathepsine B ou L en deux chaînes : la chaîne lourde du côté C-terminal et la chaîne légère du côté N-terminal<sup>174</sup>.

7) Lors du clivage, 7 résidus situés entre la chaîne légère et la chaîne lourde ainsi que plusieurs autres du côté C-terminal sont supprimés. Ces deux chaînes, uniquement liées entre elles par des liaisons hydrophobes, constituent la forme mature de la Cath D (Figure 63, 7)<sup>175</sup>.

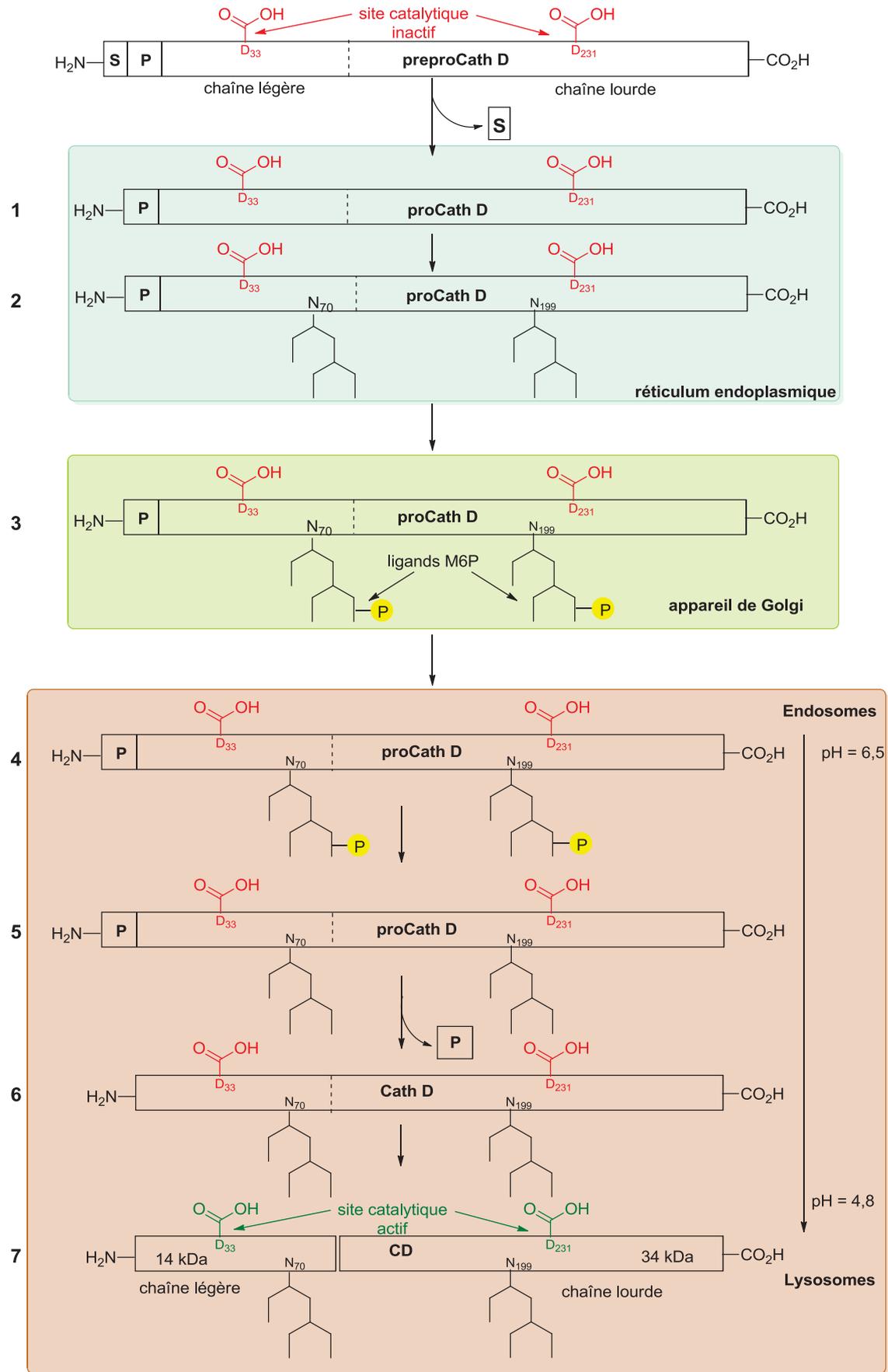


Figure 63 : Maturation protéolytique de la Cath D<sup>175</sup>.

## VIII.2. Mécanisme enzymatique et structure de la cathepsine D

La cathepsine D est une aspartyl-endorpeptidase, clivant spécifiquement les liaisons peptidiques entre deux acides aminés hydrophobes à pH acide (pH optimal 3,5)<sup>176</sup>. C'est une enzyme majeure des lysosomes et endosomes.

La Figure 59 montre la structure tridimensionnelle déterminée par diffraction des rayons X<sup>177</sup>. La chaîne légère du côté N-terminal est composée de 97 résidus (14 kDa, en cyan) et la chaîne lourde du côté C-terminal possède 240 résidus (34 kDa, en vert). Elles sont liées par des interactions hydrophobes. Cette protéine comporte une troisième région, l'interdomaine constitué des 8 résidus du côté N-term, des 17 résidus du côté C-term et des 41 résidus liant l'inter-domaine. C'est cette dernière région qui relie les chaînes légère et lourde entre elles et forme le site catalytique.

Chaque chaîne possède un oligosaccharide (en blanc) lié aux résidus Asn 70 et Asn 199 (en orange). Son site catalytique est constitué d'une poche de 30 Å de long composée de feuillettes  $\beta$  antiparallèle et comporte deux acides aspartiques (en jaune), les résidus Asp 33 et Asp 231, qui sont situés face à face. Un pont disulfure entre les résidus Cys 27 et Cys 96 sur la chaîne légère stabilise ce domaine et stabilise le côté C-terminal de cette chaîne contre les dégradations protéolytiques.

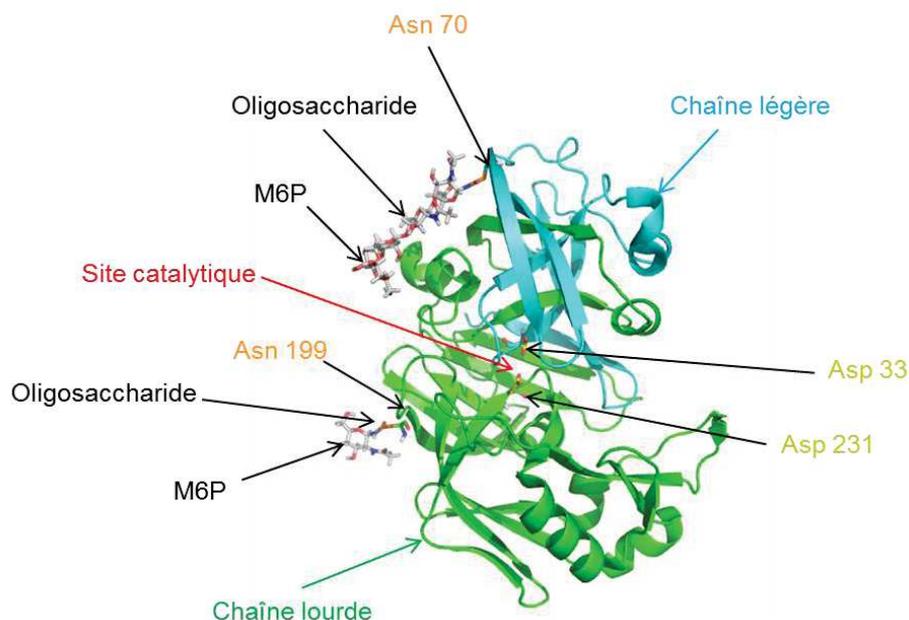


Figure 64 : Structure cristallographique de la cathepsine D (code PDB : 1LYA).

### VIII.3. Rôle physiologique de la cathepsine D

Outre son rôle crucial dans le catabolisme intracellulaire des peptides/protéines comme la dégradation d'hormones comme l'insuline<sup>178</sup> et le glucagon<sup>179</sup>, diverses études ont démontré son implication dans de nombreux processus biologiques. Elle est impliquée dans l'activation de précurseurs de protéines biologiquement actives comme l'hormone parathyroïde<sup>180</sup> et la prolactine<sup>181</sup> ou dans la maturation d'antigènes<sup>182</sup>. De plus, des fonctions indépendantes de son activité enzymatique via des interactions avec des partenaires ont aussi été décrites telles que les processus de différenciation épithéliale, de cicatrisation<sup>183</sup> et l'activation des neutrophiles<sup>184</sup>. Elle est capable d'induire<sup>185,186</sup> ou d'inhiber l'apoptose<sup>187</sup>. Néanmoins, il n'est pas clairement établi si ces effets pro-apoptotique<sup>188</sup> et anti-apoptotique<sup>189</sup> sont dépendants de son activité enzymatique.

Les tableaux 4 répertorient des fonctions dépendantes et indépendantes de son activité enzymatique.

Tableau 10 : Fonctions biologiques dépendantes et indépendantes de l'activité enzymatique de la Cath D.

Fonctions biologiques	Protéines cibles	Fonctions biologiques	Protéines cibles
Activation et dégradation d'hormones polypeptidiques, de chimiokines, de facteurs de croissance et de leurs récepteurs.	Insuline	Régulation de l'apoptose	Bid
	glucagon		Thiredoxine-1
	Récepteur aux Androgènes	Traitement des activateurs et inhibiteurs d'enzyme	Kininogène
Activation de précurseurs d'enzymes	Cathepsine B		Kallistatine
	Cathepsine L		Cystatine C
	Transglutaminase 1	Hydrolyse de cholestérol LDL	Apolipoprotéine B
Traitement d'antigène du cerveau	Tau	Dégradation de protéines des matrices de membranes extracellulaire	Protéoglycanes
	Protéine amyloïde $\beta$ A4		Collagènes
	Tubuline		Fibronectine
Dégradation du cytosquelette des protéines	Neurofilament	Autre cibles.	Hémoglobine
	Actine		Connectine
	Myosine		Dermicidine
Fibrinolyse par les monocytes	Fibrogène		
	Fibrine		
Fonctions biologiques indépendantes de l'activité enzymatique			
Activation de Neutrophiles et leucocytes			
Régulation de l'apoptose			
Cicatrisation			

Des études sur des souris déficientes en Cath D ont montré que l'enzyme n'est pas indispensable au développement de l'embryon, mais qu'elle est nécessaire au maintien de l'homéostasie de certains tissus. Son absence entraîne une atrophie des muqueuses intestinales deux semaines après la naissance suivie d'une nécrose massive des tissus intestinaux et de la destruction des cellules lymphoïdes de la rate et du thymus<sup>190</sup>. Ces souris ont également une atrophie rétinienne entraînant la cécité<sup>191</sup>. Ces symptômes n'ont cependant pas été constatés chez d'autres mammifères déficients en Cath D. Cependant, chez l'Homme, les mutations réduisant l'activité de la Cath D ou sa stabilité, le processus post-traductionnel ou l'adressage intracellulaire de la proCath D, aboutissent au développement de la maladie de Batten (ou céroïdes-lipofuscinoses neuronales). Cette

maladie est caractérisée par des symptômes de neurodégénérescence, de régression du développement, de perte de vue et d'épilepsie. L'importance des symptômes serait dépendante de l'activité enzymatique résiduelle de la Cath D<sup>191</sup>. Dans la partie suivante, nous verrons que le niveau d'activité de la Cath D est un facteur important dans des contextes pathologiques variés.

#### VIII.4. Rôles de la cathepsine D dans les pathologies

De nombreuses études ont démontré l'importance de la proCath D et de la Cath D dans diverses pathologies comme la maladie d'Alzheimer<sup>192</sup>, la maladie de Parkinson<sup>193,194</sup>, ou encore l'artériosclérose<sup>195</sup>.

Cependant, la pathologie pour laquelle le couple proCath D/Cath D est le plus étudié reste le cancer où son implication dans les processus de prolifération de cellules tumorales et de métastases, a fait l'objet de nombreuses publications<sup>196,197,184,198</sup>. La proCath D sécrétée par des cellules cancéreuses du sein<sup>199,200</sup>, de la prostate<sup>198</sup>, des ovaires<sup>201</sup> et des poumons<sup>202</sup> a un rôle de facteur autocrine de croissance cellulaire. Ainsi, des cellules du cancer du sein, dont l'expression de la proCath D a été inhibée, ont une prolifération tumorale réduite, *in cellulo* et *in vivo*<sup>203</sup>.

D'autres études ont démontré l'implication de la Cath D dans la croissance tumorale en inactivant des inhibiteurs de croissance cellulaire<sup>204</sup> ou en participant à la libération de facteurs de croissance<sup>205</sup>. La Cath D est aussi impliquée dans le processus de métastases<sup>206</sup> à la fois comme protéase et comme ligand<sup>207</sup> ainsi que dans les mécanismes d'angiogénèse<sup>208</sup>.

Le couple proCath D/Cath D est donc impliqué à divers niveaux dans les cancers et même si certains mécanismes restent encore mal compris, l'inhibition de la Cath D apparaît comme une thérapie anticancéreuse prometteuse.

## IX. Le ciblage de la cathepsine D comme stratégie anticancéreuse

### IX.1. Les inhibiteurs de la cathepsine D

Il existe différents types d'inhibiteurs qui peuvent être compétitifs, non compétitifs ou mixtes. Les inhibiteurs de la Cath D sont nombreux et peuvent être des molécules synthétiques, des analogues synthétiques de substrats, des peptides naturels synthétisés par des micro-organismes, les inhibiteurs polypeptidiques issus de plantes, les protéines synthétisées par des animaux inférieurs ou les anticorps. Dans ce manuscrit, je me concentrerai sur les inhibiteurs non-covalents issus de molécules synthétiques, d'analogues de substrats et de peptides naturels provenant de micro-organismes. La Cath D clive la liaison peptidique entre deux acides aminés hydrophobes. Les inhibiteurs non-covalents inhibent l'activité enzymatique de la Cath D en se liant à son site catalytique et en formant un complexe Cath D-inhibiteur stable qui inactive la protéase. A ce jour, aucun médicament inhibant l'activité protéolytique de la Cath D n'a été mis sur le marché.

### IX.2. Les molécules synthétiques

L'équipe de Dunn a synthétisé différentes molécules de faible poids moléculaire (de 500 à 800 g.mol<sup>-1</sup>) qui sont représentées dans la Figure 65.

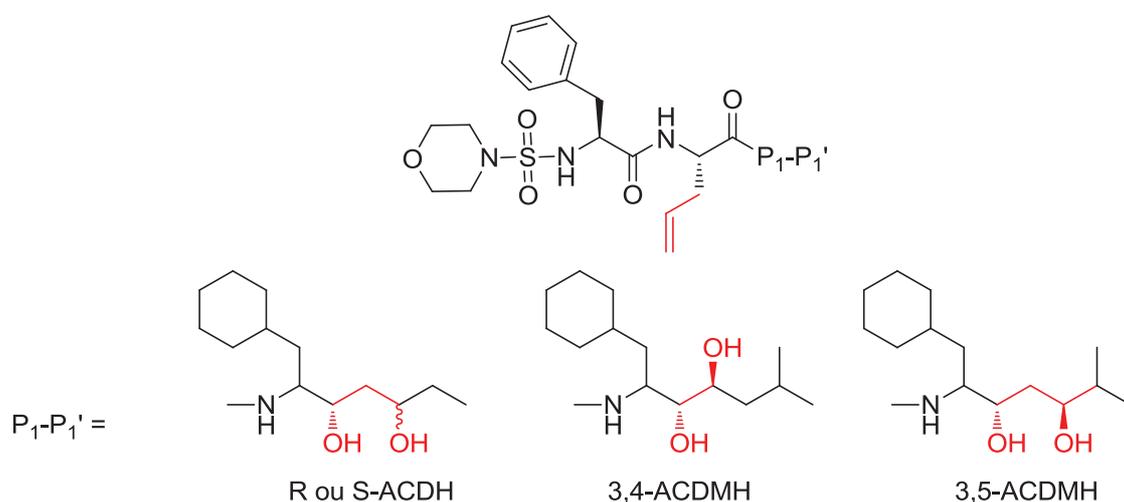


Figure 65 : Molécules isostères de l'état de transition de la cathepsine D.

Ces molécules sont constituées d'une partie commune à chaque molécule : la (morpholinylsulfonyl)-L-phenylalanyl-L-allylglycine liée à différents isostères de liaisons peptidique ( $P_1-P_1'$ ). Ces molécules ont été utilisées comme inhibiteurs et les constantes d'inhibition sont résumées dans le Tableau 12. Les groupes déterminants pour l'inhibition de la Cath D sont représentés en rouge (Figure 65). Les groupements hydroxyles sont des

mimes de l'état de transition du clivage de la liaison peptidique tandis que le groupement allyl vient se lier à une poche hydrophobe proche du site catalytique de Cath D.

**Tableau 11 : Inhibition de la cathepsine D par différentes molécules synthétiques.**

P <sub>1</sub> -P <sub>1</sub> '	K <sub>i</sub> (μmol/L)
3,5-ACDMH	0,1
3,4-ACDMH	2,5
R-ACDH	5,4
S-ACDH	6,1

Parmi ces molécules, l'isostère 3,5-ACath DMH possède la meilleure constante d'inhibition (K<sub>i</sub> = 0,1 μmol/L).

### IX.3. Les analogues de substrats synthétiques

Les analogues de substrats synthétiques sont des séquences peptidiques d'au moins 5 résidus où un acide aminé naturel L remplacé par un acide aminé non naturel D. Ce changement rend le peptide stable vis-à-vis de la Cath D et entraîne l'inhibition de son activité protéolytique. L'efficacité de l'inhibition dépend du nombre d'acides aminés non naturels ainsi que leurs positions dans la séquence<sup>209</sup>. Le Tableau 12 ci-dessous donne les constantes d'inhibition de divers analogues de substrats synthétiques. L'inhibition la plus efficace est obtenue avec la séquence Ac-pGlu-D-Phe-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu-OH (K<sub>i</sub> = 0,031 μmol/L).

**Tableau 12 : Constante d'inhibition (en μmol/L) de plusieurs analogues synthétiques pour la cathepsine D.**

analogues synthétiques	K <sub>i</sub> (μmol/L)
Ac-pGlu-D-Phe-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu-OH	0,031
Ac-D-Phe-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu-OH	0,52
Ac-D-Phe-Pro-(D)-Phe-(D)-Phe-Val-D-Leu-OH	650
Ac-D-Phe-Pro-Phe-Phe-Val-OH	pas d'inhibition

### IX.4. Les inhibiteurs naturels

Les inhibiteurs naturels de la Cath D sont synthétisés par des bactéries du genre *Streptomyces*. Ces inhibiteurs sont appelés pepstatines de par leur capacité à inhiber l'activité de la pepsine<sup>210</sup>. Ils inhibent l'activité de la Cath D, mais aussi de la cathepsine E et de la rénine<sup>210</sup>. Les pepstatines sont des pentapeptides contenant 3 acides aminés naturels (2 valine et 1 alanine) et deux acides γ-aminés identiques : la statine (l'acide (4S,3S)-4-

amino-3-hydroxy-6-méthylheptanoïque). Elles ne diffèrent les unes des autres que par le groupement N-terminal R, qui est un groupement hydrophobe de type caproyle, isovaléryle ou heptanoyle par exemple.

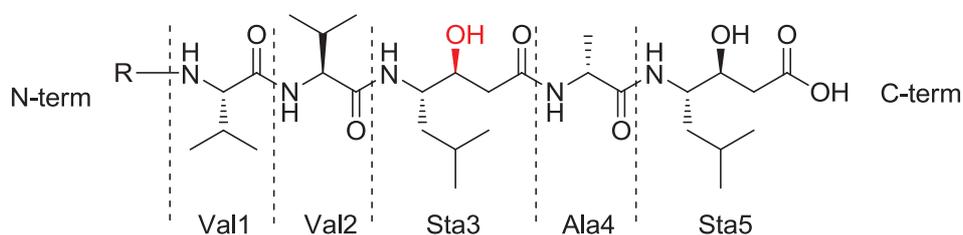


Figure 66 : Représentation générale des pepstatines.

Les différents groupements terminaux ont peu d'influence sur l'inhibition de la Cath D. Ainsi toutes les pepstatines ont des  $IC_{50}$  très proches. Celles-ci sont comprises entre 9,3  $\mu\text{mol/L}$  pour la pepstatine B et 8,8  $\mu\text{mol/L}$  pour la pepstatine A.

Tableau 13 : Concentration inhibitrice médiane de différentes pepstatines pour la cathepsine D.

Peptides naturels	Séquence	$IC_{50}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )
Pepstatine A	iso-valeryl-(Val) <sub>2</sub> -Sta-Ala-Sta-OH	8,8
Pepstatine B	n-caproyl-(Val) <sub>2</sub> -Sta-Ala-Sta-OH	9,3
Pepstatine E	iso-heptanoyl-(Val) <sub>2</sub> -Sta-Ala-Sta-OH	9,1

La pepstatine A possède la constante d'inhibition la plus basse parmi les pepstatines ( $K_i = 0,5 \mu\text{mol/L}$ ). Ce peptide naturel est celui le plus fréquemment utilisé pour l'inhibition des protéases aspartiques dans la littérature<sup>211</sup>.

### IX.5. Un inhibiteur efficace de la cathepsine D : la pepstatine A

La co-cristallisation de la cathepsine D avec la pepstatine A a été réalisée par E. T. Baldwin et coll.<sup>177</sup> (Figure 67).

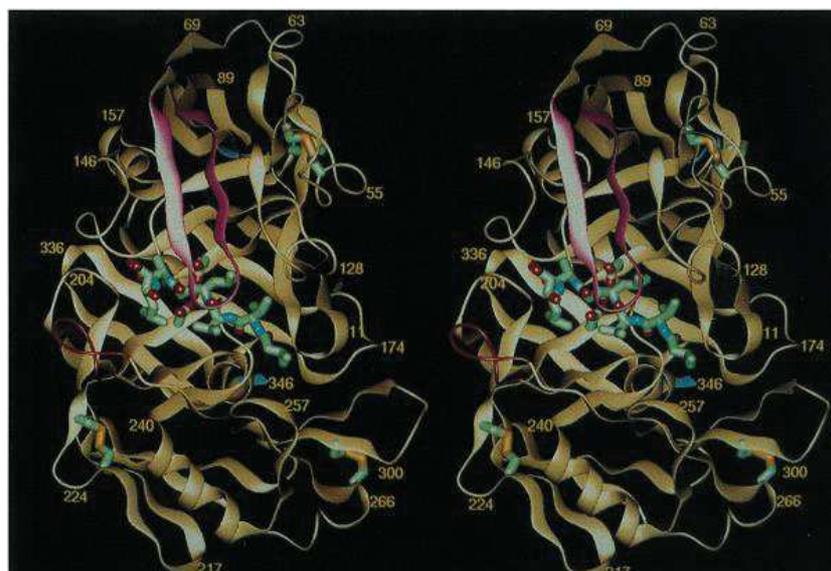


Figure 67 : Structure du complexe pepstatine-Cath D<sup>177</sup> (code PDB : 1LYA).

L'étude cristallographique montre que la pepstatine A, interagit avec le site catalytique de la Cath D en établissant de nombreuses liaisons hydrogène (Figure 68). En particulier, on peut noter les interactions entre les résidus Asp 231 et 33 et le groupement hydroxyle de la statine 3 de l'inhibiteur qui est un mime de l'état de transition lors du clivage de la liaison peptidique par l'enzyme<sup>212</sup>.

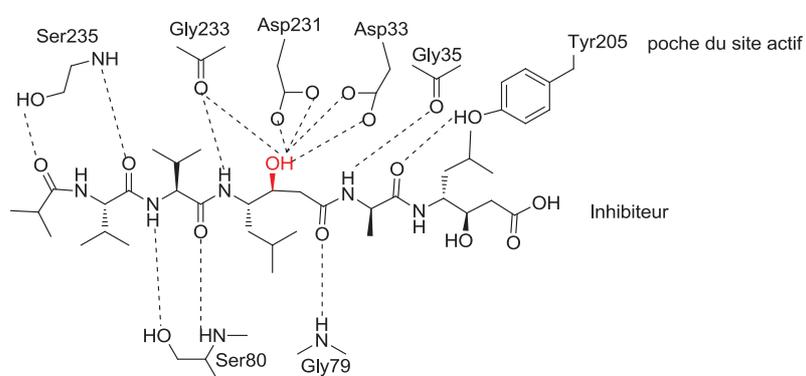


Figure 68 : Interaction entre la pepstatine A et la Cath D (site de clivage représenté en rouge)<sup>177</sup>.

Cependant, comme il a déjà été souligné, cet inhibiteur n'a aucun effet sur la croissance tumorale<sup>213</sup>. L'explication avancée par M. Fusek et coll. est que l'effet mitogène de la Cath D ne dépend pas de son activité protéolytique, mais de l'action de la proCath D comme ligand sur des récepteurs membranaires. Cependant, ce manque d'activité inhibitrice a également été attribué à l'incapacité de la pepstatine A à traverser les membranes cellulaires et ainsi inhiber l'activité protéolytique de la Cath D intracellulaire<sup>214</sup>. Afin d'apporter des éléments de réponses, notre groupe s'est particulièrement intéressé au développement de molécules capables de vectoriser la pepstatine A au niveau des lysosomes où la Cath D

est principalement localisée<sup>168</sup>. L'étude menée durant la thèse du Dr L. Vezekov a permis d'identifier en particulier un conjugué associant la pepstatine A à un vecteur AMPA<sub>4</sub> et une partie hydrophile qui permet d'augmenter la solubilité du composé. (Figure 69)

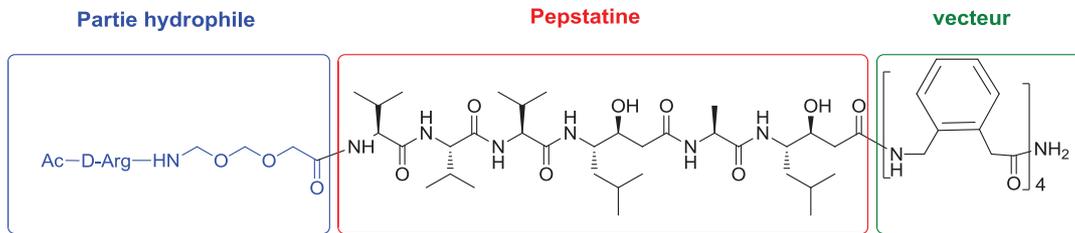


Figure 69 : Représentation du conjugué.

Il a été montré que ce composé est capable d'inhiber l'activité protéolytique de la Cath D *in vitro* et *in cellulo* ainsi que la prolifération de cellules de plusieurs lignées cancéreuses. Cette étude a permis de mettre en évidence l'implication de l'activité catalytique de la Cath D dans la prolifération de cellules cancéreuses. Suite à ces résultats, des tests *in vivo* sur souris ont été menés et ont montré une inhibition de la croissance tumorale<sup>168</sup>. Cette étude a constitué une partie de ma thèse, elle est présentée dans le chapitre III (études biologiques) de ce manuscrit.



- (1) Weinman, S.; Méhul, P. *Toute la biochimie*; Dunod: Paris, 2004.
- (2) Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balaram, P. Design of Folded Peptides†. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3131–3152.
- (3) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer. *Biochemistry*; W.H. Freeman: New York, 2012.
- (4) Ramachandran, G. N.; Sasisekharan, V. Conformation of Polypeptides and Proteins. In *Advances in Protein Chemistry*; C.B. Anfinsen, M. L. A., John T. Edsall and Frederic M. Richards, Ed.; Academic Press, 1968; Vol. Volume 23, pp. 283–437.
- (5) Mathews, C. K.; van Holde, K. E.; Haern, K., G. *Biochemistry* (3rd Edition).
- (6) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. Conformational Parameters for Amino Acids in Helical, B-Sheet, and Random Coil Regions Calculated from Proteins. *Biochemistry (Mosc.)* **1974**, *13*, 211–222.
- (7) Williams, R. W.; Chang, A.; Juretić, D.; Loughran, S. Secondary Structure Predictions and Medium Range Interactions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1987**, *916*, 200–204.
- (8) Petsko, G. A.; Ringe, D. *Protein Structure and Function*; New Science Press, 2004.
- (9) Pauling, L.; Corey, R. B.; Branson, H. R. The Structure of Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1951**, *37*, 205–211.
- (10) Huggins, M. L. The Structure of Fibrous Proteins. *Chem. Rev.* **1943**, *32*, 195–218.
- (11) Vieira-Pires, R. S.; Morais-Cabral, J. H. 310 Helices in Channels and Other Membrane Proteins. *J. Gen. Physiol.* **2010**, *136*, 585–592.
- (12) Paterson, Y.; Rumsey, S. M.; Benedetti, E.; Nemethy, G.; Scheraga, H. A. Sensitivity of Polypeptide Conformation to Geometry. Theoretical Conformational Analysis of Oligomers of .alpha.-Aminoisobutyric Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2947–2955.
- (13) Crisma, M.; Formaggio, F.; Moretto, A.; Toniolo, C. Peptide Helices Based on A-Amino Acids. *Pept. Sci.* **2006**, *84*, 3–12.
- (14) He, X. L.; Bazan, J. F.; McDermott, G.; Park, J. B.; Wang, K.; Tessier-Lavigne, M.; He, Z.; Garcia, K. C. Structure of the Nogo Receptor Ectodomain: A Recognition Module Implicated in Myelin Inhibition. *Neuron* **2003**, *38*, 177–185.
- (15) Gay, N. J.; Gangloff, M. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 141–165.
- (16) Rittinger, K.; Walker, P. A.; Eccleston, J. F.; Smerdon, S. J.; Gamblin, S. J. Structure at 1.65 Å of RhoA and Its GTPase-Activating Protein in Complex with a Transition-State Analogue. *Nature* **1997**, *389*, 758–762.
- (17) Donohue, J. Hydrogen Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1953**, *39*, 470–478.

- (18) Cooley, R. B.; Arp, D. J.; Karplus, P. A. Evolutionary Origin of a Secondary Structure:  $\alpha$ -Helices as Cryptic but Widespread Insertional Variations of  $\alpha$ -Helices Enhancing Protein Functionality. *J. Mol. Biol.* **2010**, *404*, 232–246.
- (19) Cowan, P. M.; McGAVIN, S.; North, A. C. T. The Polypeptide Chain Configuration of Collagen. *Nature* **1955**, *176*, 1062–1064.
- (20) Adzhubei, A. A.; Sternberg, M. J. E.; Makarov, A. A. Polyproline-II Helix in Proteins: Structure and Function. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 2100–2132.
- (21) Musacchio, A.; Saraste, M.; Wilmanns, M. High-Resolution Crystal Structures of Tyrosine Kinase SH3 Domains Complexed with Proline-Rich Peptides. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1994**, *1*, 546–551.
- (22) Stanger, H. E.; Syud, F. A.; Espinosa, J. F.; Giriat, I.; Muir, T.; Gellman, S. H. Length-Dependent Stability and Strand Length Limits in Antiparallel  $\beta$ -Sheet Secondary Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 12015–12020.
- (23) Syud, F. A.; Stanger, H. E.; Mortell, H. S.; Espinosa, J. F.; Fisk, J. D.; Fry, C. G.; Gellman, S. H. Influence of Strand Number on Antiparallel  $\beta$ -Sheet Stability in Designed Three- and Four-Stranded  $\beta$ -Sheets. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 553–568.
- (24) Sprague, E. R.; Redd, M. J.; Johnson, A. D.; Wolberger, C. Structure of the C-Terminal Domain of Tup1, a Corepressor of Transcription in Yeast. *EMBO J.* **2000**, *19*, 3016–3027.
- (25) Ruiz-Gómez, G.; Tyndall, J. D. A.; Pfeiffer, B.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. Over One Hundred Peptide-Activated G Protein-Coupled Receptors Recognize Ligands with Turn Structure. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, PR1–PR41.
- (26) Koch, O.; Klebe, G. Turns Revisited: A Uniform and Comprehensive Classification of Normal, Open, and Reverse Turn Families Minimizing Unassigned Random Chain Portions. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2009**, *74*, 353–367.
- (27) K, G.; S, R. Beta- and Gamma-Turns in Proteins Revisited: A New Set of Amino Acid Turn-Type Dependent Positional Preferences and Potentials. *J. Biosci.* **2000**, *25*, 143–156.
- (28) Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M. A Revised Set of Potentials for  $\beta$ -Turn Formation in Proteins. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 2207–2216.
- (29) Richardson, J. S. The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure. In *Advances in Protein Chemistry*; C.B. Anfinsen, J. T. E. and F. M. R., Ed.; Academic Press, 1981; Vol. Volume 34, pp. 167–339.
- (30) Chou, K.-C. Prediction of Tight Turns and Their Types in Proteins. *Anal. Biochem.* **2000**, *286*, 1–16.

- (31) Dasgupta, B.; Pal, L.; Basu, G.; Chakrabarti, P. Expanded Turn Conformations: Characterization and Sequence-Structure Correspondence in A-Turns with Implications in Helix Folding. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2004**, *55*, 305–315.
- (32) Watson, H. C. The Stereochemistry of the Protein Myoglobin. *Prog. Stereochem.* **1973**, *4*, 299 – null.
- (33) Dasgupta, B.; Chakrabarti, P. Pi-Turns: Types, Systematics and the Context of Their Occurrence in Protein Structures. *BMC Struct. Biol.* **2008**, *8*, 39.
- (34) Schellman, C. Protein Folding. *Elsevier/ North-Holland, New York*, 1980, 53–61.
- (35) Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatisky, M. Synthetic Therapeutic Peptides: Science and Market. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 40–56.
- (36) Guichard, G.; Calbo, S.; Muller, S.; Kourilsky, P.; Briand, J.-P.; Abastado, J.-P. Efficient Binding of Reduced Peptide Bond Pseudopeptides to Major Histocompatibility Complex Class I Molecule. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26057–26059.
- (37) Chorev, M.; Goodman, M. A Dozen Years of Retro-Inverso Peptidomimetics. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 266–273.
- (38) Toniolo, C. Conformationally Restricted Peptides through Short-Range Cyclizations. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 287–300.
- (39) Whitby, L. R.; Ando, Y.; Setola, V.; Vogt, P. K.; Roth, B. L.; Boger, D. L. Design, Synthesis, and Validation of a B-Turn Mimetic Library Targeting Protein–Protein and Peptide–Receptor Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10184–10194.
- (40) Seebach, D.; Sifferlen, T.; Mathieu, P. A.; Häne, A. M.; Krell, C. M.; Bierbaum, D. J.; Abele, S. CD Spectra in Methanol of B-Oligopeptides Consisting of B-Amino Acids with Functionalized Side Chains, with Alternating Configuration, and with Geminal Backbone Substituents – Fingerprints of New Secondary Structures? *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2849–2864.
- (41) Seebach, D.; Abele, S.; Gademann, K.; Jaun, B. Pleated Sheets and Turns of B-Peptides with Proteinogenic Side Chains. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1595–1597.
- (42) Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5891–5892.
- (43) Gellman, S. H. Foldamers: A Manifesto. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173–180.
- (44) Hill, D. J.; Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S. A Field Guide to Foldamers. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893–4012.

- (45) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. B-Peptide Foldamers: Robust Helix Formation in a New Family of B-Amino Acid Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071–13072.
- (46) Seebach, D.; Ciceri, P. E.; Overhand, M.; Jaun, B.; Rigo, D.; Oberer, L.; Hommel, U.; Amstutz, R.; Widmer, H. Probing the Helical Secondary Structure of Short-Chain B-Peptides. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2043–2066.
- (47) Hamuro, Y.; Geib, S. J.; Hamilton, A. D. Novel Folding Patterns in a Family of Oligoanthranilamides: Non-Peptide Oligomers That Form Extended Helical Secondary Structures. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10587–10593.
- (48) Dervan, P. B.; Bürli, R. W. Sequence-Specific DNA Recognition by Polyamides. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 688–693.
- (49) Price, J. L.; Horne, W. S.; Gellman, S. H. Structural Consequences of B-Amino Acid Preorganization in a Self-Assembling A/β-Peptide: Fundamental Studies of Foldameric Helix Bundles. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12378–12387.
- (50) Basuroy, K.; Dinesh, B.; Shamala, N.; Balaram, P. Promotion of Folding in Hybrid Peptides through Unconstrained Γ Residues: Structural Characterization of Helices in (αγγ)<sub>n</sub> and (αγδ)<sub>n</sub> Sequences. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, n/a – n/a.
- (51) Sharma, G. V. M.; Babu, B. S.; Ramakrishna, K. V. S.; Nagendar, P.; Kunwar, A. C.; Schramm, P.; Baldauf, C.; Hofmann, H.-J. Synthesis and Structure of A/δ-Hybrid Peptides—Access to Novel Helix Patterns in Foldamers. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15*, 5552–5566.
- (52) Guo, L.; Almeida, A. M.; Zhang, W.; Reidenbach, A. G.; Choi, S. H.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. Helix Formation in Preorganized B/γ-Peptide Foldamers: Hydrogen-Bond Analogy to the A-Helix without A-Amino Acid Residues. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7868–7869.
- (53) Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. B-Peptides: From Structure to Function. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232.
- (54) Kovacs, J.; Ballina, R.; Rodin, R. L.; Balasubramanian, D.; Applequist, J. Poly-B-L-Aspartic Acid. Synthesis through Pentachlorophenyl Active Ester and Conformational Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 119–120.
- (55) Fernández-Santín, J. M.; Aymamí, J.; Rodríguez-Galán, A.; Muñoz-Guerra, S.; Subirana, J. A. A Pseudo A-Helix from Poly(α-Isobutyl-L-Aspartate), a Nylon-3 Derivative. *Nature* **1984**, *311*, 53–54.
- (56) Seebach, D.; Matthews, J. L. B-Peptides: A Surprise at Every Turn. *Chem. Commun.* **1997**, 2015–2022.

- (57) Matthews, J. L.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D. Linear and Cyclic B-3-Oligopeptides with Functionalised Side-Chains (-CH<sub>2</sub>OBn, -CO<sub>2</sub>Bn, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Bn) Derived from Serine and from Aspartic and Glutamic Acid. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1998**, 3331–3340.
- (58) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Richards, M. R.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. Synthesis and Structural Characterization of Helix-Forming B-Peptides: Trans-2-Aminocyclopentanecarboxylic Acid Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7574–7581.
- (59) Mathad, R. I.; Gessier, F.; Seebach, D.; Jaun, B. The Effect of Backbone-Heteroatom Substitution on the Folding of Peptides – A Single Fluorine Substituent Prevents a B-Heptapeptide from Folding into a 314-Helix (NMR Analysis). *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 266–280.
- (60) Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Peggion, C. Control of Peptide Conformation by the Thorpe-Ingold Effect (C $\alpha$ -Tetrasubstitution). *Pept. Sci.* **2001**, *60*, 396–419.
- (61) Glättli, A.; Daura, X.; Seebach, D.; van Gunsteren, W. F. Can One Derive the Conformational Preference of a B-Peptide from Its CD Spectrum? *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12972–12978.
- (62) Seebach, D.; Hook, D. F.; Glättli, A. Helices and Other Secondary Structures of B- and  $\Gamma$ -Peptides. *Pept. Sci.* **2006**, *84*, 23–37.
- (63) Appella, D. H.; Barchi, J. J.; Durell, S. R.; Gellman, S. H. Formation of Short, Stable Helices in Aqueous Solution by B-Amino Acid Hexamers. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2309–2310.
- (64) Vaz, E.; Pomerantz, W. C.; Geyer, M.; Gellman, S. H.; Brunsveld, L. Comparison of Design Strategies for Promotion of B-Peptide 14-Helix Stability in Water. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2254–2259.
- (65) Arvidsson, P. I.; Rueping, M.; Seebach, D. Design, Machine Synthesis, and NMR-Solution Structure of a B-Heptapeptide Forming a Salt-Bridge Stabilised 314-Helix in Methanol and in Water. *Chem. Commun.* **2001**, 649–650.
- (66) Cheng, R. P.; DeGrado, W. F. De Novo Design of a Monomeric Helical B-Peptide Stabilized by Electrostatic Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5162–5163.
- (67) Guarracino, D. A.; Chiang, H. R.; Banks, T. N.; Lear, J. D.; Hodsdon, M. E.; Schepartz, A. Relationship between Salt-Bridge Identity and 14-Helix Stability of  $\beta$ 3-Peptides in Aqueous Buffer. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 807–810.
- (68) Park, J.-S.; Lee, H.-S.; Lai, J. R.; Kim, B. M.; Gellman, S. H. Accommodation of A-Substituted Residues in the B-Peptide 12-Helix: Expanding the Range of Substitution

- Patterns Available to a Foldamer Scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8539–8545.
- (69) Wang, X.; Espinosa, J. F.; Gellman, S. H. 12-Helix Formation in Aqueous Solution with Short B-Peptides Containing Pyrrolidine-Based Residues. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4821–4822.
- (70) Porter, E. A.; Wang, X.; Schmitt, M. A.; Gellman, S. H. Synthesis and 12-Helical Secondary Structure of B-Peptides Containing (2R,3R)-Aminoproline. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3317–3319.
- (71) Lee, H.-S.; Syud, F. A.; Wang, X.; Gellman, S. H. Diversity in Short B-Peptide 12-Helices: High-Resolution Structural Analysis in Aqueous Solution of a Hexamer Containing Sulfonylated Pyrrolidine Residues. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7721–7722.
- (72) Fernandes, C.; Faure, S.; Pereira, E.; Théry, V.; Declerck, V.; Guillot, R.; Aitken, D. J. 12-Helix Folding of Cyclobutane B-Amino Acid Oligomers. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3606–3609.
- (73) Pandey, S. K.; Jogdand, G. F.; Oliveira, J. C. A.; Mata, R. A.; Rajamohanam, P. R.; Ramana, C. V. Synthesis and Structural Characterization of Homochiral Homo-Oligomers of Parent Cis- and Trans-Furanoid-B-Amino Acids. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17*, 12946–12954.
- (74) Möhle, K.; Günther, R.; Thormann, M.; Sewald, N.; Hofmann, H.-J. Basic Conformers in B-Peptides. *Biopolymers* **1999**, *50*, 167–184.
- (75) Barker, S. F.; Angus, D.; Taillefumier, C.; Probert, M. R.; Watkin, D. J.; Watterson, M. P.; Claridge, T. D. W.; Hungerford, N. L.; Fleet, G. W. J. Cis- and Trans-3-Azido-Oxetane-2-Carboxylate Scaffolds: Hexamers of Oxetane Cis-B-Amino Acids. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4247–4250.
- (76) Hetényi, A.; Mándity, I. M.; Martinek, T. A.; Tóth, G. K.; Fülöp, F. Chain-Length-Dependent Helical Motifs and Self-Association of B-Peptides with Constrained Side Chains. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 547–553.
- (77) Bolin, K. A.; Millhauser, G. L. A and 310: The Split Personality of Polypeptide Helices. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 1027–1033.
- (78) Abele, S.; Seiler, P.; Seebach, D. Synthesis, Crystal Structures, and Modelling of B-Oligopeptides Consisting of 1-(Aminomethyl)cyclopropanecarboxylic Acid: Ribbon-Type Arrangement of Eight-Membered H-Bonded Rings. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1559–1571.
- (79) Gademann, K.; Häne, A.; Rueping, M.; Jaun, B.; Seebach, D. The Fourth Helical Secondary Structure of B-Peptides: The (P)-28-Helix of a B-Hexapeptide Consisting

- of (2R,3S)-3-Amino-2-Hydroxy Acid Residues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1534–1537.
- (80) Yang, D.; Zhang, Y.-H.; Zhu, N.-Y.  $\beta$ 2,2-Aminoxy Acids: A New Building Block for Turns and Helices. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9966–9967.
- (81) Yang, D.; Chang, X.-W.; Zhang, D.-W.; Jiang, Z.-F.; Song, K.-S.; Zhang, Y.-H.; Zhu, N.-Y.; Weng, L.-H.; Chen, M.-Q. Chiral  $\alpha$ -Aminoxy Acid/Achiral Cyclopropane  $\alpha$ -Aminoxy Acid Unit as a Building Block for Constructing the  $\alpha$  N–O Helix. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4796–4805.
- (82) Salaün, A.; Potel, M.; Roisnel, T.; Gall, P.; Le Grel, P. Crystal Structures of Aza- $\beta$ 3-Peptides, A New Class of Foldamers Relying on a Framework of Hydrazinoturns. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6499–6502.
- (83) Hintermann, T.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D.  $\Gamma$ -Peptides Forming More Stable Secondary Structures than  $\alpha$ -Peptides: Synthesis and Helical NMR-Solution Structure of the  $\Gamma$ -Hexapeptide Analog of H-(Val-Ala-Leu)<sub>2</sub>-OH. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 983–1002.
- (84) Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R.; Michnick, S. Design of Secondary Structures in Unnatural Peptides: Stable Helical  $\Gamma$ -Tetra-, Hexa-, and Octapeptides and Consequences of  $\alpha$ -Substitution. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8569–8570.
- (85) Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R. Synthesis and Folding Preferences of  $\Gamma$ -Amino Acid Oligopeptides: Stereochemical Control in the Formation of a Reverse Turn and a Helix. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4925–4929.
- (86) Baldauf, C.; Günther, R.; Hofmann, H.-J. Helix Formation and Folding in  $\Gamma$ -Peptides and Their Vinylogues. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2573–2588.
- (87) Baldauf, C.; Günther, R.; Hofmann, H.-J. Control of Helix Formation in Vinylogous  $\Gamma$ -Peptides by ( *E* )- and ( *Z* )-Double Bonds: A Way to Ion Channels and Monomolecular Nanotubes. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5351–5361.
- (88) Mathieu, L.; Legrand, B.; Deng, C.; Vezenkov, L.; Wenger, E.; Didierjean, C.; Amblard, M.; Averlant-Petit, M.-C.; Masurier, N.; Lisowski, V.; et al. Helical Oligomers of Thiazole-Based  $\Gamma$ -Amino Acids: Synthesis and Structural Studies. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6006–6010.
- (89) Qureshi, M. K. N.; Smith, M. D. Parallel Sheet Structure in Cyclopropane  $\Gamma$ -Peptides Stabilized by C–HO Hydrogen Bonds. *Chem. Commun.* **2006**, 5006–5008.
- (90) Liang, G.-B.; Gellman, S. H. B-Turn and B-Hairpin Mimicry with Tetrasubstituted Alkenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1806–1816.
- (91) Cox, M. T.; Heaton, D. W.; Horbury, J. Preparation of Protected Trans-Olefinic Dipeptide Isosteres. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 799–800.

- (92) Szabo, L.; Smith, B. L.; McReynolds, K. D.; Parrill, A. L.; Morris, E. R.; Gervay, J. Solid Phase Synthesis and Secondary Structural Studies of (1→5) Amide-Linked Sialooligomers1. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1074–1078.
- (93) McReynolds, K. D.; Gervay-Hague, J. Examining the Secondary Structures of Unnatural Peptides and Carbohydrate-Based Compounds Utilizing Circular Dichroism. *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, *11*, 337–362.
- (94) Hungerford, N. L.; Claridge, T. D. W.; Watterson, M. P.; Aplin, R. T.; Moreno, A.; Fleet, G. W. J. Tetrahydrofuran Amino Acids: Secondary Structure in Tetrameric and Octameric Carbopeptoids Derived from a D-Allo 5-(aminomethyl)tetrahydrofuran-2-Carboxylic Acid. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **2000**, 3666–3679.
- (95) Claridge, T. D. W.; Long, D. D.; Hungerford, N. L.; Aplin, R. T.; Smith, M. D.; Marquess, D. G.; Fleet, G. W. J. An Octameric Carbopeptoid; Secondary Structure in Octameric and Tetrameric 5-Aminomethyl-Tetrahydrofuran-2-Carboxylates. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2199–2202.
- (96) Berl, V.; Huc, I.; Khoury, R. G.; Krische, M. J.; Lehn, J.-M. Interconversion of Single and Double Helices Formed from Synthetic Molecular Strands. *Nature* **2000**, *407*, 720–723.
- (97) Akazome, M.; Ishii, Y.; Nireki, T.; Ogura, K. Induced Helix of 2-(2-Aminophenoxy)alkanoic Acid Oligomers as a  $\Delta$ -Peptidomimetic Foldamer. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4430–4433.
- (98) Raynal, N.; Averlant-Petit, M.-C.; Bergé, G.; Didierjean, C.; Marraud, M.; Duru, C.; Martinez, J.; Amblard, M. Molecular Modeling Study for a Novel Structured Oligomer Subunit Selection: The Example of 2-Aminomethyl-Phenyl-Acetic Acid. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1787–1790.
- (99) Wu, C. W.; Kirshenbaum, K.; Sanborn, T. J.; Patch, J. A.; Huang, K.; Dill, K. A.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. Structural and Spectroscopic Studies of Peptoid Oligomers with A-Chiral Aliphatic Side Chains. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13525–13530.
- (100) Huang, K.; Wu, C. W.; Sanborn, T. J.; Patch, J. A.; Kirshenbaum, K.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E.; Radhakrishnan, I. A Threaded Loop Conformation Adopted by a Family of Peptoid Nonamers. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1733–1738.
- (101) Tomasini, C.; Angelici, G.; Castellucci, N. Foldamers Based on Oxazolidin-2-Ones. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 3648–3669.
- (102) Angelici, G.; Falini, G.; Hofmann, H.-J.; Huster, D.; Monari, M.; Tomasini, C. Nanofibers from Oxazolidin-2-One Containing Hybrid Foldamers: What Is the Right Molecular Size? *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15*, 8037–8048.

- (103) Crisma, M.; Moretto, A.; Toniolo, C.; Kaczmarek, K.; Zabrocki, J. First Rigid Peptide Foldamers with an Alternating Cis–Trans Amide Sequence. An Oligomeric Building Block for the Construction of New Helices, Large-Ring Cyclic Correlates, and Nanotubes. *Macromolecules* **2001**, *34*, 5048–5052.
- (104) Deshmukh, R.; Purohit, H. Peptide Scaffolds: Flexible Molecular Structures With Diverse Therapeutic Potentials. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2012**, *18*, 125–143.
- (105) Goodman, C. M.; Choi, S.; Shandler, S.; DeGrado, W. F. Foldamers as Versatile Frameworks for the Design and Evolution of Function. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 252–262.
- (106) Zasloff, M. Magainins, a Class of Antimicrobial Peptides from *Xenopus* Skin: Isolation, Characterization of Two Active Forms, and Partial cDNA Sequence of a Precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 5449–5453.
- (107) Bulet, P. Les Peptides Antimicrobiens de La Drosophile. **1999**.
- (108) Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. Mimicry of Host-Defense Peptides by Unnatural Oligomers: Antimicrobial B-Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7324–7330.
- (109) Schmitt, M. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. Interplay among Folding, Sequence, and Lipophilicity in the Antibacterial and Hemolytic Activities of A/β-Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 417–428.
- (110) Violette, A.; Fournel, S.; Lamour, K.; Chaloin, O.; Frisch, B.; Briand, J.-P.; Monteil, H.; Guichard, G. Mimicking Helical Antibacterial Peptides with Nonpeptidic Folding Oligomers. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 531–538.
- (111) Claudon, P.; Violette, A.; Lamour, K.; Decossas, M.; Fournel, S.; Heurtault, B.; Godet, J.; Mély, Y.; Jamart-Grégoire, B.; Averlant-Petit, M.-C.; et al. Consequences of Isostructural Main-Chain Modifications for the Design of Antimicrobial Foldamers: Helical Mimics of Host-Defense Peptides Based on a Heterogeneous Amide/Urea Backbone. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 333–336.
- (112) Kritzer, J. A.; Lear, J. D.; Hodsdon, M. E.; Schepartz, A. Helical B-Peptide Inhibitors of the p53-hDM2 Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9468–9469.
- (113) Harker, E. A.; Daniels, D. S.; Guarracino, D. A.; Schepartz, A. B-Peptides with Improved Affinity for hDM2 and hDMX. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2038–2046.
- (114) Ernst, J. T.; Becerril, J.; Park, H. S.; Yin, H.; Hamilton, A. D. Design and Application of an A-Helix-Mimetic Scaffold Based on an Oligoamide-Foldamer Strategy: Antagonism of the Bak BH3/Bcl-xL Complex. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 535–539.

- (115) Yin, H.; Lee, G.; Park, H. S.; Payne, G. A.; Rodriguez, J. M.; Sebti, S. M.; Hamilton, A. D. Terphenyl-Based Helical Mimetics That Disrupt the p53/HDM2 Interaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2704–2707.
- (116) Sattler, M.; Liang, H.; Nettlesheim, D.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Eberstadt, M.; Yoon, H. S.; Shuker, S. B.; Chang, B. S.; Minn, A. J.; et al. Structure of Bcl-xL-Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis. *Science* **1997**, *275*, 983–986.
- (117) Rodriguez, J. M.; Ross, N. T.; Katt, W. P.; Dhar, D.; Lee, G.; Hamilton, A. D. Structure and Function of Benzoylurea-Derived  $\alpha$ -Helix Mimetics Targeting the Bcl-xL/Bak Binding Interface. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 649–656.
- (118) Sadowsky, J. D.; Schmitt, M. A.; Lee, H.-S.; Umezawa, N.; Wang, S.; Tomita, Y.; Gellman, S. H. Chimeric ( $\alpha/\beta + A$ )-Peptide Ligands for the BH3-Recognition Cleft of Bcl-xL: Critical Role of the Molecular Scaffold in Protein Surface Recognition. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11966–11968.
- (119) Sadowsky, J. D.; Fairlie, W. D.; Hadley, E. B.; Lee, H.-S.; Umezawa, N.; Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, S.; Huang, D. C. S.; Tomita, Y.; Gellman, S. H. ( $\alpha/\beta + \alpha$ )-Peptide Antagonists of BH3 Domain/Bcl-xL Recognition: Toward General Strategies for Foldamer-Based Inhibition of Protein–Protein Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 139–154.
- (120) Edwards, T.; Wilson, A. Helix-Mediated Protein–protein Interactions as Targets for Intervention Using Foldamers. *Amino Acids* **2011**, *41*, 743–754.
- (121) Imamura, Y.; Umezawa, N.; Osawa, S.; Shimada, N.; Higo, T.; Yokoshima, S.; Fukuyama, T.; Iwatsubo, T.; Kato, N.; Tomita, T.; et al. Effect of Helical Conformation and Side Chain Structure on  $\Gamma$ -Secretase Inhibition by B-Peptide Foldamers: Insight into Substrate Recognition. *J. Med. Chem.* **2013**.
- (122) Prabhakaran, P.; Priya, G.; Sanjayan, G. J. Foldamers: They're Not Just for Biomedical Applications Anymore. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4006–4008.
- (123) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*; 4th ed.; Garland Science, 2002.
- (124) Cahill, K. Simple Model of the Transduction of Cell-Penetrating Peptides. *IET Syst. Biol.* **2009**, *3*, 300–306.
- (125) Wilson, R. The Extracellular Matrix: An Underexplored but Important Proteome. *Expert Rev. Proteomics* **2010**, *7*, 803–806.
- (126) Yanagishita, M.; Podyma-Inoue, K. A.; Yokoyama, M. Extraction and Separation of Proteoglycans. *Glycoconj. J.* **2009**, *26*, 953–959.

- (127) Heitz, F.; Morris, M. C.; Divita, G. Twenty Years of Cell-Penetrating Peptides: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 195–206.
- (128) Torchilin, V. P. Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 145–160.
- (129) Liu, T.-C.; Galanis, E.; Kirn, D. Clinical Trial Results with Oncolytic Virotherapy: A Century of Promise, a Decade of Progress. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2007**, *4*, 101–117.
- (130) Mudshinge, S. R.; Deore, A. B.; Patil, S.; Bhalgat, C. M. Nanoparticles: Emerging Carriers for Drug Delivery. *Saudi Pharm. J. SPJ* **2011**, *19*, 129–141.
- (131) Frankel, A. D.; Pabo, C. O. Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus. *Cell* **1988**, *55*, 1189–1193.
- (132) Green, M.; Loewenstein, P. M. Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein. *Cell* **1988**, *55*, 1179–1188.
- (133) Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostini-Bazin, H.; Prochiantz, A. Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 1864–1868.
- (134) Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444–10450.
- (135) Gaudin, Y.; Ruigrok, R. W. H.; Brunner, J. Low-pH Induced Conformational Changes in Viral Fusion Proteins: Implications for the Fusion Mechanism. *J. Gen. Virol.* **1995**, *76*, 1541–1556.
- (136) Basseur, R.; Divita, G. Happy Birthday Cell Penetrating Peptides: Already 20 Years. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2010**, *1798*, 2177–2181.
- (137) Milletti, F. Cell-Penetrating Peptides: Classes, Origin, and Current Landscape. *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 850–860.
- (138) Bechara, C.; Sagan, S. Cell-Penetrating Peptides: 20 Years Later, Where Do We Stand? *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1693–1702.
- (139) Lindberg, M.; Gräslund, A. The Position of the Cell Penetrating Peptide Penetratin in SDS Micelles Determined by NMR. *FEBS Lett.* **2001**, *497*, 39–44.
- (140) Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. Arginine-Rich Peptides AN ABUNDANT SOURCE OF MEMBRANE-PERMEABLE PEPTIDES HAVING POTENTIAL AS CARRIERS FOR INTRACELLULAR PROTEIN DELIVERY. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5836–5840.

- (141) Tünnemann, G.; Ter-Avetisyan, G.; Martin, R. M.; Stöckl, M.; Herrmann, A.; Cardoso, M. C. Live-Cell Analysis of Cell Penetration Ability and Toxicity of Oligo-Arginines. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 469–476.
- (142) Prochiantz, A. Getting Hydrophilic Compounds into Cells: Lessons from Homeopeptides. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1996**, *6*, 629–634.
- (143) Derossi, D.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. Trojan Peptides: The Penetratin System for Intracellular Delivery. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 84–87.
- (144) Delaroche, D.; Aussedat, B.; Aubry, S.; Chassaing, G.; Burlina, F.; Clodic, G.; Bolbach, G.; Lavielle, S.; Sagan, S. Tracking a New Cell-Penetrating (W/R) Nonapeptide, through an Enzyme-Stable Mass Spectrometry Reporter Tag. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1932–1938.
- (145) Oehlke, J.; Scheller, A.; Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Klauschenz, E.; Melzig, M.; Bienert, M. Cellular Uptake of an  $\alpha$ -Helical Amphipathic Model Peptide with the Potential to Deliver Polar Compounds into the Cell Interior Non-Endocytically. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1998**, *1414*, 127–139.
- (146) Scheller, A.; Oehlke, J.; Wiesner, B.; Dathe, M.; Krause, E.; Beyermann, M.; Melzig, M.; Bienert, M. Structural Requirements for Cellular Uptake of  $\alpha$ -Helical Amphipathic Peptides. *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 185–194.
- (147) Oehlke, J.; Scheller, A.; Janek, K.; Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Bienert, M. Rapid Translocation of Amphipathic  $\alpha$ -Helical and  $\beta$ -Sheet-Forming Peptides through Plasma Membranes of Endothelial Cells. In *Peptide Science — Present and Future*; Shimonishi, Y., Ed.; Springer Netherlands, 2002; pp. 782–783.
- (148) Oehlke, J.; Krause, E.; Wiesner, B.; Beyermann, M.; Bienert, M. Extensive Cellular Uptake into Endothelial Cells of an Amphipathic  $\beta$ -Sheet Forming Peptide. *FEBS Lett.* **1997**, *415*, 196–199.
- (149) Sadler, K.; Eom, K. D.; Yang, J.-L.; Dimitrova, Y.; Tam, J. P. Translocating Proline-Rich Peptides from the Antimicrobial Peptide Bactenecin 7†. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, *41*, 14150–14157.
- (150) Daniels, D. S.; Schepartz, A. Intrinsically Cell-Permeable Miniature Proteins Based on a Minimal Cationic PPII Motif. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14578–14579.
- (151) Fernández-Carneado, J.; Kogan, M. J.; Pujals, S.; Giralt, E. Amphipathic Peptides and Drug Delivery. *Pept. Sci.* **2004**, *76*, 196–203.
- (152) Martín, I.; Teixidó, M.; Giralt, E. Design, Synthesis and Characterization of a New Anionic Cell-Penetrating Peptide: SAP(E). *ChemBioChem* **2011**, *12*, 896–903.

- (153) Gomez, J. A.; Gama, V.; Yoshida, T.; Sun, W.; Hayes, P.; Leskov, K.; Boothman, D.; Matsuyama, S. Bax-Inhibiting Peptides Derived from Ku70 and Cell-Penetrating Pentapeptides. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 797.
- (154) Rhee, M.; Davis, P. Mechanism of Uptake of C105Y, a Novel Cell-Penetrating Peptide. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1233–1240.
- (155) Marks, J. R.; Placone, J.; Hristova, K.; Wimley, W. C. Spontaneous Membrane-Translocating Peptides by Orthogonal High-Throughput Screening. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8995–9004.
- (156) Fonseca, S. B.; Pereira, M. P.; Kelley, S. O. Recent Advances in the Use of Cell-Penetrating Peptides for Medical and Biological Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 953–964.
- (157) Stanzl, E. G.; Trantow, B. M.; Vargas, J. R.; Wender, P. A. Fifteen Years of Cell-Penetrating, Guanidinium-Rich Molecular Transporters: Basic Science, Research Tools, and Clinical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2944–2954.
- (158) Wender, P. A.; Mitchell, D. J.; Pattabiraman, K.; Pelkey, E. T.; Steinman, L.; Rothbard, J. B. The Design, Synthesis, and Evaluation of Molecules That Enable or Enhance Cellular Uptake: Peptoid Molecular Transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 13003–13008.
- (159) Wender, P. A.; Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Kreider, E. L.; Wylie, B. L. Oligocarbamate Molecular Transporters: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a New Class of Transporters for Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13382–13383.
- (160) Cooley, C. B.; Trantow, B. M.; Nederberg, F.; Kiesewetter, M. K.; Hedrick, J. L.; Waymouth, R. M.; Wender, P. A. Oligocarbonate Molecular Transporters: Oligomerization-Based Syntheses and Cell-Penetrating Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16401–16403.
- (161) Foged, C.; Franzyk, H.; Bahrami, S.; Frokjaer, S.; Jaroszewski, J. W.; Nielsen, H. M.; Olsen, C. A. Cellular Uptake and Membrane-Destabilising Properties of A-Peptide/ $\beta$ -Peptoid Chimeras: Lessons for the Design of New Cell-Penetrating Peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2008**, *1778*, 2487–2495.
- (162) Rueping, M.; Mahajan, Y.; Sauer, M.; Seebach, D. Cellular Uptake Studies with B-Peptides. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 257–259.
- (163) Seebach, D.; Beck, A. K.; Bierbaum, D. J. The World of B- and  $\Gamma$ -Peptides Comprised of Homologated Proteinogenic Amino Acids and Other Components. *Chem. Biodivers.* **2004**, *1*, 1111–1239.

- (164) Kolesinska, B.; Podwysocka, D. J.; Rueping, M. A.; Seebach, D.; Kamena, F.; Walde, P.; Sauer, M.; Windschiegl, B.; Meyer-Ács, M.; Vor der Brüggén, M.; et al. Permeation through Phospholipid Bilayers, Skin-Cell Penetration, Plasma Stability, and CD Spectra of A- and B-Oligoproline Derivatives. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10*, 1–38.
- (165) Fillon, Y. A.; Anderson, J. P.; Chmielewski, J. Cell Penetrating Agents Based on a Polyproline Helix Scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11798–11803.
- (166) Iriondo-Alberdi, J.; Laxmi-Reddy, K.; Bouguerne, B.; Staedel, C.; Huc, I. Cellular Internalization of Water-Soluble Helical Aromatic Amide Foldamers. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1679–1685.
- (167) Vezenkov, L. L.; Maynadier, M.; Hernandez, J.-F.; Averlant-Petit, M.-C.; Fabre, O.; Benedetti, E.; Garcia, M.; Martinez, J.; Amblard, M. Noncationic Dipeptide Mimic Oligomers as Cell Penetrating Nonpeptides (CPNP). *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1850–1854.
- (168) Maynadier, M.; Vezenkov, L. L.; Amblard, M.; Martin, V.; Gandreuil, C.; Vaillant, O.; Gary-Bobo, M.; Basile, I.; Hernandez, J.-F.; Garcia, M.; et al. Dipeptide Mimic Oligomer Transporter Mediates Intracellular Delivery of Cathepsin D Inhibitors: A Potential Target for Cancer Therapy. *J. Controlled Release* **2013**, *171*, 251–257.
- (169) Lubomir, V. Synthesis, Structural and Biological Analysis of Organized Biomimetic Systems, Università degli Studi di Napoli Federico II, 2010.
- (170) Kawamoto, S.; Takasu, M.; Miyakawa, T.; Morikawa, R.; Oda, T.; Futaki, S.; Nagao, H. Inverted Micelle Formation of Cell-Penetrating Peptide Studied by Coarse-Grained Simulation: Importance of Attractive Force between Cell-Penetrating Peptides and Lipid Head Group. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 095103.
- (171) Deshayes, S.; Plénat, T.; Charnet, P.; Divita, G.; Molle, G.; Heitz, F. Formation of Transmembrane Ionic Channels of Primary Amphipathic Cell-Penetrating Peptides. Consequences on the Mechanism of Cell Penetration. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2006**, *1758*, 1846–1851.
- (172) Wender, P. A.; Galliher, W. C.; Goun, E. A.; Jones, L. R.; Pillow, T. H. The Design of Guanidinium-Rich Transporters and Their Internalization Mechanisms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 452–472.
- (173) Mayor, S.; Pagano, R. E. Pathways of Clathrin-Independent Endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 603–612.
- (174) Laurent-Matha, V.; Derocq, D.; Prebois, C.; Katunuma, N.; Liaudet-Coopman, E. Processing of Human Cathepsin D Is Independent of Its Catalytic Function and Auto-

- Activation: Involvement of Cathepsins L and B. *J. Biochem. (Tokyo)* **2006**, *139*, 363–371.
- (175) Zaidi, N.; Maurer, A.; Nieke, S.; Kalbacher, H. Cathepsin D: A Cellular Roadmap. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *376*, 5–9.
- (176) Barrett, A. J. Cathepsin D. Purification of Isoenzymes from Human and Chicken Liver. *Biochem. J.* **1970**, *117*, 601–607.
- (177) Baldwin, E. T.; Bhat, T. N.; Gulnik, S.; Hosur, M. V.; Sowder, R. C.; Cachau, R. E.; Collins, J.; Silva, A. M.; Erickson, J. W. Crystal Structures of Native and Inhibited Forms of Human Cathepsin D: Implications for Lysosomal Targeting and Drug Design. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 6796–6800.
- (178) Authier, F.; Métioui, M.; Fabrega, S.; Kouach, M.; Briand, G. Endosomal Proteolysis of Internalized Insulin at the C-Terminal Region of the B Chain by Cathepsin D. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 9437–9446.
- (179) Authier, F.; Mort, J. S.; Bell, A. W.; Posner, B. I.; Bergeron, J. J. M. Proteolysis of Glucagon within Hepatic Endosomes by Membrane-Associated Cathepsins B and D. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 15798–15807.
- (180) Diment, S.; Martin, K. J.; Stahl, P. D. Cleavage of Parathyroid Hormone in Macrophage Endosomes Illustrates a Novel Pathway for Intracellular Processing of Proteins. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 13403–13406.
- (181) Piwnica, D.; Fernandez, I.; Binart, N.; Touraine, P.; Kelly, P. A.; Goffin, V. A New Mechanism for Prolactin Processing into 16K PRL by Secreted Cathepsin D. *Mol. Endocrinol.* **2006**, *20*, 3263–3278.
- (182) Baechle, D.; Flad, T.; Cansier, A.; Steffen, H.; Schitteck, B.; Tolson, J.; Herrmann, T.; Dihazi, H.; Beck, A.; Mueller, G. A.; et al. Cathepsin D Is Present in Human Eccrine Sweat and Involved in the Postsecretory Processing of the Antimicrobial Peptide DCD-1L. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 5406–5415.
- (183) Egberts, F.; Heinrich, M.; Jensen, J.-M.; Winoto-Morbach, S.; Pfeiffer, S.; Wickel, M.; Schunck, M.; Steude, J.; Saftig, P.; Proksch, E.; et al. Cathepsin D Is Involved in the Regulation of Transglutaminase 1 and Epidermal Differentiation. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 2295–2307.
- (184) Benes, P.; Vetvicka, V.; Fusek, M. Cathepsin D—Many Functions of One Aspartic Protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2008**, *68*, 12–28.
- (185) Deiss, L. P.; Galinka, H.; Berissi, H.; Cohen, O.; Kimchi, A. Cathepsin D Protease Mediates Programmed Cell Death Induced by Interferon-Gamma, Fas/APO-1 and TNF-Alpha. *EMBO J.* **1996**, *15*, 3861–3870.

- (186) Roberg, K.; Kagedal, K.; Öllinger, K. Microinjection of Cathepsin D Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Fibroblasts. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 89–96.
- (187) Sagulenko, V.; Muth, D.; Sagulenko, E.; Paffhausen, T.; Schwab, M.; Westermann, F. Cathepsin D Protects Human Neuroblastoma Cells from Doxorubicin-Induced Cell Death. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 1869–1877.
- (188) Schestkova, O.; Geisel, D.; Jacob, R.; Hasilik, A. The Catalytically Inactive Precursor of Cathepsin D Induces Apoptosis in Human Fibroblasts and HeLa Cells. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *101*, 1558–1566.
- (189) Öllinger, K. Inhibition of Cathepsin D Prevents Free-Radical-Induced Apoptosis in Rat Cardiomyocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *373*, 346–351.
- (190) Saftig, P.; Hetman, M.; Schmahl, W.; Weber, K.; Heine, L.; Mossmann, H.; Koster, A.; Hess, B.; Evers, M.; von Figura, K. Mice Deficient for the Lysosomal Proteinase Cathepsin D Exhibit Progressive Atrophy of the Intestinal Mucosa and Profound Destruction of Lymphoid Cells. *EMBO J.* **1995**, *14*, 3599–3608.
- (191) Steinfeld, R.; Reinhardt, K.; Schreiber, K.; Hillebrand, M.; Kraetzner, R.; Bruck, W.; Saftig, P.; Gartner, J. Cathepsin D Deficiency Is Associated with a Human Neurodegenerative Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* **2006**, *78*, 988–998.
- (192) Whitaker, J. N.; Herman, P. K.; Sparacio, S. M.; Zhou, S. R.; Benveniste, E. N. Changes Induced in Astrocyte Cathepsin D by Cytokines and Leupeptin. *J. Neurochem.* **1991**, *57*, 406–414.
- (193) Cullen, V.; Lindfors, M.; Ng, J.; Paetau, A.; Swinton, E.; Kolodziej, P.; Boston, H.; Saftig, P.; Woulfe, J.; Feany, M. B.; et al. Cathepsin D Expression Level Affects Alpha-Synuclein Processing, Aggregation, and Toxicity in Vivo. *Mol. Brain* **2009**, *2*, 5.
- (194) Qiao, L.; Hamamichi, S.; Caldwell, K. A.; Caldwell, G. A.; Yacoubian, T. A.; Wilson, S.; Xie, Z.-L.; Speake, L. D.; Parks, R.; Crabtree, D.; et al. Lysosomal Enzyme Cathepsin D Protects against Alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity. *Mol. Brain* **2008**, *1*, 17.
- (195) Chen, G. C.; Lau, K.; Hamilton, R. L.; Kane, J. P. Differences in Local Conformation in Human Apolipoprotein B-100 of Plasma Low Density and Very Low Density Lipoproteins as Identified by Cathepsin D. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12581–12587.
- (196) Liaudet-Coopman, E.; Beaujouin, M.; Derocq, D.; Garcia, M.; Glondu-Lassis, M.; Laurent-Matha, V.; Prébois, C.; Rochefort, H.; Vignon, F. Cathepsin D: Newly Discovered Functions of a Long-Standing Aspartic Protease in Cancer and Apoptosis. *Cancer Lett.* **2006**, *237*, 167–179.

- (197) Masson, O.; Bach, A.-S.; Derocq, D.; Prébois, C.; Laurent-Matha, V.; Pattingre, S.; Liaudet-Coopman, E. Pathophysiological Functions of Cathepsin D: Targeting Its Catalytic Activity versus Its Protein Binding Activity? *Biochimie* **2010**, *92*, 1635–1643.
- (198) Větvička, V.; Větvičková, J.; Fusek, M. Effect of Procathepsin D and Its Activation Peptide on Prostate Cancer Cells. *Cancer Lett.* **1998**, *129*, 55–59.
- (199) M, F.; V, V. Mitogenic function of human procathepsin D: the role of the propeptide. <http://www.biochemj.org/bj/303/bj3030775.htm> (accessed Aug 20, 2014).
- (200) Větvička, V.; Větvičková, J.; Fusek, M. Effect of Human Procathepsin D on Proliferation of Human Cell Lines. *Cancer Lett.* **1994**, *79*, 131–135.
- (201) Bazzett, L. B.; Watkins, C. S.; Gercel-Taylor, C.; Taylor, D. D. Modulation of Proliferation and Chemosensitivity by Procathepsin D and Its Peptides in Ovarian Cancer. *Gynecol. Oncol.* **1999**, *74*, 181–187.
- (202) Větvička, V.; Větvičková, J.; Beneš, P. Role of Enzymatically Inactive Procathepsin D in Lung Cancer. *Anticancer Res.* **2004**.
- (203) Down-Regulation of Cathepsin-D Expression by Antisense Gene Transfer Inhibits Tumor Growth and Experimental Lung Metastasis of Human Breast Cancer Cells. *Publ. Online 29 July 2002 Doi101038sjonc1205657* **2002**, *21*.
- (204) Liaudet, E.; Derocq, D.; Rochefort, H.; Garcia, M. Transfected Cathepsin D Stimulates High Density Cancer Cell Growth by Inactivating Secreted Growth Inhibitors. *Cell Growth Differ.* **1995**, *6*, 1045–1052.
- (205) Briozzo, P.; Badet, J.; Capony, F.; Pieri, I.; Montcourrier, P.; Barritault, D.; Rochefort, H. MCF7 Mammary Cancer Cells Respond to bFGF and Internalize It Following Its Release from Extracellular Matrix: A Permissive Role of Cathepsin D. *Exp. Cell Res.* **1991**, *194*, 252–259.
- (206) Garcia, M.; Derocq, D.; Pujol, P.; Rochefort, H. Overexpression of Transfected Cathepsin D in Transformed Cells Increases Their Malignant Phenotype and Metastatic Potency. *Oncogene* **1990**, *5*, 1809–1814.
- (207) Rochefort, H.; Liaudet-Coopman, E. Cathepsin D in Cancer Metastasis: A Protease and a Ligand. *APMIS* **1999**, *107*, 86–95.
- (208) Cathepsin-D Affects Multiple Tumor Progression Steps in Vivo: Proliferation, Angiogenesis and Apoptosis. *Publ. Online 29 August 2002 Doi101038sjonc1205745* **2002**, *21*.
- (209) Lin, T. Y.; Williams, H. R. Inhibition of Cathepsin D by Synthetic Oligopeptides. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 11875–11883.
- (210) T Aoyagi, H. M. Biological Activity of Pepstatins, Pepstanone A and Partial Peptides on Pepsin, Cathepsin D and Renin. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1973**, *25*, 689–694.

- (211) Marcinişzyn, J.; Hartsuck, J. A.; Tang, J. Mode of Inhibition of Acid Proteases by Pepstatin. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 7088–7094.
- (212) Gacko, M.; Minarowska, A.; Karwowska, A.; Minarowski, Ł. Cathepsin D Inhibitors. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2007**, *45*, 291–313.
- (213) Fuseka, M.; Vetvicka, V. Dual Role of Cathepsin D: Ligand and Protease. *Biomed Pap.* **2005**, *149*, 43–50.
- (214) Abdel-Meguid, S. S. Inhibitors of Aspartyl Proteinases. *Med. Res. Rev.* **1993**, *13*, 731–778.

## X. La synthèse peptidique

### X.1. Principe général de la synthèse peptidique

Les oligomères de mimes de dipeptides développés dans ce travail de thèse ont été synthétisés suivant des stratégies de synthèse peptidique. La synthèse de peptides repose sur la formation de liaisons amides entre la fonction amine d'un premier aminoacide et la fonction acide d'un second aminoacide et implique une succession d'étapes de déprotection, d'activation et de couplage<sup>1</sup>. Contrairement à la synthèse des protéines par les ribosomes qui s'effectue du côté N-terminal vers le côté C-terminal, la synthèse peptidique chimique, en raison de problèmes d'épimérisation, se déroule du côté C-terminal vers le côté N-terminal. De nombreux paramètres jouent des rôles majeurs sur l'efficacité d'une synthèse tels que les groupements protecteurs employés, les conditions de couplage et de déprotection (le solvant, le type d'agent de couplage et de réactif de déprotection, l'emploi d'additif, la stœchiométrie des réactifs, la durée de couplage et de déprotection), ainsi que les conditions de purification des intermédiaires (lavage, extraction ou chromatographie). Il faut noter que la séquence et la longueur du peptide ont également un impact déterminant sur la réussite de la synthèse.

### X.2. Stratégie de synthèse

Deux grandes stratégies de synthèse peuvent être envisagées :

La stratégie par fragments ou convergente : l'allongement de la chaîne se fait par l'introduction de blocs de plusieurs résidus préalablement préparés par stratégie itérative. Elle présente certains avantages (facilité d'isolation des intermédiaires de synthèse et nombre de purifications restreint, segment plus facile à resynthétiser en cas de problème). Bien que cette stratégie soit plus rapide et plus efficace pour les séquences complexes ou longues (entre 50 et 100 acides aminés), elle est peu utilisée en raison de rendements faibles, de problèmes de solubilité des fragments totalement protégés qui sont engagés dans la réaction de couplage et de problèmes d'épimérisation qui seront évoqués plus loin.

Dans la stratégie pas à pas, chaque résidu est incorporé l'un après l'autre dans la séquence peptidique de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. Cette stratégie est simple à mettre en place et elle permet de s'affranchir des problèmes d'épimérisation, de solubilité et présente, en outre, l'avantage d'être applicable facilement à la synthèse sur support solide (manuelle ou automatisée). Elle a donc été généralement préférée pour la réalisation de ces travaux.

La synthèse est réalisée, soit en solution à partir d'un aminoacide protégé sur sa fonction acide carboxylique, soit sur support solide après ancrage du premier aminoacide au support *via* sa fonction acide carboxylique. L'élongation de la chaîne peptidique (Schéma 1) est réalisée en suivant des cycles de :

- **déprotection** de la fonction amine *N*-terminale du peptide en cours d'élongation
- **couplage** de l'acide aminé suivant, dont la fonction acide est activée, et la fonction amine protégée par un groupement de type uréthane.

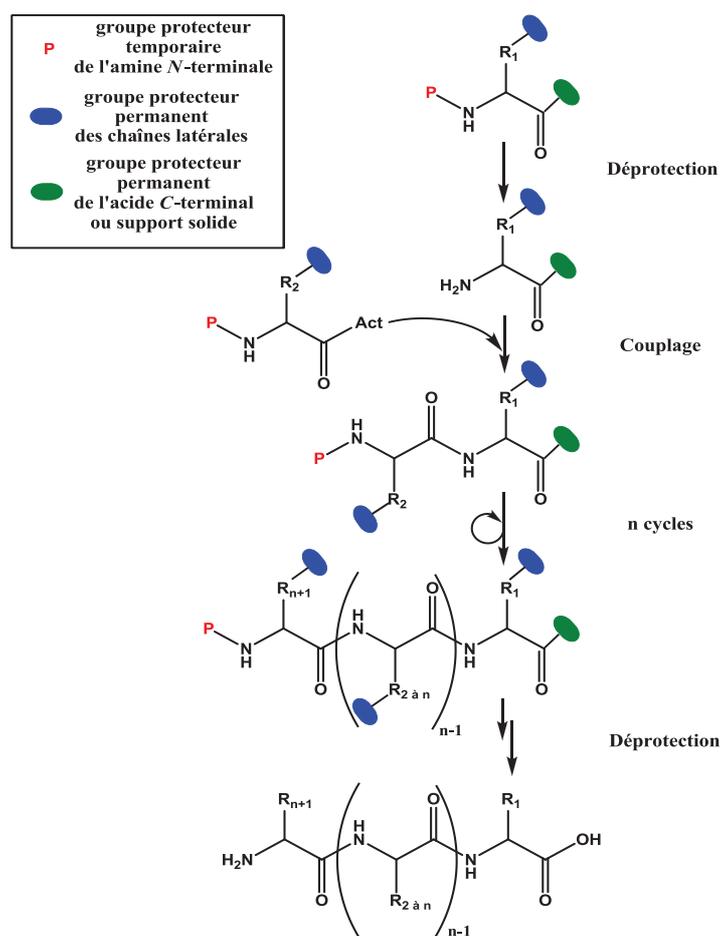


Schéma 1 : Principe de la synthèse peptidique pas à pas.

### X.3. Réaction secondaire - Epimérisation

Un des problèmes majeurs rencontrés en synthèse peptidique et déterminant dans le choix de la stratégie de synthèse est l'épimérisation du carbone  $\alpha$  de l'acide aminé à coupler. En effet, la formation d'une liaison peptidique requiert l'activation de la fonction acide carboxylique de cet aminoacide. Une oxazolone peut alors être formée et conduire à l'épimérisation du carbone  $\alpha$  (Schéma 2). En effet, une fois l'oxazolone formée, l'abstraction

du proton  $\alpha$  devient possible, même par une base faible, du fait de la stabilisation par résonance du carbanion formé. L'épimérisation de l'oxazolone peut être largement réduite ou éliminée si la fonction amine de l'acide aminé activé est protégée par un groupement exerçant des effets électrodonneurs (déstabilisation du carbanion). C'est la raison pour laquelle, la synthèse peptidique s'effectue toujours de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale avec la fonction amine de l'acide aminé activé protégée par un groupement de type uréthane.

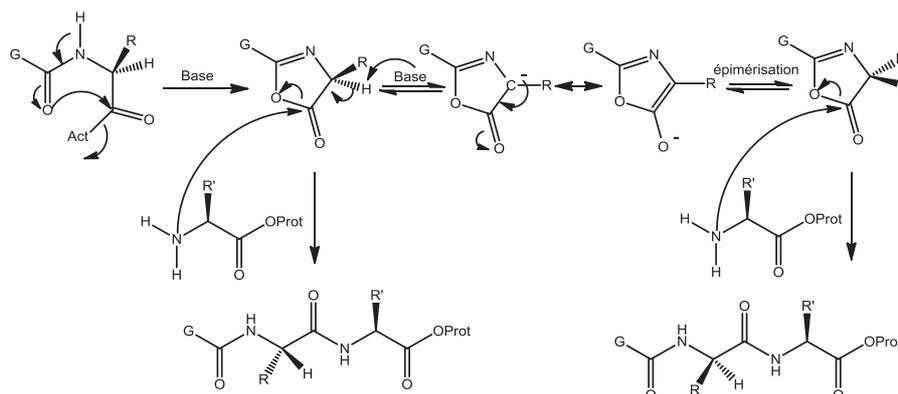


Schéma 2. Formation d'oxazolone et épimérisation du carbone  $\alpha$ .

D'autres réactions secondaires liées à la présence de certains acides aminés peuvent également être observées comme la formation de dicétopipérazine, la transposition  $\alpha/\beta$  aspartique, la cyclisation de l'arginine en  $\delta$ -lactame pour ne citer qu'elles. Aucune de ces réactions n'a été observée lors de la synthèse des divers oligomères, elles ne seront donc pas détaillées ici.

#### X.4. Les protections

Lors de la synthèse d'un peptide, pour réaliser de façon univoque la réaction de couplage entre deux acides aminés, il faut protéger :

- la fonction amine de l'acide aminé activé (Fmoc, Boc, Z, ...)
- la fonction acide de l'acide aminé C-terminal (sous forme d'ester : *tert*-butylique, benzylique, allylique, ...)
- les éventuelles fonctions réactives des chaînes latérales.

On distingue deux types de protection : les protections temporaires qui sont utilisées pour protéger l'amine en position N-terminale et qui sont clivées avant chaque couplage et les protections permanentes qui sont utilisées pour protéger la fonction acide carboxylique du premier acide aminé de la séquence et les chaînes latérales susceptibles de réagir. Les groupements protecteurs doivent être faciles à éliminer et orthogonaux. Le choix du

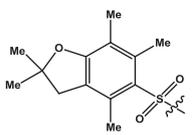
groupement protecteur temporaire de la fonction amine va déterminer la stratégie de synthèse employée. Le tableau ci-dessous présente les deux grandes stratégies de la synthèse peptidique (Tableau 22) :

**Tableau 14 : Stratégies de synthèse peptidique utilisées. (Les protections temporaires figurent en rouge, les protections permanentes en bleu).**

Stratégie	Conditions de déprotection	
	à chaque cycle	en fin de synthèse
Boc/Bzl <sup>2</sup>	TFA	Acide fort (HF)
Fmoc/tBu <sup>3</sup>	Amine secondaire (Pip ou DEA)	TFA

La stratégie envisagée va orienter le choix des protections des chaînes latérales selon leur mode de déprotection (TFA, acide fort ou autre). Le tableau suivant présente les protections des chaînes latérales des résidus Arg et Trp utilisés lors de mes travaux de thèse (Tableau 23) :

**Tableau 15 : Quelques groupes protecteurs de chaînes latérales.**

Chaîne latérale de l'acide aminé	Protection	Conditions de déprotection	Références
Arg	Pbf 	TFA / scavengers*  ~ 3 h	4
	NO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> /Pd/C (dans certains cas difficiles HF)	
Trp	Boc	TFA / scavengers*	5

\* Lors de la déprotection de chaînes latérales au TFA, des carbocations, provenant des groupes protecteurs (ou du bras restant sur le support en synthèse supportée), peuvent être formés. Ceux-ci peuvent réagir avec des chaînes latérales d'acides aminés fonctionnalisés riches en électrons, comme les résidus Cys, Ser, Trp, Tyr, Met. Pour éviter la formation des produits secondaires en résultant, divers réactifs nucléophiles, appelés *scavengers*, sont utilisés afin de piéger les carbocations. Dans le cadre de ma thèse, l'eau qui permet de piéger modérément le cation *tert*-butyle et les produits de clivage à base d'arylsulfonyle (Pbf) et le triisopropylsilane (TIS) ont été utilisés.

## X.5. Les agents de couplage

La formation d'une liaison amide implique l'attaque nucléophile de l'amine du premier acide aminé sur la fonction carboxylique du second. Cependant, le groupement OH de la fonction acide carboxylique n'est pas suffisamment nucléofuge pour que cette réaction puisse avoir lieu. C'est la raison pour laquelle l'introduction de bons groupements partants (agents de couplage) est indispensable pour parvenir à la formation de la liaison peptidique. Il existe de très nombreux agents de couplage<sup>6</sup>, parmi lesquels les carbodiimides, les esters activés, les sels de phosphonium et d'uronium, les halogénures d'acides, les anhydrides symétriques et mixtes. Ils fonctionnent selon des mécanismes différents et présentent chacun leurs avantages et leurs inconvénients. L'objectif de cette partie n'étant pas de rapporter une liste exhaustive de ces réactifs, seuls les phosphoniums et uroniums utilisés au cours de mes travaux sont brièvement présentés.

Depuis la découverte du BOP<sup>7</sup> en 1975, la méthode aux acyloxyphosphoniums est largement utilisée. Ces réactifs sont faciles d'utilisation, conduisent à de bons rendements et n'induisent pas (ou peu) d'épimérisation. D'autres agents aussi efficaces mais moins toxiques (pas de libération de HMPT) ont été développés, comme le PyBOP<sup>8</sup>.

Les sels de phosphoniums sont aujourd'hui souvent remplacés par les uroniums, tels que l'HBTU<sup>9</sup>, ou l'HATU<sup>9</sup>. Ces composés cristallisent sous forme de N-oxide guanidinium (forme non représentée). L'HATU permet d'obtenir de meilleurs rendements mais coûte beaucoup plus cher que le HBTU qui reste le réactif de couplage utilisé préférentiellement.

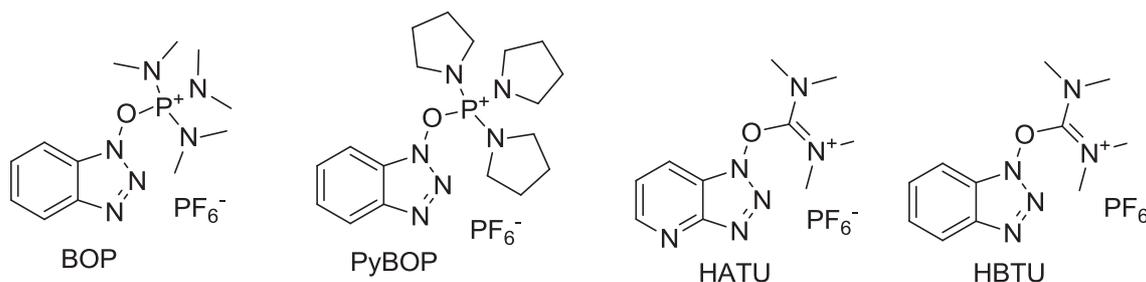


Figure 70 : Les sels de phosphonium et d'uronium.

Avec les uroniums, une réaction secondaire sur l'amine terminale du peptide, conduisant à la formation d'un dérivé tétraméthylguanidinium peut se produire si ces réactifs sont utilisés en excès ou si la cinétique de couplage est lente (Schéma 3)<sup>10</sup>. Pour contourner cette réaction secondaire, la pré-activation de la fonction acide avant l'ajout de l'amine est nécessaire.



Schéma 3. Réaction secondaire avec les uroniums.

## X.6. Le milieu de synthèse

En synthèse peptidique, deux grandes méthodologies peuvent être utilisées : la synthèse en solution (en phase homogène) ou la synthèse sur support solide. Leurs caractéristiques principales sont résumées ci-dessous. Quel que soit le milieu de synthèse, les réactions se déroulent dans des solvants organiques tels que le DMF ou la N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP).

### X.6.1. La synthèse en solution

La synthèse en solution permet un suivi aisé de la synthèse de l'oligomère après chaque étape par les techniques d'analyses classiques (chromatographie sur couche mince (CCM) ou chromatographie liquide haute pression (HPLC)). Chaque intermédiaire peut être isolé et caractérisé facilement. Elle est plus adaptée à la synthèse de grande quantité que la phase solide. Cependant, si le peptide possède une séquence longue, celui-ci risque de voir sa solubilité dans les solvants organiques diminuer au cours de la synthèse, ce qui peut nuire à l'efficacité des couplages. De plus, les étapes de purifications intermédiaires sont parfois longues à mettre en œuvre et fastidieuses. La synthèse en phase homogène est particulièrement attractive pour la synthèse de petits oligomères en grande quantité. La stratégie la plus fréquemment employée en solution est la stratégie Boc/Bzl, les produits

secondaires (dibenzofulvène et dérivés) après le clivage du groupement Fmoc étant plus difficiles à éliminer.

### X.6.2. La synthèse en phase solide

Bruce Merrifield a publié en 1963<sup>2</sup>, la synthèse des peptides sur support solide (SPPS) qui a permis de repousser de manière considérable les limites de la synthèse peptidique. La particularité de cette stratégie repose sur l'ancrage du premier acide aminé par sa fonction acide carboxylique sur une matrice de polymère insoluble qui fait office de groupement protecteur permanent pour cette fonction. Le peptide étant ancré sur la résine, les excès de réactifs sont facilement éliminés après réaction par des lavages successifs. Cette stratégie permet d'obtenir des rendements proches de 100% et est largement utilisée actuellement. Ce succès a entraîné le développement de nombreuses matrices, ainsi que de nouvelles méthodes d'activation et de protection des acides aminés.

Les résines sont des billes composées de polystyrène, de polyamide ou d'un mélange de polystyrène/polyéthylène glycol dont la taille varie entre 50 µm et 500 µm. Elles sont fonctionnalisées par des bras (linkers) qui déterminent les conditions d'accrochage et de décrochage du peptide de la résine ainsi que la nature de la fonction portée par le peptide en position C-terminale après le clivage de la résine. Le nombre de sites utilisables pour la synthèse peptidique est déterminé par la charge de la résine et est donnée en millimole par gramme de résine. De ces caractéristiques dépend le type de stratégie de synthèse qui sera utilisé pour la synthèse peptidique.

- La stratégie Boc/Bzl où le groupement Boc est clivé en présence TFA tandis que les protections des chaînes latérales et le décrochage du peptide de la résine se déroule en milieu acide fort en présence de fluorure d'hydrogène (HF). Cette stratégie nécessite une rampe à HF et est plus difficile à mettre en place.
- La stratégie Fmoc/tBu où le groupement Fmoc est clivé en présence de pipéridine à 20% dans le DMF. Les protections sur les chaînes latérales sont déprotégées en milieu acide en présence de TFA. Le peptide est clivé de la résine dans les mêmes conditions. Cette stratégie est plus simple à mettre en place et moins risquée, cependant les peptides longs sont susceptibles de s'agréger et donc de diminuer les rendements de couplage. C'est la stratégie la plus utilisée et c'est celle qui a été choisie pour la synthèse de tous les oligomères décrits dans ce travail.

L'avantage principal de la SPPS est l'absence d'étapes de purifications intermédiaires, le peptide restant accroché à la résine jusqu'à l'étape finale de clivage. De simples lavages entre chaque réaction de déprotection et de couplage permettent

l'élimination rapide des réactifs en excès. Ceci offre un gain de temps important et permet l'automatisation du processus de synthèse. Une fois le peptide synthétisé, il est décroché de la résine par clivage adapté à la résine utilisée puis précipité dans du diéther et centrifugé. Les groupements protecteurs des chaînes latérales étant solubles dans l'éther, ils sont éliminés à cette étape. Le peptide est ensuite purifié, généralement par HPLC-préparative.

La SPPS présente néanmoins quelques inconvénients. Les intermédiaires réactionnels n'étant pas isolés, le suivi réactionnel est plus complexe que pour la synthèse en solution. Des tests colorimétriques comme le test de Kaiser<sup>11</sup> ou d'acide trinitrobenzènesulfonique (TNBS)<sup>12</sup> permettent de vérifier le couplage ou la déprotection d'un résidu via la détection des amines libres. Cependant, ces méthodes sont qualitatives et ne donnent pas d'indication sur l'avancement d'un couplage ou d'une déprotection. La seule solution est le clivage d'une infime partie de la résine durant la synthèse pour pouvoir ensuite analyser le composé brut par HPLC ou LC/MS. Ce micro-clivage est néanmoins relativement long et n'est donc pas utilisé systématiquement à chaque étape de la synthèse. Le mauvais déroulement d'une synthèse conduit classiquement à des peptides tronqués.

Durant mes travaux, deux types de résines ont été utilisés :

- la résine chlorure de 2-chlorotrytyle qui est clivée dans un mélange trifluoroéthanol (TFE)/dichlorométhane (DCM) 3/7 et permet d'obtenir le peptide avec les protections des chaînes latérales intactes et une fonction acide libre en position C-terminale.

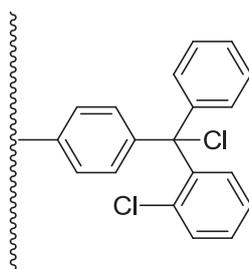


Figure 71 : Résine chlorure de 2-chlorotrytyle.

- La résine Rink amide aminométhyle polystyrène qui est clivée en milieu TFA 95% et permet d'obtenir le peptide complètement déprotégé avec une fonction amide en position C-terminale.

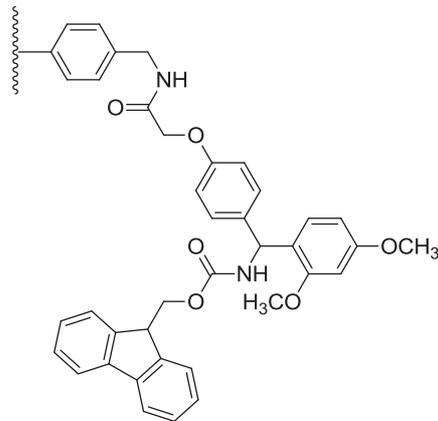


Figure 72 : Résine Rink amide aminométhyle polystyrène.

## XI. Les techniques d'analyses spectroscopiques

Afin de déterminer les conformations des différents oligomères synthétisés, nous avons utilisé plusieurs techniques d'analyses. Deux d'entre elles ont une résolution atomique : la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la cristallographie de rayon X (RX). D'autres méthodes alternatives de basses résolutions existent. Elles sont plus rapides et apportent un certain nombre d'informations sur la conformation des oligomères. Par exemple, les spectroscopies d'absorption infra-rouge, de fluorescence et de dichroïsme circulaire (CD) sont couramment utilisées pour avoir rapidement des indications sur la structure d'oligomères. Ces différentes techniques sont décrites succinctement dans ce chapitre.

### XI.1. La diffraction des rayons X (RX)

La diffraction des rayons X est la méthode expérimentale qui permet d'obtenir le plus d'informations quant à l'existence d'une conformation particulière au sein d'un enchaînement peptidique à l'état solide. Un monocristal du composé est placé au milieu du faisceau de rayon X et les spectres de diffraction sont enregistrés par un détecteur. La structure tridimensionnelle du produit est alors obtenue par l'analyse des taches de diffraction. Cette méthode permet d'obtenir des structures de haute résolution et permet la distinction de deux points de l'espace proche de l'ångström. Elle donne accès à trois types d'informations :

- Les paramètres géométriques (longueurs de liaisons, angles de valence et angles dièdres) ;
- Les modes d'interactions intramoléculaires et intermoléculaires (liaisons hydrogène) ;
- Les conformations moléculaires.

La détermination d'une structure par radiocristallographie est un procédé long qui dépend principalement de l'aptitude des produits synthétisés à former des monocristaux bien ordonnés qui diffractent correctement la lumière.

De plus, la conformation d'une molécule dans la maille cristalline dépend des forces d'empilement et de cohésion du cristal qui peuvent s'exercer au détriment d'interactions intramoléculaires existantes dans la même molécule isolée dans le vide ou en solution diluée dans un solvant inerte. Par conséquent, le comportement d'une espèce peptidique à l'état solide peut différer de celui observé en solution très diluée sur des molécules « isolées ».

## XI.2. La résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN est un outil particulièrement adapté à la détermination des structures en solution des oligomères. Elle permet d'obtenir des informations à l'échelle de l'atome, tel que la formule brute ou sa structure dimensionnelle. Cette technique mesure les variations du moment magnétique de certains noyaux atomiques lorsqu'ils sont soumis à des champs magnétiques externes et locaux (dus, entre autre, aux noyaux environnants).

L'étude RMN d'un composé requiert qu'il soit pur, concentré (de l'ordre du millimolaire), monodisperse et stable dans le temps. L'analyse RMN permet de mettre en évidence des interactions entre noyaux observables ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ , ...) : celles-ci peuvent être chimiques (couplage scalaire) ou spatiales (couplage dipolaire ou effet nucléaire Overhauser NOE). Grâce à des familles d'expériences multidimensionnelles, il est possible d'attribuer les déplacements chimiques et d'obtenir des informations sur la structure chimique d'une molécule (COSY, TOCSY, ...) et des informations spatiales (ROESY, NOESY, ...). L'expérience COSY est généralement associée à l'expérience TOCSY (TOTally Correlated SpectroscopY), afin de pouvoir attribuer les spins au sein d'un même résidu. Les expériences ROESY ou NOESY sont ensuite utilisées pour effectuer l'attribution séquentielle de notre composé. Ces données sont ensuite utilisées pour déterminer la structure en solution du composé analysé.

La détermination de structure par RMN nécessite des contraintes qui représentent les forces physiques auxquelles la molécule est soumise en solution. La principale source de ces informations est l'observation d'effet NOE entre deux noyaux hydrogènes. Cet effet fait apparaître des pics de corrélation croisés sur les spectres ROESY/NOESY. Son volume est inversement proportionnel à la distance  $d$  entre deux protons et ne peut être détecté si cette distance est supérieure à 5 Å. Les volumes de pics NOE sont convertis en contraintes de distance par la relation suivante :

$$d_{ij} \propto \text{NOE}^{-1/6}$$

où  $d_{ij}$  est la distance entre deux protons  $i$  et  $j$ , et NOE l'intensité du pic NOE correspondant.

Un second type de contrainte : la valeur des angles de torsion, peut être obtenue par la mesure des constantes de couplage  $^3\text{J}$ .

Ces différentes contraintes permettent la modélisation moléculaire de la molécule. Les données obtenues lors des diverses expériences de RMN sont ainsi converties en distances inter-protoniques et angles dièdres avant d'être utilisées dans un programme de modélisation moléculaire. L'obtention d'une structure tridimensionnelle satisfaisant aux

contraintes de distances et d'angles et correspondant à un minimum énergétique est alors possible.

### **XI.3. Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (IR-TF)**

La spectroscopie moyenne infrarouge (MIR), entre  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ , est une sonde privilégiée des vibrations intramoléculaires des peptides et des protéines. En effet, ces molécules polaires présentent des variations de moments dipolaires dynamiques élevées sous excitation infrarouge donnant lieu à des intensités de modes actifs dans l'infrarouge importantes. Ainsi la spectroscopie IR est particulièrement sensible aux interactions par liaison hydrogène s'exprimant dans les systèmes moléculaires que nous étudions. En particulier, les bandes caractéristique amides (amide A et B et amide I et II) sont particulièrement sensibles à la mise en place de liaisons hydrogène<sup>13,14</sup>. Parmi ces bandes de vibration, les bandes amide A et amide I et II sont utilisées pour suivre la mise en place des interactions par liaisons hydrogène intramoléculaires. Les origines vibrationnelles de ces bandes sont rappelées ci-dessous.

La bande amide A, située entre  $3500$  et  $3200 \text{ cm}^{-1}$ , est dominée par l'élongation de la liaison N-H ( $\nu(\text{N-H})$ ). Elle présente classiquement une dépendance de sa fréquence et de sa largeur caractéristique de la mise en place des liaisons H. Les  $\nu\text{NH}$  apparaissent à haute fréquence, typiquement autour de  $3450 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ , lorsqu'ils ne sont pas engagés dans des liaisons hydrogène intramoléculaires. La position moyenne de la bande est dans ce cas déterminée par les interactions avec le solvant. Lorsque des interactions par liaison hydrogène existent, un déplacement vers les basses fréquences de la bande de  $100$  à  $150 \text{ cm}^{-1}$  est couramment observé. La largeur de la bande amide A est aussi un indicateur du degré de dispersité des liaisons hydrogène au sein du système étudié.

La bande amide I, située entre  $1800$  et  $1600 \text{ cm}^{-1}$  est une vibration complexe impliquant le couplage des élongations des groupements carbonyles et des liaisons CN et CCN. Lors de la mise en place de liaisons hydrogène type  $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$ , en première approximation, son comportement en fréquence s'apparente à celui observé pour les vibrations amide A. En effet, l'existence de liaisons hydrogène conduit à un amincissement du mode interne amide I impliqué. Sa largeur est un indicateur des différents types d'interactions en présence dans le système.

La bande amide II, située entre  $1575$  et  $1480 \text{ cm}^{-1}$  correspond à l'élongation de la liaison C-N et la torsion de la liaison N-H. On observe couramment un durcissement des modes amide II lors de la mise en place de liaisons hydrogène. Ainsi la différence de position entre les positions de la bande amide II et de la bande amide I est souvent utilisée comme

un critère quantitatif caractérisant la force moyenne de liaison hydrogène (type N-H...O=C) au sein d'un système.

Ainsi, cette spectroscopie permet de déterminer rapidement si les oligomères sont susceptibles de se structurer. En effet, les structures secondaires sont principalement stabilisées par des liaisons hydrogène, les structures de types polyproline étant une exception. Aussi les composés ne présentant pas de telles liaisons pourront être facilement écartés. Cependant, cette technique n'est pas suffisante pour caractériser avec certitude l'éventuelle structuration d'un oligomère et les résultats obtenus doivent donc impérativement être confrontés à ceux obtenus par des techniques complémentaires (RMN, dichroïsme circulaire...).

Au niveau expérimental, cette spectroscopie vibrationnelle comporte plusieurs limitations :

- Les solvants doivent être transparents dans les zones de fréquences explorées. Cela exclut l'eau et le méthanol.
- Les produits analysés doivent être solubles dans les solvants choisis.
- L'auto-association dans ces solvants reste une éventualité qui aboutirait à un faux positif.

Les bandes d'intérêts se situent donc entre 3500 et 3200  $\text{cm}^{-1}$  pour la bande des amides A et entre 1800 et 1500  $\text{cm}^{-1}$  pour la bande des amides I et II. En fonction de la fréquence de ces bandes, nous pourrions déterminer si les fonctions amide et carbonyles sont impliquées ou non dans des liaisons hydrogène.

#### **XI.4. Le dichroïsme circulaire (CD)**

Le dichroïsme circulaire (CD) est une technique spectroscopique sensible qui permet la détection des structures d'oligomères. En effet, les structures optiquement actives absorbent de manière inégale les deux composantes droite et gauche d'un faisceau de lumière incidente circulairement polarisée. Lorsque cette lumière traverse une solution d'un composé chiral, elle se polarise elliptiquement. Ainsi, si la molécule n'adopte pas d'organisation structurale, l'intensité du spectre de CD sera nulle. En revanche, si l'oligomère adopte une organisation structurale, le spectre pourra alors contenir des signaux positifs et négatifs. Ces analyses étant particulièrement sensibles aux repliements de la chaîne peptidique, elles présenteront des spectres différents en fonction de la structure secondaire et de l'arrangement spatial de l'oligomère.

Cette méthode est particulièrement utilisée pour l'analyse conformationnelle des peptides et protéines. L'unité de mesure généralement utilisée est l'ellipticité molaire par

résidu en  $\text{deg.cm}^2.\text{mol}^{-1}$ . Les structures secondaires des protéines ont ainsi été décrites, ainsi que la double hélice de l'ADN par exemple. Les foldamères étant par définition des oligomères structurés, cette technique a été employée pour les caractériser. Cependant, étant donné qu'ils diffèrent des structures secondaires des protéines, leur signature dichroïque est elle aussi différente. Il n'est donc pas possible de corréler un spectre dichroïque non référencé avec une structure, en revanche, deux composés possédant la même signature dichroïque possèdent une structure identique. Cette technique étant plus simple à mettre en place et demandant moins de temps pour le traitement des données post analyses, c'est cette méthode que nous avons utilisée pour valider la structuration au sein d'une même famille d'oligomères. Cette technique permet aussi de faire varier facilement des conditions expérimentales (solvant, température, pH, salinité,..) et ainsi d'observer l'influence de ces paramètres sur la structuration des composés. Cette technique ne fournit cependant pas autant d'information sur la structure des oligomères que les rayons-X ou la RMN. Dans notre cas, le CD devrait nous permettre d'obtenir une signature dichroïque caractéristique de nos composés.

Toutes ces techniques apportent des informations complémentaires qui permettent une caractérisation précise de la structure qu'adopte un composé, à l'état solide ou en solution.

## XII. Oligomères de mimes contraints de dipeptides : Synthèse et Etudes structurales

Nous avons présenté dans le chapitre précédant l'importance des foldamères et les multiples applications qu'ils offrent. Les foldamères peptidomimétiques représentent un des systèmes moléculaires structurés les mieux caractérisés et permettent la construction de nombreuses architectures imitant les structures secondaires périodiques des protéines. Ces structures sont stabilisées par des liaisons hydrogène intramoléculaires (hélice 14, 12, 10, ...). Si une part importante de ces foldamères incorporent des acides  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$ -aminés<sup>15</sup>, d'autres structures utilisant des mimes de coudes  $\gamma$  ou  $\beta$  ont aussi été décrites<sup>16,17</sup>. Ces systèmes construits à partir de motifs contraints ont la particularité de conserver leur contrainte conformationnelle intrinsèque le long des oligomères<sup>18</sup>. Lors du développement de nouveaux foldamères, une étude structurale est nécessaire afin de pouvoir déterminer quel type de conformation ils adoptent et si ces oligomères conservent une structure stable en solution.

Dans ce chapitre, je présenterai la synthèse et l'étude structurale d'oligomères de deux mimes de coude  $\beta$  : des oligomères de (3S)-amino-5-carboxyméthyl-2,3-dihydro-1,5-benzothiazépine-4(5H)-one] (DBT) et des oligomères de dérivés  $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames (Agl-AA, avec AA correspondant à un acide aminé variable). Ces motifs contraints et leurs oligomères correspondants sont représentés dans la Figure 73.

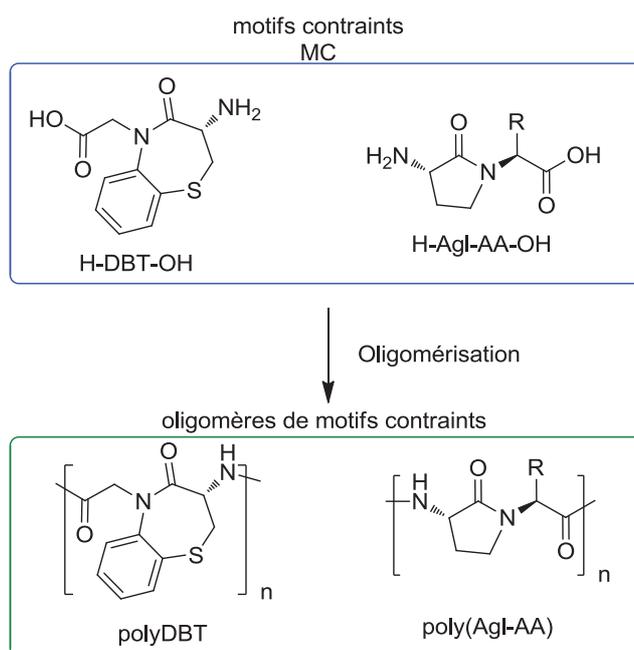


Figure 73 : Les motifs contraints DBT et Agl-AA et leurs oligomères correspondants.

Les oligomères de DBT ont été étudiés lors de la thèse du Dr. Vezekov,<sup>19</sup> en particulier pour leur capacité à traverser les membranes cellulaires<sup>20</sup>. Durant ma thèse, l'étude structurale de ces oligomères a été réalisée. Nous avons montré qu'ils sont capables d'adopter des structures stables et définies en ruban, correspondant à des enchainements périodiques de coude  $\beta$  II'. En se basant sur ces structures, nous avons ensuite sélectionné un nouveau mime de coude, des dérivés d' $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames, permettant d'accéder à des systèmes beaucoup plus versatiles. Ces composés ont largement été utilisés comme mimes de coude  $\beta$  II' dans des séquences peptidiques afin de moduler leurs activités biologiques et de renforcer leur biodisponibilité<sup>21</sup>, mais ils n'ont jamais été utilisés pour la synthèse d'oligomères structurés. Leurs caractéristiques structurales intrinsèques (coude  $\beta$  II' comme les DBT) et la versatilité apportée par les aminoacides qui les constituent, nous ont parues deux propriétés particulièrement attractives pour la construction de nouveaux foldamères. Une stratégie de synthèse originale a été développée à cet effet. Elle consiste en la conversion directe de séquences peptidiques, alternant des résidus méthionines avec n'importe quel autre aminoacide, en oligomères d' $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames. Dans cette nouvelle série d'oligomères, la modulation et le positionnement spatial des groupes fonctionnels sont directement contrôlés par la séquence peptidique native. Cette stratégie sera présentée dans ce chapitre de ma thèse.

Les études structurales nécessaires à la caractérisation de ces différents oligomères ont été effectuées en collaboration avec plusieurs chercheurs et équipes de recherche:

- Le Dr. Baptiste Legrand, ingénieur de Recherche dans notre équipe « *Chimie des Acides Aminés, Peptides, Hétérocycles et Chimie Supportée* » a effectués les analyses RMN et de dichroïsme circulaire (CD).
- Les analyses IRTF ont été effectuées en collaboration avec le Professeur Jean-Louis Bantignies dans l'équipe « Nanostructures » du Laboratoire Charles Coulomb de l'Université Montpellier II.
- Les analyses par diffractions des rayons X ont été effectuées par le Dr. Claude Didierjean et Emmanuel Wenger du Laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisation de l'Université de Lorraine à Vandœuvre-lès-Nancy.

## XII.1. Oligomères de (3S)-amino-5-carbonylméthyl-2,3-dihydro-1,5-benzothiazépine-4(5H)-one] (DBT)

### XII.1.1. Introduction

La première partie de mes travaux de thèse a concerné la conception, la synthèse et l'étude structurale d'oligomères de mimes contraints de dipeptides et leur utilisation pour le développement de nouveaux vecteurs favorisant la pénétration intracellulaire (Figure 1). Des recherches menées durant la thèse du Dr. Lubomir Vezekov au sein de l'équipe ont permis d'identifier une nouvelle famille de vecteurs, des oligomères de motifs DBT et AMPA<sup>19</sup>. Tout d'abord, il a été montré que des oligomères de DBT (tétramère, DBT<sub>4</sub>) sont capables d'augmenter considérablement le pourcentage d'internalisation de la fluorescéine avec une efficacité supérieure à celle des poly-arginines (peptides vecteurs de référence de type Cell Penetrating Peptides ou CPP, travaux de P. Wender).<sup>22</sup> Ce résultat a été confirmé par le dosage des vecteurs internalisés grâce à une méthode de quantification directe par spectrométrie de masse que nous avons développée.<sup>23</sup> Cette méthode repose sur l'utilisation d'un marqueur UV-absorbant, l' $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) permettant par effet discriminatoire une amplification du signal de la molécule d'intérêt et ainsi de mesurer, dans des milieux biologiques complexes (dans ce cas, le milieu de cellules), les faibles concentrations internalisées. Ces oligomères sont internalisés par voie endosomale et sont localisés à 16 heures dans les lysosomes.

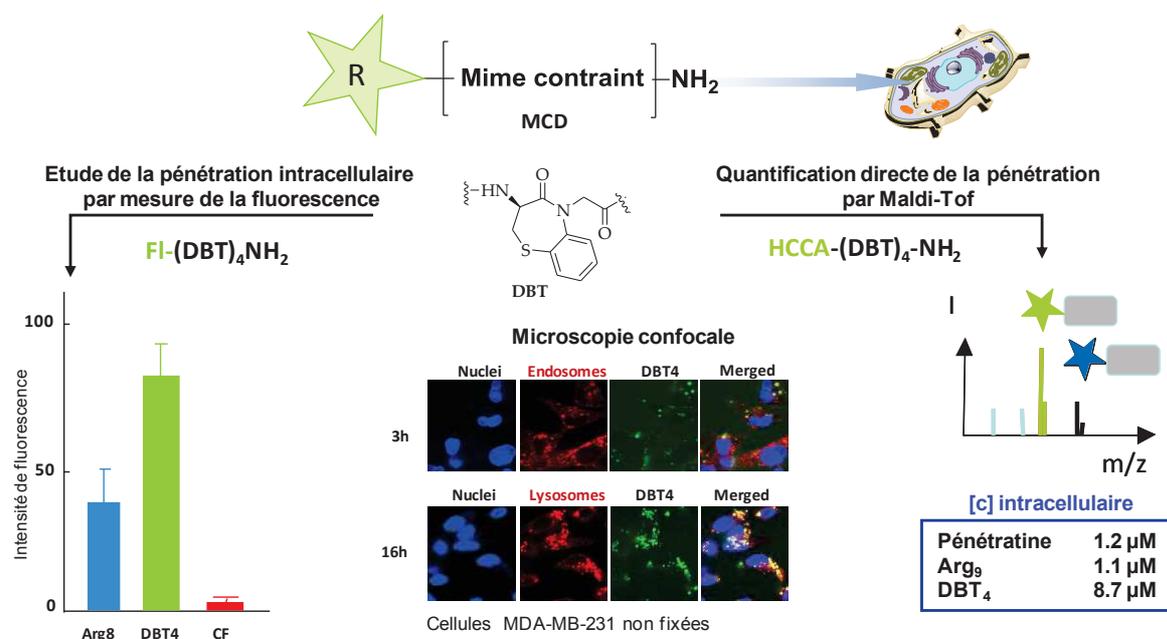


Figure 74 : Etude de la pénétration intracellulaire de l'Arg8 et d'oligomère de DBT dans des cellules MDA-MB-231.

La localisation spécifique de cette famille d'oligomères présente un intérêt majeur pour adresser, dans le compartiment endo-lysosomal, la pepstatine, un puissant inhibiteur de la cathepsine D (Cath D) qui est une enzyme lysosomale surexprimée dans un grand nombre de tumeurs solides. La synthèse et l'évaluation biologique *in vitro* et *in vivo* de divers conjugués associant un de nos vecteurs (l'AMPA<sub>4</sub>) à la pepstatine qui, seule, est totalement inactive du fait de sa trop faible pénétration intracellulaire a permis d'identifier un composé qui possède une puissante activité antiproliférative (résultats détaillés dans le chapitre III).

A ce jour et bien que les résultats obtenus soient déjà très prometteurs, une étude importante doit être menée pour une application plus générale de ces vecteurs et en particulier pour un adressage intracellulaire spécifique vers d'autres compartiments. C'est dans ce contexte que je me suis intéressé dans le premier volet de ma thèse :

1) à l'**étude structurale des oligomères de DBT** afin de déterminer si les propriétés de pénétration de ces composés étaient liées à leur structure, et

2) sur la base des données structurales de ces édifices, je me suis ensuite attaché au **développement d'une nouvelle génération de vecteurs** plus versatiles, construite par oligomérisation de dérivés d' $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames.

La structure de tous ces édifices moléculaires a été étudiée par des techniques physicochimiques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), la cristallographie aux rayons X (RX), la spectroscopie infrarouge (IR) et le dichroïsme circulaire (CD).

### **XII.1.2. Synthèse du monomère DBT et son oligomérisation**

Dans un premier temps, les motifs monomériques DBT et LBT ont été synthétisés en suivant la voie préalablement développée puis optimisée par L. Vezenkov et al.<sup>19</sup>. Ces motifs ont ensuite été utilisés pour la synthèse des oligomères sur support solide. La synthèse du motif DBT sera tout d'abord décrite, puis les synthèses des oligomères dérivant du DBT et du LBT seront présentées avant de terminer par leur étude structurale. Les oligomères de LBT ont été synthétisés pour les étude de cristallisation (paragraphe III.1.2).

Les motifs DBT et LBT sont synthétisés à partir de D-cystéine et L-cystéine, respectivement selon la voie de synthèse suivante :

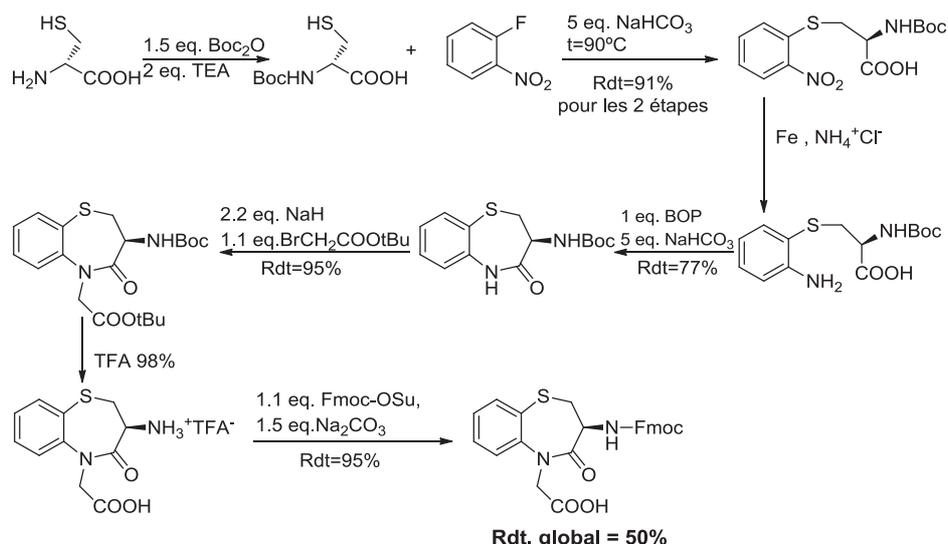


Schéma 4 : Voie de synthèse du Fmoc-DBT-OH.

Après la protection par un groupement Boc de la D-cystéine, celle-ci est mise en jeu dans une réaction de condensation avec le 2-Fluoro nitrobenzène. Lors de cette réaction, la fonction thiol peut elle aussi réagir avec le Boc<sub>2</sub>O mais cette réaction secondaire n'empêche pas la condensation et ne nécessite donc pas de traitement particulier. Le groupement nitro est ensuite réduit en amine en présence de fer et de chlorure d'ammonium. L'amine ainsi obtenue permet la cyclisation intramoléculaire du composé par une réaction de couplage peptidique et la formation de la benzothiazépine. La fonction amide est ensuite déprotonée en présence d'hydrure de sodium et permet la substitution nucléophile du bromoacétate de tert-butyle. Cette étape se déroulant en milieu basique, la Boc-D (ou L)-cystéine et non la Fmoc-D(ou L)-cystéine ont été engagées dans la première étape de la synthèse. Le groupement Fmoc, adapté à la synthèse sur support solide (stratégie Fmoc/tBu) que nous avons choisi pour construire les oligomères, n'est introduit qu'en fin de synthèse. Les groupements Boc et tert-butyle sont ensuite clivés en présence de TFA pour conduire au DBT complètement déprotégé. La fonction amine est protégée par un groupement Fmoc avec du Fmoc-Succinimide (Fmoc-OSu) en milieu basique. Le motif DBT protégé par un groupement Fmoc est ainsi obtenu en 7 étapes avec un rendement global de 50%. Le motif Fmoc-LBT-OH est obtenu avec des rendements identiques à partir de la L-cystéine.

Les oligomères de D- et L-BT sont ensuite synthétisés via une stratégie SPPS en utilisant les protections Fmoc/tBu (Schéma 5). Le premier motif est accroché sur la résine de type Rink amide par une réaction de couplage classique mettant en jeu l'HBTU comme agent de couplage en présence de DIEA. Les oligomères sont synthétisés par des répétitions de cycles de déprotection (Piperidine 20%/DMF) et de couplage.

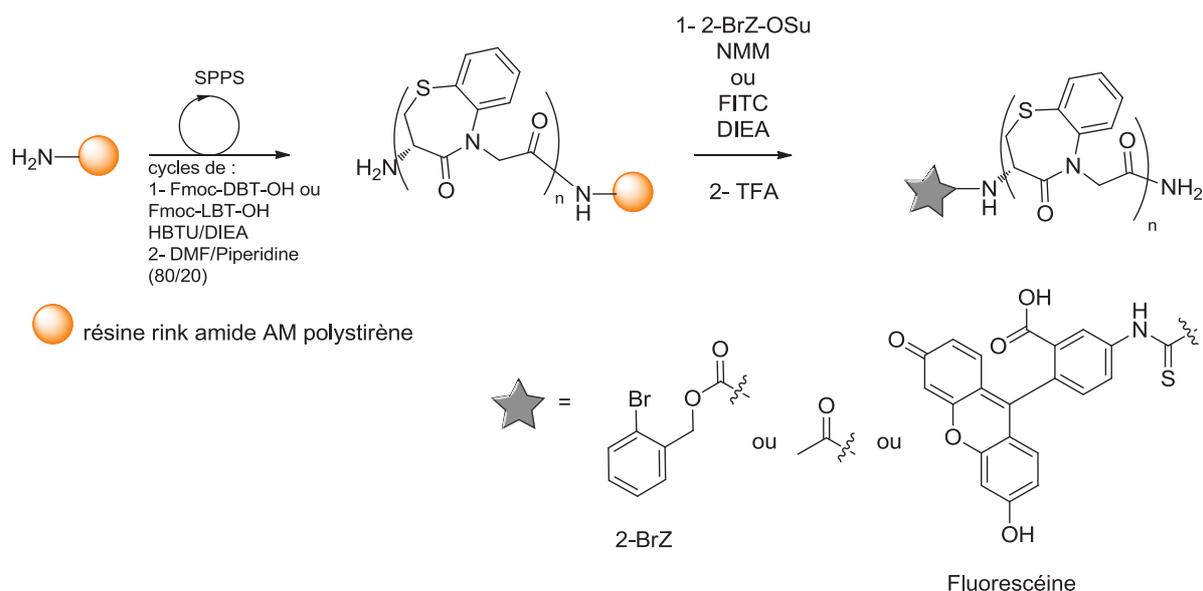


Schéma 5 : Synthèse d'oligomère de DBT sur support solide.

Trois types de composés ont été synthétisés :

- des oligomères incorporant 2, 4 ou 6 motifs D- ou LBT, portant en position N-terminale un groupement 2-bromobenzoyloxycarbonate (2-BrZ) pour favoriser la cristallisation ;
- des oligomères incorporant 2, 3, 4, 5 ou 6 motifs DBT portant en position N-terminale un groupement acétyle (Ac) pour faciliter les analyses RMN ;
- un oligomère comportant 4 motifs DBT couplé à une sonde fluorescente : la fluorescéine. Les oligomères utilisés dans les études structurales ont été obtenus avec un rendement compris entre 5 et 60% tandis que le composé fluorescent a été obtenu avec un rendement de 25%.

### XII.1.3. Etudes structurales des polyDBT

Le composé Boc-DBT-NH<sub>2</sub> adopte une structure en coude  $\beta$  de type II' à l'état solide et en solution<sup>24</sup> (Figure 11). Ce coude est stabilisé par une liaison hydrogène entre le groupe carbonyle du Boc et le NH de l'amide C-terminal formant un pseudocycle C<sub>10</sub>. Il possède des valeurs d'angles dièdres  $\phi_1=66^\circ$ ,  $\psi_1 = -144^\circ$ ,  $\phi_2 = -83^\circ$ ,  $\psi_2=7^\circ$ .

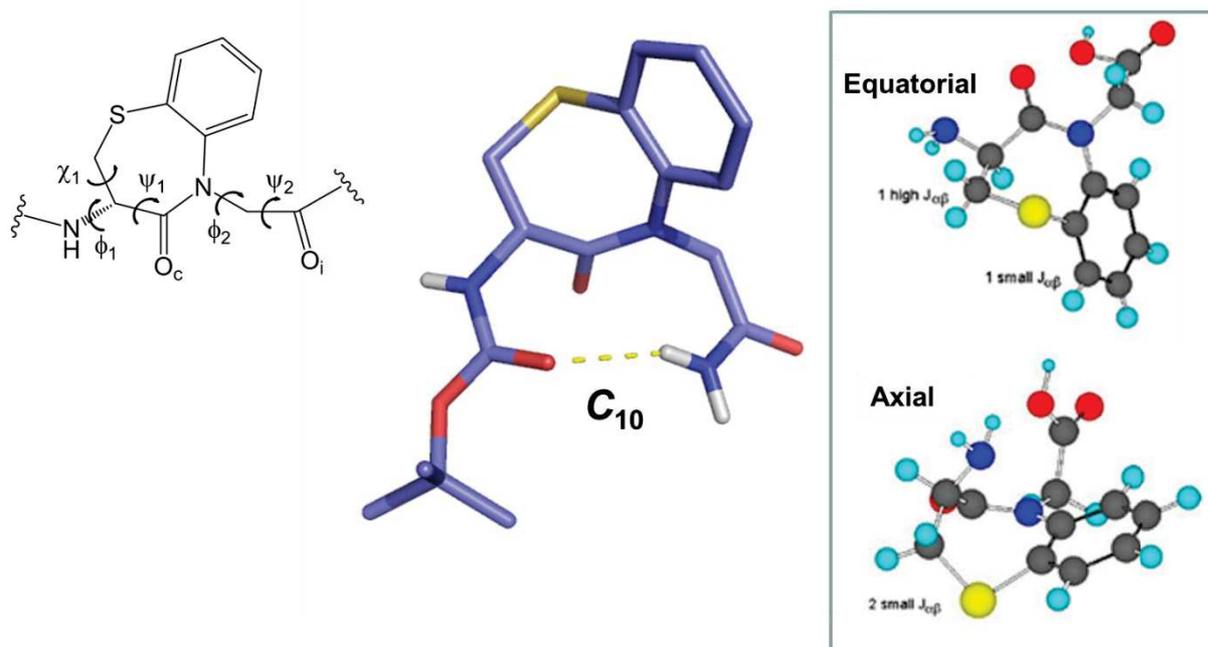


Figure 75 : Structure cristalline du Boc-DBT-NH<sub>2</sub> et conformations possibles du DBT : équatoriale et axiale<sup>24</sup>

Le cycle benzothiazépinone peut adopter deux conformations : une conformation axiale (A) et une autre équatoriale (E) suivant l'orientation du groupement Boc par rapport au cycle (Figure 75). Le DBT adopte la forme équatoriale à l'état solide comme on peut l'observer sur la structure cristalline mais également en solution d'après les constantes de couplage vicinales  $^3J(\text{H}\alpha/\text{H}\beta)$  mesurées (6,8 et 11,2 Hz).

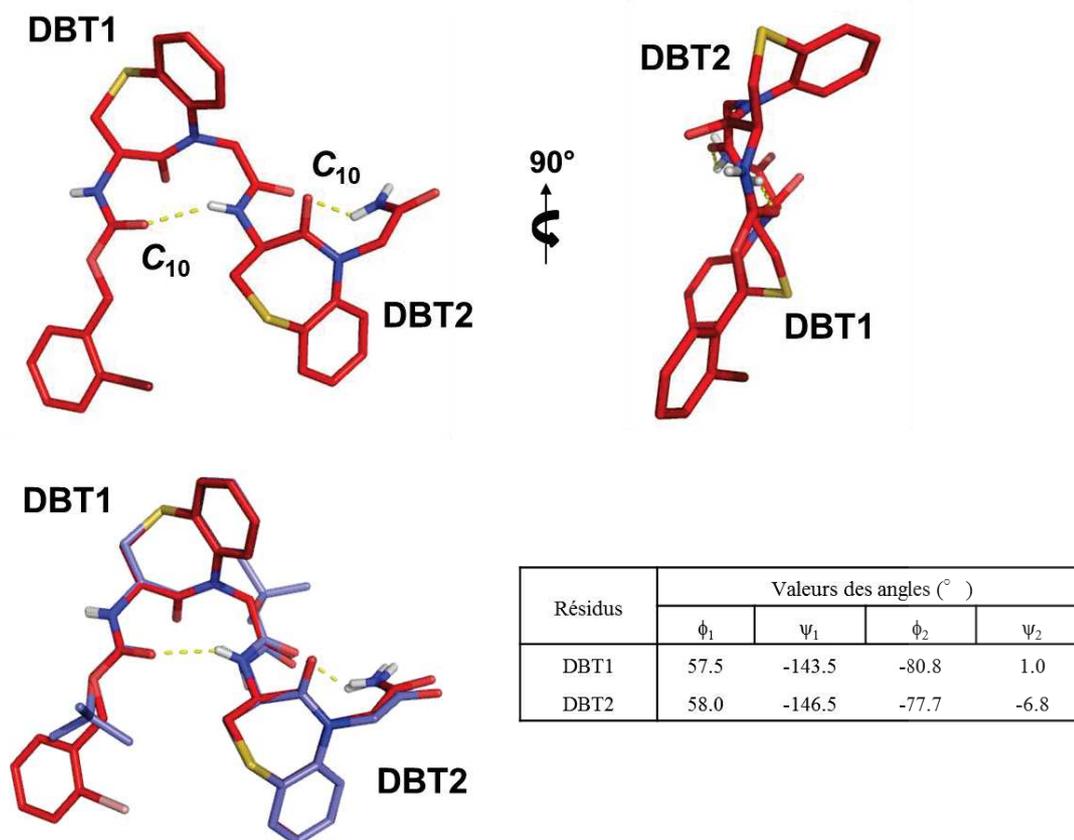
Afin d'étudier les structures d'oligomères de DBT de différentes tailles, nous avons tout d'abord synthétisé des oligomères protégés par un groupe acétyle (Ac) puis par un groupe 2-BrZ qui peuvent faciliter la cristallogénèse et l'analyse cristallographique. De même, des énantiomères L ont été synthétisés afin de faire des essais de cristallogénèse sur des mélanges racémiques. Les différents oligomères synthétisés pour l'étude structurale sont répertoriés dans le Tableau 16.

Tableau 16: Oligomères de DBT et de LBT synthétisés pour l'étude structurale.

Composé N°	Séquence	Composé N°	Séquence
<b>1</b>	2-BrZ-(LBT) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	<b>7</b>	Ac-(DBT) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>
<b>2</b>	2-BrZ-(LBT) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	<b>8</b>	Ac-(DBT) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>
<b>3</b>	2-BrZ-(LBT) <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>	<b>9</b>	Ac-(DBT) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>
<b>4</b>	2-BrZ-(DBT) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	<b>10</b>	Ac-(DBT) <sub>5</sub> -NH <sub>2</sub>
<b>5</b>	2-BrZ-(DBT) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	<b>11</b>	Ac-(DBT) <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
<b>6</b>	2-BrZ-(DBT) <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>		

#### XII.1.4. Analyses par diffraction des rayons X

Les premiers essais de cristallisation d'oligomères de DBT de différentes longueurs portant un groupe acétyle en position N-terminale et une fonction amide en position C-terminale (Ac-(DBT)<sub>x</sub>-NH<sub>2</sub>) n'ont pas permis d'obtenir des cristaux. Suite à cet échec, un groupement protecteur 2-BrZ a été introduit à la place de l'acétyle et une méthode inspirée de la cristallographie de protéines racémiques décrite par Zawadke et Berg en 1993<sup>25</sup> a été entreprise. Cette méthode consiste à cristalliser des protéines à partir d'un mélange de la protéine naturelle et de son énantiomère synthétisé chimiquement à partir d'acides aminés D. Cette méthode a permis d'obtenir des cristaux de protéines impossibles à obtenir à partir d'un seul énantiomère<sup>26</sup>. Nous avons donc synthétisé les deux énantiomères des oligomères de DBT et LBT comportant 2, 4 et 6 motifs. Malgré de nombreux essais de cristallisation avec ces composés purs ou en mélange racémique, nous n'avons obtenu des cristaux de bonne qualité que pour le composé **4** par évaporation lente d'un mélange méthanol/eau. La structure du dimère de DBT est représentée sur la Figure 76.



**Figure 76: Structure cristalline du composé 4, les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés. Superposition de la structure du monomère (en bleu) sur la structure du dimère (en rouge).**

Le dimère adopte une structure en ruban composé d'une succession de deux coudes similaires à celui formé par le monomère Boc-DBT-NH<sub>2</sub>. Les valeurs des angles dièdres adoptés par les motifs DBT de l'oligomère **4** rapportées dans la Figure 76 sont très proches de celles mesurées pour le motif monomérique:  $\phi_1=66^\circ$ ,  $\psi_1 = -144^\circ$ ,  $\phi_2 = -83^\circ$ ,  $\psi_2=7^\circ$ . En effet, on observe sur la figure 76 que la structure du monomère est parfaitement superposable avec chacun des coudes formés par le dimère. Les motifs consécutifs sont inversés suivant une symétrie de  $180^\circ$  par rapport à l'axe défini par le réseau de liaisons hydrogène au centre du ruban. Cette structure est plane comme on peut le voir sur la vue axiale. Elle est stabilisée par deux liaisons hydrogène entre les groupements carbonyles des résidus *i* et les protons amides des résidus *i*+2 formant des pseudocycles à 10 chaînons (Figure 77). Ainsi, le motif monomérique est pré-organisé en coude et se répète deux fois dans le cas du dimère.

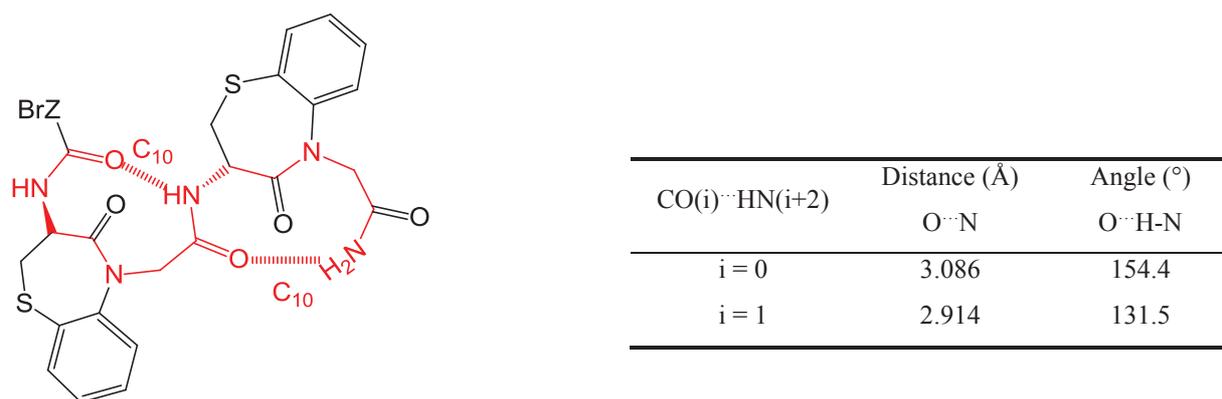


Figure 77 : Représentation schématique des liaisons hydrogène formant les pseudo-cycles  $C_{10}$  et valeurs de distances O...HN et d'angles

Nous avons par la suite procédé à des analyses par RMN des composés **7**, **8**, **9**, **10** et **11** afin de déterminer la structure adoptée par ces oligomères en solution.

### XII.1.5. Analyses en solution par RMN

Les études par RMN des oligomères de DBT ont été menées dans le méthanol. La majorité des résonances  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  ont pu être attribuées à 283 K, en combinant des expériences homonucléaires COSY, TOCSY, ROESY et hétéronucléaires  $^{13}\text{C}$ -HMBC,  $^{13}\text{C}$ - et  $^{15}\text{N}$ -HSQC et  $^{13}\text{C}$ -HSQC-TOCSY, en abondance naturelle. Pour ces études, la nomenclature suivante a été utilisée pour la description du motif DBT.

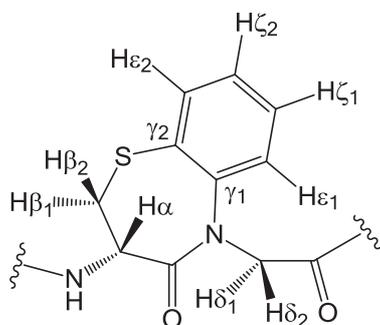


Figure 78 : Nomenclature du résidu DBT.

Nous avons obtenu des spectres RMN avec des signaux bien dispersés et fins pour les résonances des protons amides des oligomères jusqu'à 6 motifs comme on peut le voir sur la Figure 79. On observe une faible variation des déplacements chimiques de ces protons jusqu'au trimère puis des changements notables apparaissent à partir de l'incorporation du 4<sup>ème</sup> motif DBT avec un éclatement des résonances sur 0,7 ppm (Figure 79). Par exemple, le proton amide NH1 du monomère de DBT, du dimère **7** et trimère **8** a un déplacement chimique de 8,6 ppm et se déplace vers 8,2 ppm à partir du tétramère.

Globalement, les signaux s'éclatent de manière importante à partir du tétramère avec une dispersion maximale pour le pentamère avant une contraction à partir de l'hexamère. Cette dispersion importante à partir du tétramère peut s'expliquer par une modification de la structure des oligomères de DBT avec un rôle important des courants de cycle induits par les cycles aromatiques des DBT.

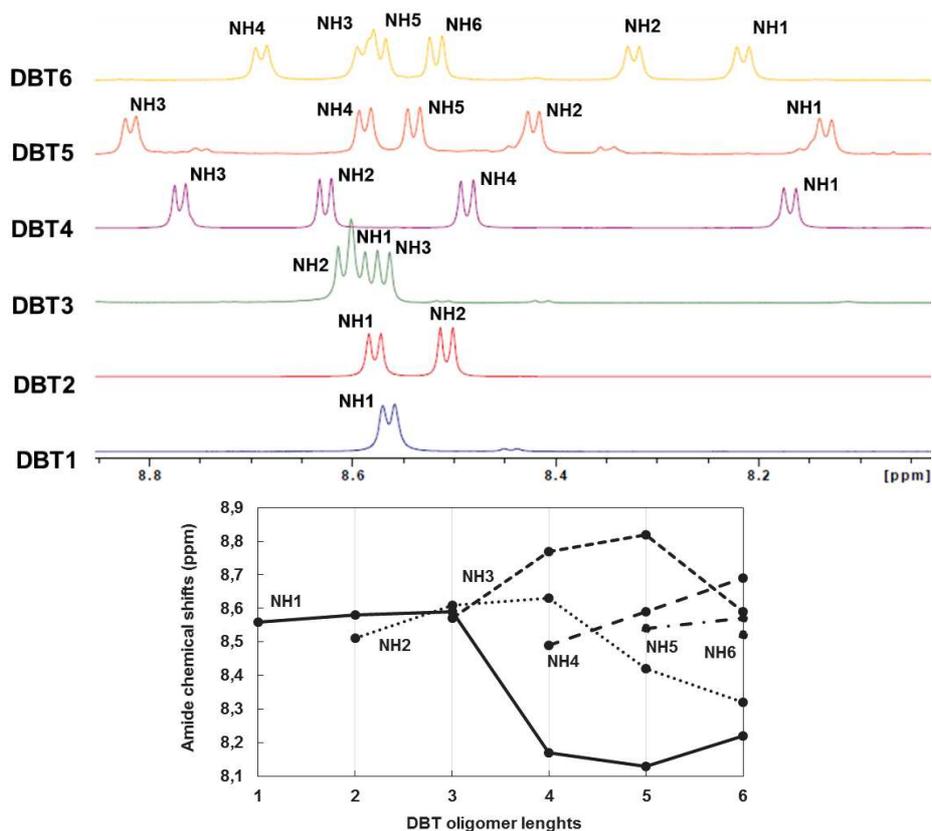


Figure 79 : Région amide des spectres RMN  $^1\text{H}$  du motif Ac-DBT-NH $_2$  et des oligomères 7, 8, 9, 10 et 11. Variation des déplacements chimiques des protons amides en fonction de la taille des oligomères.

Les raies de l'hexamère **11** sont moins éclatées que pour le tétra- et le pentamère. Les solubilités des composés diminuent de manière importante à partir de 6 motifs et il est probable qu'ils forment des agrégats d'où les spectres ROESY de mauvaise qualité pour ces longueurs d'oligomères. Nous sommes en train d'enregistrer des spectres avec des concentrations variables de tous les oligomères pour vérifier cette hypothèse.

Tableau 17 : Coefficients de température des protons amides dans le MeOH (en ppb/K).

Résidus	<i>Oligomères</i>					
	<i>DBT1</i>	<i>DBT2</i>	<i>DBT3</i>	<i>DBT4</i>	<i>DBT5</i>	<i>DBT6</i>
<b>DBT<sup>1</sup></b>	7,0	7,0	7,0	2,0	2,0	4,0
<b>DBT<sup>2</sup></b>	-	6,0	6,0	5,0	3,0	1,3
<b>DBT<sup>3</sup></b>	-	-	6,0	8,0	8,0	5,3
<b>DBT<sup>4</sup></b>	-	-	-	4,0	5,0	6,0
<b>DBT<sup>5</sup></b>	-	-	-	-	6,0	4,7
<b>DBT<sup>6</sup></b>	-	-	-	-	-	5,3

Les coefficients de température nous permettent d'évaluer l'implication des protons amides dans des liaisons hydrogène (Tableau 17). Nous observons des valeurs relativement importantes (6,0-7,0 ppb/K) pour le dimère **7** et le trimère **8**. Le proton amide du premier motif DBT du tétramère **9** et des deux premiers motifs du pentamère ont des valeurs relativement faibles ( $\leq 3,0$  ppb/K) ce qui semble indiquer qu'ils sont impliqués fortement dans une liaison hydrogène. Dans le cas de l'hexamère **9**, le NH du DBT2 semble impliqué dans une liaison hydrogène très stable. Il faut néanmoins relativiser ces résultats car les positions relatives des cycles aromatiques des DBT par rapport aux protons amides varient avec la température et peuvent influencer fortement les  $\delta(\text{HN})$ .

Tableau 18 : Constantes de couplage  $^3J(\text{N}^{\text{H}}, \alpha\text{CH})$ ,  $^3J(\text{N}^{\text{H}}, \beta^1\text{CH})$  et  $^3J(\text{N}^{\text{H}}, \beta^2\text{CH})$  des oligomères 7, 8, 9, 10 et 11 dans le  $\text{CD}_3\text{OH}$  en Hz à 283 K.

Residue	Composé 7			Composé 8			Composé 9		
	$^3J_{\alpha}$	$^3J_{\alpha\beta_1}$	$^3J_{\alpha\beta_2}$	$^3J_{\alpha}$	$^3J_{\alpha\beta_1}$	$^3J_{\alpha\beta_2}$	$^3J_{\alpha}$	$^3J_{\alpha\beta_1}$	$^3J_{\alpha\beta_2}$
DBT <sup>1</sup>	7,1	6,8	11,8	7,6	6,8	11,7	7,2	6,8	11,8
DBT <sup>2</sup>	7,5	6,8	11,8	7,7	7,0	11,7	6,8	6,8	11,8
DBT <sup>3</sup>	-	-	-	7,2	6,9	11,7	6,5	6,8	11,8
DBT <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	7,5	7,2	11,8
DBT <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DBT <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Residue	Composé 10			Composé 11		
	$^3J_{\alpha}$	$^3J_{\alpha\beta_1}$	$^3J_{\alpha\beta_2}$	$^3J_{\alpha}$	$^3J_{\alpha\beta_1}$	$^3J_{\alpha\beta_2}$
DBT <sup>1</sup>	7,2	6,8	11,8	7,2	6,8	11,8
DBT <sup>2</sup>	6,7	6,9	11,8	6,8	6,7	11,8
DBT <sup>3</sup>	6,3	6,9	11,8	7,2	6,7	11,8
DBT <sup>4</sup>	7,0	6,9	11,8	6,6	6,9	11,8
DBT <sup>5</sup>	7,3	7,0	11,8	7,1	7,0	11,8
DBT <sup>6</sup>	-	-	-	7,3	6,9	11,8

Nous avons ensuite essayé d'obtenir des informations sur les angles de torsion  $\phi_1$  et  $\chi_1$  en mesurant les constantes de couplages  $^3J(\text{NH}, \alpha\text{CH})$ ,  $^3J(\text{NH}, \beta^1\text{CH})$  et  $^3J(\text{NH}, \beta^2\text{CH})$ . Les  $^3J(\text{NH}, \alpha\text{CH})$  des DBT ont toutes des valeurs entre 6 et 8 Hz ce qui correspond à plusieurs valeurs d'angles dièdres d'après la courbe de Karplus<sup>27</sup>. Nous n'avons donc pas pu obtenir d'informations intéressantes sur la valeur de  $\phi_1$  en mesurant ces constantes de couplages. Nous avons vu précédemment que les valeurs de constantes  $^3J(\text{N}^{\text{H}}, \beta\text{CH})$  permettent de déduire les valeurs de  $\chi_1$  et la conformation du cycle benzothiazepinone du DBT. Les valeurs  $^3J(\text{NH}, \beta^1\text{CH})$  et  $^3J(\text{NH}, \beta^2\text{CH})$  de tous les motifs sont d'environ 6,8 et 11,8 Hz respectivement et sont similaires à celles mesurées pour le composé Boc-DBT-NH<sub>2</sub> peu importe la longueur des oligomères (Tableau 18). Ces valeurs correspondent à une conformation équatoriale du DBT ( $\chi_1 \sim -170^\circ$ ). Par conséquent la taille des oligomères n'influence pas la forme du cycle benzothiazepinone du DBT observée pour le monomère, favorable à une succession de coude de type  $\beta$  II'.

Les spectres ROESY nous ont permis d'extraire des informations de distances inter-protons pour les différents oligomères. Les NOE caractéristiques sont représentés sur la

Figure 80, ci-dessous. La présence et les intensités de NOE inter-résidus sont ensuite répertoriées dans le tableau 6.

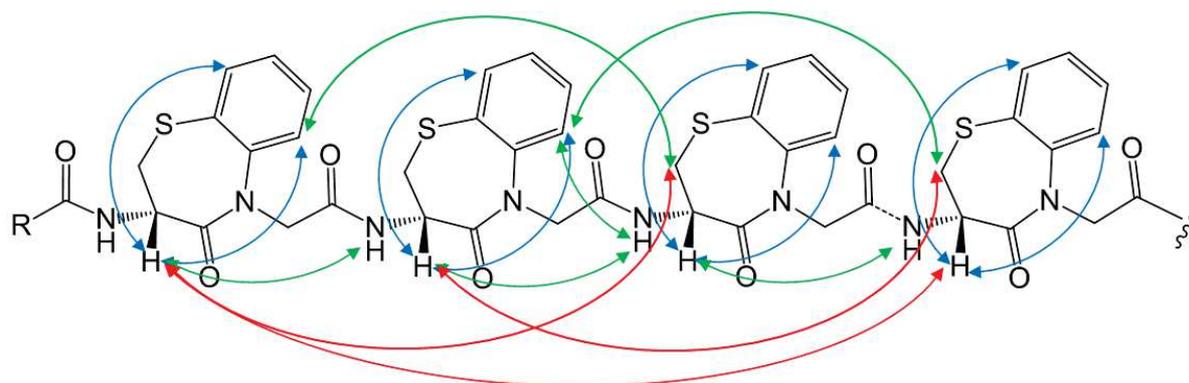


Figure 80 : Représentation des NOE longues distances caractéristiques de l'oligomère de DBT.

On observe en bleu la présence de pics NOE typiques de la conformation équatoriale représentés en bleu entre les protons  $^{\alpha}\text{CH}$  et  $^{\beta}\text{CH}$  du noyau benzène des DBT en accord avec les valeurs  $^3J(\text{N}^{\text{H}}, \beta\text{CH})$  mesurées. Les corrélations en vert sont caractéristiques des coudes successifs qui stabilisent la structure en ruban et sont présentes pour tous les oligomères. A partir du tétramère, nous avons ensuite détecté deux types de corrélations longues distances  $\text{HN}(i) - \text{H}\alpha(i+3)$  et  $\text{H}\alpha(i) - \text{H}\beta(i+2)$  qui sont incompatibles avec une structure étendue en ruban (en rouge).

Tableau 19 : NOE inter-résidu observé par les études spectrales ROESY des différents oligomères. (NOE Fort "s" <2,7 Å; moyen "m" < 3,3 Å et faible "w" < 5,0 Å).

NOE ( <i>i,j</i> )	Ac-(DBT) <sub>x</sub> , x:	<i>j-i</i>	Intensité des NOE
Ac – HN2	2, 3(s)	2	w
1.Hα – 2.HN	2, 3(s),4, 5	1	w
1.HN – 4.Hα	4, 5, 6	3	w
1.Hδ <sub>1</sub> – 2.HN	2, 3, 4, 5, 6	1	m, m, w, m
1.Hδ <sub>2</sub> – 2.HN	2, 3, 4, 5, 6	1	m
1.Hε <sub>1</sub> – 2.HN	2, 3, 4, 5, 6	1	m, w, w, w
1.Hε <sub>1</sub> – 3.Hβ <sub>1</sub>	3, 4, 5, 6	2	w
2.Hα – 4.Hβ <sub>2</sub>	4, 5, 6	2	m
2.Hε <sub>1</sub> – 4.Hβ <sub>1</sub>	4, 5, 6	2	w, m
2.HN – 5.Hα	5, 6	3	w
2.Hδ <sub>1</sub> – 3.HN	3, 4, 5, 6	1	w
2.Hδ <sub>2</sub> – 3.HN	3, 4, 5, 6	1	m
2.Hε <sub>1</sub> – 3.HN	3, 4, 5, 6	1	w
3.Hα – 4.HN	4, 5, 6	1	w
3.Hα – 5.Hβ <sub>2</sub>	5, 6	2	w
3.Hε <sub>1</sub> – 5.Hβ <sub>1</sub>	5, 6	2	w
3.Hδ <sub>1</sub> – 4.HN	4, 5, 6	1	w
3.Hδ <sub>2</sub> – 4.HN	4, 5, 6	1	m
3.Hε <sub>1</sub> – 4.HN	4, 5, 6	1	w
4.Hδ <sub>1</sub> – 5.HN	4, 5, 6	1	w
4.Hδ <sub>2</sub> – 5.HN	4, 5, 6	1	m
4.Hε <sub>1</sub> – 5.HN	4, 5, 6	1	w
4.Hε <sub>1</sub> – 6.Hβ <sub>1</sub>	6	2	w
5.Hε <sub>1</sub> – 6.HN	6	1	w

Les différences dans les sets de NOE, combinées avec les modifications importantes des spectres <sup>1</sup>H à partir du tétramère, tendent à démontrer que les oligomères de DBT subissent des variations conformationnelles lorsque leur taille augmente en solution. En effet, les jeux de contraintes du dimère et du trimère sont parfaitement compatibles avec la structure en ruban observé à l'état solide pour le dimère. Les structures RMN des oligomères plus longs n=4, 5, 6 sont en cours de calculs. Cependant, nous observons des violations de certaines contraintes de distance. Il est possible que ces oligomères adoptent plusieurs conformations en équilibre (ruban et une autre structure non déterminée) ou que des

phénomènes d'auto-assemblages soient à l'origine de pics croisés additionnels sur les cartes ROESY.

### XII.1.6. Etudes de dichroïsme circulaire

Les oligomères ont ensuite été étudiés par dichroïsme circulaire dans le méthanol à 20°C (Figure 21). Afin de déterminer si le motif DBT présente une signature intrinsèque, nous avons procédé à l'analyse du motif DBT intermédiaire dépourvu du groupement acide acétique (Figure 81). Ce motif n'est pas capable d'adopter la conformation en coude  $\beta$  décrite précédemment et présente uniquement une signature dichroïque caractéristique du motif (en bleu dans la Figure 82).

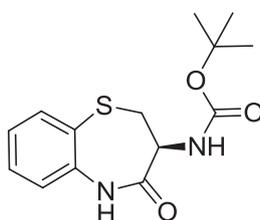


Figure 81 : Motif DBT intermédiaire dépourvu du groupe acide acétique sur la fonction amide.

On note que le monomère de DBT dépourvu du groupe acide acétique à une signature caractéristique avec deux minima à 205 et 227 nm et deux maxima à 217 et 245 nm. Cette signature varie peu avec la taille des oligomères. On observe un décalage très léger des spectres vers la droite avec la longueur des oligomères. L'ellipticité molaire du signal augmente de manière quasi-proportionnelle au nombre de résidus incorporés jusqu'au tétramère. Elle augmente encore un peu pour le pentamère et diminue pour l'hexamère.

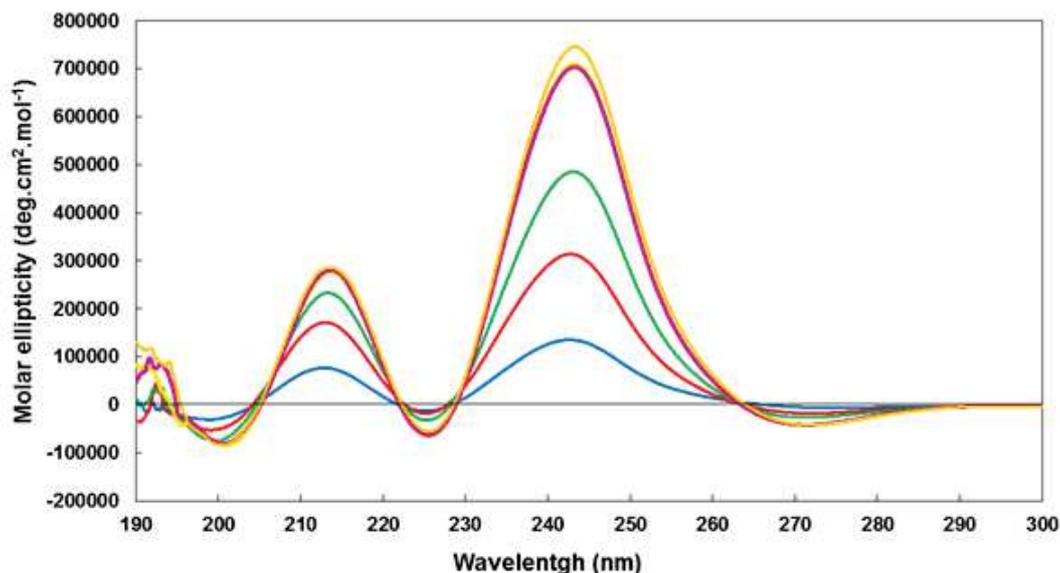


Figure 82 : Spectre de dichroïsme circulaire du monomère (en bleu) et des oligomères 7 (en rouge), 8 (en vert), 9 (en violet), 10 (en orange) et 11 (en jaune) dans le MeOH à 20°C.

De par le signal CD intrinsèque du DBT, on ne peut extraire précisément le signal induit par les transitions électroniques des liaisons peptidiques en fonction de la longueur des oligomères. La signature caractéristique des conformations adoptées par les oligomères est masquée par le signal intense du DBT. L'évolution de l'intensité des maxima et minima avec la taille des oligomères est logique jusqu'au tétramère puisque que l'intensité du signal est majoritairement lié au nombre de motifs. Inversement, à ce stade de l'étude, il est difficile d'expliquer les variations observées pour le pentamère et l'hexamère. L'hypothèse la plus probable semble être la précipitation partielle des composés dans la solution mère (1 mM) avec le temps, néanmoins des concentrations plus importantes ont été analysées par RMN sans agrégation visible. Il sera nécessaire d'enregistrer de nouveaux spectres pour ces composés pour confirmer cette tendance en contrôlant la concentration exacte des échantillons.

### XII.1.7. Conclusion

L'ensemble des analyses structurales montre que les oligomères de DBT sont capables d'adopter des structures en ruban, stabilisées par des pseudo-cycles à dix chaînons  $C_{10}$ , caractéristiques d'oligomère de coude  $\beta$ . Nous avons décrit cette structure dans le premier chapitre de ce manuscrit. Elle dérive de l'hélice  $3_{10}$  et est observée dans certaines protéines<sup>28</sup> mais n'incorpore généralement pas plus de deux coudes répétés. Les oligomères de DBT ont montré d'ores et déjà d'intéressantes propriétés biologiques, en particulier comme vecteur favorisant la pénétration cellulaire. Cependant, ce motif conduit à des oligomères peu solubles et dépourvus de fonctions pouvant mimer les chaînes latérales

des aminoacides. Nous avons par conséquent développé la synthèse d'oligomères d'un autre inducteur de coude  $\beta$  plus versatile que le DBT : le lactame de Freidinger<sup>29</sup>. Ces motifs constitués d'une (S)-3 aminopyrrolidin-2-one et d'un dérivé d'acide aminé portent les chaînes latérales issues des aminoacides qui le constituent. Je présenterai la synthèse de ces nouveaux oligomères et leurs études structurales dans la suite de ce chapitre.

## XII.2. Synthèse d'oligomères d' $\alpha$ -amino $\gamma$ -lactame

Comme les DBT, les  $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames (Agl-AA) sont des inducteurs de coude  $\beta$  II' développés par Freidinger et coll.<sup>30</sup> à la fin des années 70 et utilisés avec succès dans la synthèse d'un analogue de l'hormone de libération de l'hormone lutéinisante<sup>21</sup> (luteinizing hormone-releasing hormone, LH-RH). Cette hormone de séquence pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> forme un coude  $\beta$  II' impliquant les 4 résidus Tyr-Gly-Leu-Arg (représenté en vert). Lors de la synthèse d'un de ces analogues, l'équipe de Freidinger a remplacé le fragment dérivant du dipeptide Gly-Leu par un motif Agl-Leu (Figure 83, **B**). Cet analogue a montré un effet 2,4 fois supérieur à la LH-RH naturelle *in-vivo*. Après les travaux précurseurs de Freidinger, les motifs  $\alpha$ -amino lactames ont largement été utilisés dans divers programmes de chimie médicinale pour le développement de dérivés de peptides à visée thérapeutique<sup>31</sup>.

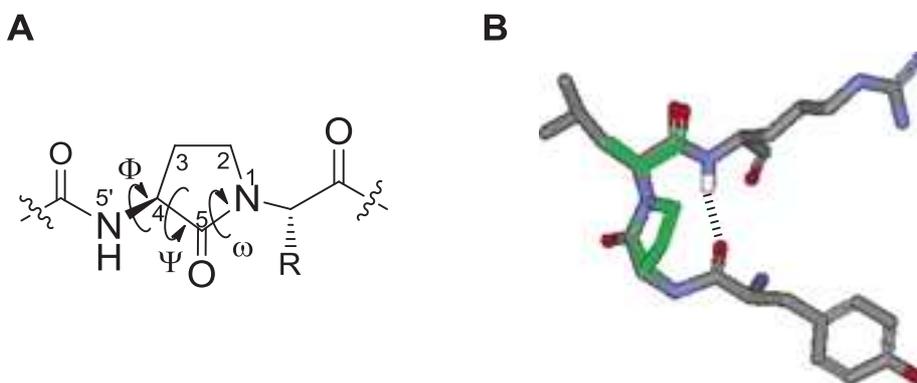


Figure 83 : A) motif Agl-AA et B) modélisation du motif Agl-Leu (en vert) superposé au térapeptide TyrGlyLeuArg issu de la séquence de la LH-RH.

Ce motif Agl-AA est un mime contraint de dipeptide et les études structurales *in silico* démontrent qu'il adopte une conformation différente de celle d'un dipeptide N-méthylé au niveau de la liaison amide<sup>32</sup>. Contrairement aux dipeptides N-méthylés, le  $\gamma$ -lactame formé interdit la rotation de la liaison entre l'azote N1 et le carbone C5. Ainsi, l'incorporation d'un  $\gamma$ -lactame dans une séquence peptidique a plusieurs conséquences. Il contraint la liaison amide modifiée à adopter une configuration *trans* et restreint la valeur de l'angle  $\Psi = -125 \pm 10$ . Si cette valeur est en accord avec les valeurs usuelles du résidu *i*+1 d'un coude  $\beta$  II', ce motif peut en revanche avoir deux valeurs d'angles dièdres possibles :  $\Phi = -140^\circ$  ou  $60$ . L'étude *in silico* a montré que les conformations de plus basse énergie ont une valeur d'angle  $\Phi$  de  $-140^\circ$  qui est incompatible avec la présence d'un coude  $\beta$  II'. En revanche, les conformations d'énergie légèrement supérieure (5,5 kcal/mol plus haute) présentent un angle  $\Phi$  de  $60^\circ$ , correspondant cette fois à un coude  $\beta$  II'. On peut noter néanmoins que l'énergie est abaissée en présence de groupement encombrant sur l'amine N5' favorisant la

formation du coude  $\beta$  comme l'a montré Freidinger et coll.<sup>33</sup> dans l'analogie de la LH-RH. Lorsque ce lactame adopte les valeurs d'angles  $\Phi = 60^\circ$  et  $\Psi = -120^\circ$  correspondants au coude  $\beta$ , les valeurs des angles  $\Phi_{i+1}$  et  $\Psi_{i+1}$  sont respectivement de  $-80^\circ$  et  $0^\circ$ .

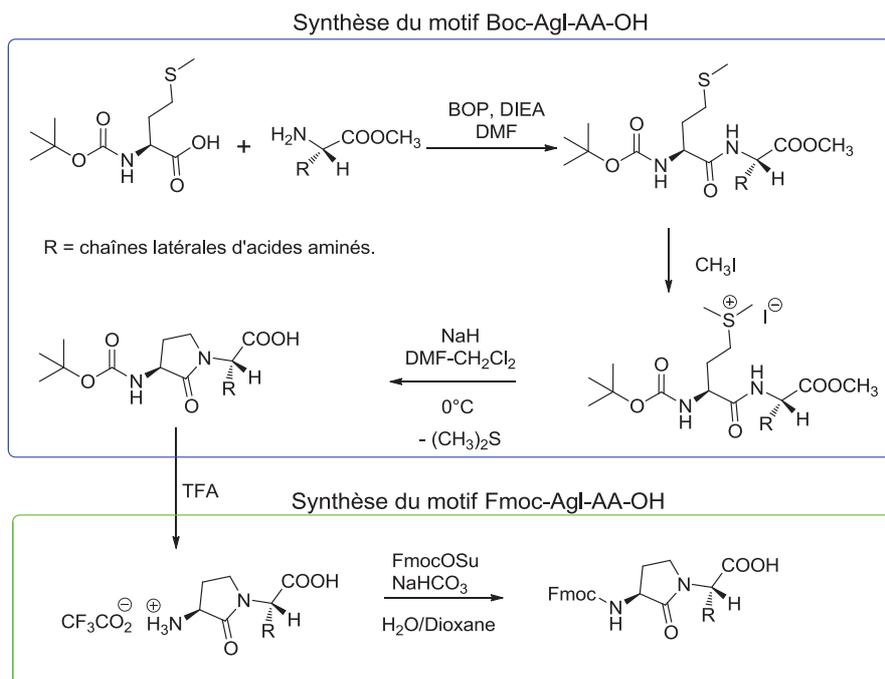
Comme décrit dans le premier chapitre, les rubans de type coude  $\beta$  ( $\beta$ -bend ribbon)<sup>28</sup> correspondent à une répétition périodiques de coudes  $\beta$  le long de leur séquence. Ainsi l'oligomérisation de tout mime de coude  $\beta$  doit conduire à ce type de structure secondaire, ce que nous avons observé pour les oligomères de DBT.

Comme évoqué précédemment, même si ce type d'oligomères permet d'accéder à des structures en ruban et a permis d'identifier une nouvelle famille de vecteurs de pénétration intracellulaire, ils sont limités par la diversité fonctionnelle qu'ils apportent et qui est souvent cruciale pour le développement d'outils à visée thérapeutique. Dans ce contexte, cette partie de mon travail de thèse a concerné le développement de nouveaux oligomères structurés en ruban construits à partir des briques AgI-AA, qui comme le DBT, se structurent en coude  $\beta$ . Ils offrent en revanche une grande diversité fonctionnelle, en effet toutes les chaînes des aminoacides protéinogéniques ou non peuvent être incorporées.

### **XII.2.1. Stratégie de synthèse d'oligomères de poly-AgI**

De façon générale la synthèse de peptides incorporant les  $\gamma$ -lactames requiert la synthèse préalable du motif en solution, l'introduction de protections, sur la fonction acide ou amine de la chaîne principale, adaptées à la stratégie mise en place et la purification du motif avant l'incorporation dans la séquence peptidique.

La synthèse du motif AgI-AA protégé par un groupement N-Boc développée par Freidinger se déroule en 3 étapes, cette stratégie est donnée dans le Schéma 6. La synthèse commence par 1) un couplage peptidique entre la Boc-méthionine (Boc-Met-OH) et un acide aminé dont la fonction acide est protégée par un ester méthylique. 2) La fonction thioéther de la chaîne latérale de la méthionine est ensuite méthylée en présence d'iodométhane afin de former un bon groupement nucléofuge sous la forme d'un sel de sulfonium. 3) Le  $\gamma$ -lactame est ensuite obtenu par attaque nucléophile de l'azote de l'amide déprotonée par action de l'hydrure de sodium, en  $\alpha$  du sel de sulfonium. Comme on peut le constater dans ce schéma de synthèse on peut faire varier très facilement le groupement R du motif AgI-AA en fonction de l'acide aminé couplé à la méthionine utilisé durant la première étape. Pour une synthèse en stratégie Fmoc/tBu, généralement utilisée pour la synthèse de peptides longs sur support solide, 2 étapes supplémentaires sont nécessaires : l'élimination du groupement Boc par une solution de TFA, et l'introduction du groupement Fmoc (par exemple par le réactif Fmoc-OSu en présence de base).

Schéma 6 : Synthèse en solution des motifs Boc-Agl- AA-OH et Fmoc-Agl-AA-OH<sup>34</sup> .

Les composés obtenus par cette synthèse sont énantiomériquement purs, hormis le cas particulier du motif Agl-Phe (R= CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) pour lequel 12 à 15 % d'épimérisation au niveau du C $\alpha$  du résidu Phe ont été reportés<sup>29</sup>. Cette synthèse peut être appliquée à tous les acides aminés permettant ainsi une grande versatilité des motifs, apportée par les chaînes latérales de différentes natures (hydrophobe, hydrophile, cationique, anionique, etc...) et ainsi des oligomères les incorporant.

Pour la synthèse d'oligomères incorporant plusieurs motifs Agl-AA, il est nécessaire de synthétiser et purifier chaque motif avant l'oligomérisation. Pour éviter ce processus nous avons recherché une nouvelle stratégie de synthèse simple, rapide et adaptée au support solide. Cette stratégie repose sur la conversion de simples séquences peptidiques, synthétisés sur support solide, en oligomères de  $\gamma$ -lactames par une réaction de multicyclisation intramoléculaire. Cette stratégie ainsi que les études structurales des oligomères qu'elle a permis de synthétiser sont présentées dans les paragraphes suivants.

### XII.2.2. Développement d'une nouvelle stratégie de synthèse de poly-Agl

Le premier objectif était de développer une stratégie sur support solide, beaucoup plus adaptée à la synthèse d'oligomères longs. A ce jour seulement deux stratégies de synthèse sur support solide permettant de générer le lactame en cours d'élongation du peptide ont été proposées<sup>35,36,37</sup>.

Cependant elles ne concernent l'incorporation que d'un seul motif et sont peu adaptées à la synthèse simple et rapide des oligomères. Dans la stratégie de synthèse que nous proposons, nous avons tout d'abord transféré la synthèse des  $\gamma$ -lactames décrite en solution par Freidinger et coll. au support solide et l'avons adaptée à la préparation des oligomères de  $\gamma$ -lactames. Cette stratégie est décrite dans le Schéma 7.

La première étape consiste en la synthèse sur support solide selon une stratégie Fmoc/tBu de séquences peptidiques alternant des résidus méthionine et des acides aminés portant les chaînes latérales de notre choix. Avant l'étape de cyclisation qui nécessite l'emploi d'une base, le groupement Fmoc est éliminé et les groupements acétyle ou Br(Z) sont introduits (Schéma 7, **A**). Ensuite, les fonctions thioéthers des méthionines sont méthylées à l'aide d'un agent méthylant afin de générer un groupement nucléofuge sous forme de sels de sulfonium (Schéma 7, **B**). Puis, en présence d'une base forte, les fonctions amides sont déprotonées (Schéma 7, **C**) et le peptide subit une réaction de multicyclisation par le biais d'une substitution nucléophile en  $\alpha$  du groupement sulfonium (Schéma 7, **D**). Cette dernière étape permet d'obtenir l'oligomère d'Agl-AA. Cette stratégie, permettant de convertir une simple séquence peptidique en oligomères d'Agl-AA, donne facilement et rapidement accès à des oligomères de longueur et de nature différentes.

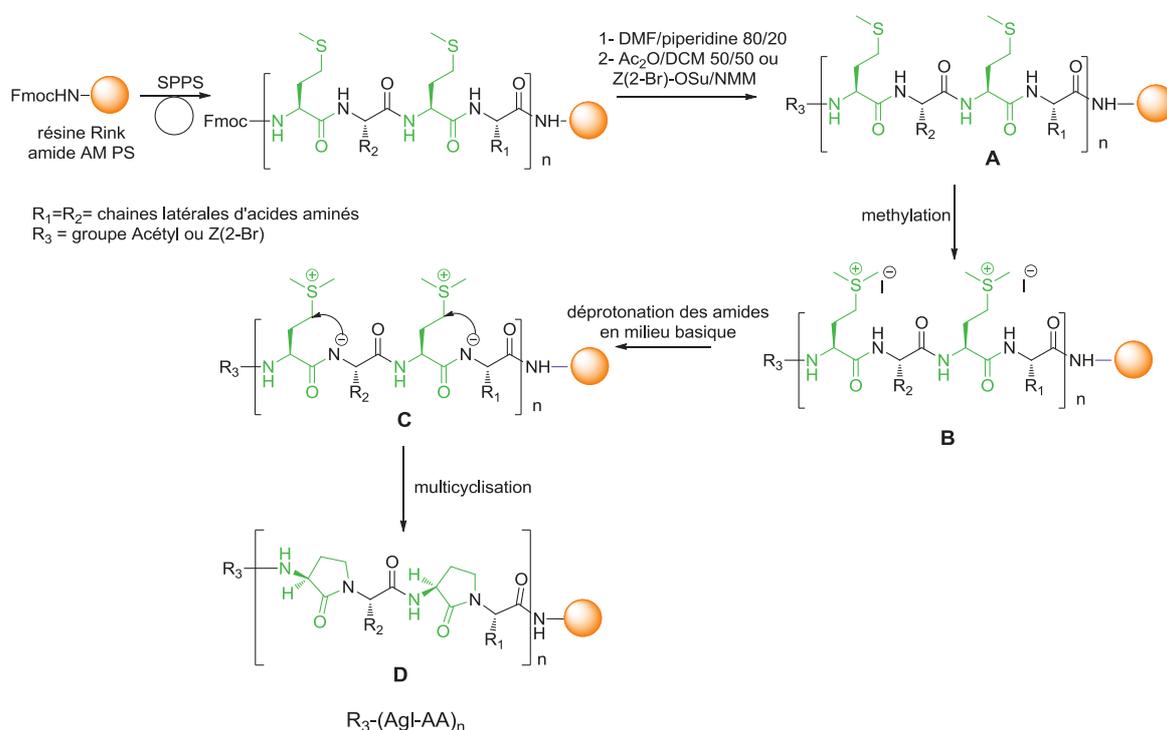


Schéma 7 : Stratégie général de la synthèse de poly-(Agl-AA) sur support solide.

L'étape de formation du  $\gamma$ -lactame constitue l'étape clef de la stratégie de synthèse que nous avons développée. Ainsi, nous avons tout d'abord dû adapter et optimiser les

conditions de formation du lactame décrites par Freidinger à la phase solide. Pour cela, nous avons choisi le dipeptide modèle Z-Met-Phe greffé sur une résine Rink amide et nous avons testé différentes conditions : matrice de la résine (PS ou PEG), agent de méthylation, solvant pour l'étape de méthylation et base pour la cyclisation.

Deux types de résine ont été utilisés: une résine Rink amide aminométhyle et une résine Rink amide ChemMatrix (résine polyéthylène glycol). La résine ChemMatrix a été choisie pour sa meilleure compatibilité avec les solvants aqueux.

Après le couplage de la Z-méthionine sur la phénylalanine ancrée au support solide, la synthèse du  $\gamma$ -lactame se déroule en deux étapes, une étape de méthylation de la fonction thioéther de la méthionine et une étape de déprotonation de l'amide par une base pour permettre l'attaque nucléophile en  $\alpha$  du sel de sulfonium. L'optimisation de ces deux étapes est décrite ci-dessous.

#### XII.2.2.a. Méthylation de la fonction thioéther sur support solide

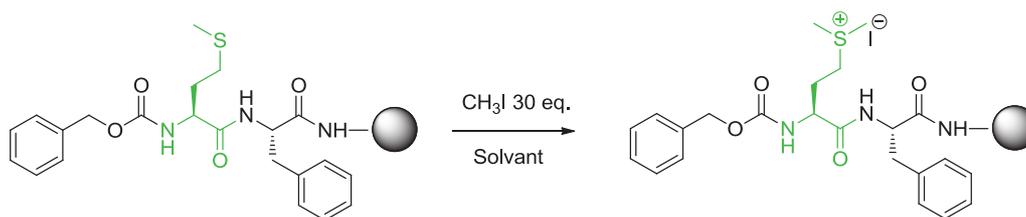
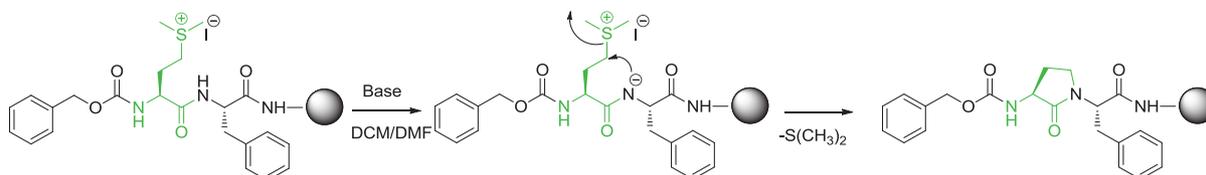


Schéma 8 : Méthylation sur support de la fonction thioéther de la méthionine par le iodométhane.

Cette méthylation se déroule en solution en utilisant l'iodométhane ( $\text{CH}_3\text{I}$ ) comme solvant et comme réactif, ce qui n'est pas très adapté à la synthèse en phase solide. Ainsi, d'autres conditions ont été testées sur les résines polystyrène et ChemMatrix. Tout d'abord nous avons utilisé un autre agent de méthylation, moins toxique que l'iodométhane, le tétrafluoroborate de triméthylxonium. Malheureusement, nous avons observé, quel que soit le nombre d'équivalents de ce sel, la dégradation des résines. Nous avons évalué à 30 équivalents la quantité d'iodométhane utilisée lors des synthèses en solution et avons conservé ce large excès pour la réaction sur support. Dans un premier temps, le THF qui permet d'avoir un très bon taux de gonflement de la résine, a été utilisé mais n'a pas permis d'obtenir de résultats satisfaisants. En effet seulement 20% de conversion est obtenue avec la résine PS et de nombreux produits secondaires (non identifiés) sont obtenus avec la résine ChemMatrix. Un mélange DCM/DMF (1:1), identique à celui utilisé pour l'étape de cyclisation en solution a ensuite été utilisé. Il a permis une méthylation totale de la fonction

thioéther après 24 heures de réaction à température ambiante. Nous avons donc décidé d'utiliser ce mélange DCM/DMF (1:1) pour l'ensemble des étapes de cette synthèse.

### XII.2.2.b. Déprotonation du proton amidique et cyclisation



**Schéma 9 : Cyclisation intramoléculaire par l'attaque nucléophile en  $\alpha$  du sel de sulfonium par la fonction amide déprotonée.**

Cette étape lorsqu'elle est réalisée en solution implique la déprotonation de la fonction amide par action de l'hydrure de sodium (NaH). L'emploi du NaH entraîne un dégagement gazeux et exige un milieu anhydre peu adapté à nos conditions de synthèse en phase solide. Nous avons donc dû trouver une base pour remplacer l'hydrure de sodium. Deux bases ont ainsi été testées : l'hydroxyde de lithium (LiOH) et la 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), adaptée au milieu organique. La résine portant le dipeptide méthylié est mis en réaction avec les différentes bases en utilisant un mélange DCM/DMF (1:1) pendant 24H. Après un cycle de lavage classique de la résine (DMF, MeOH, DCM) le peptide est clivé de la résine par un traitement à l'acide trifluoroacétique. Le composé est ensuite analysé par LC-MS et les taux de conversion sont évalués par mesure d'aire et sont résumés dans le Tableau 20.

**Tableau 20 : Optimisation de la réaction de cyclisation.**

Résine	Base	Eq	Tps	rdt
ChemMatrix	LiOH	3	24H	46%
ChemMatrix	DBU	3	24H	90%
AM polystyrène	LiOH	3	24H	40%
AM polystyrène	DBU	3	24H	90%

L'hydroxyde de lithium conduit à une conversion de 46% sur résine ChemMatrix et de 40% sur résine AM polystyrène. Les résines de types ChemMatrix gonflent dans les solvants polaires et apolaires, ce qui peut expliquer cette différence de rendement, néanmoins assez faible, entre ces deux résines. Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant la DBU comme base avec 90% de conversion, pour les deux types de résines. L'autre composé obtenu n'étant pas le sel de sulfonium mais le dipeptide initial, une réaction de déméthylation du sel de sulfonium s'est donc produite durant cette étape.

La DBU est la base la plus adaptée à notre synthèse, elle sera donc retenue pour les synthèses suivantes. Le type de résine n'influe pas sur l'efficacité de la réaction, aussi ai-je utilisé la résine Rink amide AM PS pour la suite des synthèses. Comme il a été décrit par Freidinger, une épimérisation sur le C $\alpha$  de la phénylalanine peut se produire lors de la synthèse du motif Agl-Phe en solution. C'est pourquoi nous avons vérifié si cette épimérisation avait aussi lieu sur support solide en présence de DBU.

### XII.2.3. Contrôle de l'épimérisation

Pour ce faire, les dipeptides Ac-Met-(S)-Phe-NH $_2$  et Ac-Met-(R)-Phe-NH $_2$  ont été synthétisés sur support solide (résine Rink amide AM PS) puis mis en jeu dans la réaction de cyclisation. Les composés Ac-Agl-Phe-NH $_2$  (**12**) et Ac-Agl-(R)-Phe-NH $_2$  (**13**) ont été analysés par HPLC et LC/MS.

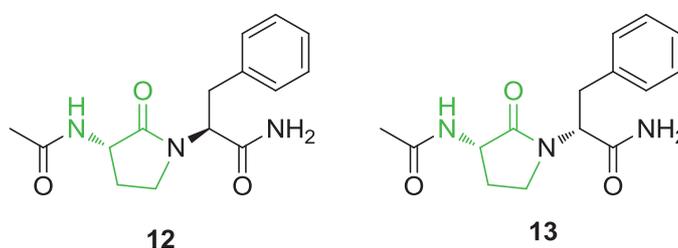


Figure 84 : Composés Ac-Agl-(S)-Phe-NH $_2$  (**12**) et Ac-Agl-(R)-Phe-NH $_2$  (**13**) utilisés pour le contrôle de l'épimérisation.

Les chromatogrammes HPLC des composés injectés séparément et co-injectés sont représentés ci-dessous. Les deux diastéréoisomères **12** et **13** sont suffisamment séparés (Figure 85, **C**) pour ne pas nécessiter une analyse sur colonne chirale ou une étude par RMN. Il n'apparaît pas de produit qui correspondrait à un épimère, que ce soit pour le composé **12** (Figure 85, **A**) ou pour le composé **13** (Figure 85, **B**). Nous pouvons donc confirmer l'absence d'épimérisation lors de la synthèse sur un support solide de type Rink amide.

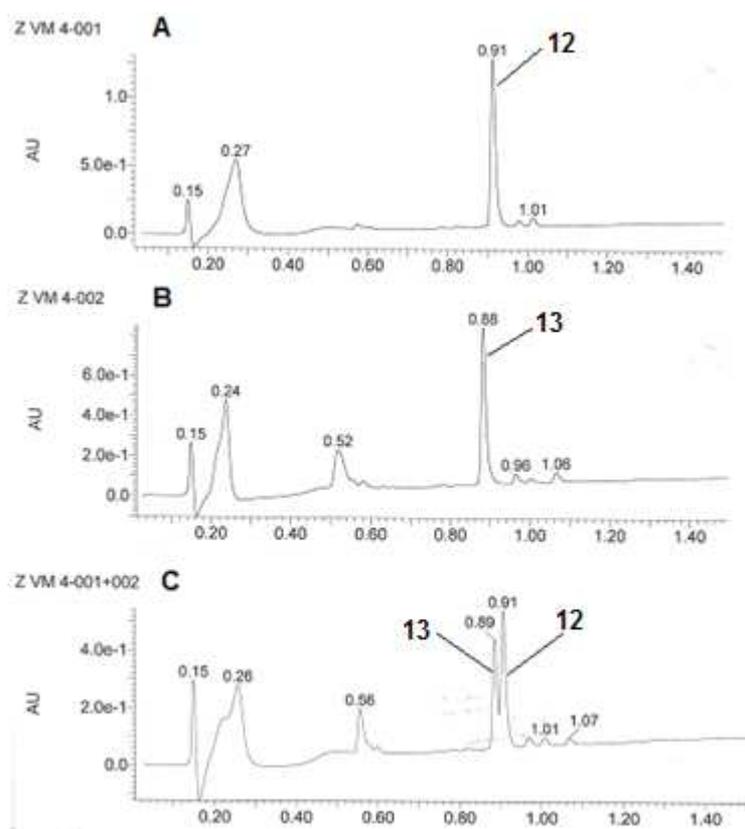


Figure 85 : Chromatogrammes des épimères : A) composé 12, B) composé 13 et C) composés 12 et 13 co-injectés.

Les études structurales des oligomères ont nécessité la préparation d'oligomères portant une fonction acide en position C-terminale (paragraphe XII.3.2). La synthèse de ces composés a été réalisée sur une résine acide de type chlorure de 2-chlorotriptyle et nous avons constaté l'apparition d'un second composé après l'étape de multicyclisation. Nous avons supposé que ce composé de même masse pouvait correspondre, d'après les résultats décrits antérieurement par Freidinger<sup>29</sup>, au diastéréoisomère épimérisé au niveau du résidu phénylalanine en position C-terminale (c'est-à-dire le résidu porté par la résine). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons synthétisé sur résine chlorure de 2-Chlorotriptyle les composés **14** et **15**, composés acides, analogues aux composés **12** et **13**.

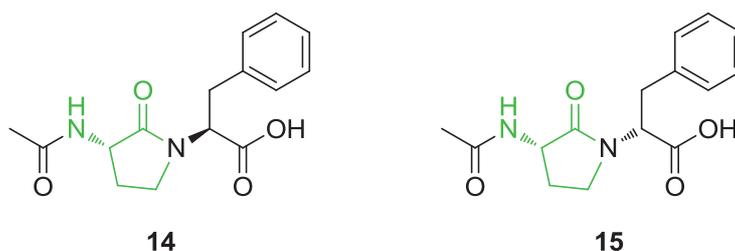


Figure 86: Composés Ac-Agl-Phe-OH (**14**) et Ac-Agl-(R)Phe-OH (**15**) utilisés pour le contrôle de l'épimérisation.

Comme pour l'étude précédente, les composés **14** et **15** obtenus après cyclisation ont été clivés et analysés par HPLC et LC/MS. Contrairement aux composés **12** et **13**, les chromatogrammes obtenus sur colonne C<sub>18</sub> phase inverse non-chirale n'ont pas permis de déterminer avec certitude l'absence d'épimérisation puisqu'aucune séparation des diastéréoisomères éventuellement présents n'a été observée. Nous avons donc injecté le composé **14** sur colonne chirale OD-RH en utilisant un gradient isocratique à 30% d'acétonitrile (ACN) 0,1% de TFA pendant 30 min.

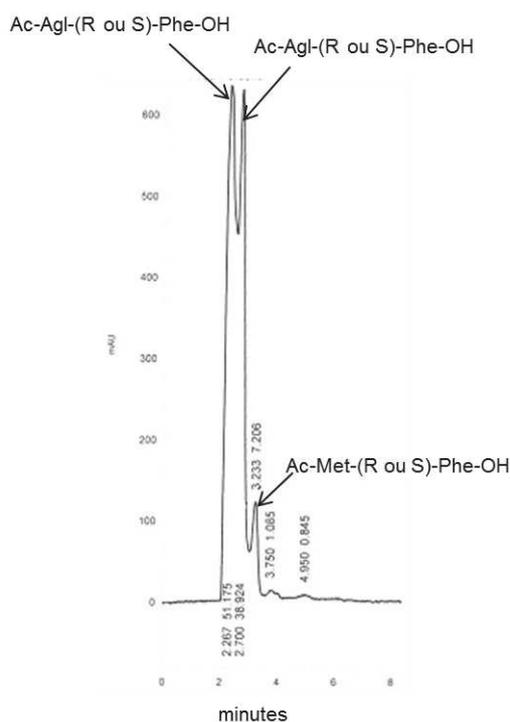


Figure 87 : Chromatogramme entre 0 et 8 min du composé **14**.

Bien que la séparation obtenue après optimisation soit médiocre, nous observons par exemple pour le composé **14** deux pics d'intensité voisine qui correspondent au mélange des deux composés diastéréoisomères. Contrairement à la synthèse des dipeptides amides, on observe une épimérisation importante du C $\alpha$  de la Phe sur le composé **14**. Si une épimérisation de l'ordre de 12 à 15% a été observée en solution par Freidinger, la synthèse du  $\gamma$ -lactame ancré via une liaison ester sur la résine entraîne une plus forte épimérisation. Des études sont actuellement en cours au sein de notre équipe afin de déterminer si cette épimérisation est limitée au résidu Phe ou si d'autres résidus sont susceptibles de subir cette réaction secondaire. En fonction des résultats de cette étude, des conditions différentes devront être mises au point pour la préparation d'oligomères d'Agl-AA sur résine acide.

Cette voie de synthèse permet l'obtention du monomère Agl-Phe sans épimérisation lorsqu'elle est effectuée sur une résine Rink amide. Elle a donc ensuite été appliquée à la synthèse d'oligomères de longueur plus importante à l'exception d'un composé acide libre, synthétisé pour les mesures de diffraction aux RX, qui a été purifié par HPLC semi-préparative.

Pour la synthèse des oligomères, les conditions réactionnelles ont été adaptées. Les réactions de méthylation et de multicyclisation sur ces oligomères plus longs ont nécessité 48H et 10 équivalents de DBU ont dû être utilisés (Schéma 10).

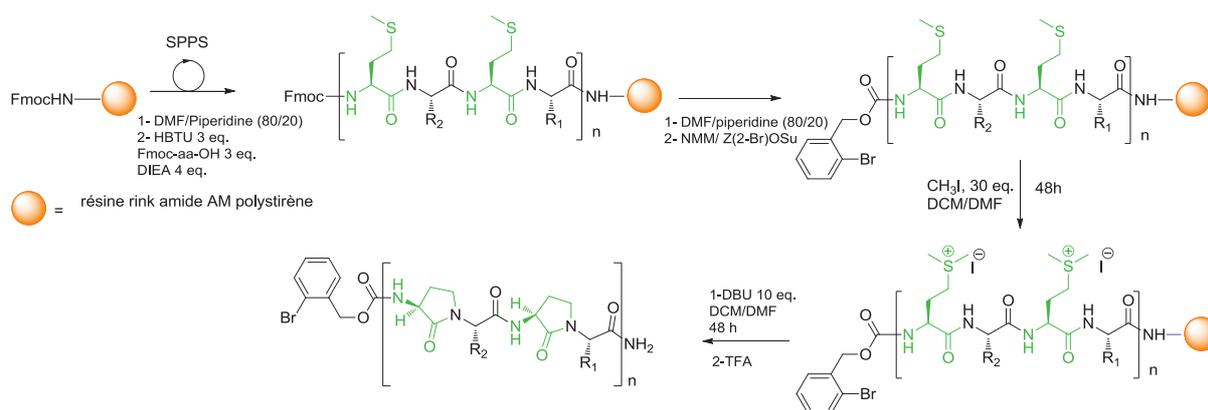


Schéma 10 : Stratégie de synthèse des poly(Agl-AA) sur support solide.

Après avoir mis au point et optimisé cette voie de synthèse originale, j'ai synthétisé plusieurs séries d'oligomères de différentes longueurs (du dimère à l'hexamère) avec des rendements allant de 5 à 45%. Lors de la synthèse des oligomères les plus longs, il peut arriver qu'un des sels de sulfonium se déméthyle et nécessite une seconde multicyclisation (méthylation et cyclisation intramoléculaire). Ces oligomères ont ensuite été analysés par différentes méthodes d'analyses structurales.

### XII.3. Analyses structurales d'oligomères d'Agl-AA aromatiques

Dans un premier temps, nous avons voulu étudier deux paramètres, d'une part, la structuration des oligomères dans des solvants organiques et d'autre part, l'influence de la configuration du  $\gamma$ -lactame sur sa structure. Pour se faire, j'ai synthétisé deux séries d'oligomères : une série homochirale, incorporant un (S)- $\gamma$ -lactame et la (S)-phénylalanine et une série hétérochirale incorporant un (R)- $\gamma$ -lactame et la (S)-phénylalanine. Tous les oligomères ont été protégés en position N-terminale par un groupe 2-BrZ.

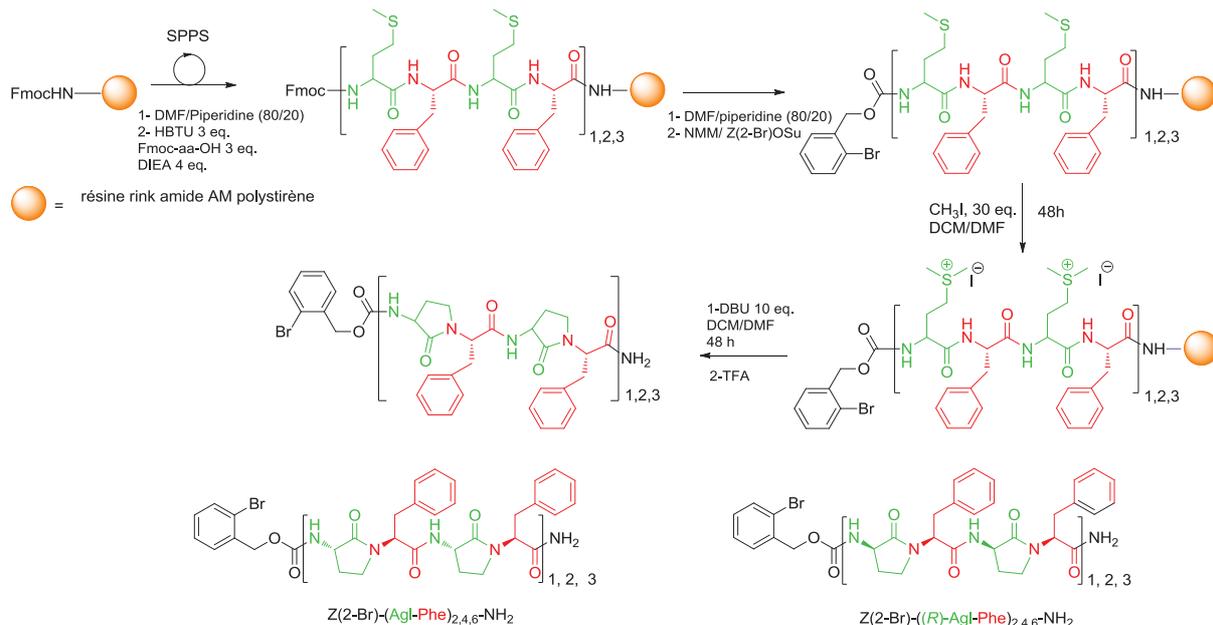


Schéma 11 : Synthèse des oligomères AgI-AA aromatiques.

Chaque oligomère a été synthétisé à partir du peptide correspondant protégé par un groupe 2-BrZ et alternant des résidus (S)- ou (R)-Met et des résidus (S)-Phe. Le dimère, le tétramère et l'hexamère de chaque série ont été obtenus avec des rendements allant de 10 à 40% et sont résumés dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Oligomères homo et hétérochiraux de AgI-Phe.

Composé N°	séquence
16	2-BrZ-(Agl-Phe) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>
17	2-BrZ-(Agl-Phe) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>
18	2-BrZ-(Agl-Phe) <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
19	2-BrZ-((R)-Agl-Phe) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>
20	2-BrZ-((R)-Agl-Phe) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>
21	2-BrZ-((R)-Agl-Phe) <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>

Ces composés ont ensuite été analysés par différentes méthodes d'analyses spectroscopiques. Nous avons débuté par des analyses par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) qui permettent de vérifier rapidement si les composés homochiraux et hétérochiraux sont capables de former des liaisons hydrogène.

### XII.3.1. Analyses par spectromètre infrarouge à transformée de Fourier

Les expériences ont été réalisées en solution dans des cellules liquide de volume 700  $\mu\text{L}$  munies de fenêtres en NaCl de 3 mm d'épaisseur avec des entretoises en téflon de 500 microns d'épaisseur. Les spectres obtenus pour les six composés sont présentés ci-dessous

dans les régions des vibrations des amides A entre 3500 et 3200  $\text{cm}^{-1}$  et celle des amides I et II entre 1800 et 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Dans un premier temps, nous avons comparé les deux séries l'une à l'autre dans ces deux régions afin d'évaluer l'influence de la configuration du  $\gamma$ -lactame sur l'établissement des liaisons hydrogène. Dans un second temps, nous avons étudié chaque composé d'une même série pour déterminer l'influence de la longueur de l'oligomère sur sa structuration.

### XII.3.1.a. Comparaison dans la région des bandes amides A

Les composés **16**, **17** et **18** montrent 2 bandes bien résolues dans la région des amides A : une commune à tous à 3471  $\text{cm}^{-1}$  et une inférieure à 3400  $\text{cm}^{-1}$  et dont la fréquence de vibration baisse avec la longueur de l'oligomère : 3340  $\text{cm}^{-1}$  pour le dimère **16**, 3318  $\text{cm}^{-1}$  pour le tétramère **17** et 3306  $\text{cm}^{-1}$  pour l'hexamère **18**. Cette bande suggère l'existence d'une interaction hydrogène qui se renforce avec la longueur de l'oligomère. En revanche, les oligomères hétérochiraux **19**, **20** et **21** montrent des signatures spectrales beaucoup plus larges qui suggèrent en première approximation un désordre local plus important que précédemment. On observe un continuum de signatures spectrales dans la région des amides A qui indique une dispersité de liaisons hydrogène importante

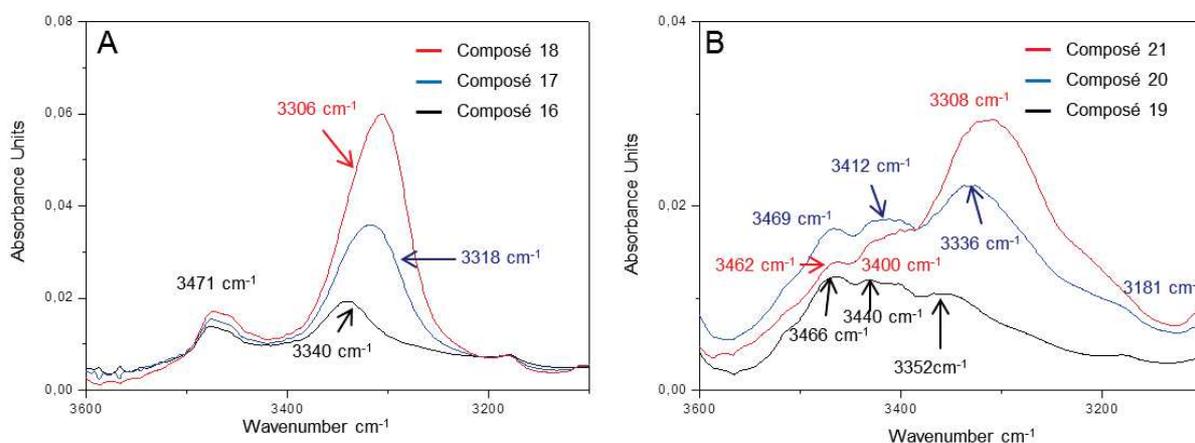


Figure 88 : Spectres IR-TF de la région des Amides A, enregistré dans le  $\text{CHCl}_3$ . A) Oligomères homochiraux dimère (noir), tétramère (bleu) et hexamère (rouge). B) Oligomères hétérochiraux dimère (noir), tétramère (bleu) et hexamère (rouge).

### XII.3.1.b. Comparaison dans la région des amides I et II

L'étude des signatures spectrales de ces différents composés dans la région des amides I et II semble confirmer les résultats obtenus lors de l'étude de la région des amides A. Les oligomères de la série homochirale présentent à nouveau deux bandes bien résolues dans la région des amides I et II. L'ensemble de ces signatures vibrationnelles, fonctionnant par deux dans les différents domaines sondés, suggèrent deux environnements distincts. Un

arrangement composé de groupements amides sans interactions par liaisons hydrogène intra ou intermoléculaires significatives et un environnement qui est composé d'interactions par liaisons hydrogène fortes et peu dispersées.

Dans la région des amides I et II, les signatures spectrales présentées par les composés hétérochiraux ont un comportement comparable à celles observées dans la région des amides A. La contribution amide I complexe est déplacée vers les hautes fréquences, avec un maximum autour  $1690\text{ cm}^{-1}$  suggérant des systèmes plus désordonnés et moins liés par liaisons hydrogène que le groupe de composés homochiraux. Le comportement de la bande amide II à  $1520\text{ cm}^{-1}$  (amollissement vers les basses fréquences et élargissement) soutient la même explication. En revanche, le dimère et le tétramère hétérochiral **19** et **20** ne présentent qu'une bande large de CO non lié à  $1692\text{ cm}^{-1}$  et  $1686\text{ cm}^{-1}$  respectivement. L'hexamère **21** quant à lui présente un épaulement caractéristique de CO non lié à  $1696\text{ cm}^{-1}$  et une bande de CO lié à  $1673\text{ cm}^{-1}$ .

Ces résultats indiquent une structuration plus importante pour des oligomères AgIPhe homochiraux que pour les oligomères hétérochiraux.

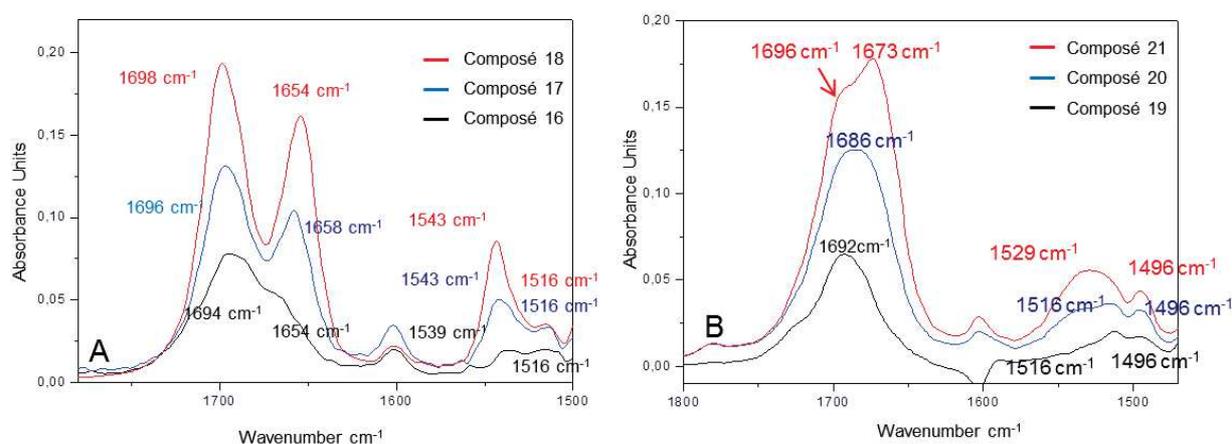


Figure 89 : Spectres IR-TF dans la région des Amides I et II enregistrés dans le  $\text{CHCl}_3$ . A) Oligomères homochiraux dimère (noir), tétramère (bleu) et hexamère (rouge). B) Oligomères hétérochiraux dimère (noir), tétramère (bleu) et hexamère (rouge).

### XII.3.1.b.1. Etude des oligomères homochiraux

Lorsque nous comparons les trois oligomères, des différences significatives apparaissent à la fois au niveau des intensités relatives des bandes et au niveau des positions. Ainsi, quand le nombre de motifs dans les oligomères augmente (de **16** à **18**), on observe plusieurs choses : (1) un déplacement des vibrations amides A et amide I liés vers les basses fréquences ( $3340, 3318, 3307\text{ cm}^{-1}$  /  $1667, 1657, 1654\text{ cm}^{-1}$ ) (2) une

augmentation de l'intensité relative des vibrations amide I liés par rapport aux amides I libres (idem pour les amide A liés versus amide A libres) ; (3) une augmentation spectaculaire de l'intensité des vibrations amide II liés à haute fréquence.

L'ensemble de ces résultats concernant l'évolution des fréquences moyennes suggère un renforcement moyen des interactions par liaisons hydrogène lorsqu'on augmente le nombre de motifs le long de la chaîne peptidique. Concernant la variation d'intensité relative des vibrations des amides libres par rapport aux amides liées, ce comportement suggère que le nombre de groupements amides liés relativement aux amides libres augmente lorsque le nombre de motifs augmentent.

Ainsi, l'ajout de motif le long de la chaîne peptidique augmente donc la stabilité de la structure.

Si on regarde plus en détails, dans la région des liaisons amide I, l'oligomère le plus court montre une bande à  $1698\text{ cm}^{-1}$  et un épaulement à  $1653\text{ cm}^{-1}$ . Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus dans la région des amides A et laissent supposer une implication plus faible de la liaison C=O (composante  $\nu\text{C=O}$  très impliquée dans l'amide I) dans des liaisons hydrogène. En revanche, les oligomères plus longs montrent deux bandes distinctes et étroites situées à  $1698\text{ cm}^{-1}$  et  $1653\text{ cm}^{-1}$ . L'intensité des bandes amide I augmente de manière proportionnelle à l'ajout de motifs dans la séquence de l'oligomère mais la proportion relative entre les bandes des amides I liées et non liées ne change pas. Ces résultats sont cohérents, chaque motif comporte deux fonctions carbonyles pouvant former des liaisons hydrogènes, mais seulement une fonction amide comportant un proton libre, l'autre formant le lactame. Aussi lors de l'ajout d'un motif, deux fonctions carbonyles sont ajoutées mais une seule fonction amide portant un proton susceptible de former une liaison hydrogène. Ainsi, un groupement carbonyle sur deux se retrouve impliqué dans une liaison hydrogène avec l'unique proton amide libre.

#### *XII.3.1.b.2. Etude des oligomères hétérochiraux*

En revanche, les spectres IR des composés **19**, **20** et **21** montrent dans la région des amides A un massif large composé d'au minimum trois composantes : deux au-dessus de  $3400\text{ cm}^{-1}$  ( $3475$  et  $3415\text{ cm}^{-1}$ ) caractéristiques de protons amide faiblement liés ou non liés et une, d'intensité similaire, inférieure à  $3340\text{ cm}^{-1}$  caractéristique des protons amides liés. Cette bande augmente avec le nombre de résidus inclus dans la séquence mais de manière moins notable que pour les homo-oligomères. De plus, l'apparition d'une seconde bande correspondant à des protons amides faiblement liés ( $3415\text{ cm}^{-1}$ ) supporte l'absence de

structuration (ou une plus faible structuration) des oligomères hétérochiraux par rapport aux composés homochiraux.

Cette hypothèse est renforcée par le comportement des bandes amide I où une structure plus ou moins complexe, déplacée vers les hautes fréquences (aux alentours de  $1680\text{ cm}^{-1}$ ) par rapport aux composés homochiraux (aux alentours de  $1655\text{ cm}^{-1}$ ), est observée.

Ces analyses mettent en évidence la présence de liaisons hydrogène dans les oligomères homochiraux suggérant leur capacité à adopter des structures secondaires ordonnées. Elles montrent également l'importance de la configuration du C $\alpha$  du  $\gamma$ -lactame pour la structuration des oligomères. En effet, les indicateurs IR semblent défavorables à la présence d'une structure ordonnée dans les oligomères hétérochiraux.

Par la suite, des analyses par diffraction des rayons X ont été menées sur les oligomères homochiraux afin de déterminer leur structure à l'état solide.

### **XII.3.2. La diffraction des rayons X**

Les spectres IR ont montré la faculté des oligomères d'Agl-Phe à établir des liaisons hydrogène et, par conséquent, à adopter des structures bien définies. Nous avons donc effectué des essais de cristallisation et en parallèle fait une étude en solution de ces composés par RMN.

#### ***XII.3.2.a. Synthèse de composé pour l'étude cristallographique des poly(Agl-AA)***

Dans un premier temps, nous avons essayé d'obtenir des cristaux à partir des composés **16** à **18**, sans succès. La cristallisation à partir d'un mélange n'ayant pas été concluante lors des études sur les DBT, nous avons appliqué une autre stratégie pour l'obtention de cristaux en employant d'autres groupements protecteurs. En effet, le type de groupements situés en position N et C-terminale peut avoir une influence sur la cristallisation du composé. Nous avons donc remplacé les groupements 2-BrZ et NH<sub>2</sub> utilisés jusqu'à présent par des groupements Boc en position N-terminale et benzyloxy (OBn) en position C-terminale. Ces groupements ont été employés par l'équipe de S. Gelmann pour obtenir des cristaux lors de l'étude de foldamères. Ce changement de groupement protecteur m'a obligé à employer une résine permettant l'obtention d'oligomères avec un groupement acide en position C-terminal. Comme je l'ai décrit plus tôt, ce type de résine entraîne une épimérisation importante du premier résidu greffé. Cependant, la séparation d'un diastéréoisomère étant possible, j'ai malgré tout procédé à cette synthèse afin d'obtenir le composé Boc-(Agl-Phe)<sub>4</sub>-OBn (composé **23**).

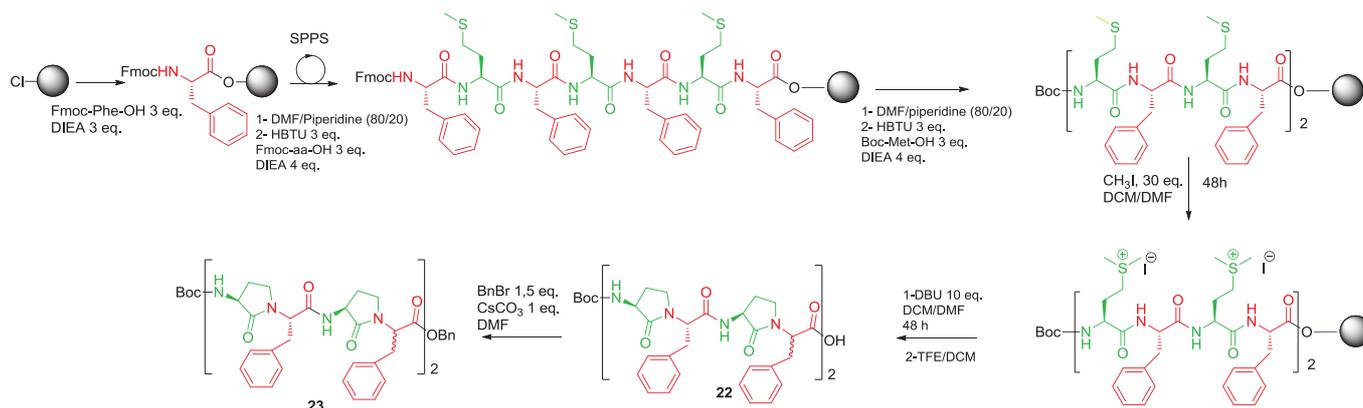
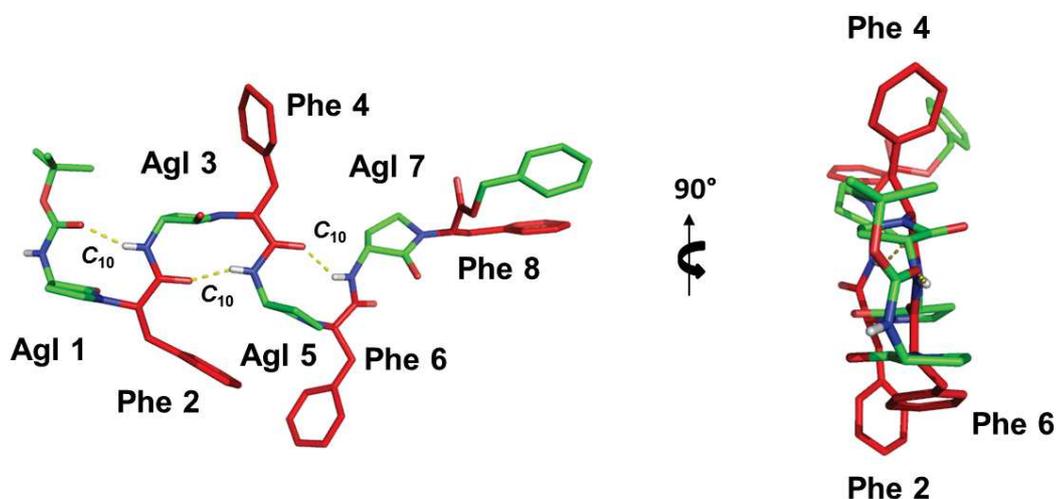


Schéma 12 : Synthèse du composé 23.

Le peptide est donc synthétisé sur résine chlorure de 2-Chlorotriptyle et la Boc-Met-OH est incorporée comme dernier résidu. Le peptide est ensuite mis en jeu dans les étapes de méthylation et multicyclisation avant d'être clivé en présence d'un mélange trifluoroéthanol/DCM (4/7) afin de conserver le groupement Boc intact. Cette synthèse a effectivement entraîné l'épimérisation du C $\alpha$  de la Phe côté C-terminal et l'obtention de deux diastéréoisomères. Ces deux composés ne sont cependant pas séparés et sont protégés par le groupement benzyloxy en solution. Ils sont ensuite séparés par HPLC semi-préparative et ont permis d'obtenir des monocristaux adaptés à la diffraction par RX. Grâce à ces cristaux, la structure du composé **23** à l'état solide a pu être déterminée (Figure 90 ci-dessous).

### XII.3.2.b. Etude de la structure à l'état solide du Boc-(Agl-Phe)<sub>4</sub>-OBn

Le tétramère d'Agl-Phe adopte une structure en ruban à l'état solide, avec une succession de coudes stabilisés par des liaisons hydrogène entre le groupement carbonyle du résidu *i* et le proton amide du résidu *i*+3 qui forme des pseudocycles C<sub>10</sub> (Figure 90).


 Figure 90 : Structure cristalline de l'oligomère d'(Agl-Phe)<sub>4</sub>.

Cette structure est très proche de celle adoptée par les oligomères de DBT. Les angles de torsion  $\phi$ ,  $\psi$  et  $\omega$  du squelette du composé **23** sont donnés dans le tableau 9. Si on omet le dernier résidu, les valeurs moyennes des angles de torsion  $\phi$  et  $\psi$  pour le cycle  $\gamma$ -lactame et pour la Phe sont respectivement de  $51,6^\circ$  et  $-134^\circ$ ,  $-84,5^\circ$  et  $10^\circ$ . A l'exception de la Phe 8, les carbonyles des Phe sont tous impliqués dans des liaisons hydrogène dans l'axe du ruban tandis que ceux des  $\gamma$ -lactames sont exposés perpendiculairement, alternativement de part et d'autre du ruban. Cet oligomère répartit de manière stable, définie et prédictible les chaînes latérales des phénylalanines sur les deux faces du ruban.

Tableau 22 : Angles de torsion  $\Phi$ ,  $\Psi$  et  $\omega$  du composé **23**.

Résidus	$\phi$	$\psi$	$\omega$
<b>Agl.1</b>	59.0	-131.0	179.5
<b>Phe.2</b>	-86.5	6.2	163.3
<b>Agl.3</b>	48.8	-127.4	177.9
<b>Phe.4</b>	-81.0	19.0	-172.8
<b>Agl.5</b>	51.7	-131.7	173.0
<b>Phe.6</b>	-85.9	6.2	-174.6
<b>Agl.7</b>	46.8	-146.0	-168.3
<b>(D)Phe.8</b>	96.3	-100.6	-

Les angles dièdres des coudes formés par le dipeptide Agl-Phe varient peu le long de la séquence et sont très proches des valeurs usuelles des coudes de type  $\beta$  II'. Le résidu Phe 8 a une stéréochimie D et l'extrémité benzyloxy n'a pas de donneur de liaison hydrogène pour stabiliser un quatrième coude, ce qui explique la conformation différente de l'extrémité C-terminale. Les analyses des oligomères **16**, **17** et **18** en solution par RMN ont été entreprises.

### XII.3.3. Analyses RMN

Les spectres IRTF ont permis de montrer la présence de liaisons hydrogène intramoléculaires des oligomères d'Agl-AA et leur propension à s'organiser en solution. Nous avons obtenu une structure cristalline qui montre que ces composés adoptent, en effet, une structure en ruban similaire à celle obtenue pour le dimère de DBT. Par conséquent, nous

avons ensuite vérifié par RMN et CD que ces structures étaient stables en solution. Nous avons enregistré des spectres RMN dans la pyridine- $d_5$  et dans le méthanol- $d_3$ , à 298 K en général (Figure 91).

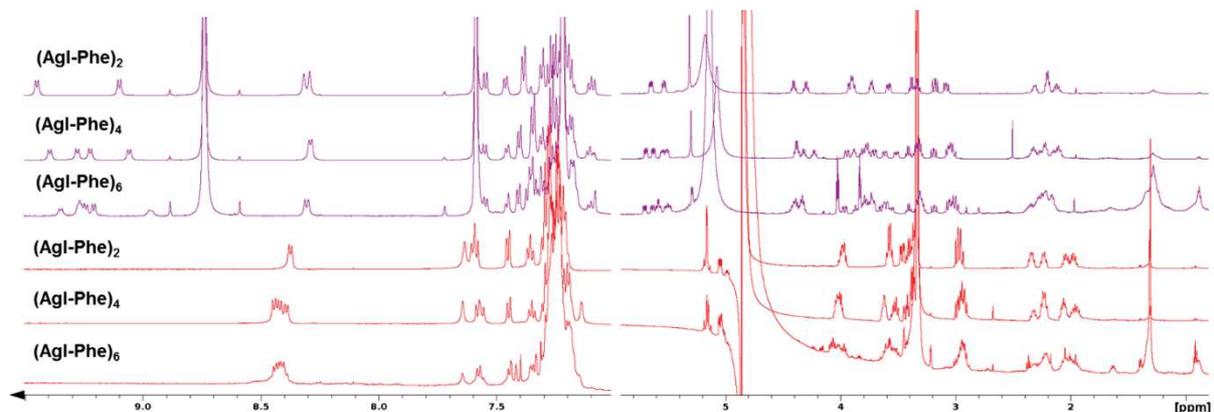


Figure 91 : Spectres 1H des homo-oligomères d'AgI-Phe dans la pyridine- $d_5$  (en violet) et dans le méthanol- $d_3$  (en rouge).

La pyridine- $d_5$  a été utilisée dans un premier temps car c'est un bon solvant pour de nombreux composés. En effet, elle induit un éclatement des résonances important comme on peut l'observer sur les spectres de la Figure 91. Par comparaison, les signaux dans le méthanol sont beaucoup moins dispersés et l'attribution est plus complexe, surtout pour les séquences les plus longues. Ainsi, les résonances de l'(AgI-Phe) $_6$  n'ont pas pu être déterminée dans le méthanol.

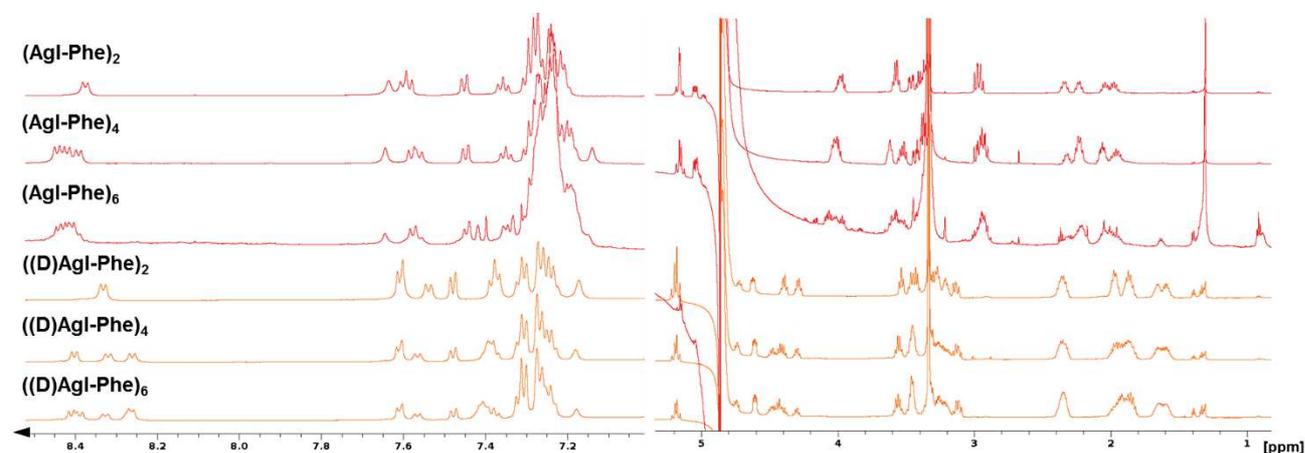


Figure 92 : Comparaison des spectres 1H des homo- (en rouge) et des hétéro-oligomères d'AgI-Phe (en orange) dans le méthanol- $d_3$ .

De façon surprenante, on observe sur la Figure 92 que les spectres des hétéro-oligomères (en orange) ont des signaux plus éclatés que les homo-oligomères (en rouge) dans le méthanol.

De par la dispersion importante dans la pyridine deutérée, nous avons tout d'abord effectué des études RMN des tétramères (*S*)-Agl-Phe et (*R*)-Agl-Phe plus complète dans ce solvant. Nous avons attribué les déplacements chimiques  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  et effectué l'attribution stéréospécifique des méthylènes des cycles  $\gamma$ -lactames.

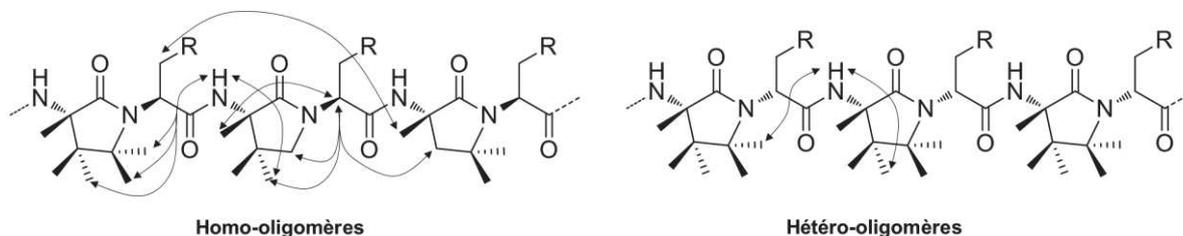


Figure 93 : Corrélations NOE détectées le long des séquences des oligomères d'Agl-Phe.

Il existe des différences notables sur les spectres ROESY des deux diastéréoisomères. On détecte peu de NOE sur les spectres des hétéro-oligomères contrairement aux spectres des homo-oligomères où l'on observe de nombreuses corrélations entre résidus successifs mais également entre les résidus  $i$  et  $i+2$ . Par conséquent, il est probable que les séquences (*R*)-Agl-Phe n'adoptent pas de structure stable contrairement aux séquences (*S*)-Agl-Phe. Nous avons ensuite déterminé la structure des homo-oligomères en introduisant des contraintes de distances dérivées de l'intensité des pics NOE dans la suite de logiciels AMBER 11<sup>38</sup>. Les 20 structures de plus basses énergies compatibles avec les contraintes extraites des spectres ROESY sont présentées dans la Figure 94, ci-dessous.

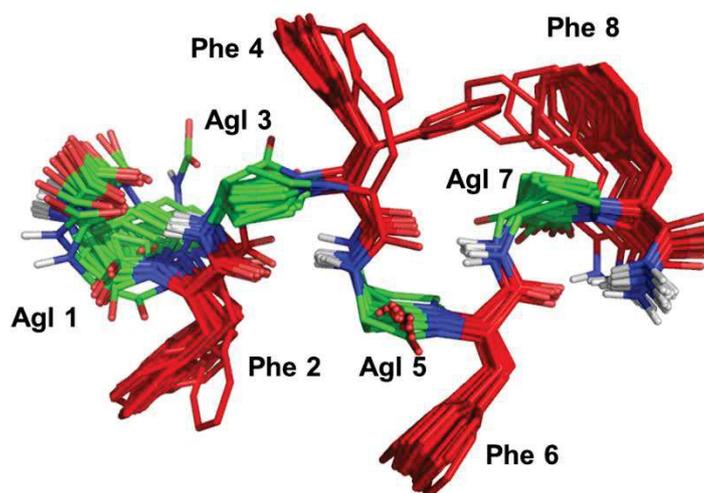


Figure 94 : Superposition des 20 structures de plus basse énergie obtenues par modélisation sous contraintes RMN du composé 17 dans la pyridine  $d^5$ .

Cet oligomère adopte en solution une structure similaire à celle obtenue à l'état solide. Nous observons le même set de NOE caractéristique pour tous les homo-oligomères d'Agl-Phe dans la pyridine- $d_5$  et le méthanol- $d_3$ . Nous pouvons donc en conclure que les oligomères d'Agl-Phe adoptent une structure en ruban composée d'une succession de coude peu importe la taille des séquences en solution. Nous avons ensuite enregistré la signature dichroïque caractéristique de ce type de composés dans le méthanol et comparé ce spectre à celui d'oligomères incorporant d'autres types de chaînes latérales.

### XII.3.4. Etudes par dichroïsme circulaire

Les spectres CD des différents oligomères d'Agl-Phe ont été enregistrés dans le méthanol à différentes températures. Ces analyses ont été menées sur les composés **16** à **21**. Les composés homochiraux ont une signature dichroïque avec un minimum à 224 nm et un épaulement à 205 nm alors que les composés hétérochiraux ont une signature différente avec un minimum à 212 nm et un autre plus faible à 225 nm. Nous observons que les spectres n'évoluent pas avec la longueur des oligomères indiquant que la structure des homo-oligomères est déjà organisée en ruban dès le dimère d'Agl-Phe.

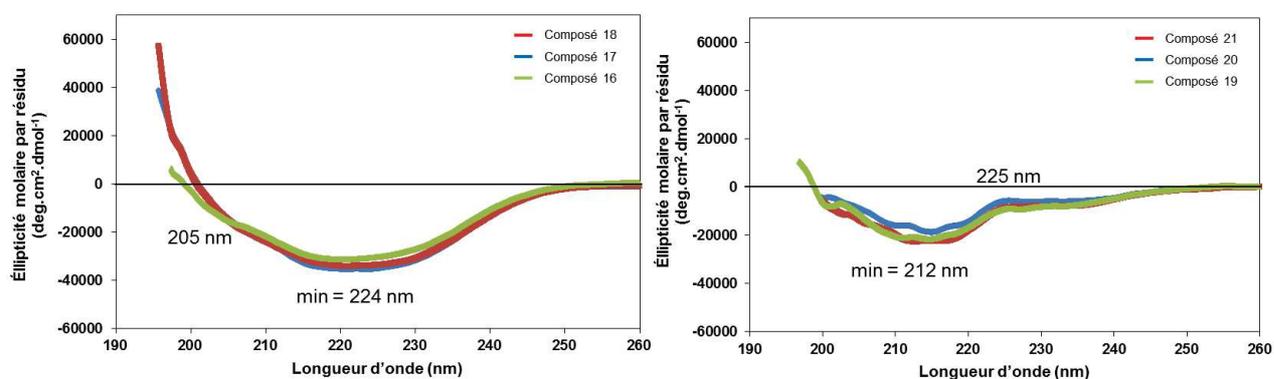


Figure 95 : Spectres dichroïques des oligomères 16 à 18 et 19 à 21 dans le MeOH à 20°C.

Nous avons précédemment démontré d'après les études IRTF et RMN que les homo-oligomères adoptent une structure bien définie par rapport aux hétéro-oligomères. Nous connaissons donc les signatures caractéristiques des oligomères d'Agl-AA quand ils sont structurés en ruban. Afin de concevoir des composés ayant des applications biologiques, il est nécessaire qu'ils soient solubles dans l'eau, nous avons par conséquent synthétisé par la suite des séquences hydrosolubles. Les spectres CD de ces composés ont dès lors été enregistrés dans le méthanol et comparés aux spectres mesurés pour les oligomères d'Agl-Phe.

## XII.4. Etudes structurales d'oligomères d'Agl-AA hydrosolubles

Dans la littérature, des séquences de CPP cationiques ou amphipatiques ont une capacité importante à traverser les membranes biologiques. Nous avons par conséquent synthétisé des oligomères amphipatiques et cationiques à partir d'arginine dans un premier temps. Nous avons vu précédemment que la structure des AgI-AA permet une répartition contrôlée des chaînes latérales de part et d'autre d'un ruban permettant de synthétiser de façon prédictive des composés amphipatiques. Néanmoins, à ce stade de notre étude, nous ne savons pas si cette structure est conservée lorsque d'autres chaînes latérales sont incorporées et si cette structure est stable dans un milieu aqueux.

Nous avons synthétisé 3 séries de composés : une série d'oligomères amphipatiques homochiraux alternant les chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes (Phe) et d'acide aminé cationique (Arg), une série d'oligomères amphipatiques hétérochiraux identiques mais avec des  $\gamma$ -lactames de configuration *R* et une série d'oligomères cationiques incorporant uniquement des résidus Arg.

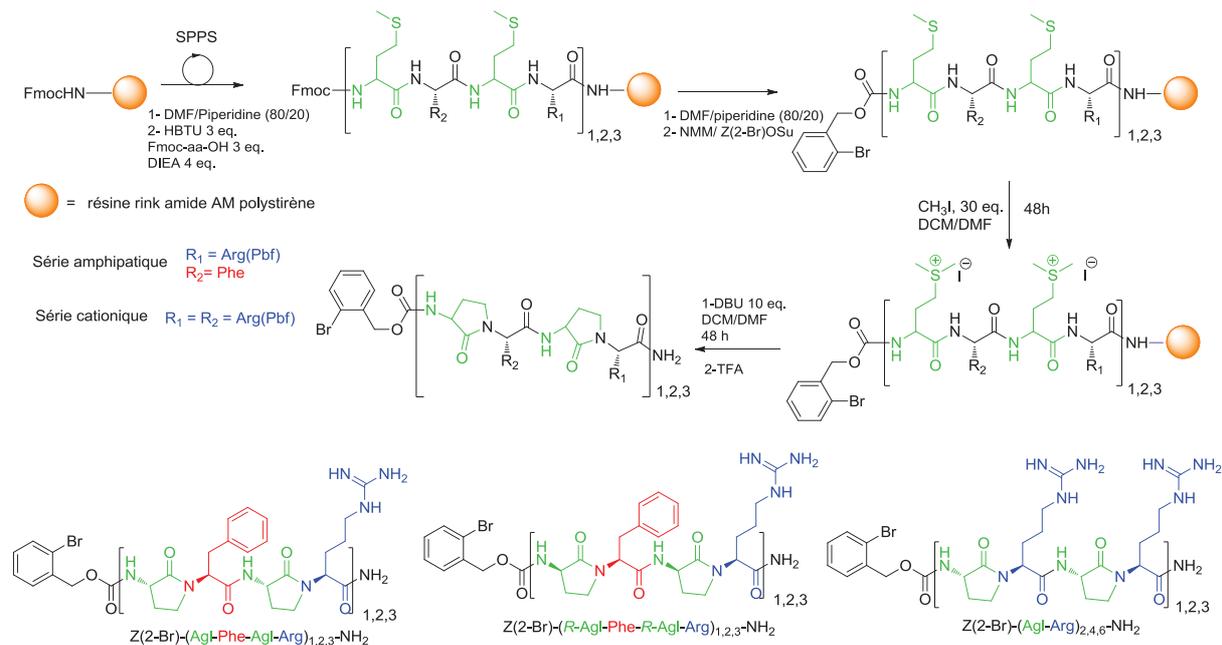


Schéma 13 : Synthèse des oligomères amphipatiques et cationiques.

Les oligomères AgI-AA (composés **24** à **32**) ont été synthétisés à partir des alternances Met-AA correspondantes. Ils sont protégés sur leur fonction N-terminale par un groupe 2-BrZ. Les rendements sont de 10 à 30%. Les séquences de tous les oligomères sont reportées dans le Tableau 23.

Tableau 23 : Séquences d'oligomères hydrosolubles.

Composé N°	Séquence	Composé N°	Séquence
24	2-BrZ-Agl-Phe-Agl-Arg-NH <sub>2</sub>	30	2-BrZ-(R)-Agl-Phe-D-Agl-Arg-NH <sub>2</sub>
25	2-BrZ-(Agl-Phe-Agl-Arg) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	31	2-BrZ-((R)-Agl-Phe-D-Agl-Arg) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>
26	2-BrZ-(Agl-Phe-Agl-Arg) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>	32	2-BrZ-((R)-Agl-Phe-D-Agl-Arg) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>
27	2-BrZ-(Agl-Arg) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>		
28	2-BrZ-(Agl-Arg) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>		
29	2-BrZ-(Agl-Arg) <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>		

Comme je l'ai expliqué précédemment, les analyses IRTF ne peuvent pas être effectuées dans l'eau ou le méthanol à cause du recouvrement entre les bandes d'absorption de ces solvants et les bandes d'intérêts générées par nos composés. Ces oligomères ne sont pas solubles dans le chloroforme. C'est pourquoi ces séries de composés ont uniquement été étudiées par CD et RMN.

#### XII.4.1. Analyses de dichroïsme circulaire des oligomères hydrosolubles

Avant d'effectuer les analyses dans l'eau, nous avons vérifié que les signatures des tétramères **25** et **28** sont identiques à celle du composé **17** (2-BrZ-((R)-Agl-Phe)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>) dans le méthanol. Nous avons donc enregistré leurs signatures dichroïques dans ce solvant à 20°C. Le spectre regroupant ces trois composés est représenté ci-dessous.

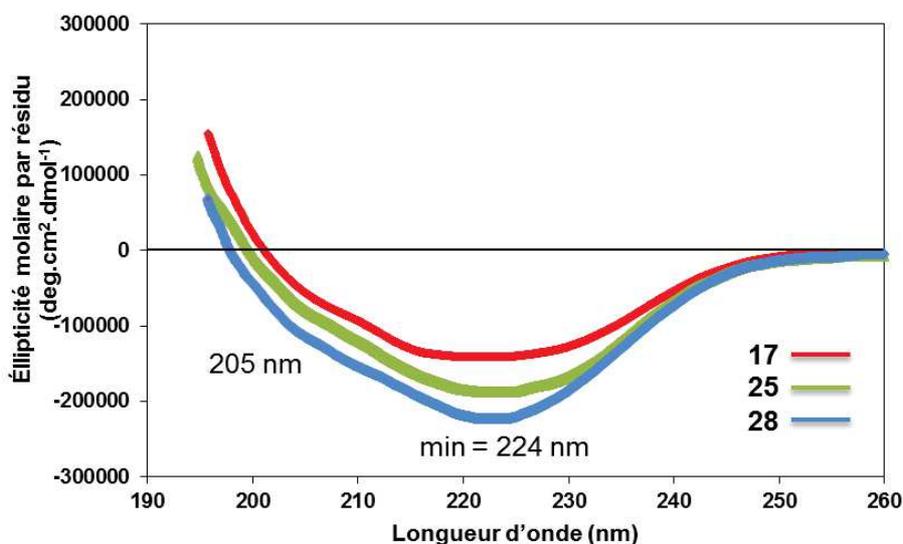


Figure 96 : Spectres dichroïques des composés 17, 25 et 28 dans le MeOH à 20°C.

Les trois oligomères ont une signature dichroïque très proche avec un minimum caractéristique à 224 nm et un léger épaulement à 205 nm dans le méthanol. Les oligomères d'Agl-Phe/Arg et d'Agl-Arg adoptent probablement une structure en ruban comme les Agl-Phe, cette hypothèse est actuellement vérifiée par RMN. Nous avons ensuite enregistré les spectres CD des composés hydrosolubles dans l'eau.

#### XII.4.1.a. Les composés amphipatiques homochiraux

La signature dichroïque des composés **24**, **25** et **26** a été mesurée dans l'eau, à pH 6,3 et à 20°C (Figure 97). Les oligomères possèdent des spectres CD similaires, avec un minimum à 220 nm et un maximum à 192 nm. Nous n'avons pas pu mettre en évidence ce maximum dans le méthanol car ce solvant absorbe beaucoup dans l'UV lointain (à partir de d'environ 196 nm). Nous observons que les signatures des composés sont semblables dans le méthanol et dans l'eau. Cette signature est la même que celles précédemment observées dans le méthanol pour les tétramères **17**, **25** et **28** et confirme la conservation de la structure dans l'eau.

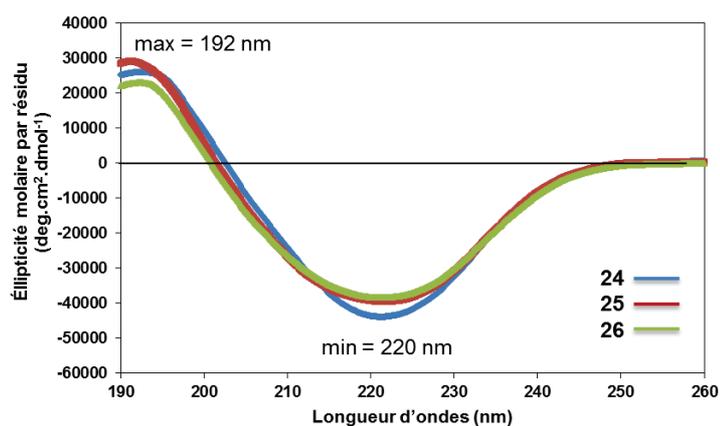


Figure 97 : Spectres dichroïques des composés amphipatique 24, 25 et 26 dans l'eau à 20°C.

#### XII.4.1.b. Les oligomères polycationiques

Les mesures pour les composés **27**, **28** et **29** ont été effectuées dans les mêmes conditions et montrent une signature et donc une conformation identique (Figure 98).

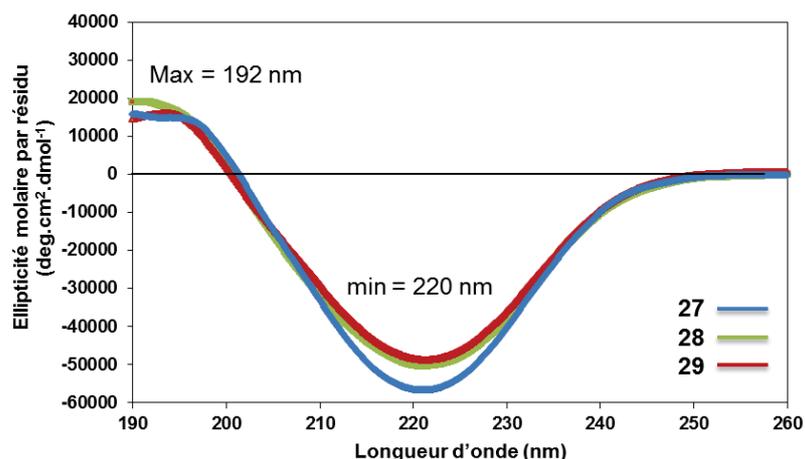


Figure 98 : Spectres dichroïques des composés polyArginine 27, 28 et 29 dans l'eau à 20°C.

Une seconde série d'expériences a ensuite été entreprise afin d'étudier la stabilité de la conformation des oligomères lors des changements de température.

#### XII.4.1.c. Etude de stabilité vis-à-vis de la température

Afin de vérifier la stabilité de cette conformation vis-à-vis de la température, les signatures des composés ont été mesurées à 20°C, 90°C puis à nouveau à 20°C. Les résultats pour les composés **25** et **28** sont représentés ci-dessous.

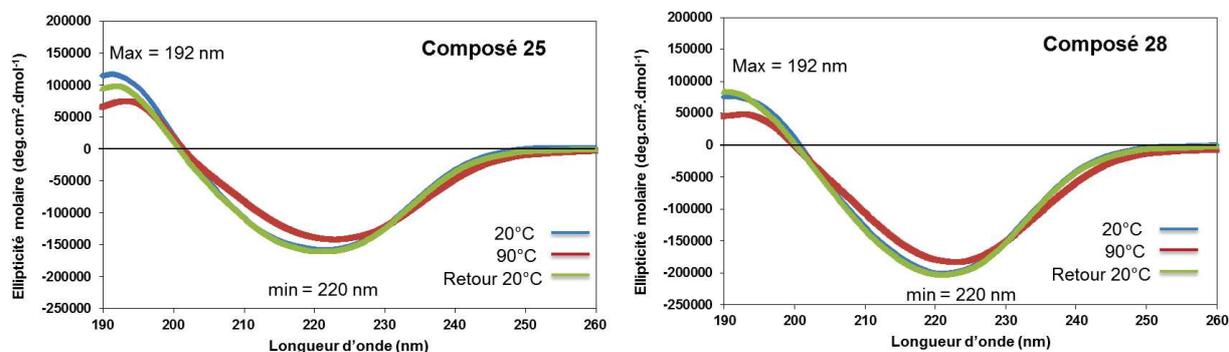


Figure 99 : Etude de stabilité en fonction de la température des composés 25 et 28 dans l'eau.

Les deux oligomères conservent une signature dichroïque identique que ce soit à 20 ou 90°C. L'augmentation de température ne modifie que sensiblement l'ellipticité molaire des composés avec un léger déplacement du minimum vers 222 nm, ce qui indique que la structure globale des oligomères reste en ruban même à haute température. On remarque que cette légère variation de spectre est complètement réversible lorsque l'on enregistre de nouveau un spectre à 20°C.

#### XII.4.1.d. Etude de dichroïsme circulaire des oligomères hétérochiraux

Nous avons démontré que les oligomères hétérochiraux n'adoptent pas de conformation stable dans les solvants organiques, et nous avons souhaité confirmer ces analyses dans l'eau. Les composés **30**, **31** et **32** ont donc été analysés dans des conditions identiques à celles employées pour les oligomères précédents. Leurs signatures dichroïques sont représentées ci-dessous.

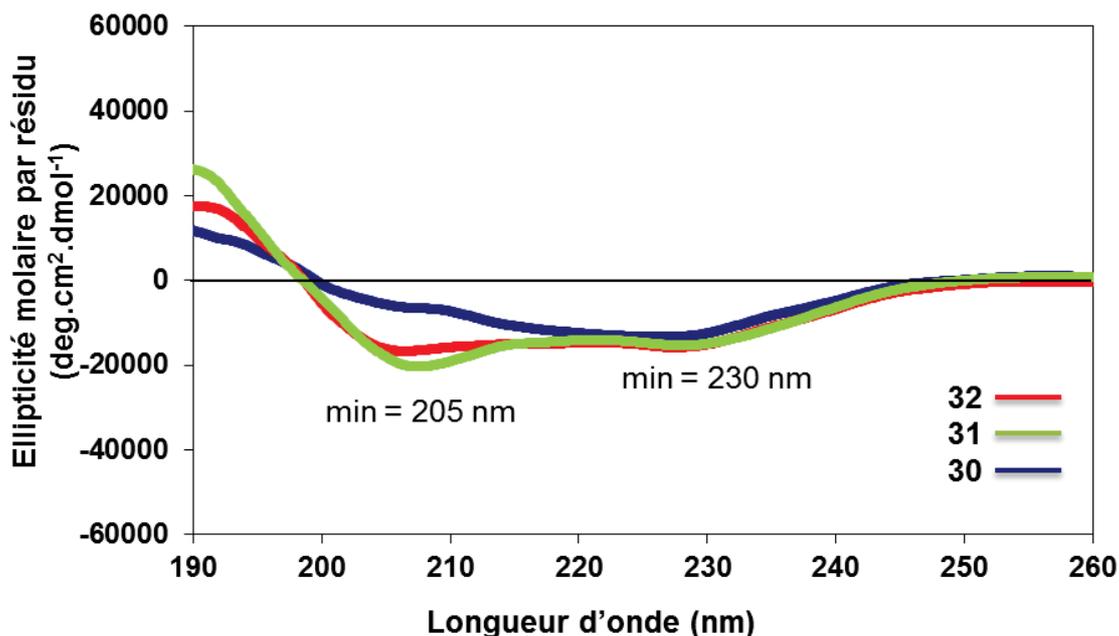


Figure 100 : Spectres dichroïque des oligomères 30 à 32 dans l'eau à 20°C.

Le dimère (composé **30**) présente une signature dichroïque avec un minimum à 230 nm tandis que les oligomères plus longs (composés **31** et **32**) présentent une signature dichroïque similaire avec deux minima à 205 nm et 230 nm. Ces signatures ressemblent à celles déjà observées dans le méthanol pour les séquences (*R*)-Agl-Phe, par conséquent les composés (*R*)-Agl-AA hydrosolubles n'adoptent pas de structures préférentielles dans l'eau.

#### XII.4.2. Conclusion

Les analyses par différentes spectroscopies nous ont permis de déterminer la structure des oligomères d' $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames en solution et à l'état solide. Ces oligomères se structurent en ruban de type coude  $\beta$  ( $\beta$  bend ribbon) stabilisé par des liaisons hydrogène entre le groupement carbonyle du résidu *i* et le proton amide du résidu *i*+3 formant un pseudo-cycle  $C_{10}$ . Les études sur les composés hétérochiraux indiquent l'importance de la configuration du  $C\alpha$  du  $\gamma$ -lactame pour la structuration de ces oligomères.

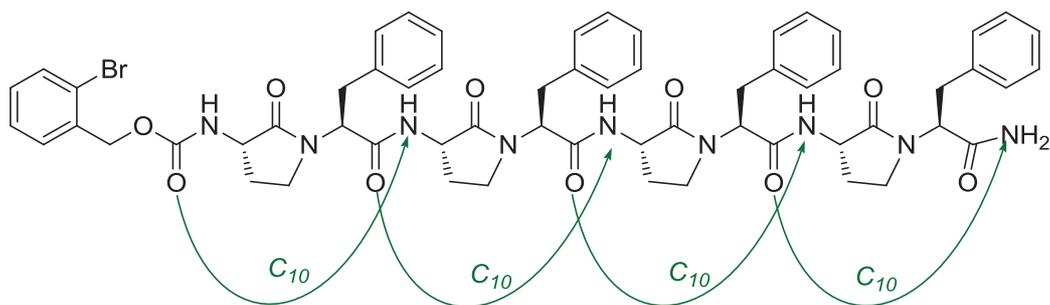


Figure 101 : Représentation des liaisons hydrogène stabilisant l'oligomère 17.

Chaque chaîne latérale est répartie de part et d'autre du squelette peptidique de manière stable et prédictible. La stratégie que j'ai développée au cours de ma thèse permet d'obtenir de manière aisée une nouvelle famille de foldamères hydrosolubles incorporant différentes chaînes latérales afin de moduler leurs propriétés.

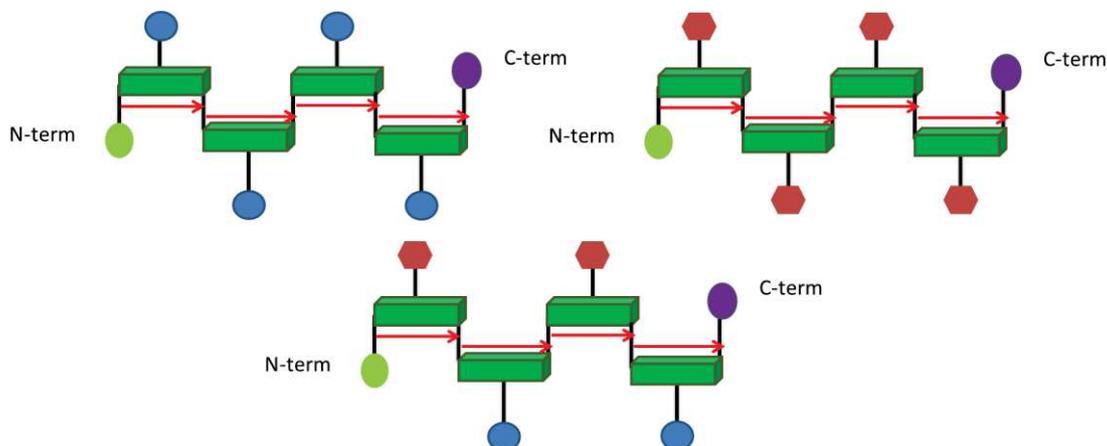


Figure 102 : Représentation schématique des oligo-AgI. Les chaînes latérales cationiques sont représentées par des ronds bleus et les chaînes latérales aromatiques par des hexagones rouges.

La seconde partie de mes travaux étant dédiée à la vectorisation intracellulaire de composés bioactifs, j'ai incorporé sur les différents oligomères d'AgI, hydrophobes, cationiques et amphipathiques, une sonde fluorescente afin d'étudier leur capacité à pénétrer dans les cellules. Cette étude est décrite dans le chapitre suivant.

## **XII.5. Conclusion générale des études structurales**

Une partie de mes travaux de thèse a permis de déterminer la structure d'oligomères de DBT et de poser les bases pour la conception et la synthèse des nouveaux oligomères de  $\gamma$ -lactames de Freidinger. Les différentes analyses par spectroscopies RMN, IRTF et CD ont montré que les oligomères de DBT sont effectivement capables d'adopter une structure en ruban et la cristallisation du dimère nous a permis d'obtenir d'importantes informations quant à sa structure à l'état solide. L'obtention de cristaux pour des oligomères plus longs reste un objectif que nous nous efforçons d'atteindre.

J'ai ensuite synthétisé de nouveaux oligomères constitués par une répétition itérative de coude  $\beta$ , comme dans le cas des oligo-DBT, mais beaucoup plus versatiles. Une stratégie de synthèse originale et directe a été développée. Cette stratégie est basée sur une modification post synthétique de peptides qui permet l'obtention de foldamères à partir d'une séquence peptidique naturelle par le biais d'une multicyclisation intramoléculaire sur support solide. Cette méthode bénéficie des avantages de la SPPS, elle ne nécessite pas la synthèse préalable de motifs monomériques en solution, ce qui la rend particulièrement attractive. Cependant, afin d'éviter l'épimérisation des oligomères acides, des conditions adaptées devront être mis au point.

La seconde partie de mes travaux a concerné l'étude biologique de nos oligomères, en particulier, leurs propriétés de pénétration intracellulaire et leur utilisation pour la délivrance intracellulaire d'un inhibiteur de la croissance de cellules cancéreuses. Les résultats sont présentés dans la partie suivante de ce manuscrit



- (1) Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239–254.
- (2) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- (3) Carpino, L. A.; Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748–5749.
- (4) Carpino, L. A.; Shroff, H.; Triolo, S. A.; Mansour, E.-S. M. E.; Wenschuh, H.; Albericio, F. The 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-Sulfonyl Group (Pbf) as Arginine Side Chain Protectant. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7829–7832.
- (5) White, P. Peptides: Chemistry and Biology. Ed. Smith J.A.; Rivier, J.E. ESCOM, Leiden, 1992, 537.
- (6) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602.
- (7) Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. Reactifs de Couplage Peptidique I (1) - L'hexafluorophosphate de Benzotriazolyl N-Oxytrisdiméthylamino Phosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1219–1222.
- (8) Coste, J.; Frerot, E.; Jouin, P. Coupling N-Methylated Amino Acids Using PyBroP and PyCloP Halogenophosphonium Salts: Mechanism and Fields of Application. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2437–2446.
- (9) Abdelmoty, I.; Albericio, F.; Carpino, L. A.; Foxman, B. M.; Kates, S. A. Structural Studies of Reagents for Peptide Bond Formation: Crystal and Molecular Structures of HBTU and HATU. *Lett. Pept. Sci.* **1994**, *1*, 57–67.
- (10) Story, S. C.; Aldrich, J. V. Side-Product Formation during Cyclization with HBTU on a Solid Support. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 292–296.
- (11) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
- (12) Hancock, W. S.; Battersby, J. E. A New Micro-Test for the Detection of Incomplete Coupling Reactions in Solid-Phase Peptide Synthesis Using 2,4,6-Trinitrobenzene-Sulphonic Acid. *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 260–264.
- (13) Byler, D. M.; Susi, H. Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra. *Biopolymers* **1986**, *25*, 469–487.
- (14) Vass, E.; Hollósi, M.; Besson, F.; Buchet, R. Vibrational Spectroscopic Detection of Beta- and Gamma-Turns in Synthetic and Natural Peptides and Proteins. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1917–1954.
- (15) Hill, D. J.; Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S. A Field Guide to Foldamers. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3893–4012.

- (16) Tomasini, C.; Luppi, G.; Monari, M. Oxazolidin-2-One-Containing Pseudopeptides That Fold into B-Bend Ribbon Spirals. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2410–2420.
- (17) Baruah, P. K.; Sreedevi, N. K.; Gonnade, R.; Ravindranathan, S.; Damodaran, K.; Hofmann, H.-J.; Sanjayan, G. J. Enforcing Periodic Secondary Structures in Hybrid Peptides: A Novel Hybrid Foldamer Containing Periodic  $\Gamma$ -Turn Motifs. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 636–639.
- (18) Amblard, M.; Martinez, J.; Berge, G. Oligomers of Nonpeptide Restricted Mimetics of Dipeptides or Tripeptides and the Use Thereof in the Synthesis of Synthetic Proteins and Polypeptides. WO/2001/051506, July 20, 2001.
- (19) Lubomir, V. Synthesis, Structural and Biological Analysis of Organized Biomimetic Systems, Università degli Studi di Napoli Federico II, 2010.
- (20) Vezenkov, L. L.; Maynadier, M.; Hernandez, J.-F.; Averlant-Petit, M.-C.; Fabre, O.; Benedetti, E.; Garcia, M.; Martinez, J.; Amblard, M. Noncationic Dipeptide Mimic Oligomers as Cell Penetrating Nonpeptides (CPNP). *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1850–1854.
- (21) Freidinger, R. M.; Veber, D. F.; Perlow, D. S.; Brooks; Saperstein, R. Bioactive Conformation of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone: Evidence from a Conformationally Constrained Analog. *Science* **1980**, *210*, 656–658.
- (22) Tünnemann, G.; Ter-Avetisyan, G.; Martin, R. M.; Stöckl, M.; Herrmann, A.; Cardoso, M. C. Live-Cell Analysis of Cell Penetration Ability and Toxicity of Oligo-Arginines. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 469–476.
- (23) Paramelle, D.; Subra, G.; Vezenkov, L. L.; Maynadier, M.; André, C.; Enjalbal, C.; Calmès, M.; Garcia, M.; Martinez, J.; Amblard, M. A Straightforward Approach for Cellular-Uptake Quantification. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2010**, *49*, 8240–8243.
- (24) Amblard, M.; Raynal, N.; Averlant-Petit, M.-C.; Didierjean, C.; Calmès, M.; Fabre, O.; Aubry, A.; Marraud, M.; Martinez, J. Structural Elucidation of the B-Turn Inducing (S)-[3-Amino-4-Oxo-2,3-Dihydro-5H-benzo[b][1,4]thiazepin-5-Yl] Acetic Acid (DBT) Motif. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3733–3735.
- (25) Zawadzke, L. E.; Berg, J. M. The Structure of a Centrosymmetric Protein Crystal. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **1993**, *16*, 301–305.
- (26) Yeates, T. O.; Kent, S. B. H. Racemic Protein Crystallography. *Annu. Rev. Biophys.* **2012**, *41*, 41–61.
- (27) Minch, M. J. Orientational Dependence of Vicinal Proton-Proton NMR Coupling Constants: The Karplus Relationship. *Concepts Magn. Reson.* **1994**, *6*, 41–56.
- (28) Hayward, S.; Leader, D. P.; Al-Shubailly, F.; Milner-White, E. J. Rings and Ribbons in Protein Structures: Characterization Using Helical Parameters and Ramachandran

- Plots for Repeating Dipeptides. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2014**, *82*, 230–239.
- (29) Freidinger, R. M. Synthesis of  $\gamma$ -Lactam-Constrained Tryptophyl-Lysine Derivatives. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3631–3633.
- (30) Freidinger, R. M.; Veber, D. F.; Hirschmann, R.; Paegle, L. M. Lactam Restriction of Peptide Conformation in Cyclic Hexapeptides Which Alter Rumen Fermentation. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, *16*, 464–470.
- (31) Perdih, A.; Kikelj, D. The Application of Freidinger Lactams and Their Analogs in the Design of Conformationally Constrained Peptidomimetics. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1525–1556.
- (32) Paul, P. K. C.; Burney, P. A.; Campbell, M. M.; Osguthorpe, D. J. The Conformational Preferences of  $\gamma$ -Lactam and Its Role in Constraining Peptide Structure. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1990**, *4*, 239–253.
- (33) Freidinger, R. M. Design and Synthesis of Novel Bioactive Peptides and Peptidomimetics. *J Med Chem* **2003**, *46*, 5553–5566.
- (34) Freidinger, R. M.; Perlow, D. S.; Veber, D. F. Protected Lactam-Bridged Dipeptides for Use as Conformational Constraints in Peptides. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 104–109.
- (35) Scott, W. L.; Alsina, J.; Kennedy, J. H.; O'Donnell, M. J. Solid-Phase Synthesis of Constrained Terminal and Internal Lactam Peptidomimetics. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1629–1632.
- (36) Lama, T.; Campiglia, P.; Carotenuto, A.; Auriemma, L.; Gomez-Monterrey, I.; Novellino, E.; Grieco, P. A Novel Route to Synthesize Freidinger Lactams by Microwave Irradiation\*. *J. Pept. Res.* **2005**, *66*, 231–235.
- (37) Jamieson, A. G.; Boutard, N.; Beauregard, K.; Bodas, M. S.; Ong, H.; Quiniou, C.; Chemtob, S.; Lubell, W. D. Positional Scanning for Peptide Secondary Structure by Systematic Solid-Phase Synthesis of Amino Lactam Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7917–7927.
- (38) Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668–1688.



Cette partie est dédiée à l'étude biologique des foldamères synthétisés dans notre laboratoire. Nous avons présenté dans le chapitre précédent les résultats biologiques obtenus avec les oligomères de DBT, étudiés par le Dr. L. Vezekov durant sa thèse<sup>1</sup>. L'étude conformationnelle de ces composés, réalisée durant ce travail de thèse, a montré qu'ils sont capables d'adopter en solution une structure en ruban. Afin de développer de nouveaux vecteurs plus solubles et plus versatiles que les oligomères de DBT, nous avons conçu de nouveaux foldamères adoptant une structure en ruban similaire, les oligomères d' $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames (Agl). Une stratégie de synthèse originale et efficace a été mise au point, donnant accès à une grande diversité fonctionnelle. Ainsi divers oligomères de nature différente ont été synthétisés : des oligomères hydrophobes, cationiques ou amphipatiques. Afin d'évaluer leur capacité à traverser la membrane plasmique, des dérivés d'Agl-AA fluorescents ont été synthétisés puis étudiés *in vitro*. Leur propriété de pénétration cellulaire et leur localisation intracellulaire a été déterminée.

L'étude biologique de ces composés a été réalisée en utilisant deux techniques : la mesure d'émission de fluorescence totale et l'imagerie par microscopie confocale.

La mesure de fluorescence totale est une technique qui permet d'évaluer la concentration d'un composé fluorescent, en mesurant la lumière qu'il émet après excitation par un photon. A faible concentration, l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à sa concentration et permet donc une quantification.

La microscopie confocale est une technique d'imagerie optique utilisée pour augmenter la résolution optique et le contraste d'une image en utilisant une illumination par un faisceau laser, concentré par un laser et un sténopé placé devant le détecteur dans le même plan focal que l'objectif (plans confocaux). Ainsi, seuls les photons provenant du plan focal passent le sténopé et sont détectés par l'objectif formant ainsi l'image. Cette technique permet d'obtenir des images de faible profondeur de champ nettes et rend ainsi possible l'observation de l'intérieur des cellules. Cette technique, couplée au marquage chimique des différents organites de la cellule avant incubation, permet de déterminer la localisation intracellulaire des composés<sup>2</sup>.

Nous avons ensuite appliqué l'un de ces vecteurs de pénétration intracellulaire au transport de la pepstatine A, un inhibiteur puissant de la Cath D vers le compartiment endolysosomal. Cette cible a été présentée dans le chapitre bibliographique de ce manuscrit.

Parallèlement à ces études, j'ai synthétisé un bioconjugué associant un oligomère d'AMPA, comme vecteur, et l'inhibiteur de Cath D. Ce composé préalablement étudié dans notre équipe a montré un puissant effet antiprolifératif sur diverses lignées de cellules

cancéreuses. Afin d'approfondir son étude, j'ai synthétisé ce composé en quantité importante pour des études *in vivo* chez la souris.

Les études biologiques présentées dans ce chapitre ont été effectuées par les Dr ; Marie Maynadier et Virginie Bellet de l'équipe « Glyco- et Nanovecteurs pour le Ciblage Thérapeutique » de l'IBMM.

### **XIII. Les poly $\alpha$ -amino $\gamma$ -lactames comme oligomères pénétrants**

#### **XIII.1. Généralités**

La synthèse et l'étude structurale des oligomères d' $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames ont été présentées dans la première partie de ce chapitre. Ces études ont permis de confirmer la capacité de ces composés à adopter une conformation stable, en solution comme à l'état solide, similaire à celle des poly-DBT : une structure en ruban. Grâce à cette stratégie, plusieurs types d'oligomères, amphipatiques, aromatiques et cationiques ont été synthétisés. Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre de ce manuscrit, la structure peut être un critère déterminant pour l'internalisation d'un composé. Le contrôle de la structuration et de la répartition des chaînes latérales offre ainsi de nombreuses possibilités pour la synthèse de nouveaux vecteurs favorisant l'internalisation intracellulaire. Des séquences pourvues d'une sonde fluorescente sur la position N-terminale ont donc été synthétisées et étudiées dans des expériences de pénétration intracellulaire. Les résultats obtenus lors de ces études sont présentés ici.

#### **XIII.2. Synthèse d'oligomères fluorescents**

Pour la synthèse de ces oligomères, la fluorescéine isothiocyanate a été utilisée comme sonde fluorescente. Cette sonde possède une bande d'absorption à 494 nm et une bande d'émission à 521 nm. Elle permet de mesurer l'internalisation des composés par mesure d'émission de fluorescence totale et de suivre leur adressage par microscopie confocale. Cependant, le couplage de cette sonde sur un acide  $\alpha$ -aminé donne lieu à une réaction secondaire de type dégradation d'Edman<sup>3</sup>. C'est pourquoi, il est nécessaire d'incorporer un bras espaceur entre le dernier résidu de la séquence et la sonde fluorescente. Nous avons choisi d'utiliser l'acide aminohexanoïque (Ahx). Dans un premier temps, les différents oligomères d'AgI-AA ont été préparés selon la stratégie suivante (Schéma 14).

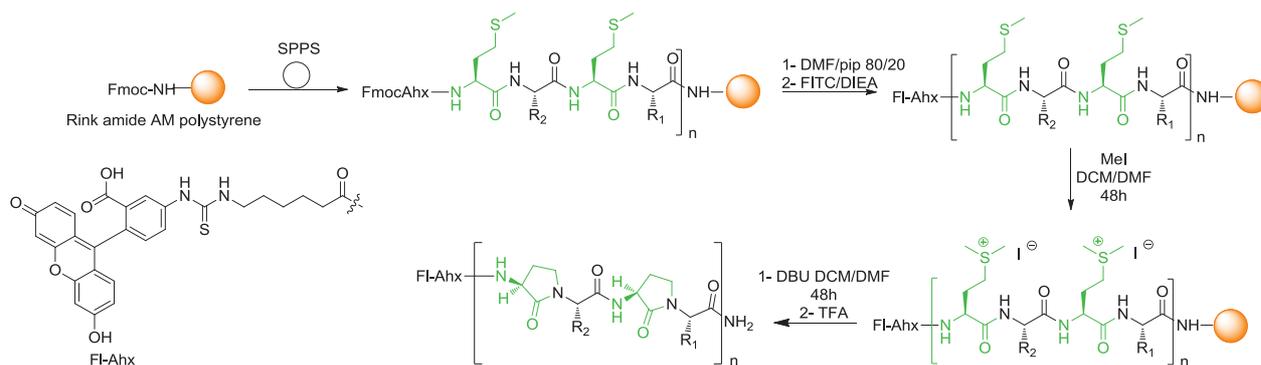


Schéma 14: Stratégie de synthèse des oligomères fluorescents.

Le peptide linéaire alternant des résidus méthionine et les aminoacides sélectionnés est synthétisé par SPPS. L'espaceur Ahx est introduit en position N-terminale du peptide puis la sonde fluorescente est couplée en présence de DIEA avant l'étape de multicyclisation. Cependant, l'oligomère fluorescent de poly(Agl-AA) n'a jamais été obtenu par cette voie à cause d'une dégradation de la fluorescéine lors de cette dernière étape. La stratégie de synthèse a donc été modifiée pour la synthèse des oligomères fluorescents (Schéma 15). Dans cette nouvelle stratégie, la multicyclisation se déroule après avoir incorporé le résidu Ahx protégé par un groupement Boc. Les conditions de multicyclisation restent inchangées et une fois le poly Agl-AA obtenu sur résine, le groupement Boc est clivé en présence de lutidine et de TMSOTf<sup>4</sup> permettant de conserver le peptide sur le support solide. Une fois, le peptide déprotégé, la sonde fluorescente est couplée en présence de DIEA.

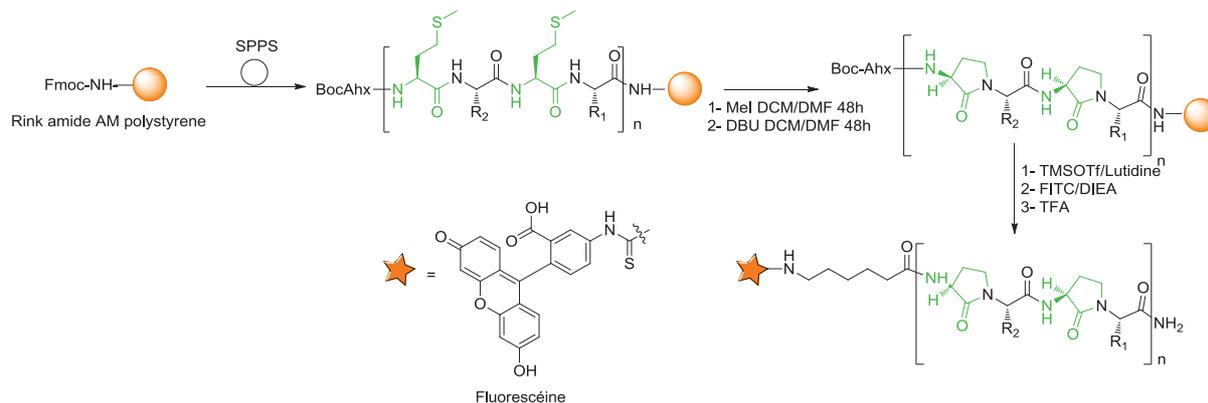


Schéma 15 : Nouvelle voie de synthèse d'oligomères fluorescents.

Avec cette nouvelle stratégie, 4 séries d'oligomères de longueurs différentes (2, 4 et 6 motifs incorporés dans l'oligomère) ont été synthétisées. Une première série a été synthétisée à partir de peptides incorporant uniquement la méthionine (composés **33**, **34** et **35**, Tableau 24 et Figure 103, **A**). Ces composés doivent nous permettre de vérifier les

propriétés d'internalisation du  $\gamma$ -lactame seul. La seconde série de composés est directement inspirée des poly-DBT, et incorpore uniquement des chaînes latérales de la phénylalanine (Tableau 24 et Figure 103, **B**). Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons décrit l'importance de la présence de charges positives ou du caractère amphipatique des différents CPP ou foldamères pénétrants. En se basant sur ces caractéristiques physico-chimiques et afin d'augmenter la solubilité des oligomères de la série **B**, deux autres séries de composés ont été synthétisés par incorporation de résidus arginine : (1) une série d'oligomères amphipatiques incorporant les chaînes latérales de la phénylalanine et de l'arginine (Tableau 24 et Figure 103, **C**) et une série de composés polycationiques incorporant uniquement des résidus arginine (Tableau 24 et Figure 103, **D**). Cette dernière série a été conçue en émettant l'hypothèse que la structure bien définie des oligomères d'Agl-AA pourrait permettre une internalisation efficace même avec un nombre limité de résidus arginine (moins de 8), comme cela a pu être observé pour des dérivés de CPP cycliques<sup>5</sup> ou des mimes d'hélices cationiques<sup>6</sup>. Les oligomères fluorescents ont été obtenus avec des rendements allant de 10 à 40%.

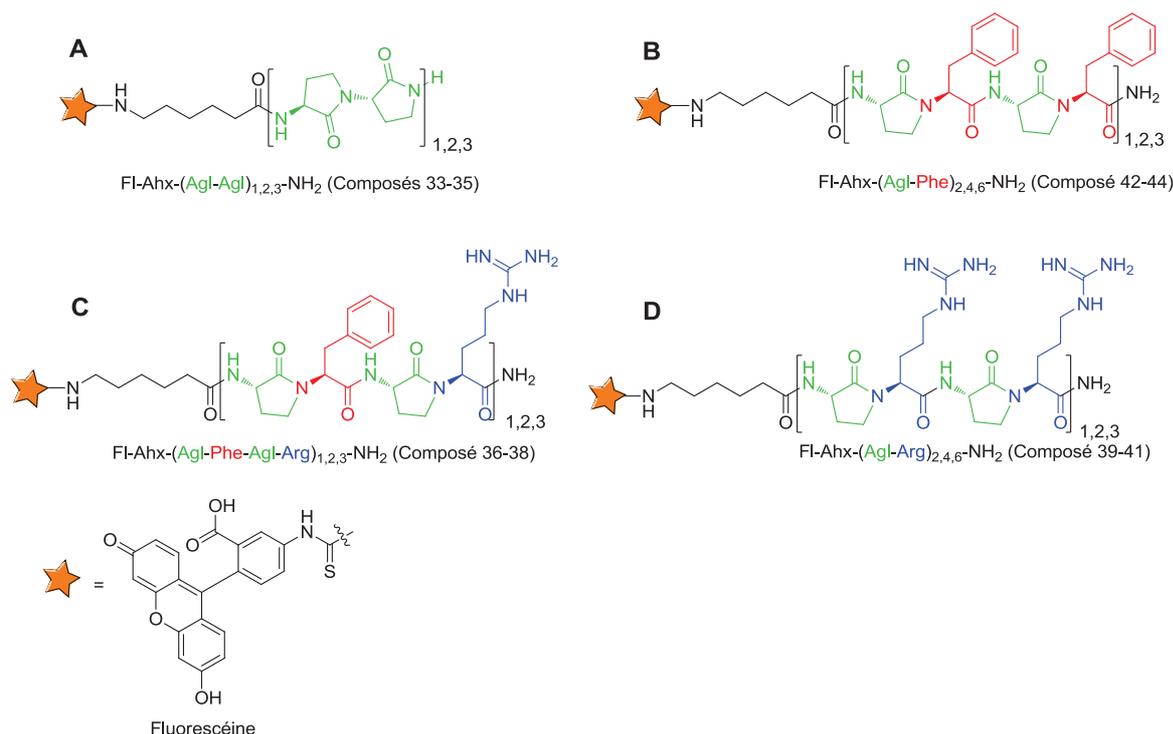


Figure 103 : Oligomères fluorescents.

L'étude des oligomères de DBT ayant montré que le tétramère présentait la meilleure internalisation non seulement par rapport aux oligomères plus courts mais aussi par rapport à plusieurs CPP connus (polyArg<sub>8</sub>, polyArg<sub>9</sub> et Pénétratine), le FI-DBT<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (composé **45**) a été utilisé comme référence. Afin de déterminer si l'efficacité d'internalisation des CPP

hydrophobes et aromatiques comme le DBT<sub>4</sub> et/ou les oligomères de la série **B** dépendait uniquement de la répartition des groupements hydrophobes aromatiques ou, comme dans le cas des CPP polycationiques, de leur nombre, un hexapeptide polyaromatique non structuré, le composé **46**, a été également synthétisé et utilisé comme contrôle. Les composés **45** et **46** ont été synthétisés par SPPS selon une stratégie Fmoc/tBu classique avec un rendement de 24 et 16% respectivement.

Tableau 24 : Liste des oligomères fluorescents synthétisés pour les études de pénétration intracellulaire.

Composé N°	Séquence	Composé N°	Séquence
<b>33</b>	FI-Ahx-(Agl) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	<b>39</b>	FI-Ahx-(Agl-Arg) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>
<b>34</b>	FI-Ahx-(Agl) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	<b>40</b>	FI-Ahx-(Agl-Arg) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>
<b>35</b>	FI-Ahx-(Agl) <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>	<b>41</b>	FI-Ahx-(Agl-Arg) <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
<b>36</b>	FI-Ahx-Agl-Phe-Agl-Arg-NH <sub>2</sub>	<b>42</b>	FI-Ahx-(Agl-Phe) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>
<b>37</b>	FI-Ahx-(Agl-Phe-Agl-Arg) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	<b>43</b>	FI-Ahx-(Agl-Phe) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>
<b>38</b>	FI-Ahx-(Agl-Phe-Agl-Arg) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>	<b>44</b>	FI-Ahx-(Agl-Phe) <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
Référence et contrôle			
<b>45</b>	FI-DBT <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	<b>46</b>	FI-Ahx-Phe <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>

L'étude de la pénétration intracellulaire de ces composés a été menée sur des lignées de cellules de cancer du sein MDA-MB-231. Le protocole utilisé pour cette étude est rappelé ci-dessous.

Les cellules sont incubées avec les différents oligomères fluorescents à une concentration de 10  $\mu$ M pendant 24 heures puis les oligomères n'ayant pas été internalisés sont éliminés par lavages avec du tampon phosphate salin (PBS). Afin de décrocher les composés collés à la membrane, les cellules sont ensuite traitées par la trypsine pendant 5 minutes et centrifugées. Le culot cellulaire est lysé puis la fluorescence des composés est mesurée à 530 nm.

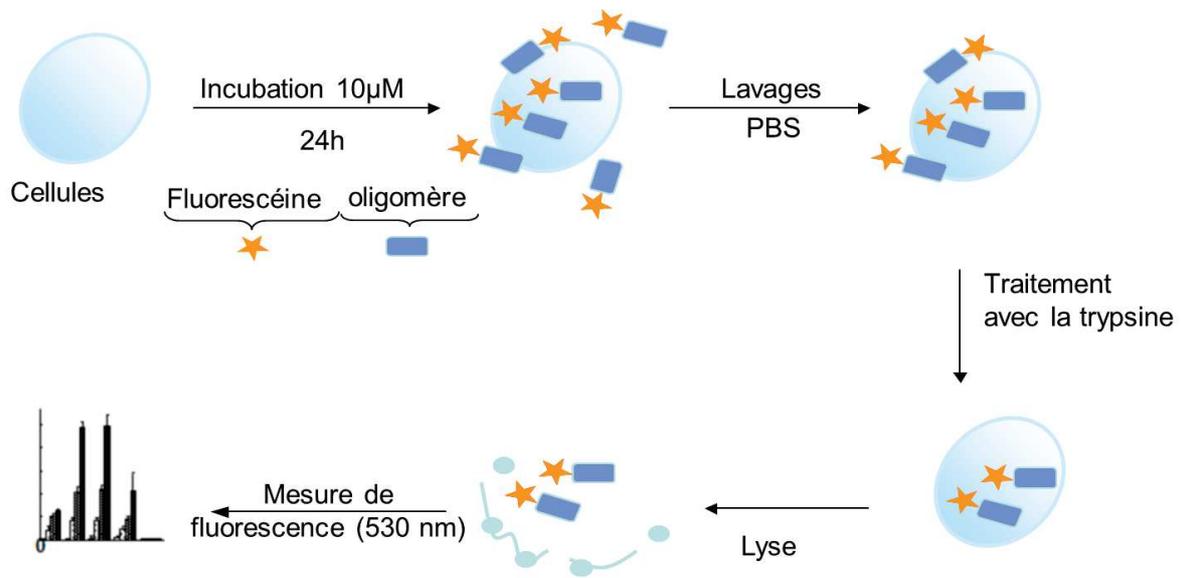


Figure 104 : protocole appliqué lors des études d'internalisation.

L'intensité de la fluorescence a été mesurée et exprimée en pourcentage par rapport au composé **45** (Figure 105).

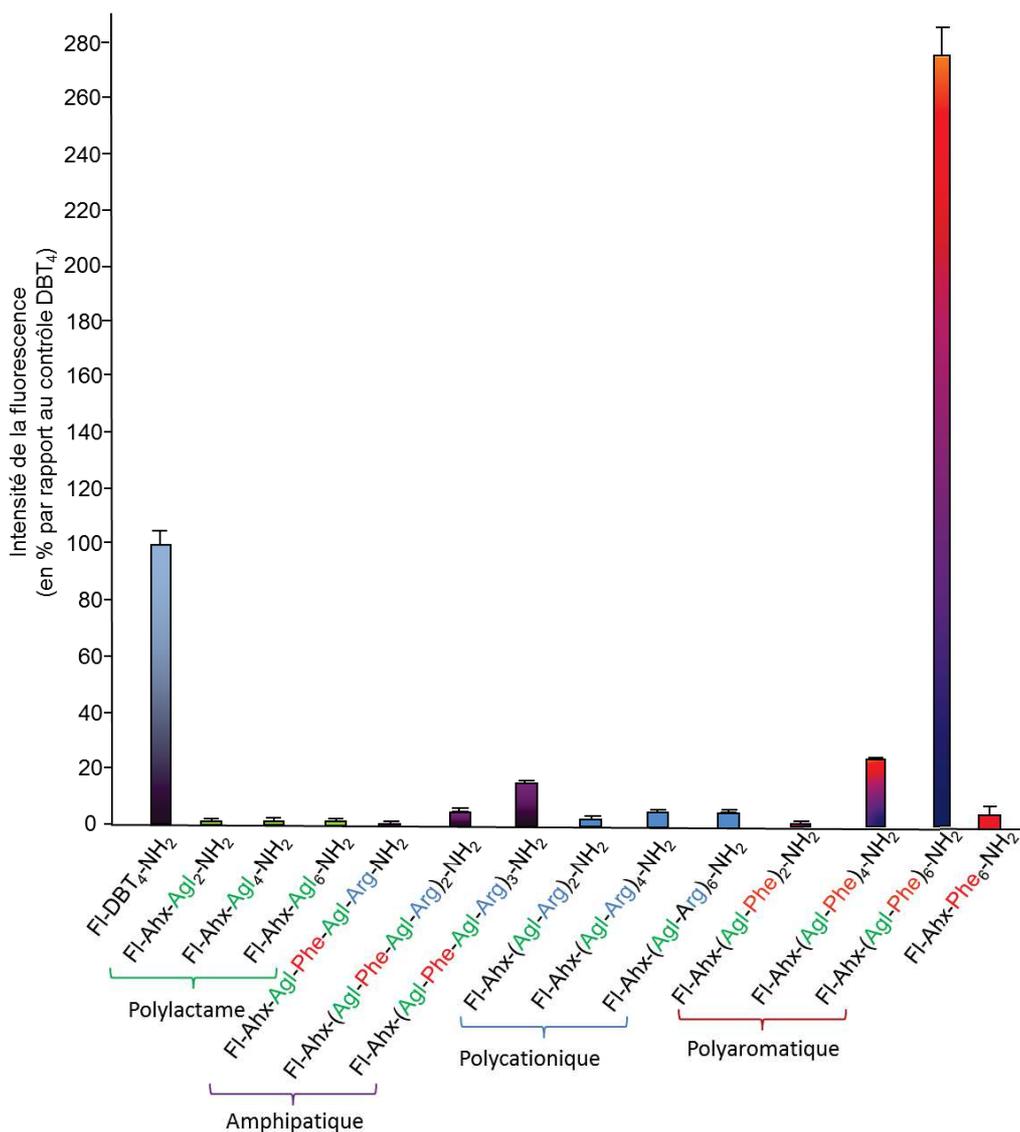


Figure 105 : Etude d'internalisation des oligomères poly Agl-AA sur cellules MDA-MB-231 (l'intensité de la fluorescence est exprimée en % par rapport à la référence 45).

Les oligomères incorporant uniquement le  $\gamma$ -lactame (composés **33**, **34** et **35**) ont une intensité de fluorescence nulle et ne sont donc pas internalisés.

L'internalisation des composés amphipatiques (composés **36**, **37** et **38**) augmente avec la longueur de l'oligomère, mais ces valeurs restent très faibles par rapport à la référence. Parmi eux, l'oligomère le plus long (composé **38**) est six fois moins internalisé que la référence **45**.

La mesure de la fluorescence des composés polycationiques **39**, **40** et **41** indique qu'ils ne sont que très faiblement internalisés. Les études menées sur les CPP cationiques ont montré que l'efficacité d'internalisation était dépendante du nombre et de la densité de charge. Ils doivent comporter au moins 8 charges positives et leur structure n'influence pas

l'efficacité d'internalisation. Malgré leur structure secondaire bien définie qui aurait pu limiter le nombre de résidus cationiques nécessaires à l'internalisation dans l'oligomère<sup>6</sup>, les résultats obtenus montrent que les oligomères d'Agl-AA cationiques s'inscrivent dans la lignée des CPP classiques. Cependant la synthèse d'oligomères plus longs permettrait de vérifier et confirmer si le nombre de charges ainsi que leur densité sont des pré-requis pour l'efficacité d'internalisation.

Les meilleurs résultats ont été obtenus pour les foldamères hydrophobes. L'efficacité d'internalisation augmente avec la taille de l'oligomère. Le dimère **42** n'est pas capable de traverser les membranes cellulaires. Le tétramère **43** est capable de traverser les membranes cellulaires, bien que l'intensité de fluorescence soit 4 fois moins importante que celle du composé de référence **45**. L'incorporation de deux motifs supplémentaires augmente considérablement l'internalisation de l'oligomère. Le composé **44** est 2,7 fois plus internalisé que la référence **45**.

L'ensemble des résultats montrent que plusieurs paramètres influencent la pénétration intracellulaire des oligomères d'Agl.

- Comme nous l'avons constaté dans la série des oligomères de DBT, l'efficacité d'internalisation des foldamères amphipatiques et aromatiques, augmente avec la taille de l'oligomère. Les composés **38** et **44** sont les plus efficaces dans leur série respective.
- A longueur équivalente, les meilleurs résultats sont obtenus avec les oligomères incorporant uniquement des résidus phénylalanine. Cependant le caractère polyaromatique de ces composés ne semble pas le seul requis pour l'efficacité d'internalisation. En effet, alors que les composés **44** et **46** comportent le même nombre de résidus phénylalanine, l'oligomère **44** est 40 fois plus internalisé que le composé non structuré **46**. De plus, à longueur, nombre de motifs aromatiques et structure secondaire similaires, le tétramère de DBT présente une efficacité supérieure à celle de l'oligomère **43**. Il est difficile d'interpréter ce résultat en se basant uniquement sur ces paramètres. La mesure de l'hydrophobie de ces différentes séries de composés pourrait apporter des informations complémentaires. Pour cela, une étude est actuellement envisagée au sein du laboratoire.

Cette première série de composés a permis d'identifier deux foldamères, de nature différente, capables de traverser les membranes cellulaires : le composé amphipatique **38** et le composé poly aromatique **44**. L'efficacité pour ces deux composés est très différente. Néanmoins, afin d'obtenir des informations supplémentaires, l'internalisation de ces composés a été étudiée par microscopie confocale.

### XIII.3. Imagerie confocale et co-localisation

Afin de choisir de manière pertinente un vecteur pour la délivrance d'un principe actif en fonction de la cible thérapeutique visée, il est nécessaire de connaître sa localisation intracellulaire (cytoplasme, noyau, compartiment endolysosomal par exemple), même si dans certains cas l'association d'un cargo peut modifier cette localisation. Pour la déterminer, des expériences d'imagerie par microscopie confocale ont été réalisées sur des lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 avec le composé de référence **45**, les foldamères **38** et **44** et le composé **46** comme contrôle négatif. Dans un premier temps, les cellules ont été incubées avec deux fluorochromes : le Hoescht qui permet le marquage des noyaux et le CellMask qui colore les membranes cellulaires. Les images sont représentées séparément puis fusionnées afin de déterminer la localisation des composés (Figure 106, **A**). Confirmant les résultats obtenus précédemment avec les expériences de mesure de fluorescence totale, le composé **46** n'est pas observé à l'intérieur des cellules. En revanche, les composés **38** et **44** sont capables de traverser la membrane plasmique mais ne sont pas capables de traverser l'enveloppe endolysosomale. Une seconde expérience de co-marquage avec le lysotracker, fluorochrome spécifique des lysosomes, a permis de montrer que le composé **44**, qui est le plus efficace en terme d'internalisation, est spécifiquement adressé, comme le DBT<sub>4</sub>, aux lysosomes (Figure 106, **B**). Ce composé a été par la suite utilisé pour véhiculer un inhibiteur d'une aspartyl protéase, la Cathepsine D, dans un contexte de découverte de nouveaux composés à visée anticancéreuse (**chapitre XIV**).

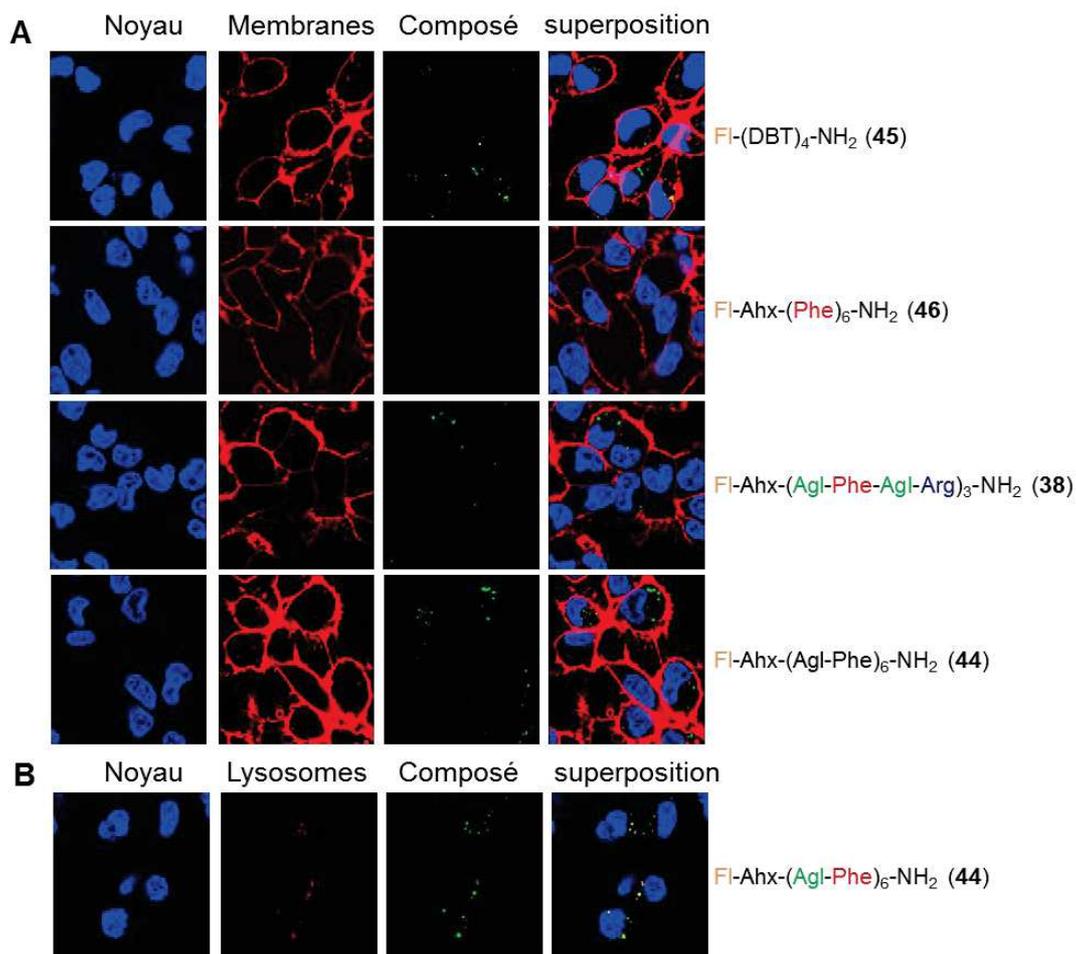


Figure 106 : Images obtenues par microscopie confocale sur des lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 incubées pendant 24h avec les composés 38, 44, 45 et 46.

### XIII.4. Nouveaux oligomères pour la vectorisation

Pour approfondir ces premiers résultats, nous avons fait varier d'autres paramètres en synthétisant 4 nouveaux oligomères (Tableau 25).

Tableau 25: Seconde série de composés pour les études d'internalisation.

Composé N°	séquence
47	FI-Ahx-(Agl-Phe) <sub>2</sub> -(Agl-Phe-Agl-Arg) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>
48	FI-Ahx-((R)-Agl-Phe) <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
49	FI-Ahx-(Agl-Trp-Agl-Arg) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>
50	FI-Ahx-(Agl-Trp) <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>

L'hexamère amphipatique **38** a des propriétés d'internalisation et des caractéristiques physico-chimiques intéressantes mais son efficacité reste très faible. Afin d'augmenter son

efficacité tout en conservant les 3 résidus chargés, le composé **47** incorporant deux motifs (Agl-Phe) supplémentaires entre le bras espaceur Ahx et  $\gamma$ -lactame N-terminal du composé **38** a été synthétisé. Cet oligomère offre ainsi un bon compromis entre le nombre de résidus aromatiques, le caractère amphiphile et la solubilité (Figure 107).

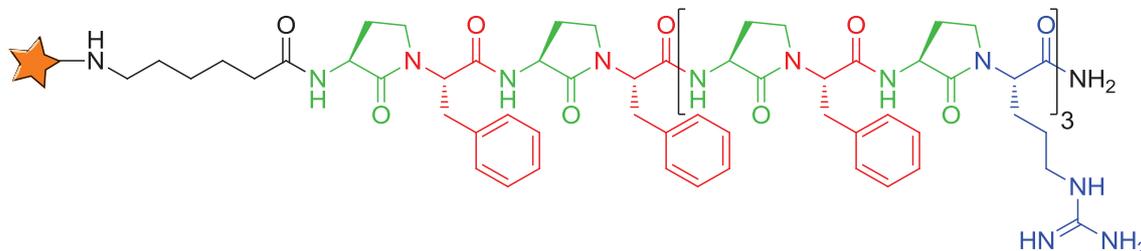


Figure 107 : oligomère FI-Ahx-(Agl-Phe)<sub>2</sub>-(Agl-Phe-Agl-Arg)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (composé 47).

Nous avons montré que le nombre de résidus hydrophobes n'était pas un critère suffisant pour rendre un composé capable de pénétrer les membranes cellulaires. Pour affiner cette étude, nous avons synthétisé le composé **48** (Figure 108) qui est analogue hétérochiral du composé **44**. Comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent, les composés hétérochiraux n'adoptent pas de structure stable et définie en solution. Nous espérons ainsi pouvoir déterminer si la structure en ruban de nos composés est déterminante pour l'internalisation.

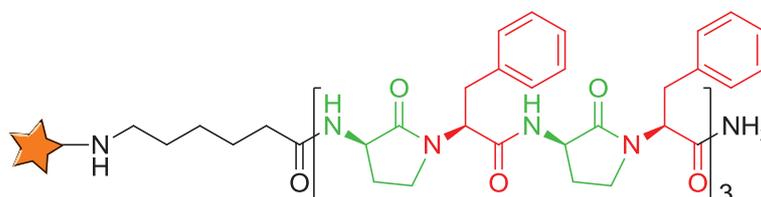


Figure 108 : Oligomère fluorescent hétérochiral FI-Ahx-((R)-Agl-Phe)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (composé 48).

Le rôle crucial du tryptophane pour l'efficacité d'internalisation de la pénétratine a été démontré<sup>7</sup> et son utilisation en alternance avec des résidus arginine a conduit à la découverte de puissants CPP<sup>8,9</sup>. En se basant sur ces données de la littérature, un hexamère d'Agl-AA alternant des résidus Trp et Arg a été synthétisé, le composé **49**. Afin de vérifier l'importance de l'alternance de résidus Trp et Arg pour l'internalisation, un hexamère n'incorporant que des résidus Trp a également été préparé, le composé **50** (Figure 109).

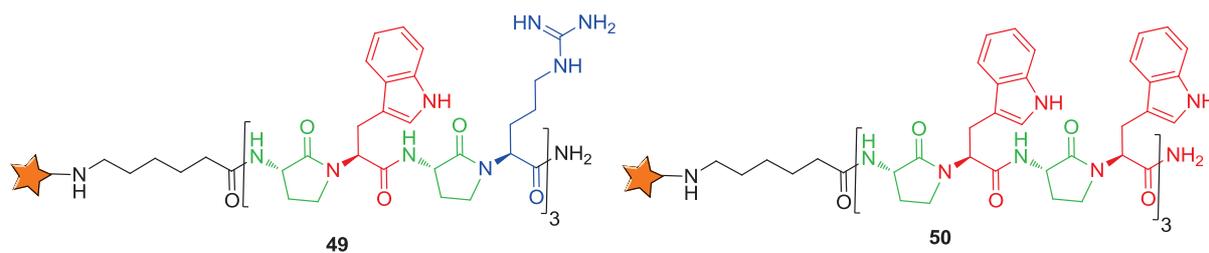


Figure 109 : Oligomères FI-Ahx-(Agl-Trp-Agl-Arg)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (composé 49) et FI-Ahx-(Agl-Trp)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (composé 50).

Ces composés ont été testés de manière identique à la première expérience d'internalisation. Nous avons utilisé les composés, **38**, **44** et **45** comme références dans ces expériences.

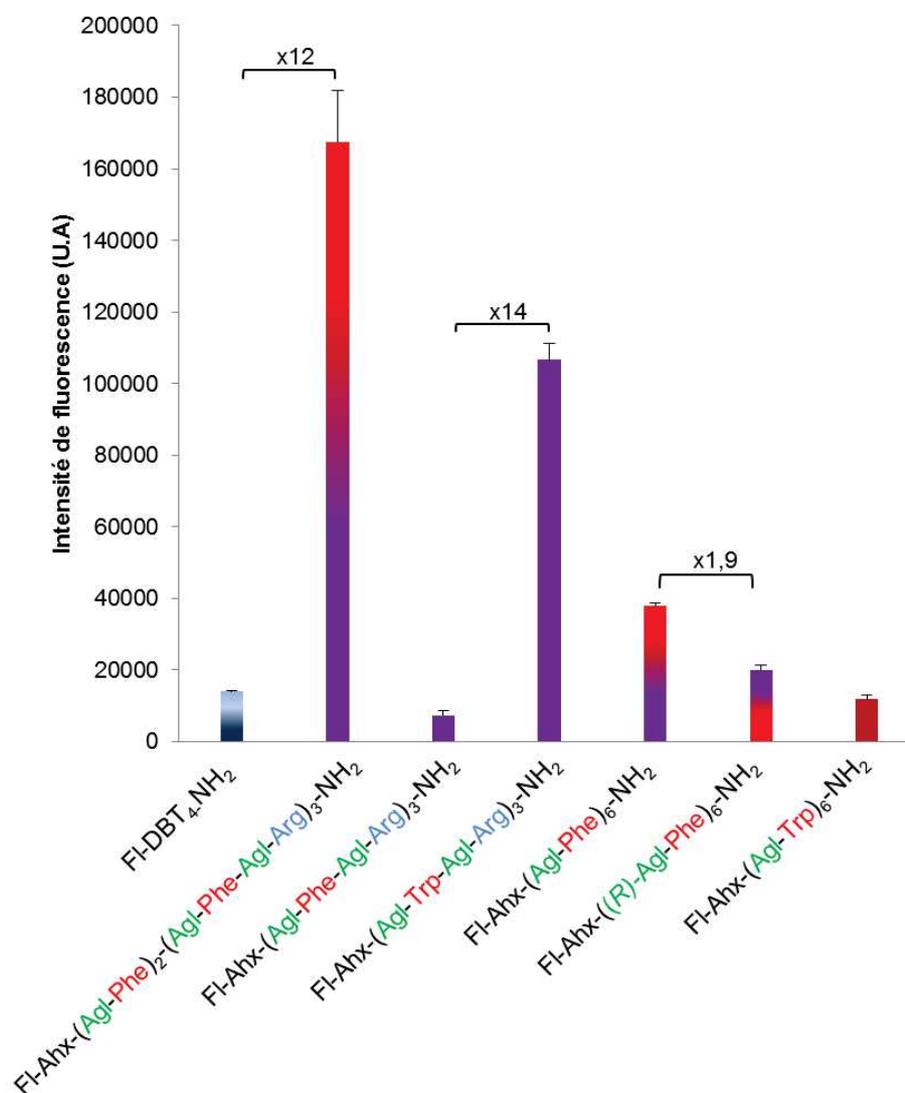


Figure 110 : Mesure de l'intensité de fluorescence des nouveaux vecteurs sur cellules de cancer du sein MDA-MB-231.

Le composé **47** est 12 fois plus internalisé que la référence **45** (Figure 110). L'augmentation de l'hydrophobicité du composé, tout en conservant une hydrosolubilité importante, favorise l'internalisation de ce composé. Lors des manipulations, nous avons constaté une précipitation du composé après la lyse des cellules. Afin d'écartier les conditions expérimentales, nous avons tenté de reproduire cette précipitation dans les conditions physiologiques auxquelles ce composé a été exposé. Le composé a été dissout dans le milieu de culture, à pH acide proche de celui des endosomes et lysosomes et à température physiologique de 37°. Nous n'avons observé aucun précipité dans ces conditions. Une hypothèse serait que ce composé s'accumule dans un ces compartiments du cytosol, les endosomes ou les lysosomes par exemple. La concentration importante de ce composé dans ces compartiments entraînerait sa précipitation. Afin d'étudier cette hypothèse, des études par microscopie confocale de cellules marquées par des colorants des différents organites cellulaires devront être entreprises.

Le composé hétérochiral **48** pénètre deux fois moins dans les cellules que le composé homochiral **44**. Ces composés chimiquement identiques mais de conformation différente n'ont donc pas les mêmes propriétés de pénétration cellulaire, montrant que la structure secondaire des composés influence l'internalisation.

Le composé amphipatique **49** est 7 fois plus internalisé que la référence **45** et 14 fois plus que son homologue **38**. En revanche, le composé **50** ne comportant que des résidus tryptophane pénètre beaucoup moins efficacement que le composé **49**. Ce résultat confirme l'efficacité du tryptophane en alternance avec des résidus arginine pour l'internalisation et montre que ces deux composés se comportent de façon différente, certainement dans leur interaction à la membrane qui est la première étape avant l'internalisation. Afin d'approfondir ces résultats, des séquences plus courtes seront synthétisées et étudiées. Des études portant sur l'influence du nombre de résidus Trp sur la pénétration cellulaire dans des séquences de même longueur seront aussi entreprises.

Le composé **50** en revanche, pénètre 1,2 fois moins dans les cellules que la référence **45**, contrairement au composé **44**. Les oligomères **44** et **50** ont pourtant des caractéristiques physico-chimiques proches qui n'expliquent pas une telle différence d'internalisation. Nous pensons que cette différence est due à l'affinité particulière du tryptophane pour la membrane cellulaire.

### **XIII.5. Conclusion**

Les études biologiques menées sur les oligomères de poly-Agl-AA marqués par une sonde fluorescente ont permis d'identifier de nouveaux foldamères pénétrants capables de

traverser efficacement les membranes cellulaires. Parmi les 16 oligomères synthétisés et testés, les composés **44**, **47**, **49** pénètrent dans les cellules avec une efficacité très supérieure (12 fois pour le meilleur d'entre eux) à celle du composé de référence **45**. Les études de microscopie confocale du composé **44** ont montré qu'il est adressé dans les compartiments endolysosomiaux. Il constitue un nouveau vecteur potentiel et puissant pour la délivrance de molécules actives ciblant ces compartiments. Le meilleur vecteur est un oligomère amphipatique auquel sont ajoutés deux motifs hydrophobes (Agl-Phe) du côté N-terminal. Des résultats prometteurs ont également été obtenus pour des composés amphipatiques comportant des résidus tryptophanes et arginines ou des composés comportant uniquement des résidus phénylalanines. Les oligomères les mieux internalisés comportent au minimum 6 motifs « Agl-AA ».

Le premier volet de ce travail a concerné la synthèse de nouveaux foldamères et leur évaluation comme vecteurs de pénétration intracellulaire. Dans un second volet, je me suis attaché à leur utilisation pour la délivrance de la pepstatine, un puissant inhibiteur de la cathepsine D (Cath D), dont l'utilisation est fortement limitée par sa très faible capacité d'internalisation. L'inhibition de cette enzyme, surexprimée et sécrétée par de nombreuses tumeurs solides, nous a paru une approche prometteuse pour le développement de nouveaux anticancéreux. Ces travaux sont présentés dans la suite de ce chapitre.

## XIV. L'inhibition de la cathepsine D pour la thérapie anticancéreuse

L'implication de la cathepsine D (Cath D) dans différents cancers a été décrite par de nombreuses équipes<sup>10,11,12</sup>. Parmi elles, l'équipe de Garcia a confirmé son rôle dans les cancers du sein<sup>13</sup>. Cette enzyme est surexprimée dans les cancers sous deux formes, la forme active et sous forme de pro-enzyme inactive. Cette enzyme est produite dans les lysosomes et les endosomes. La pro enzyme agit comme facteur de croissance autocrine en interagissant avec un récepteur membranaire encore non déterminé tandis que l'enzyme active agit par le biais de son activité protéolytique. L'inhibition de son activité protéolytique intracellulaire est donc une stratégie anticancéreuse prometteuse. Pour parvenir à inhiber cette activité protéolytique, il est donc nécessaire de pouvoir cibler les compartiments endolysosomaux. Nous avons présenté plusieurs composés adressés à ces compartiments. Cette stratégie a été étudiée avant mon arrivée au laboratoire lors des travaux du Dr. L. Venzekov<sup>1</sup>. Ces travaux ont consisté à la vectorisation de la pepstatine A, un inhibiteur de l'état de transition de la Cath D, peu soluble et incapable de traverser seul les membranes plasmiques. Un bio-conjugué constitué de la pepstatine A, d'un vecteur favorisant la pénétration intracellulaire : l'AMPA<sub>4</sub> et d'une partie hydrophile a été développé (composé **51**, Figure 111)<sup>14</sup>.

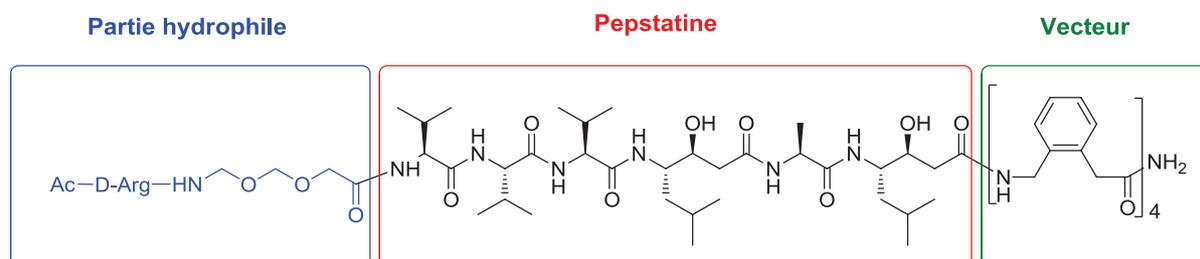


Figure 111 : Pepstatine A conjuguée à un oligomère d'AMPA et à un fragment hydrophile.

Ce composé a montré une inhibition équivalente à la pepstatine sur enzyme isolée. Cette inhibition est maintenue sur cellules vivantes, contrairement à la pepstatine seule. Fort de ces premiers résultats, des lignées de cancer du sein (MDA-MB-231 et MCF7), du colon (HCT-116), d'ostéosarcome (SaOS2) ou de la prostate (LNCaP)<sup>14</sup> ont été incubées avec ce composé. Le taux de survie cellulaire a été évalué puis comparé à la croissance des cellules traitées avec un contrôle (1% DMSO) (Figure 112). Les cellules ont aussi été incubées en présence de l'analogue de la pepstatine ( $\text{Ac-r-O}_2\text{Oc-(Val)}_3\text{-Sta-Ala-Sta-NH}_2$ , composé **55**) et du vecteur seul ( $\text{Ac-D-Arg-O}_2\text{Oc-(AMPA)}_4\text{-NH}_2$ , composé **56**).

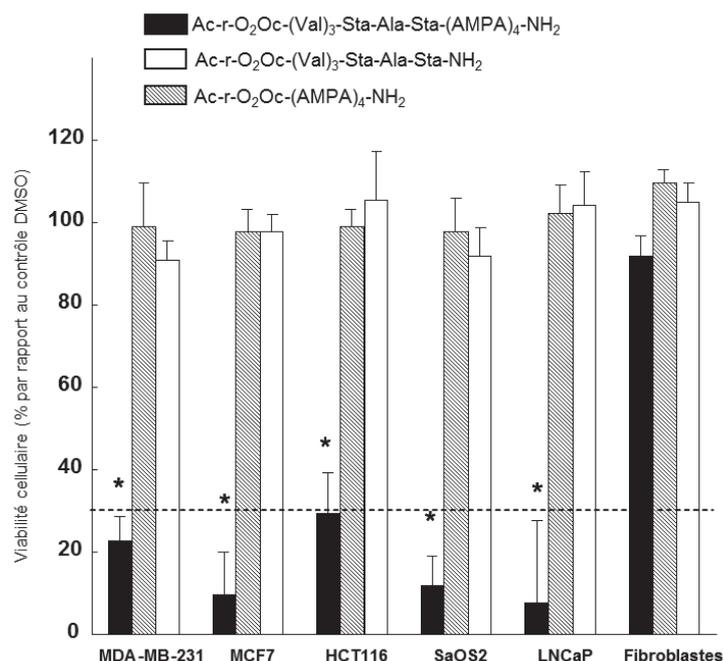


Figure 112 : Evaluation de la cytotoxicité de l'inhibiteur vectorisé (en noir), de l'analogue de la pepstatine (en blanc) et du vecteur seul (en hachuré) vis à vis de plusieurs lignées cancéreuses.

Les cellules sont incubées pendant 3 jours avec le composé **51** puis la viabilité cellulaire est évaluée par le test utilisant du MTT (méthode rapide de numération des cellules vivantes) et est représentée en % par rapport à la viabilité des cellules traitées par du DMSO (contrôle). L'ensemencement initial est représenté en pointillé. Toutes les lignées cancéreuses traitées par la pepstatine A vectorisée montrent un taux de survie inférieur ou équivalent à l'ensemencement initial. La pepstatine sans vecteur (**55**) et le vecteur seul (**56**) n'induisent aucune toxicité à la fois sur les lignées cancéreuses et sur les cellules saines. Ces résultats montrent que l'activité antiproliférative de la pepstatine est associée à sa capacité à traverser les membranes cellulaires et ainsi le rôle majeur de l'activité intracellulaire de la cathepsine D pour la prolifération des cellules tumorales. Afin de contrôler l'importance de l'adressage des inhibiteurs au niveau des lysosomes, deux dérivés de la pepstatine associés aux CPP, polyarginine (Arg8) et Pénétratine ont alors été synthétisés et testés.

Tableau 26 : Inhibition de l'activité protéolytique de la Cath D par différents bioconjugués.

Inhibition de l'activité protéolytique de la Cath D (en % par rapport au contrôle DMSO)		
Composés	10 <sup>-5</sup> M sur enzyme isolée	10 <sup>-5</sup> M sur cellules vivantes (MDA-MB-231)
<b>Bioconjugués</b>		
Ac-D-Arg-O <sub>2</sub> Oc-peps-(AMPA) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> ( <b>51</b> )	95 ± 2	94 ± 4
isoval-(Val) <sub>2</sub> -Sta-Ala-Sta-Pénétratine-NH <sub>2</sub> ( <b>57</b> )	90 ± 2	95 ± 2
isoval-(Val) <sub>2</sub> -Sta-Ala-Sta-(Arg) <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub> ( <b>58</b> )	93 ± 2	85 ± 4
<b>Contrôle négatif</b>		
Ac-D-Arg-O <sub>2</sub> Oc-(Val) <sub>3</sub> -Sta-Ala-Sta-NH <sub>2</sub> ( <b>55</b> )	92 ± 3	8 ± 14
Pepstatine A	95 ± 1	10 ± 10
DMSO	0 ± 9	0 ± 5

Les résultats d'internalisation (Tableau 26) et d'inhibition de la prolifération sur les cellules MDA-MB-231 (Figure 113 : Inhibition de la prolifération cellulaire sur des lignées de cellules du cancer du sein MDA-MB-231. Figure 113) montrent que les conjugués pepstatine-polyArg (**57**) et pepstatine-Pénétratine (**58**) sont capables de pénétrer à l'intérieur des cellules mais qu'ils n'exercent aucune activité antiproliférative.

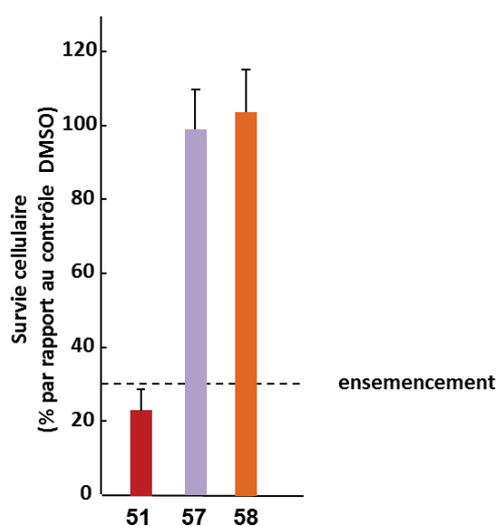


Figure 113 : Inhibition de la prolifération cellulaire sur des lignées de cellules du cancer du sein MDA-MB-231.

Des tests *in vivo* sur souris athymiques xéno greffées par des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 ont ensuite été réalisées avec le composé **51** et le composé **55** comme contrôle négatif. Dans ces expériences, les souris ont été traitées 20 jours après la greffe par des injections intra-péritonéales à 18 mg/kg du composé **51** ou du composé **55** pendant 48 jours. Les résultats ont montré que seul l'inhibiteur vectorisé entraîne une diminution de la taille des tumeurs et une réduction de l'incidence tumorale. Il est important de souligner que les souris traitées n'ont pas perdu de poids, indiquant une bonne tolérance du traitement<sup>14</sup>.

Afin d'approfondir ces résultats, mes travaux s'articulent autour de deux axes :

- D'une part la production du composé **51**, dont les résultats d'inhibition de la Cath D et l'activité antiproliférative *in vitro* et *in vivo* sont très prometteurs, en quantité importante pour de nouvelles études *in vivo* chez la souris.
- D'autre part, l'utilisation d'autres vecteurs de pénétration intracellulaire, en particulier d'un oligomère d' $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactame (Agl) pour adresser la pepstatine A dans le compartiment endolysosomal et étudier son effet sur la prolifération de cellules cancéreuses.

#### XIV.1. Synthèse d'un nouveau bio-conjugué

Les premiers résultats obtenus lors des études d'internalisation des composés poly-Agl-AA ont mis en avant le composé **44** FI-Ahx-(Agl-Phe)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>. Il est deux fois plus internalisé que le composé de référence **45** et à l'instar de la première génération de vecteurs, il cible le système endolysosomal. Afin d'évaluer sa capacité à vectoriser la pepstatine et à l'adresser dans le bon compartiment intracellulaire un nouveau bioconjugué incorporant la pepstatine a été synthétisé. Comme le composé **51**, il comprend une partie hydrophile en position N-terminale, pour augmenter la solubilité et l'oligomère de  $\gamma$ -lactame "(Agl-Phe)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>" en position C-terminale. Dans un premier temps son activité inhibitrice sur enzyme isolée et *in cellulo* a été évaluée. Il a ensuite été évalué pour sa capacité à inhiber la prolifération de cellules MDA-MB-231 de cancer du sein. Pour la synthèse de ce composé, une stratégie par fragment a été adoptée. Les parties vecteur et pepstatine portant le bras hydrophile sont préparées séparément sur support solide. Cette approche a été possible grâce à la présence d'un résidu statine, non épimérisable, en position C-terminale du constituant pepstatine. Après clivage de chaque entité de leur support respectif, les deux fragments sont couplés en solution.

Le vecteur **52** est synthétisé sur une résine Rink amide en suivant la stratégie de synthèse développée dans la première partie de ce travail (Schéma 16). Après l'obtention du peptide alternant des résidus Phe et Met, la réaction de multicyclisation est réalisée sur

support solide et l'oligomère est alors clivé du support par un traitement au TFA. Il a été utilisé pour le couplage en solution sans purification préalable.

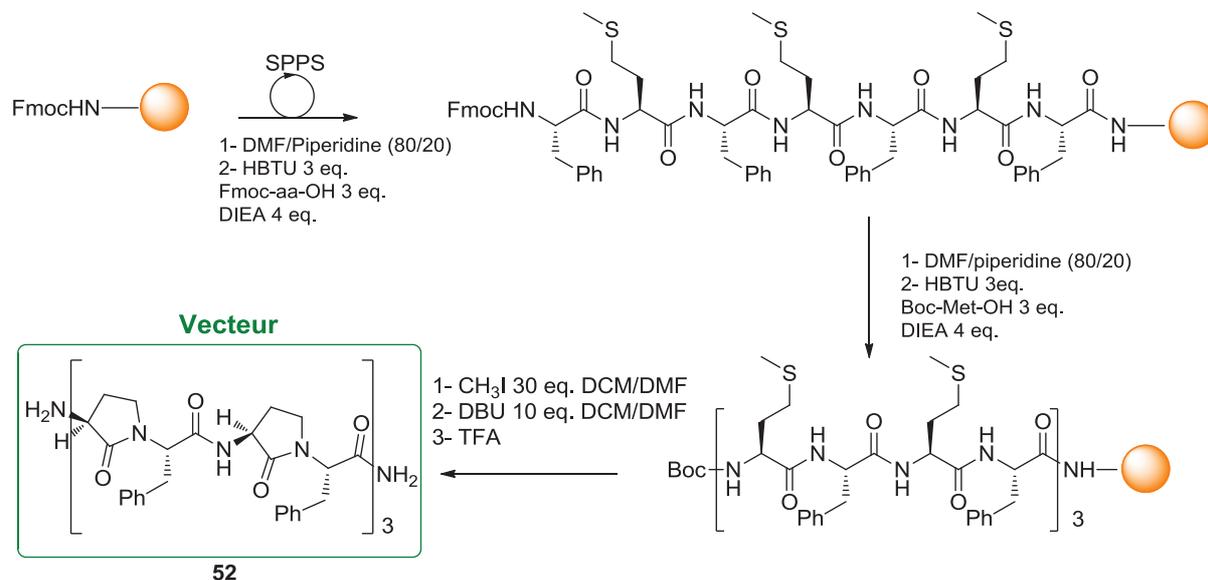


Schéma 16: Voie de synthèse du vecteur H-(Agi-Phe)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (composé 52).

Parallèlement, l'analogue de la pepstatine A portant une partie hydrosoluble est synthétisé sur résine chlorure de 2-chlorotriyle (Schéma 17). Cette résine a été choisie afin de libérer, du support solide, le dérivé pepstatine portant une fonction acide C-terminale qui permet d'effectuer le couplage avec la partie vecteur. Le peptide obtenu n'a pas été purifié avant le couplage en solution.

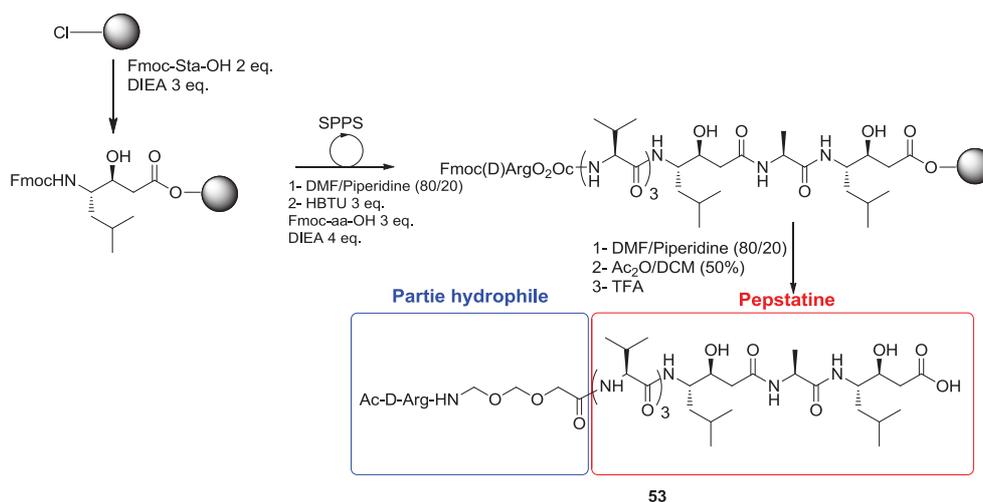


Schéma 17 : Synthèse sur support solide de Ac-D-Arg-O<sub>2</sub>Oc-(Val)<sub>3</sub>-Sta-Ala-Sta-OH (composé 53).

Ces deux fragments ont ensuite été couplés en solution à l'aide de BOP comme agent d'activation pour conduire au conjugué pepstatine (Composé **54**) avec un rendement de 7.8 % après purification. Le rendement faible est dû à une purification difficile du

composé. Une purification préalable de chaque fragment avant le couplage en solution pourrait améliorer ce rendement.

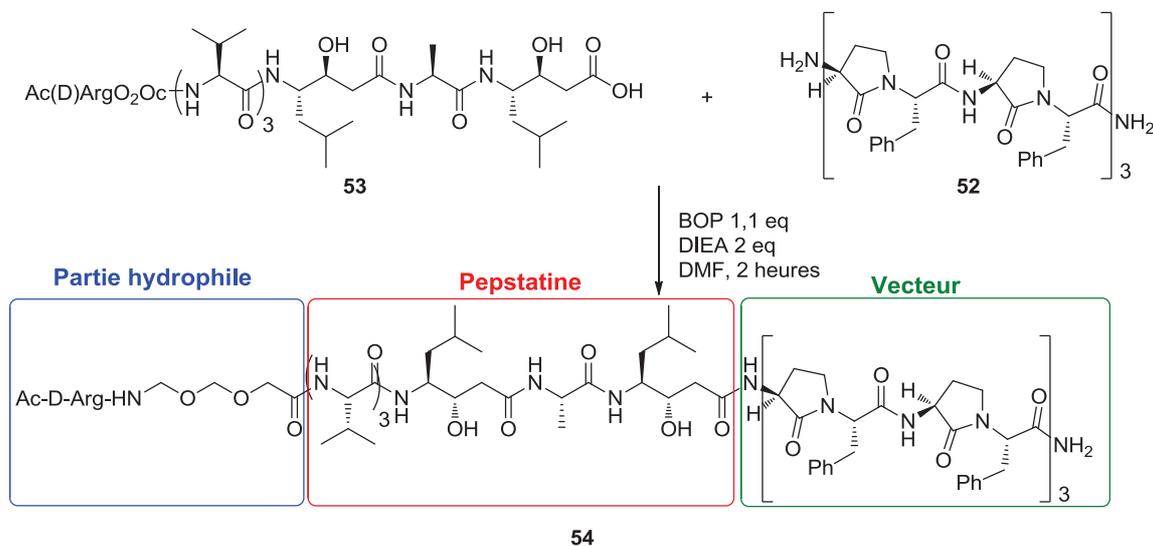


Schéma 18 : Synthèse par fragments en solution de la pepstatine A couplée à un hexamère AgI-Phe (composé **54**).

## XIV.2. Etudes d'inhibition et de cytotoxicité

Nous avons évalué l'inhibition de l'activité protéolytique de la Cath D par ce composé à  $10^{-5}$  M et  $10^{-8}$  M sur Cath D isolée puis à  $10^{-5}$  M sur cellules vivantes. Les résultats sont présentés dans le Tableau 27.

. Les valeurs d'inhibition du composé de référence **51**, de la Pepstatine A et de son analogue couplé à la partie hydrophile ainsi que le contrôle DMSO sont aussi intégrées à ce tableau pour comparaison.

Tableau 27 : Inhibition de l'activité protéolytique de la cathepsine D *in vitro* et *in cellulo*.

Inhibition de l'activité protéolytique de la Cath D (en % par rapport au contrôle DMSO)			
Composé	10 <sup>-5</sup> M sur enzyme isolée	10 <sup>-8</sup> M sur enzyme isolée	10 <sup>-5</sup> M sur cellules vivantes
<b>Inhibiteur de Cath D vectorisé</b>			
Ac-D-Arg-O <sub>2</sub> Oc-peps-(AMPA) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> ( <b>51</b> )	95 ± 2	93 ± 1	94 ± 4
Ac-D-Arg-O <sub>2</sub> Oc-peps-(Agl-Phe) <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub> ( <b>54</b> )	94 ± 2	91 ± 2	95 ± 2
<b>Contrôle négatif</b>			
Ac-D-Arg-O <sub>2</sub> Oc-(Val) <sub>3</sub> -Sta-Ala-Sta-NH <sub>2</sub> ( <b>55</b> )	92 ± 3		8 ± 14
Pepstatine A	95 ± 1	92 ± 1	10 ± 10
DMSO	0 ± 9	0 ± 8	0 ± 5

Le composé **54** inhibe l'activité protéolytique de la Cath D isolée ou *in cellulo* de manière équivalente au composé **51**. Par comparaison, la pepstatine A et son analogue inhibent effectivement la Cath D isolée mais sont incapables d'inhiber son activité dans des cellules vivantes. Suite à ces résultats, l'évaluation de la cytotoxicité de ce composé a été entreprise.

Les effets antiprolifératifs et cytotoxiques de ce composé ont été testés sur des cellules de cancer du sein MDA-MB-231. Nous avons utilisé le même protocole que pour la première étude de cytotoxicité. Les résultats obtenus sont donnés dans l'histogramme ci-dessous, ainsi que les résultats obtenus pour le composé **51**, la pepstatine A et son analogue portant la partie hydrophile.

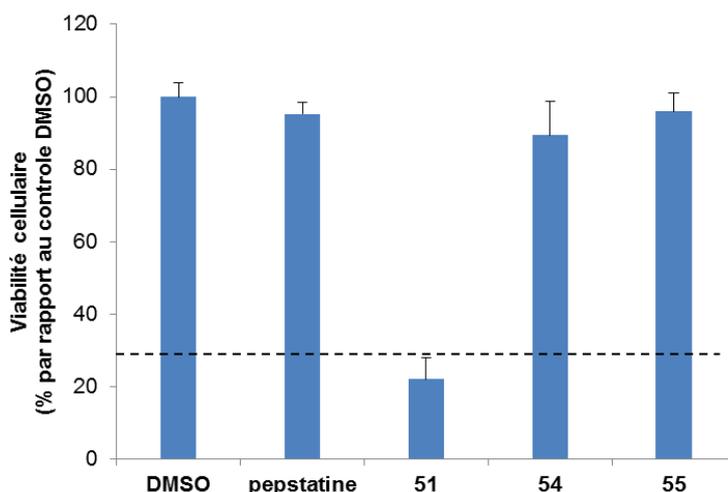


Figure 114 : Cytotoxicité sur cellules MDA-MB-231 du cancer du sein.

Comme attendu, la pepstatine A et l'analogue couplé à la partie hydrophile (composé **55**) ne sont pas cytotoxiques. Le composé **54** montre quant à lui, une très faible cytotoxicité avec moins de 10% de mort cellulaire. Par comparaison, le composé **51** entraîne près de 80% de mort cellulaire. En s'appuyant sur les résultats obtenus avec le conjugué **51**, l'inhibition de l'activité protéolytique intracellulaire de la cathepsine D par le conjugué **54** aurait dû entraîner l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses, ce qui n'est pas le cas. Ce résultat indique qu'un mécanisme plus complexe pour l'inhibition de l'activité de la prolifération cellulaire doit être mis en jeu. Il est possible que les composés **51** et **54** interagissent différemment avec la Cath D. Une étude plus approfondie est actuellement en cours dans le laboratoire afin de comprendre et de déterminer ces mécanismes.

## XV. Etude de l'effet de l'inhibition de la cathepsine D *in vivo*

Les études menées par l'équipe de M. Garcia sur des souris athymiques avec le composé **51** ont montré des résultats encourageants, aussi bien sur l'inhibition de la croissance tumorale que sur la tolérance au traitement. Fort de ces résultats, nous avons souhaité mener des études plus approfondies en faisant varier plusieurs paramètres. J'ai donc synthétisé le composé **51** en quantité importante pour pouvoir procéder à ces tests.

### XV.1. Synthèse de la pepstatine A vectorisée par l'AMPA<sub>4</sub>

La pepstatine A vectorisée (composé **51**) a été synthétisée sur support solide par SPPS classique avec une stratégie Fmoc/tBu avec un rendement final après purification de 10 %.

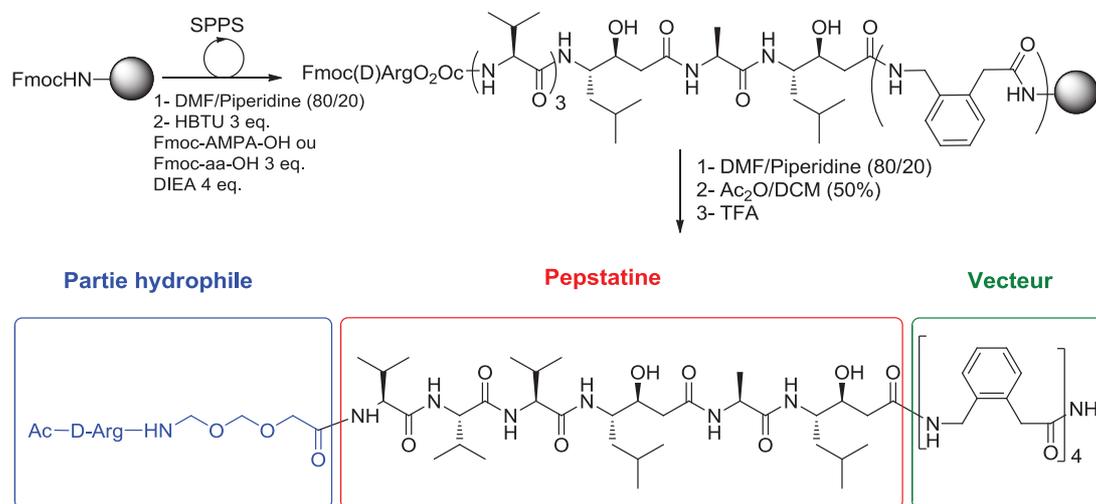


Schéma 19 : Voie de synthèse de l'inhibiteur de cathepsine D vectorisé et couplé à une partie hydrophile.

Lors de cette synthèse, deux difficultés sont apparues. En effet, lors du clivage en présence de TFA, les résidus statine peuvent subir deux réactions secondaires : un transfert N-O acylique et une estérification de la fonction hydroxyle par l'acide trifluoroacétique.

#### XV.1.1. Transfert N-O acylique

Lors du clivage en présence de TFA, une réaction de transfert N-O acylique de l'ordre de 10% est observée entre le groupement hydroxyle de la statine et l'amine de la liaison amide du résidu côté N-terminal (Schéma 20). Cette réaction étant réversible en milieu basique, des conditions ont été mises au point pour pouvoir récupérer la séquence native.



et 'c' représentent le diamètre de la tumeur. A l'issu du traitement, les souris sont sacrifiées, les organes rassemblés et pesés.

Deux données sont mesurées à l'issu de cette étude, l'évolution du volume tumoral en fonction du temps et de la dose de composé injecté, ainsi que l'effet du traitement sur le poids de la souris et de ses organes.

### XV.2.1. Evolution du volume tumoral

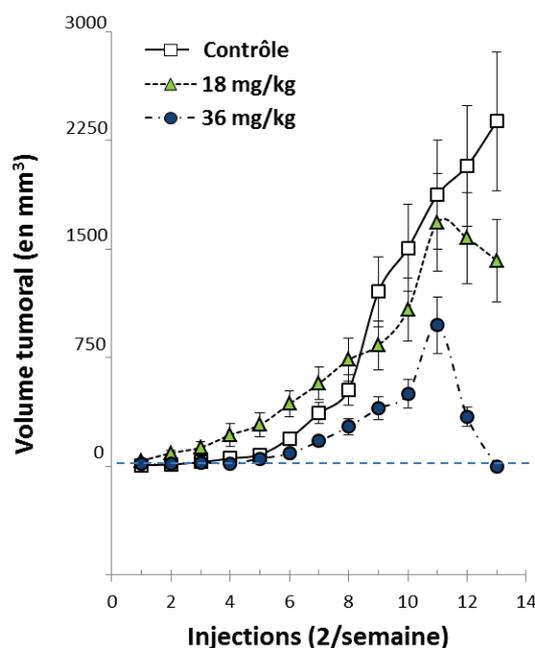


Figure 115 : Evolution du volume tumoral en fonction du temps et du traitement.

Pour les souris contrôle (Figure 115,) le volume tumoral a augmenté de manière constante jusqu'à atteindre un volume de 2250 mm<sup>3</sup> au bout de 7 semaines d'expérimentation.

Pour les souris traitées avec le composé **51** à 18 mg/kg (groupe 2), le volume tumoral, a diminué à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine, contrairement au groupe contrôle. Au bout de 7 semaines, les tumeurs ont un volume inférieur à 1500 mm<sup>3</sup>, le volume moyen du groupe contrôle au même moment est 1,5 fois plus important.

Pour les souris traitées avec 36 mg/kg de composé **51**, le volume tumoral est toujours inférieur à celui du groupe contrôle et du 2<sup>ème</sup> groupe tout au long de l'étude et n'a pas dépassé 1300 mm<sup>3</sup>. Enfin, après la 5<sup>ème</sup> semaine de traitement, le volume tumoral a diminué jusqu'à disparition totale des tumeurs au bout de la 7<sup>ème</sup> semaine.

La tolérance et l'impact des traitements sur les différents organes des souris sont ensuite évalués.

### XV.2.2. Evaluation de l'impact du traitement sur les souris

Après les 7 semaines de traitement, les souris sont sacrifiées, les organes rassemblés et pesés. Leurs poids moyens sont comparés à ceux du groupe contrôle et sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 28 : Poids moyens des organes des trois groupes de souris.

Groupe (traitement 2 fois par semaines)	Poids de l'organe (g)				
	Cœur	Foie	Poumon	Rein	Rate
<b>1 (Contrôle)</b>	0.12 ± 0.02	1.22 ± 0.13	0.19 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.16 ± 0.05
<b>2 (18 mg/kg)</b>	0.12 ± 0.02	1.35 ± 0.20	0.17 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.22 ± 0.07
<b>3 (36 mg/kg)</b>	0.14 ± 0.03	1.41 ± 0.29	0.19 ± 0.02	0.41 ± 0.08	0.22 ± 0.13

Lors d'un traitement thérapeutique, les changements de poids importants (diminution ou augmentation) peuvent être associés à une mauvaise tolérance de la part du sujet.

Dans notre étude, le traitement par le composé **51** à 18 ou 36 mg/kg n'a pas d'influence sur le poids des différents organes des souris et l'augmentation du dosage est bien supportée. D'autres études d'absorption, distribution, métabolisation et excrétion (ADME) sont actuellement en cours dans l'équipe de B. Deprez (Institut Pasteur de Lille) afin d'approfondir les résultats que nous avons obtenus à ce jour. Les faibles variations observées sont imputables aux différences de poids des souris elles-mêmes et sont non significatives.

Lorsque les souris sont sacrifiées en fin d'étude, nous avons observé pour les groupes 2 et 3, la présence de masses graisseuses différentes du tissu tumoral. Les souris du groupe **1** n'ont pas d'amas graisseux ce qui nous laisse penser que l'apparition de ce tissu serait dû aux administrations du composé **51** (Figure 116).

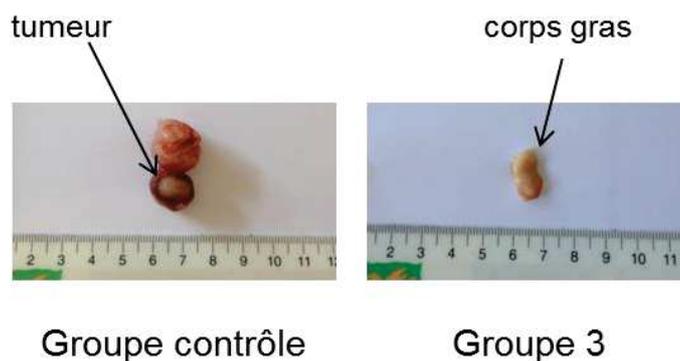


Figure 116 : Photographie montrant l'aspect d'une tumeur provenant d'une souris du groupe contrôle et d'un tissu provenant d'une souris du groupe 3.

La tumeur prélevée dans une souris du groupe contrôle est très vascularisée, avec une structure dense et un volume assez important. Ces différentes caractéristiques sont typiques des tissus tumoraux. Le prélèvement effectué dans une souris du groupe 3 en revanche, ne montre pas de vascularisation, possède une structure et un aspect souple et malléable et un volume très inférieur. Les premières coupes histologiques effectuées sur ce tissu sont colorées avec un colorant (oil red o), spécifique des corps lipidiques. Ce tissu est coloré en rouge après incubation avec l'oil red o alors que la tumeur ne l'est pas. D'autres études histologiques sont actuellement en cours afin de déterminer la composition exacte de ce tissu.

### XV.3. Conclusion

Ces études *in vivo* confirment les effets antiprolifératif et cytotoxique de l'inhibiteur vectorisé. Si le traitement à 18 mg/kg inhibe la croissance tumorale, le traitement à 36 mg/kg empêche la croissance des tumeurs et entraîne leur disparition après 48 jours de traitement. Le traitement est bien supporté par les souris et n'a pas entraîné de perte de poids.

Les résultats obtenus avec le composé **51** administré à 36 mg/kg sont très encourageants mais méritent d'être approfondis. Pour cela de nouvelles études *in vivo* sont en cours. Ces travaux sont réalisés avec les lignées cellulaires du cancer du colon HCT-116 et deux modes d'administration vont être comparés (intra péritonéal et intra tumoral). Ceci permettra de compléter et de valider l'effet antiprolifératif du composé **51** *in vivo*

L'oligomérisation des différents mimes contraints de dipeptides, le (3S)-amino-5-carbonylméthyl-2,3-dihydro-1,5-benzothiazépine-4(5H)-one (**DBT**), l'acide aminométhylphénylacétique (**AMPA**) ou les  $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames (**Agl-AA**) a permis d'obtenir des composés structurés capables de traverser les membranes cellulaires et pour l'un d'entre eux d'identifier un bioconjugué capable d'inhiber la prolifération de cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*.

Dans un premier volet de ma thèse, j'ai synthétisé une série d'oligomères de DBT dont la structure secondaire a été étudiée par RMN et cristallographie des rayons X. Ces molécules adoptent une structure en ruban de type coude  $\beta$  stabilisée par des liaisons hydrogène entre la fonction carbonyle du résidu  $i$  et le proton amide du résidu  $i+1$  formant des pseudocycles  $C_{10}$ .

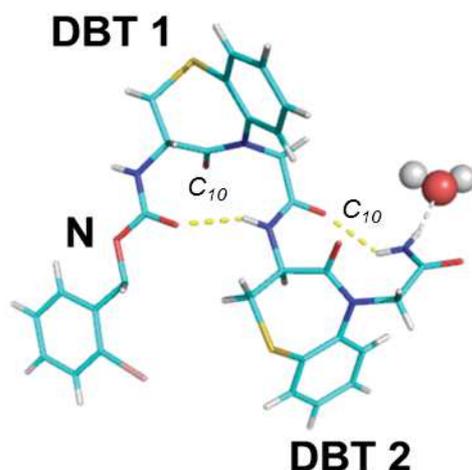
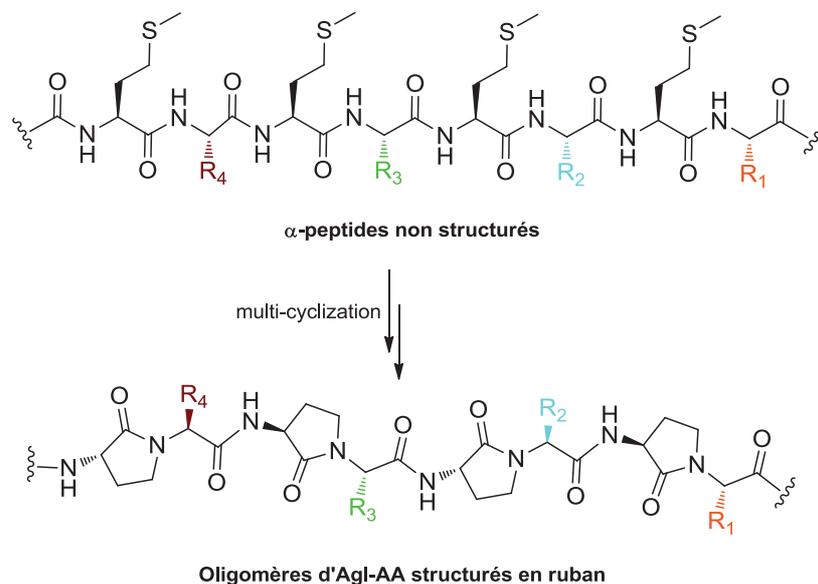


Figure 117 : Structure cristalline de l'oligomère 2-BrZ-DBT<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

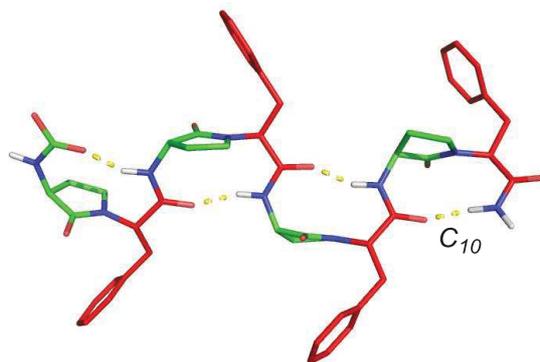
Ces composés montrent des propriétés biologiques intéressantes, principalement comme vecteurs favorisant la pénétration intracellulaire. Afin de développer de nouveaux oligomères plus versatiles inspirés des DBT, j'ai utilisé un autre mime de coude  $\beta$  II', l' $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactame pour la synthèse d'oligomères. En effet, les caractéristiques structurales intrinsèques de ce mime de coude  $\beta$  et la versatilité apportée par les aminoacides qui les constituent, nous ont permis de développer de nouveaux foldamères, capables comme les polyDBT d'adopter une structure secondaire en ruban de type coude  $\beta$ . Une stratégie de synthèse sur support solide à la fois originale et simple a été élaborée afin d'obtenir des oligomères d'Agl-AA. Elle consiste en la conversion directe de séquences peptidiques en oligomères d' $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames (oligomères **Agl-AA**). Ces séquences synthétisées selon une stratégie classique de synthèse peptidique sur support solide alternent des résidus méthionine et des acides aminés d'intérêt. Une fois le peptide obtenu une réaction de

multicyclisation, étape clé de la synthèse, permet d'obtenir sur support solide l'oligomère désiré.



**Figure 118 : Synthèse des poly(AgI-AA) par une réaction de multicyclisation.**

Grâce à cette méthode, différents oligomères d'AgI-AA ont été synthétisés : des oligomères hydrophobes, cationiques et amphipatiques. Ils ont été étudiés par différentes analyses spectroscopiques (RMN, RX, CD et IR). Ces analyses, menées dans des solvants organiques et dans l'eau, ont permis de déterminer la structure de ces composés. Comme les oligomères de DBT, tous adoptent une structure secondaire en ruban de type coude  $\beta$  stabilisée par des liaisons hydrogène entre les résidus  $i$  et  $i+2$  formant des pseudo-cycles à 10 chaînons  $C_{10}$ . Tous ces oligomères possèdent la même signature dichroïque dans le méthanol comme dans l'eau, avec un minimum à 220 nm et un maximum à 192 nm. Les chaînes latérales, qu'elles soient aromatiques ou cationiques sont réparties de part et d'autre de la chaîne principale. La modulation et le positionnement spatial des chaînes latérales sont directement contrôlés par la séquence peptidique native.



Oligomères d'Agl-Phe

Figure 119 : Structure de plus basse énergie de l'oligomère (Agl-Phe)<sub>4</sub>.

Les propriétés biologiques de ces foldamères ont ensuite été évaluées, en particulier en tant que vecteurs de pénétration intracellulaire. Pour cela, des oligomères d'Agl-AA couplés à une sonde fluorescente ont été synthétisés. L'efficacité de ces oligomères à pénétrer dans les cellules MDA-MB-231 de cancer du sein a été comparée à celle de l'oligomère DBT<sub>4</sub>. Parmi eux, plusieurs composés ont montré une internalisation supérieure à ce composé de référence et sont adressés au compartiment endolysosomal. Cette localisation spécifique est d'un intérêt majeur pour la délivrance de la pepstatine, un puissant inhibiteur de la cathepsine D (Cath D), dont l'utilisation est fortement limitée par sa très faible capacité d'internalisation. Cette protéase endolysosomale est surexprimée dans un grand nombre de cancers et l'inhibition de son activité protéolytique permet d'obtenir des effets cytotoxiques intéressants. En effet, nous avons montré dans des expériences antérieures qu'un conjugué associant la pepstatine à un oligomère d'AMPA<sub>4</sub> (composé **51**) avait un effet antiprolifératif puissant *in vitro* sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses et *in vivo* sur des tumeurs de souris. En poursuivant ce travail, nous avons développé un nouveau bioconjugué associant cette fois la pepstatine à un hexamère d'Agl-Phe ((Agl-Phe)<sub>6</sub>) capable de pénétrer dans les cellules avec une très grande efficacité et d'atteindre les lysosomes. Si ce composé est capable d'inhiber l'activité protéolytique de la Cath D *in vitro* et *in cellulo* avec des résultats équivalents au conjugué pepstatine-AMPA<sub>4</sub>, nous n'avons obtenu qu'une très faible cytotoxicité sur les cellules cancéreuses. Cette différence surprenante de cytotoxicité peut provenir d'un mécanisme d'inhibition différent entre la pepstatine vectorisée par les poly(Agl-Phe) ou les polyAMPA. Un travail de recherche est aujourd'hui en cours afin de comprendre ces résultats et d'étudier plus en profondeur les mécanismes conduisant à l'effet antiprolifératif des inhibiteurs de la Cath D.

Parallèlement, les poly(Agl-AA) vont être appliqués à la vectorisation d'autres principes actifs et en particulier de SiRNA.

Enfin, la synthèse en quantité importante du conjugué pepstatine-AMPA<sub>4</sub> a permis de mener de nouvelles études *in vivo* sur la souris. Ce bioconjugué a été injecté en intra-tumoral à 18 mg/kg et 36 mg/kg chez des souris knock-out auxquelles ont été greffées des cellules du cancer du sein MDA-MB-231. L'expérience a été menée pendant sept semaines et le traitement à 36 mg/kg a permis la réduction du volume tumoral jusqu'à sa disparition. Ces concentrations n'ont pas entraîné de perte de poids des souris ou de leurs organes, indiquant une bonne tolérance pour ce composé. Lors de cette étude, il a été constaté la présence d'une substance blanche apparentée à un corps lipidique à la place de la tumeur sur les souris traitées à 36 mg/kg.

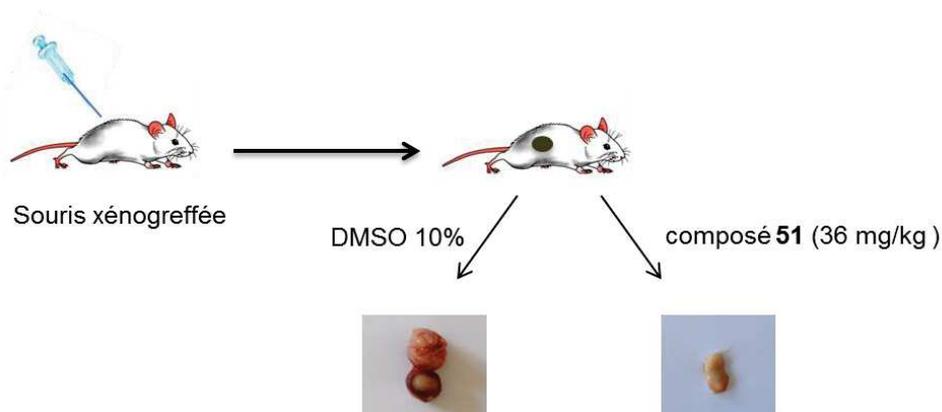


Figure 120 : Expériences *in vivo* chez la souris.

Des coupes histologiques et des colorations ont été entreprises afin de déterminer la nature exacte de cette substance. D'autres expériences sur des souris greffées avec des cellules du cancer du côlon (HCT-116) traitées par des injections intra-péritonéales et intra-tumorales sont actuellement en cours.

- (1) Pawley, B. J. Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd Ed. By James B. Pawley, Editor. Springer Science. *Scanning* **2007**, 29, 91–91.
- (2) Jullian, M.; Hernandez, A.; Maurras, A.; Puget, K.; Amblard, M.; Martinez, J.; Subra, G. N-Terminus FITC Labeling of Peptides on Solid Support: The Truth behind the Spacer. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 260–263.
- (3) Zhang, A. J.; Russell, D. H.; zhu, J.; Burgess, K. A Method for Removal of N-BOC Protecting Groups from Substrates on TFA-Sensitive Resins. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7439–7442.
- (4) Lättig-Tünnemann, G.; Prinz, M.; Hoffmann, D.; Behlke, J.; Palm-Apergi, C.; Morano, I.; Herce, H. D.; Cardoso, M. C. Backbone Rigidity and Static Presentation of Guanidinium Groups Increases Cellular Uptake of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides. *Nat. Commun.* **2011**, 2, 453.
- (5) Okuyama, M.; Laman, H.; Kingsbury, S. R.; Visintin, C.; Leo, E.; Eward, K. L.; Stoeber, K.; Boshoff, C.; Williams, G. H.; Selwood, D. L. Small-Molecule Mimics of an Alpha-Helix for Efficient Transport of Proteins into Cells. *Nat. Methods* **2007**, 4, 153–159.
- (6) Prochiantz, A. Getting Hydrophilic Compounds into Cells: Lessons from Homeopeptides. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1996**, 6, 629–634.
- (7) Delaroche, D.; Aussedat, B.; Aubry, S.; Chassaing, G.; Burlina, F.; Clodic, G.; Bolbach, G.; Lavielle, S.; Sagan, S. Tracking a New Cell-Penetrating (W/R) Nonapeptide, through an Enzyme-Stable Mass Spectrometry Reporter Tag. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 1932–1938.
- (8) Rydberg, H. A.; Matson, M.; Åmand, H. L.; Esbjörner, E. K.; Nordén, B. Effects of Tryptophan Content and Backbone Spacing on the Uptake Efficiency of Cell-Penetrating Peptides. *Biochemistry (Mosc.)* **2012**, 51, 5531–5539.
- (9) Vetvicka, V.; Vetvickova, J.; Fusek, M. Effect of Procathepsin D and Its Activation Peptide on Prostate Cancer Cells. *Cancer Lett.* **1998**, 129, 55–59.
- (10) Bazzett, L. B.; Watkins, C. S.; Gercel-Taylor, C.; Taylor, D. D. Modulation of Proliferation and Chemosensitivity by Procathepsin D and Its Peptides in Ovarian Cancer. *Gynecol. Oncol.* **1999**, 74, 181–187.
- (11) Vashishta, A.; Ohri, S. S.; Proctor, M.; Fusek, M.; Vetvicka, V. Role of Activation Peptide of Procathepsin D in Proliferation and Invasion of Lung Cancer Cells. *Anticancer Res.* **2006**, 26, 4163–4170.
- (12) Liaudet-Coopman, E.; Beaujouin, M.; Derocq, D.; Garcia, M.; Glondu-Lassis, M.; Laurent-Matha, V.; Prébois, C.; Rochefort, H.; Vignon, F. Cathepsin D: Newly Discovered Functions of a Long-Standing Aspartic Protease in Cancer and Apoptosis. *Cancer Lett.* **2006**, 237, 167–179.

- (13) Lubomir, V. Synthesis, Structural and Biological Analysis of Organized Biomimetic Systems, Università degli Studi di Napoli Federico II, 2010.
- (14) Maynadier, M.; Vezenkov, L. L.; Amblard, M.; Martin, V.; Gandreuil, C.; Vaillant, O.; Gary-Bobo, M.; Basile, I.; Hernandez, J.-F.; Garcia, M.; et al. Dipeptide Mimic Oligomer Transporter Mediates Intracellular Delivery of Cathepsin D Inhibitors: A Potential Target for Cancer Therapy. *J. Controlled Release* **2013**, *171*, 251–257.

All amino acid derivatives were purchased from Iris Biotech. The other chemicals were purchased from: commercial suppliers, Iris Biotech, Senn Chemicals, Merck, Carlo Erba, Fluka, Riedel-de Haën, Sigma Aldrich, Acros Organics, FluoroChem and VWR Prolabo. The 2-chlorotrityl chloride resin (100-200 Mesh, 1.40 mmol/g Cl/g resin) was purchased from Iris Biotech, stored at 4°C and dried under vacuum at least 24 hours before use. Fmoc Rink amide amino methyl polystyrene resin (100-200 mesh, 0.45 mmol/g) was purchased from SENN chemicals, Gentilly, France. Fluorescein isothiocyanate (FITC) was purchased from Sigma-Aldrich, Lyon, France. The solvents used for HPLC and LC/MS were of HPLC grade. All final compounds were purified by reversed-phase HPLC and the purity assessed by analytical reversed-phase HPLC was found superior to 98 %.

### ▪ X-ray diffraction

---

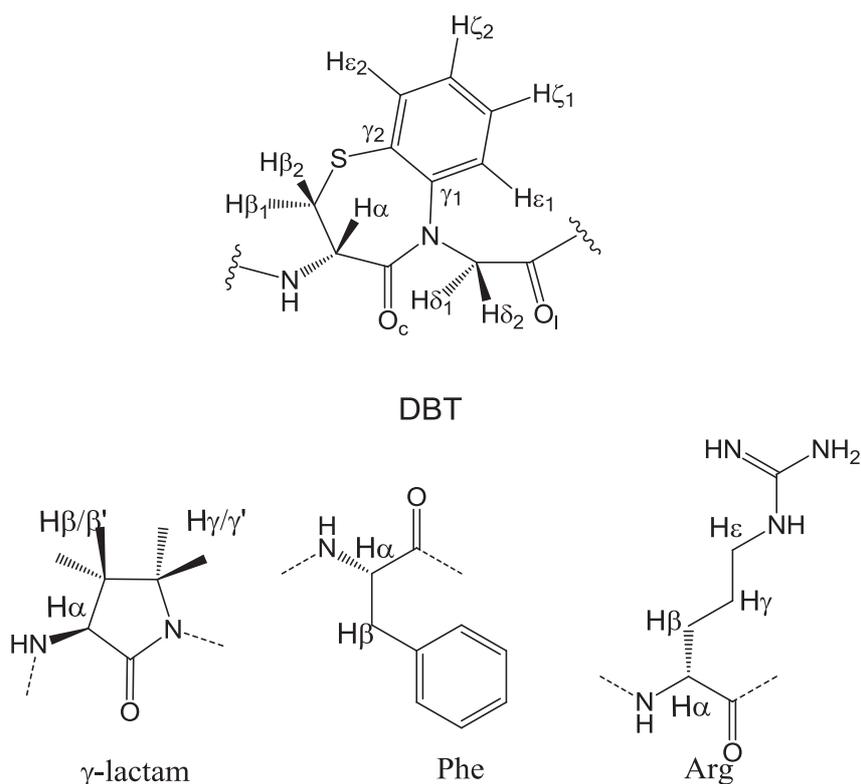
X-ray data of compound **23** were collected at 100 K with an Oxford Diffraction Xcalibur 2 diffractometer equipped with a copper microsource ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ). Diffraction data were processed using CrysAlis RED (Oxford Diffraction, **2003**). The structures were solved by direct methods with SIR2004<sup>1</sup> and the crystallographic refinements were conducted using SHELXL-97<sup>2</sup>. In the refinement of **23**, contributions of disordered solvent molecules were tentatively attenuated from the diffraction data with PLATON using the SQUEEZE procedure<sup>3</sup>.

### ▪ Nuclear magnetic resonance

---

The NMR samples contained 5-10 mM of compounds dissolved in CD<sub>3</sub>OH or/and pyridine *d*<sub>5</sub>. All spectra were recorded in the laboratoire de mesure physique de l'Université Montpellier 2 on a Bruker Avance 600 AVANCE III spectrometer equipped with a 5 mm triple-resonance cryoprobe (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N). 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 256-700 real (*t*<sub>1</sub>) × 2048 (*t*<sub>2</sub>) complex data points; 8-64 scans per *t*<sub>1</sub> increment with 1.0-1.5 s recovery delay and spectral width of 6009 Hz in both dimensions were used. The mixing times were 60 ms for TOCSY and 450 ms for the ROESY experiments. In addition, 2D heteronuclear spectra <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C-HSQC and <sup>13</sup>C-HSQC-TOCSY were acquired to fully assign residues (8-32 scans, 256-512 real (*t*<sub>1</sub>) × 2048 (*t*<sub>2</sub>) complex data points). Spectra were processed with Topspin (Bruker Biospin) and visualized with Topspin or NMRview on a Linux station. The matrices were zero-filled to 1024 (*t*<sub>1</sub>) × 2048 (*t*<sub>2</sub>) points after apodization by shifted sine-square multiplication and linear prediction in the F1 domain. Chemical shifts were referenced to the tetramethylsilane (TMS).

The following nomenclature was used for the motifs atoms.



## ▪ Structure calculations

$^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts were assigned according to classical procedures. NOE cross-peaks were integrated and assigned within the NMRView software<sup>4</sup>. The volumes of NOE peaks between methylene pair protons were used as reference of 1.8 Å. The lower bound for all restraints was fixed at 1.8 Å and upper bounds at 2.7, 3.3 and 5.0 Å, for strong, medium and weak correlations, respectively. Pseudo-atoms corrections of the upper bounds were applied for unresolved aromatic, methylene and methyl protons signals as described previously<sup>5</sup>. Structure calculations were performed with AMBER 10<sup>6</sup> in two stages: cooking, simulated annealing in vacuum. The cooking stage was performed at 1000 K to generate 100 initial random structures. SA calculations were carried during 20 ps (20000 steps, 1 fs long) as described elsewhere. First, the temperature was risen quickly and was maintained at 1000 K for the first 5000 steps, then the system was cooled gradually from 1000 K to 100 K from step 5001 to 18000 and finally the temperature was brought to 0 K during the 2000 remaining steps. For the 3000 first steps, the force constant of the distance restraints was increased gradually from 2.0 kcal.mol<sup>-1</sup>.Å to 20 kcal.mol<sup>-1</sup>.Å. For the rest of the simulation (step 3001 to 20000), the force constant is kept at 20 kcal.mol<sup>-1</sup>.Å. The 20 lowest energy structures with no violations > 0.3 Å were considered as representative of the compound

structure. The representation and quantitative analysis were carried out using MOLMOL<sup>7</sup> and PyMOL (Delano Scientific).

### ▪ *Fourier transformation infra-red spectroscopy*

---

FTIR analyses were performed on a Tensor 27 (Brucker) spectrometer. Sample were dissolved at 1 mM concentration in chloroform and transferred in liquid cell with NaCl windows of 3 mm thickness with a 500  $\mu\text{m}$  teflon brace. Spectra were recorded with 128 scans and baseline was corrected by subtracting the solvent spectrum. Different brace thickness were tested and the chosen configuration corresponds to the minimal concentration (1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for which the signal remain exploitable in term of Signal-to-noise ratio S/N (S/N (Peak to peak) =  $4\times 10^{-5}$ , S/N (quadratic mean (RMS)) =  $1\times 10^{-5}$  between 2000 and 2100  $\text{cm}^{-1}$ ). Below this value, significant compensation problems between solvent spectral bands used as reference and sample spectrum appear.

### ▪ *Circular dichroism*

---

Circular dichroism spectra were obtained on a JASCO J815 spectropolarimeter with a peltier effect regulating temperature device. Sample were dissolved at 100 and 200  $\mu\text{M}$  concentration in methanol and water and transferred in cuve with an optical pathway of 1 mm. Spectra were recorded in far UV (190 to 260 nm) at 20°C, 55°C and 90°C with a continuous scanning mode, a response time of 1 second with a step of 0.2 nm and a bandwidth of 2 nm. Signal over noise have been enhanced by taking the average value of two spectra for each analysis. Baseline was corrected by subtracting the solvent spectrum (Water or methanol).

### ▪ *Analysis of the compounds*

---

The HPLC system consisted of a Waters Alliance 2690 HPLC. All the analyses were carried out using a RP C18 monolithic Onyx Phenomenex 25 x 4.6 mm column. A flow rate of 3 mL/min and a gradient of (0–100)% B over 3 min were used. Eluent A: water/0.1% formic acid; eluent B: acetonitrile/0.1% formic acid. The detection was performed at 214 nm.

## ▪ **LC/MS Analyses**

---

The LC/MS analyses were performed with a LC/MS system consisting of a Waters Alliance 2690 HPLC, coupled to a Waters-Micromass ZQ spectrometer (electrospray ionization mode, ESI+). All the analyses were carried out using a RP C18 monolithic Onyx Phenomenex 25 x 4.6 mm column. A flow rate of 3 mL/min and a gradient of (0–100)% B over 3 min were used. Eluent A: water/0.1% formic acid; eluent B: acetonitrile/0.1% formic acid. Positive ion electrospray mass spectra were acquired at a solvent flow rate of 100–500  $\mu$ L/min. Nitrogen was used for both the nebulizing and drying gas. The data were obtained in a scan mode in 0.1s intervals; 10 scans were summed up to get the final spectrum.

### ▪ **Cell preparation and Treatment with fluorescent oligomers**

---

We used 1 mM stock solutions of compounds dissolved in DMSO that were further diluted with serum-free medium to obtain a final concentration of  $10^{-5}$  M. All compounds were protected from light during the experiments, and their fluorescence values were regularly verified. Human breast cancer MDA-MB-231 cells were maintained in monolayer cultures in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamycin at 37 °C in 5%  $\text{CO}_2$ . One day prior to the experiment, cells were harvested using trypsin in phosphate-buffered saline (PBS), centrifuged, and resuspended with culture medium. The suspension containing  $10^6$  cells/mL was transferred into plastic 24-well plates (Becton Dickinson, Le Pont De Claix, France) (200  $\mu\text{L}/\text{well}$ ) and incubated overnight until they reached >90% confluency. On the day of the experiment, the culture medium was removed, and the cells were washed once with phenol red-free DMEM. Then, 200  $\mu\text{L}$  of DMEM containing  $10^{-5}$  M of compounds was dispersed on cells. Experiments were carried out in triplicate for each compound. To determine the amount of compounds assimilated by cells, including membrane-bound fractions, cells were washed twice with PBS. To determine the amount of internalized compounds, cells were washed with PBS and then treated for 5 min with 30  $\mu\text{L}$  of a solution containing 0.5 mg/mL trypsin. After trypsinization, cells were resuspended in phenol red-free DMEM and centrifuged for 5 min at 800 g. Adherent cells or cell pellets were lysed in 200  $\mu\text{L}$  of cell culture lysis reagent (Promega, Charbonnières, France). After 30 min of incubation at room temperature, 200  $\mu\text{L}$  of distilled water was added before analysis on a Victor 3V spectrofluorimeter (Perkin Elmer, MA, USA), with the excitation wavelength adjusted to 485 nm and emission measured at 530 nm. All fluorescence values were normalized according to the fluorescence intensity of each compound at  $10^{-5}$  M in lysis buffer in the presence of  $2 \times 10^5$  cells.

---

## ▪ *Inhibition of the Cathepsin D*

---

### Cell Line, Culture and Products

---

MDA-MB-231 was cultured in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Fisher Scientific, France), 100 U. ml<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg.ml<sup>-1</sup> streptomycin at 37°C. Pepstatine was from Sigma Aldrich Chimie (France). Stock solutions of compound were dissolved at 1 mM in DMSO. For experiment, compounds were further diluted with serum-free medium to obtain a final concentration of 10<sup>-5</sup> M.

### Cathepsin D proteolytic activity detection

---

To detect Cath D protease activity, Förster resonance energy transfer (FRET) was used. A fluorophore (EDANS) and a quencher (DABCYL) dye were coupled to the N- and C-terminal ends of a peptide substrate highly selective for Cath D. On intact peptides, the emission energy of the fluorophore was captured by the quencher. Following cleavage of the substrate, the quencher is no longer able to absorb the fluorescent energy of the fluorophore, and this increase in fluorescence was measured. The FRET substrate for Cath D [DABCYL-βAla-Arg-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Asp(EDANS)-NH<sub>2</sub>] was not commercially available and was synthesized according to standard procedures. The peptide sequence used was reported to be cleaved by Cath D, but not by other cathepsins<sup>10</sup>. In the first case, 250 ng purified recombinant human Cath D was incubated in 0.1 M citrate buffer pH 3.5 with 10 µM compounds as described<sup>10</sup>. In the second case, the compounds were incubated for 24 h with living cells, then the cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and lysed and then supernatants were used for FRET analysis. The substrate (final concentration = 5 µM) was then incubated at 37 °C with cell lysate supernatants (20 µL) at pH 3.5.

After 90 min, the plate was read in a PerkinElmer 1420 Victor 2 fluorescent plate reader at λ<sub>exc</sub> = 355 nm and λ<sub>em</sub> = 538 nm. The background fluorescence of the FRET substrate was later subtracted out. Results were presented as percent of inhibition of Cath D activity.

### Cell outgrowth assay

---

Briefly, 5,000 subconfluent cells were seeded in 96-well plates. The day after seeding, cells were treated with the indicated concentration of compounds in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). 4 days after treatment, cells were quantified using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) assay (200 µg/mL MTT for 4 h). After 4 h, the MTT/media solution was removed, and the precipitated crystals were dissolved in ethanol/DMSO (1/1). The solution absorbance was read at 540 nm.

### Cell culture for cancer cell injection in mice

---

Human breast MDA-MB-231 cancer cell lines were purchased from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Cancer cell types were allowed to grow in humidified atmosphere at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>. MDA-MB-231 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS).

### Tumor growth in athymic mice

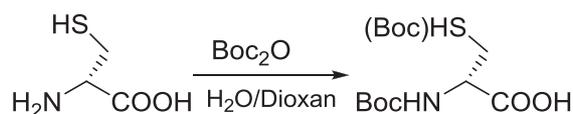
---

Female 6-week Swiss nude mice (nu-/nu-) (Charles River, France) were housed and cared in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and monitored routinely for evidence of disease. Mice were injected s.c. under the second mammary fat with  $2.5 \times 10^6$  MDA-MB-231 cells and were treated after the onset of tumors (34 days after cell implantation) with compound **51** (intratumoral injection of 18 mg/kg and 36 mg/kg body weight, twice per week) or vehicle alone for 48 days. Mice were weight twice per week and tumor volume was determined and calculated using the formula  $V = 4/3 * \pi * (a/2 * b/2 * c/2)$ , in which 'a', 'b' and 'c' represent the tumor diameters. At the end of the experiment, the mice were sacrificed and the organs were collected and weighted.

## Synthesis of Fmoc-DBT-OH and Fmoc-AMPA-OH

### ▪ *Fmoc DBT-OH synthesis*

#### Boc-(D)-Cys-OH



H-(D)-Cys-OH.HCl (20.0 g, 125.79 mmol, 1 eq) was dissolved in a mixture of 150 ml of H<sub>2</sub>O and 150 ml dioxane in a flask. The TEA (34.90 ml, 251.57 mmol, 2 eq, d =0.728) was added and the reaction mixture was cooled down to 0°C with an ice bath. Boc<sub>2</sub>O (41.14 ml, 188.68 mmol, 1.5 eq, d =1.01) was dissolved in 50ml of dioxane and then added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for four hours. Then 200 ml of the reaction mixture were evaporated under reduced pressure. The remaining solution was acidified to pH 3 by 1M solution of KHSO<sub>4</sub> and the aqueous phase was extracted three times with ethyl acetate. The organic phases were collected, washed with brine and dried over MgSO<sub>4</sub>. Then the ethyl acetate was removed under reduced pressure to obtain 29.8 g of Boc-(D)-Cys-OH as transparent oil. The weight of the obtained product was more than the calculated theoretical yield because of the presence of Boc-(D)-Cys(Boc)-OH.

Expected mass=25.0 g

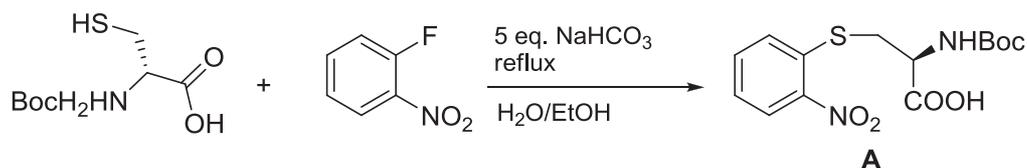
Obtained mass=29.8 g

*Yield=120 %*

Characterization:

HPLC Retention time 1.10 min

MS (ESI): m/z 222 [(M+H)<sup>+</sup>]; C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>NS.

**(S)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-3-(2-nitrophenylthio)propanoic acid (A)**

2-fluoronitrobenzene (12.58 ml, 125.78 mmol, 1 eq,  $d = 1.4$ ), Boc-(D)-Cys-OH (33.10 g, 125.78 mmol, 1 eq) and  $\text{NaHCO}_3$  (31.67 g, 377.37 mmol, 3 eq) were dissolved in a mixture of 300 ml  $\text{H}_2\text{O}$  and 300 ml EtOH. The reaction mixture was refluxed for 12 hours. Then we evaporated 400 ml of the solvent and the resulting reaction mixture was washed 2 times by  $\text{Et}_2\text{O}$  in separatory funnel. The aqueous phase was acidified to pH 3 by 1M solution of  $\text{KHSO}_4$  and extracted three times with ethyl acetate. The organic phases were collected, washed with brine and dried over  $\text{MgSO}_4$ . The ethyl acetate was removed under reduced pressure to obtain 44.11 g of compound **A** as a yellow oil.

Expected mass=43.2 g

Obtained mass=44.1 g (residual solvent or salts)

*Yield for the first two reaction was not evaluated and considered as quantitative*

Characterization:

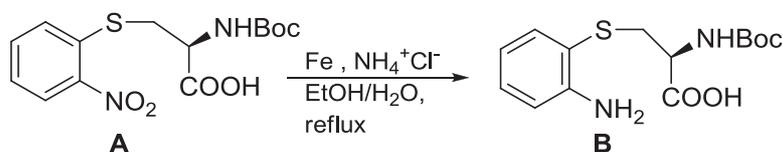
HPLC Retention time 1.56 min

MS(ESI):  $m/z$  343.0  $[(M+H)^+]$ , 685.5  $[(2M+H)^+]$

$[\alpha]_D^{20} = -75$  (c 1.0,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): conformer I (37%): 1.42 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 3.30 (m(br), 1H, S-HCH), 3.62 (m(br), 1H, S-HCH), 4.57 (m(br), 1H, NH-CH-CO), 7.05 (br, 1H, NH), 7.34 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, Ar-H), 7.60 (s, 1H, Ar-H), 8.21 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, Ar-H). conformer II (63%): 1.46 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 3.42 (m(br), 1H, S-HCH), 3.62 (m(br), 1H, S-HCH), 4.69 (m(br), 1H, NH-CH-CO), 5.46 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, NH), 7.32 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, Ar-H), 7.60 (s, 1H, Ar-H), 8.17 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, Ar-H).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): conformer I : 28.50 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 36.25 (S- $\text{CH}_2$ ), 53.51 (N-CH-CO), 81.16 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 125.74 (Ar-CH), 126.63 (Ar-CH), 127.44 (Ar-CH), 134.08 (Ar-CH), 136.41 (Ar-C), 147.12 (Ar-C), 157.10 (N-CO-O), 174.09 (COOH), conformer II : 28.67 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 35.28 (S- $\text{CH}_2$ ), 52.85 (N-CH-CO), 81.34 ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 125.93 (Ar-CH), 126.44 (Ar-CH), 128.15 (Ar-CH), 134.08 (Ar-CH), 135.73 (Ar-C), 147.50 (Ar-C), 155.84 (N-CO-O), 174.54 (COOH).

**(S)-3-(2-aminophenylthio)-2-(tert-butoxycarbonylamino)propanoic acid (B)**

Compound **A** (44.11 g, 125.79 mmol, 1 eq) was dissolved in a mixture of 300 ml of EtOH and 150 ml of H<sub>2</sub>O and then iron powder (44.11 g, 1 mass eq) and ammonium chloride (4.41 g, 0.1 mass eq) were added. The reaction mixture was refluxed on stirring by mechanical agitation for 4 hours. Then the solution was filtered through celite, the celite was washed two times with boiling EtOH and the organic phases were collected. 400 ml of the reaction mixture were evaporated and around 150 ml of H<sub>2</sub>O were added to the mixture. The aqueous phase was extracted 5 times with ethyl acetate. The collected organic phases were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and the ethyl acetate was removed under reduced pressure to obtain 33.12 g of compound **B** as a brown powder.

Expected weight=39.2 g

Obtained weight=33.1 g

Yield=84.3%

Characterization:

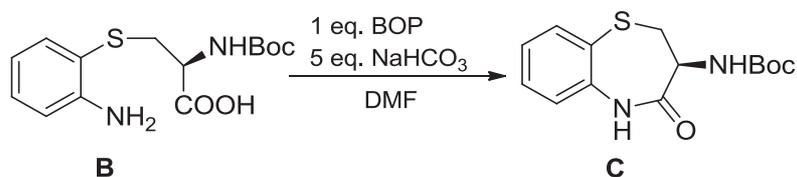
HPLC Retention time 1.3 min

MS (ESI): m/z 312.9 [(M+H)<sup>+</sup>], 621.3 [(2M+H)<sup>+</sup>]

$[\alpha]_D^{20} = +43$  (c 1.0, CH<sub>3</sub>OH) ; C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>S.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1.26 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 3.06 (m(br), 1H, S-HCH), 3.14 (m(br), 1H, S-HCH), 4.28 (m(br), 1H, NH-CH-CO), 5.46 (br, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.79 (br, 1H, NH), 6.60 (t, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.66 (d, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.01 (t, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.31 (d, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 28.70 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 38.28 (S-CH<sub>2</sub>), 55.18 (N-CH-CO), 80.46 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 116.57 (Ar-CH), 118.65 (Ar-C), 120.13 (Ar-CH), 130.50 (Ar-CH), 136.89 (Ar-CH), 147.86 (Ar-C), 156.12 (N-CO-O), 176.55 (COOH).

**(S)-tert-butyl 4-oxo-2,3,4,5-tetrahydrobenzo[b][1,4]thiazepin-3-ylcarbamate (C)**

Compound **B** (33.10 g, 106.10 mmol, 1 eq) was dissolved in 600 ml of DMF. NaHCO<sub>3</sub> (64.56 g, 530.50 mmol, 5 eq) and the BOP (46.56 g, 106.10 mmol, 1 eq) were added. After 24 hours of stirring at room temperature, the DMF was evaporated under reduced pressure and the obtained oil was dissolved in ethyl acetate. The organic phase was subsequently washed 3 times by saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and brine and dried over MgSO<sub>4</sub>. The ethyl acetate was removed under reduced pressure to obtain the crude compound **C** as a brown powder that was further purified by flash chromatography (AcOEt/Hex : 5/5) to obtain 18.31 g of white powder.

Expected weight=31.2 g

Obtained weight=18.3 g

Yield=58.7%

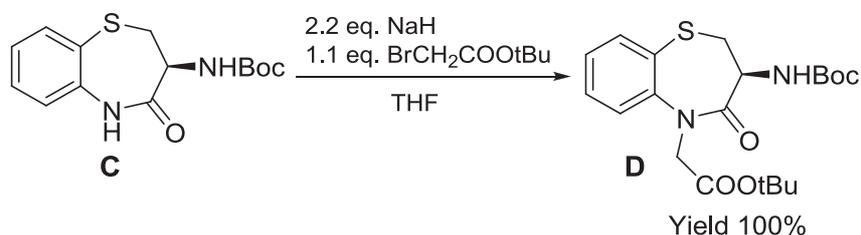
Characterization:

HPLC Retention time 1.5 min;

MS(ESI): m/z 295.0 [(M+H)<sup>+</sup>], 611.1 [(2M+Na)<sup>+</sup>]

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +274 (c 1.0, CH<sub>3</sub>OH).

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 1.33 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 2.28 (t, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 11.4 Hz, 1H, S-HCH), 3.75 (dd, J = 6.6 Hz et 11.4 Hz, 1H, S-HCH), 4.41 (m, 1H, NH-CH-CO), 5.61 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NHBoc), 7.06 (d, J = 6.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.10 (t, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 6.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.28 (t, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 6.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.53 (d, J = 6.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.45 (s, 1H, NH). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): 28.71 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 39.66 (S-CH<sub>2</sub>), 50.80 (N-CH-CO), 80.60 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 124.17 (Ar-CH), 127.14 (Ar-C), 127.65 (Ar-CH), 130.49 (Ar-CH), 135.79 (Ar-CH), 140.44 (Ar-C), 155.02 (N-CO-O), 172.88 (CONH).

**(S)-tert-butyl 2-(3-(tert-butoxycarbonylamino)-4-oxo-3,4-dihydrobenzo[b][1,4]thiazepin-5(2H)-yl)acetate (D)**

Compound **C** (18.31 g, 62.28 mmol, 1 eq) was dissolved in 150 ml of anhydrous THF under argon and after cooling to 0°C with ice bath, NaH (2.99 g, 124.56 mmol, 2 eq) was added slowly for about 20 minutes. When the release of H<sub>2</sub> was over, a solution of BrCH<sub>2</sub>COOtBu (10.11 ml, 68.51 mmol, 1.1 eq, d = 1.321) in 40 ml of anhydrous THF was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 4 hours under argon atmosphere. After the completion of the reaction (HPLC controlled) 1M solution KHSO<sub>4</sub> was added dropwise to neutralize the residual NaH. 150 ml of 1M solution of KHSO<sub>4</sub> were added and the obtained mixture was extracted three times with ethyl acetate. The organic phases were collected, washed with brine and dried over MgSO<sub>4</sub>. The ethyl acetate was removed under reduced pressure to obtain 25.71 g of compound **D** as transparent oil.

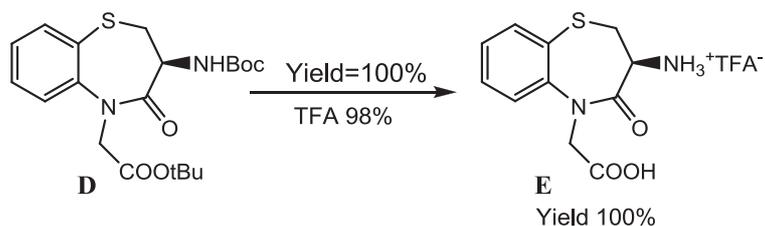
Expected weight=25.5 g

Obtained weight=25.7 g

*Yield = quantitative*

Characterization:

HPLC Retention time 1.97 min ; MS(ESI): m/z 409.0 [(M+H)<sup>+</sup>] ; C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>S

**(S)-2-(3-amino-4-oxo-3,4-dihydrobenzo[b][1,4]thiazepin-5(2H)-yl)acetic acid (E)**

Compound **D** (25.71 g, 68.75 mmol, 1 eq) was dissolved in 150 ml of TFA and the reaction mixture was stirred for 4 hours. The TFA was evaporated under reduced pressure. Five co-evaporations with 150 ml of Et<sub>2</sub>O each were performed to take away the residual non-evaporated TFA. Then compound **E** was precipitated in Et<sub>2</sub>O, filtered, washed with Et<sub>2</sub>O and dried under reduced pressure to obtain 23.10 g of compound **E** as a white powder.

Expected weight=22.9 g

Obtained weight=23.1 g

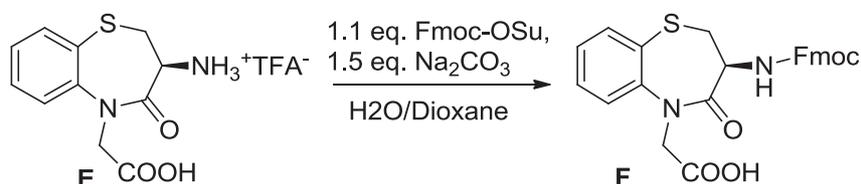
Yield = 99.1 %

Characterization:

HPLC Retention time 0.87 min

MS(ESI): m/z 253.0 [(M+H)<sup>+</sup>]

(3-S)[amino]-5-(carboxymethyl)-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5H)-one Fmoc-DBT-OH (F)



Compound **E** (25.16 g, 62.75 mmol, 1 eq) and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9.94 g, 93.75 mmol, 1.5 eq) were dissolved in a mixture of 300 ml H<sub>2</sub>O and 300 ml dioxane. The reaction mixture was cooled down to 0°C and FmocOSu (25.16 g, 68.75 mmol, 1.1 eq) was added dropwise dissolved in 100 ml of dioxane. The reaction mixture was stirred for 12 hours at room temperature. After the completion of the reaction (controlled by HPLC) 400 ml of the solvent were evaporated. The aqueous phase was washed 2 times with Et<sub>2</sub>O, acidified to pH 3 by KHSO<sub>4</sub> and extracted 3 times with ethyl acetate. The organic phases were collected, washed with brine and dried over MgSO<sub>4</sub>. The ethyl acetate was removed under reduced pressure to obtain 29.10 g of Fmoc-DBT-OH as a white powder.

Expected weight=29.7 g

Obtained weight=29.1 g

Yield = 97.8%

Characterization:

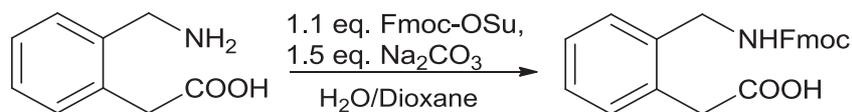
HPLC Retention time 1.88 min

MS(ESI): m/z 474.9 [(M+H)<sup>+</sup>]; C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>S.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): 2.90 (t, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 11.1 Hz, 1H, S-HCH), 3.45 (dd, J = 6.8 Hz et 11.1 Hz, 1H, S-HCH), 3.80 (t, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 1H, CO-O-CH<sub>2</sub>-CH), 4.15 (d, J = 7.6 Hz, 2H, CO-O-CH<sub>2</sub>-CH), 4.30 (d, J = 17.6 Hz, 1H, N-HCH), 4.50 (m, 1H, NH-CH-CO), 4.90 (d, J = 17.6 Hz, 1H, N-HCH), 5.85 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NHFmoc), 7.25 (d, J = 7.6 Hz, 2H, Ar-H), 7.35 (d, J = 7.6 Hz, 2H, Ar-H), 7.40 (d, J = 7.6 Hz, 2H, Ar-H), 7.45 (d, J = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.55 (m, 2H, Ar-H), 7.65 (d, J = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.75 (d, J = 7.6 Hz, 2H, Ar-H), 8.90 (br, 1H, CO<sub>2</sub>H).

### 2-aminomethyl-phenyl-acetic acid (Fmoc-AMPA-OH)

---



AMPA (5.00 g, 24.80 mmol, 1 eq) was dissolved with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.94 g, 37.20, 1.5 eq) in a mixture of 200 ml H<sub>2</sub>O and 200 ml dioxane. The solution was cooled down to 0°C and FmocOSu (9.20 g, 27.30 mmol, 1.1 eq) was added dropwise dissolved in 100 ml of dioxane. The reaction mixture was stirred for 12 hours at room temperature. After the completion of the reaction (controlled by HPLC) about 300 ml of the solvent were evaporated. The aqueous phase was washed 2 times with Et<sub>2</sub>O, acidified to pH 3 with KHSO<sub>4</sub> and extracted 3 times with ethyl acetate. The organic phases were collected, washed with brine and dried over MgSO<sub>4</sub>. The ethyl acetate was removed under reduced pressure to obtain 8.81 g of Fmoc-AMPA-OH as white powder.

Expected weight=9.6 g

Obtained weight=8.8 g

*Yield = 91.8 %*

#### Characterization:

HPLC Retention time 1.70 min ; MS(ESI): m/z 388 [(M+H)<sup>+</sup>] ; C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>NS.

## **SPPS General Procedure**

### ***▪ Microwave automated peptides synthesis.***

---

The automated peptide synthesis was performed using an automated peptide synthesizer CEM Liberty. Each synthesis was performed on a 0.25 mmol scale, using Fmoc-Rink amide AM polystyrene resin (0.45 mmol/g). The Fmoc protected amino acids (4 eq), the coupling reagent (4 eq) and DIEA (8 eq) were added to the vessel and the mixture was stirred using nitrogen flux under microwave irradiation (40 W) at 70 °C for 300 seconds. After each coupling reaction, resin was submitted to two deprotection cycles. First with 10 mL of DMF/pip 80/20 v/v solution under microwave irradiation (40 W) at 75°C for 30 seconds and the second under the same conditions during 180 seconds.

### ***▪ Procedure I : Washing steps***

---

Washing steps were performed after each coupling and deprotection steps: one time methanol, one time DCM, 3 times DMF and 3 times DCM.

### ***▪ Procedure II : Anchoring on Rink amide-PS resin***

---

Fmoc-Rink amide resin was conditioned for 30 minutes in DCM and submitted to the standard deprotection cycle, using two times DMF/pip 80/20 v/v solution for 30 minutes. After washing steps, the first constrained dipeptide mimetic (Fmoc-LBT-OH/Fmoc-DBT-OH or Fmoc-AMPA-OH) motif or Fmoc protected amino acid was loaded onto the resin through a standard coupling cycle, using HBTU (3 eq.) as a coupling agent and DIEA (3 eq.) as base.

### ***▪ Procedure III : Anchoring on 2-Chlorotrytil resin***

---

The resin 2-chlorotrytil (1.44 mmol/g) was conditioned for 30 minutes with anhydrous DCM in a plastic syringe equipped with frit. After that, the first Fmoc protected moiety (2 eq) and DIEA (2 eq) were dissolved in DMF, added to the resin and stirred mechanically overnight. Then the resin was washed and a solution of DIEA (1 eq) in MeOH was added to the resin and stirred for 20 min. The resin was washed again and effective loading was evaluated by UV titration after Fmoc removal.

#### ▪ ***Procedure IV : Coupling steps***

---

The coupling reaction was carried out manually in plastic syringes equipped with frits. HBTU (3 eq) as a coupling agent, DIEA (4 eq) as a base and Fmoc protected moieties (D/L natural aminoacids, D/L BT, AMPA, Ahx, O<sub>2</sub>Oc or β-Ala) (3 eq according to resin loading) were solubilized in DMF and added to the resin. The reaction was stirred for 3 hours at room temperature. The reaction was monitored by the standard TNBS test<sup>8</sup>.

#### ▪ ***Procedure V : Deprotection step***

---

Fmoc deprotection was carried out using DMF/piperidine 80/20 v/v solution two times for 30 minutes. In the case of deprotection of the AMPA moiety, DMF/Piperidine/DBU 92/4/4 v/v/v solution was used two times for 45 minutes. This treatment permits to avoid incomplete deprotection that was observed with the standard DMF/Piperidine solution.

#### ▪ ***Procedure VI : Boc deprotection in basic condition***

---

Boc deprotection on solid support was carried out using a mixture of TMSOTf (1 M) and 2,6 lutidine (1.5 M) in DCM for 1 hour.

#### ▪ ***Procedure VII : FITC coupling***

---

FITC coupling was carried out manually in plastic syringes equipped with frits. 1.5 eq of FITC and 3 eq of DIEA (according to resin loading) were solubilized in DMF and added to the resin. The reaction was stirred for 2 hours at room temperature.

#### ▪ ***Procedure VIII : 2-Bromobenzyloxycarbonyl coupling***

---

2-Bromobenzyloxycarbonyl (Z-BrZ) coupling was carried out manually in plastic syringes equipped with frits. 3 eq of N-(2-Bromobenzyloxycarbonyloxy)succinimide and 3 eq of N-Methylmorpholine (NMM) (according to resin loading) were solubilized in DMF and added to the resin. The reaction was stirred for 4 hours at room temperature.

---

- **Procedure IX : Acetylation**

---

Acetylation was carried manually in plastic syringes equipped with frits using DCM/Ac<sub>2</sub>O 1/1 v/v solution 2 times for 15 minutes.

---

- **Procedure : X : Cleavage of Rink amide PS resin**

---

Oligomers were cleaved from the resin for 4 hours by 99% trifluoroacetic acid. After removal of the resin by filtration, the resin was washed three times with DCM. The DCM and TFA acid filtrates were assembled and concentrated under reduced pressure. Compounds were precipitated by addition of diethyl ether and centrifuged. They were dissolved in acetonitrile/water 50/50 solution containing 0.1% TFA and freeze dried. For complex oligomers containing Arg(Pbf), Trp(Boc) or Met moieties, TFA with scavengers was used : TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5).

---

- **Procedure XI : Cleavage of 2-chlorotrityl chloride PS resin**

---

Peptides on 2-Chlorotrityl were cleaved from resin with a mixture of trifluoroethanol/DCM (3/7) for 2 hours. After removal of the resin by filtration, the resin was washed three times with DCM. The DCM and TFE filtrates were assembled and concentrated under reduced pressure. Compounds were precipitated by addition of diethyl ether and centrifuged. They were dissolved in acetonitrile/water 50/50 solution containing 0.1% TFA and freeze dried.

---

- **Procedure XII : Preparation of poly  $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactams**

---

Resin bearing peptides were swelled in DCM for 10 minutes. Then, 30 eq of iodomethane in a mixture of DMF/DCM (1:1) were added to the resin and stirred for 48 hours. After 48 hours, the resin was washed three times with DCM, DMF and MeOH. Then, cyclisation was carried out immediately in the same syringes using 10 eq of DBU in a mixture of DMF/DCM 1/1 v/v for 48 hours. The reaction was then monitored by cleaving a small amount of the resin followed by LC/MS analysis. In case of an incomplete cyclisation, the cycle of methylation and cyclization was repeated until the completion of the reaction. Oligomers were finally cleaved from the resin according to the general procedure **IX** for cleavage of Rink amide PS resin.

### ▪ *Oligomers purification*

---

The crude oligomers were purified by reverse phase semi-preparative HPLC with H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) as solvent A and ACN (0.1% TFA) as solvent B. The fractions containing chromatographically pure product were collected and freeze dried.

Arginine rich oligomers were purified by semi-preparative HPLC with H<sub>2</sub>O (0.9% triethylamine (v/v) / 0.9% phosphoric acid (v/v)) as solvent A (TEAP 2.25) and ACN/solvent A (60/40) as solvent B. The salts were removed with a second purification with H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) as solvent A and ACN (0.1% TFA) as solvent B. The fractions containing the chromatographically pure product were collected and freeze dried.

### ▪ *Fmoc quantitation*<sup>9</sup>

---

The dried resin (1–2 mg) was weighted precisely and poured into 4 mL DMF/piperidine 80/20 v/v solution, which was stirred for 1 h. The solution was then filtered and optical density of dibenzofulvene-piperidine adduct was measured at 299 nm in 1 cm wide quartz glass chamber (WPA Biowave II spectrometer). DMF/piperidine 80/20 v/v solution was used as reference. The chamber was emptied and cleaned and measurements repeated twice with fresh solutions. The loading was calculated with the average value of three readings into the following equation:  $\text{Loading (mmol/g)}_{299 \text{ nm}} = A \times v / (\epsilon \times l \times m)$  with  $\epsilon$  (molar extinction coefficient) = 6,234 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>,  $l$  (quartz glass cuvette length) = 1 cm,  $v$  (volume) = 4.10<sup>-3</sup> L,  $m$  (weight of resin) = 1–2 mg,  $A$  = average value of the 3 readings of absorbance.

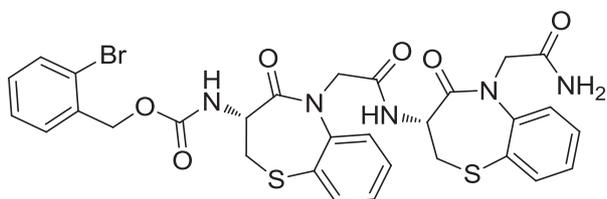
▪ **General procedure for the preparation of oligomer 1-6.**

---

The first constrained dipeptide mimic of the sequence was anchored on the Rink amide resin (500 mg, 0.45 mmol/g) using the procedure II. Oligomers were then synthesized using cycle of deprotection, washing and coupling steps according to the procedure V, I and IV respectively. The 2-BrZ group was incorporated according to the procedure VIII. Desired oligomers were then cleaved from the resin according to the procedure X and purified by preparative HPLC.

**2-BrZ-(LBT)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (1)**

---



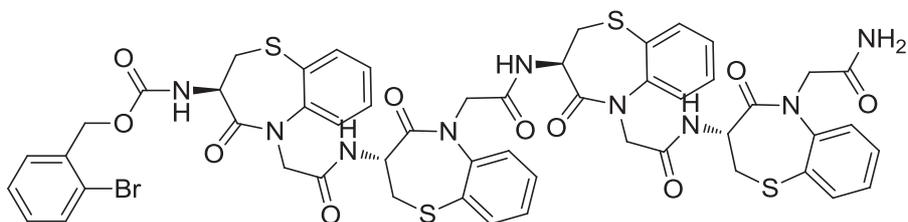
HPLC Retention time 1.72 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+] = 698.1$  ,  $[2M+H]^+ = 1398.2$

Yield : 47.8%

**2-BrZ-(LBT)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (2)**

---



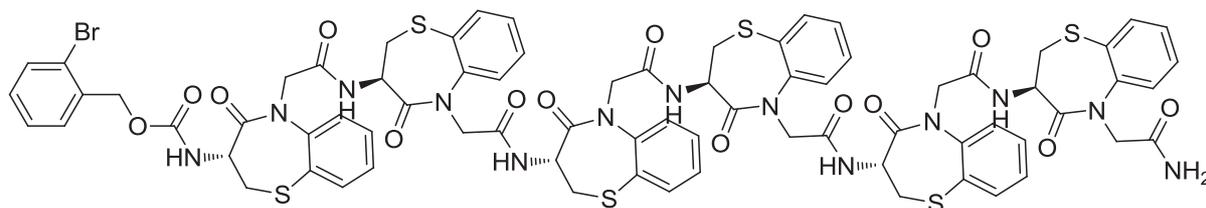
HPLC Retention time 1.92 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+] = 1166.1$

Yield : 13.2%

### 2-BrZ-(LBT)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (3)

---



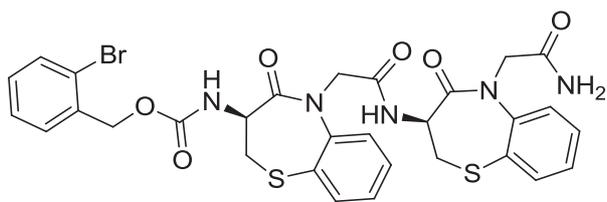
HPLC Retention time 2.07 min

MS(ESI):  $m/z [(M+2H)^{2+}] = 818.6$

Yield : 6.3%

### 2-BrZ-(DBT)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (4)

---



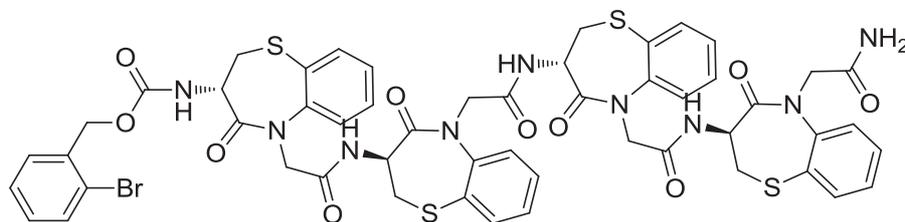
HPLC Retention time 1.72 min

MS(ESI):  $m/z [(M+H)^+] = 698.1$  ;  $[2M+H]^+ = 1398.2$

Yield : 57.8%

### 2-BrZ-(DBT)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (5)

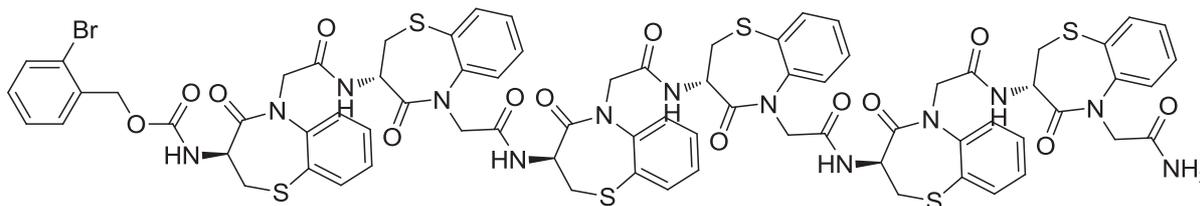
---



HPLC Retention time 1.92 min

MS(ESI):  $m/z [(M+H)^+] = 1166.1$

Yield : 16.9%

**2-BrZ-(DBT)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (6)**

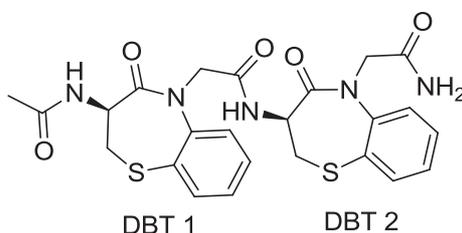
HPLC Retention time 2.07 min

MS(ESI):  $m/z [(M+2H)^{2+}] = 818.6$

Yield : 6.9%

- General procedure for the preparation of oligomers 7-11**

The first constrained dipeptide mimic of the sequence was anchored on the Rink amide resin (500 mg, 0.45 mmol/g) using the procedure II. Oligomers were then synthesized using cycle of deprotection, washing and coupling steps according to the procedure V, I and IV respectively. The oligomer was acetylated following the procedure IX. Desired oligomers were then cleaved from the resin according to the procedure X and purified by preparative HPLC.

**Ac-(DBT)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (7)**

HPLC Retention time 1.22 min

MS(ESI):  $m/z [(M+2H)^{2+}] = 528.2$

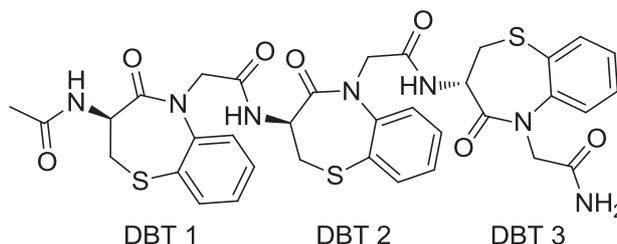
Yield : 48.4%

<sup>1</sup>H NMR chemical shifts for for **7** in CD<sub>3</sub>OH at 283K

<i>CD<sub>3</sub>OH</i>	<i>HN</i>	<i>H<sub>α</sub></i>	<i>H<sub>β1,2</sub></i>	<i>H<sub>δ1,2</sub></i>	<i>H<sub>ε1,2</sub></i>	<i>H<sub>ζ1,2</sub></i>
<b>DBT<sup>1</sup></b>	8.60	4.56	3.07, 3.60	4.23, 4.70	7.56, 7.71	7.56, 7.35
<b>DBT<sup>2</sup></b>	8.53	4.69	3.08, 3.59	4.23, 4.72	7.54, 7.72	7.58, 7.37
<b>Others</b>	CH <sub>3</sub> 1.94, NH <sub>2</sub> 7.43, n.d					

<sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR chemical shifts for **7** in CD<sub>3</sub>OH at 283K

<i>CD<sub>3</sub>OH</i>	<i>N</i>	<i>C<sub>α</sub></i>	<i>C<sub>β</sub></i>	<i>C<sub>δ</sub></i>	<i>C<sub>ε1</sub></i>	<i>C<sub>ε2</sub></i>	<i>C<sub>ζ1</sub></i>	<i>C<sub>ζ2</sub></i>
<b>DBT<sup>1</sup></b>	121.6	50.2	38.8	52.1	124.4	135.3	131.0	127.8
<b>DBT<sup>2</sup></b>	116.4	50.1	37.1	52.1	124.2	135.4	131.0	127.9
<b>Others</b>	C 20.9, N 103.4							

Ac-(DBT)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (**8**)

HPLC Retention time 1.35 min

MS(ESI):  $m/z [(M+2H)^{2+}] = 762.2$ 

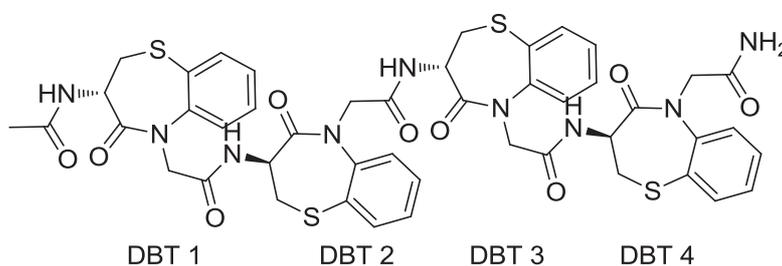
Yield : 42.4%

<sup>1</sup>H NMR chemical shifts for for **8** in CD<sub>3</sub>OH at 283K

<i>CD<sub>3</sub>OH</i>	<i>HN</i>	<i>H<sub>α</sub></i>	<i>H<sub>β1,2</sub></i>	<i>H<sub>δ1,2</sub></i>	<i>H<sub>ε1,2</sub></i>	<i>H<sub>ζ1,2</sub></i>
<b>DBT<sup>1</sup></b>	8.61	4.57	3.07, 3.62	4.22, 4.68	7.58, 7.72	7.58, 7.36
<b>DBT<sup>2</sup></b>	8.63	4.64	3.11, 3.57	4.14, 4.79	7.56, 7.71	7.58, 7.35
<b>DBT<sup>3</sup></b>	8.59	n.d	3.12, 3.53	4.18, 4.75	7.53, 7.72	7.56, 7.37
<b>Others</b>	CH <sub>3</sub> 1.94, NH <sub>2</sub> 7.44, 7.70					

$^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR chemical shifts for **8** in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at 283K

$\text{CD}_3\text{OH}$	$N$	$C_\alpha$	$C_\beta$	$C_\delta$	$C_{\varepsilon 1}$	$C_{\varepsilon 2}$	$C_{\zeta 1}$	$C_{\zeta 2}$
<b>DBT<sup>1</sup></b>	121.5	50.1	36.9	52.3	124.6	135.3	131.0	127.8
<b>DBT<sup>2</sup></b>	116.8	50.4	36.8	52.2	124.3	135.3	131.0	127.9
<b>DBT<sup>3</sup></b>	116.5	n.d	36.9	52.2	124.1	135.5	131.0	127.8
<b>Others</b>	C 20.9, N 103.7							

Ac-(DBT)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (**9**)

HPLC Retention time 1.51 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+] = 996.2$  ;  $[(M+2H)^{2+}] = 498.6$ 

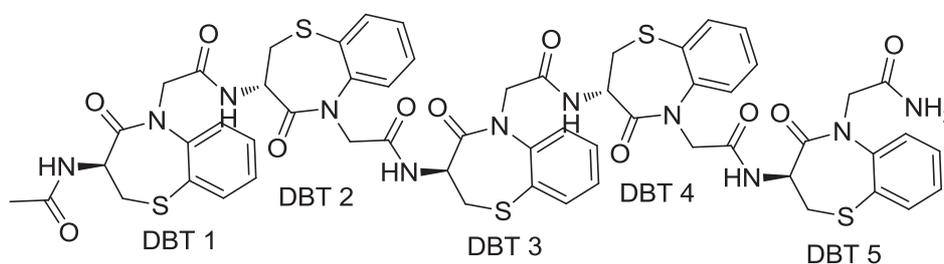
Yield : 33.3%

 $^1\text{H}$  NMR chemical shifts for **9** in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at 283K

$\text{CD}_3\text{OH}$	$HN$	$H_\alpha$	$H_{\beta 1,2}$	$H_{\delta 1,2}$	$H_{\varepsilon 1,2}$	$H_{\zeta 1,2}$
<b>DBT<sup>1</sup></b>	8.19	4.50	3.08, 3.60	4.21, 4.60	7.56, 7.71	7.57, 7.35
<b>DBT<sup>2</sup></b>	8.65	4.68	3.04, 3.66	4.10, 4.77	7.64, 7.72	7.55, 7.35
<b>DBT<sup>3</sup></b>	8.79	4.60	3.17, 3.54	4.03, 4.88	7.62, 7.70	7.58, 7.35
<b>DBT<sup>4</sup></b>	8.51	4.80	3.26, 3.43	4.22, 4.71	7.49, 7.72	7.52, 7.30
<b>Others</b>	CH <sub>3</sub> 1.93, NH <sub>2</sub> 7.45, 7.63					

$^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR chemical shifts for **9** in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at 283K

$\text{CD}_3\text{OH}$	$N$	$C_\alpha$	$C_\beta$	$C_\delta$	$C_{\epsilon 1}$	$C_{\epsilon 2}$	$C_{\zeta 1}$	$C_{\zeta 2}$
<b>DBT<sup>1</sup></b>	120.9	49.8	36.9	52.6	125.6	135.2	131.0	127.9
<b>DBT<sup>2</sup></b>	116.3	50.4	36.8	52.4	124.6	135.3	130.9	127.7
<b>DBT<sup>3</sup></b>	117.8	51.0	36.3	52.3	124.1	135.5	131.1	127.7
<b>DBT<sup>4</sup></b>	117.5	50.5	36.9	52.2	123.9	135.6	130.9	127.7
<b>Others</b>	C 21.1, N 103.7							

Ac-(DBT)<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub> (**10**)

HPLC Retention time 1.61 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+] = 1230.2$  ;  $[(M+2H)^{2+}] = 615.6$ 

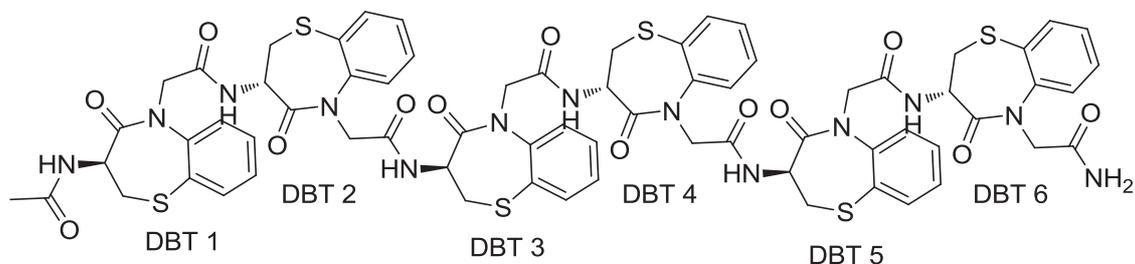
Yield : 24.6%

 $^1\text{H}$  NMR chemical shifts for **10** in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at 283K

$\text{CD}_3\text{OH}$	$HN$	$H_\alpha$	$H_{\beta 1,2}$	$H_{\delta 1,2}$	$H_{\epsilon 1,2}$	$H_{\zeta 1,2}$
<b>DBT<sup>1</sup></b>	8.16	4.47	3.06, 3.59	4.23, 4.59	7.53, 7.70	7.54, 7.34
<b>DBT<sup>2</sup></b>	8.44	4.64	3.03, 3.68	4.09, 4.74	7.64, 7.72	7.55, 7.36
<b>DBT<sup>3</sup></b>	8.84	4.63	3.13, 3.60	4.06, 4.86	7.69, 7.72	7.65, 7.37
<b>DBT<sup>4</sup></b>	8.61	4.75	3.30, 3.42	4.10, 4.79	7.55, 7.71	7.50, 7.27
<b>DBT<sup>5</sup></b>	8.56	4.72	3.16, 3.49	4.20, 4.71	7.50, 7.72	7.54, 7.33
<b>Others</b>	CH <sub>3</sub> 1.91, NH <sub>2</sub> 7.38, 7.69					

$^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR chemical shifts for **10** in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at 283K

$\text{CD}_3\text{OH}$	$N$	$C_\alpha$	$C_\beta$	$C_\delta$	$C_{\epsilon 1}$	$C_{\epsilon 2}$	$C_{\zeta 1}$	$C_{\zeta 2}$
<b>DBT<sup>1</sup></b>	120.8	49.8	36.9	52.5	124.6	135.2	131.0	127.9
<b>DBT<sup>2</sup></b>	116.0	50.3	36.8	52.5	124.7	135.6	131.0	127.9
<b>DBT<sup>3</sup></b>	117.3	51.0	36.4	52.4	124.4	135.4	131.2	127.8
<b>DBT<sup>4</sup></b>	118.2	50.5	36.6	52.3	124.1	135.5	130.9	127.6
<b>DBT<sup>5</sup></b>	117.1	50.8	36.9	52.2	123.9	135.2	130.8	127.7
<b>Others</b>	C 21.1, N 103.9							

Ac-(DBT)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (**11**)

HPLC Retention time 1.73 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+] = 1464.4$  ;  $[(M+2H)^{2+}] = 732.6$ 

Yield : 12.2%

 $^1\text{H}$  NMR chemical shifts for **11** in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at 283K

$\text{CD}_3\text{OH}$	$HN$	$H_\alpha$	$H_{\beta 1,2}$	$H_{\delta 1,2}$	$H_{\epsilon 1,2}$	$H_{\zeta 1,2}$
<b>DBT<sup>1</sup></b>	8.23	4.50	3.05, 3.57	4.24, 4.62	7.50, 7.68	7.59, 7.36
<b>DBT<sup>2</sup></b>	8.35	4.60	3.06, 3.66	4.11, 4.69	7.58, 7.70	7.55, 7.34
<b>DBT<sup>3</sup></b>	8.61	4.64	3.10, 3.63	4.05, 4.80	7.66, 7.72	7.53, 7.31
<b>DBT<sup>4</sup></b>	8.71	4.73	3.22, 3.50	4.09, 4.76	7.62, 7.73	7.57, 7.31
<b>DBT<sup>5</sup></b>	8.59	4.73	3.21, 3.44	4.12, 4.79	7.58, 7.70	7.51, 7.30
<b>DBT<sup>6</sup></b>	8.54	4.70	3.12, 3.48	4.18, 4.71	7.49, 7.68	7.50, 7.32
<b>Others</b>	$\text{CH}_3$ 1.91, $\text{NH}_2$ 7.38, 7.67					

$^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR chemical shifts for **11** in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at 283K

<b><math>\text{CD}_3\text{OH}</math></b>	<b><math>N</math></b>	<b><math>C_\alpha</math></b>	<b><math>C_\beta</math></b>	<b><math>C_\delta</math></b>	<b><math>C_{\epsilon 1}</math></b>	<b><math>C_{\epsilon 2}</math></b>	<b><math>C_{\zeta 1}</math></b>	<b><math>C_{\zeta 2}</math></b>
<b>DBT<sup>1</sup></b>	121.0	49.8	37.0	52.4	124.5	135.2	131.1	127.8
<b>DBT<sup>2</sup></b>	116.0	50.2	36.8	52.4	124.6	135.2	131.0	127.9
<b>DBT<sup>3</sup></b>	116.8	50.7	36.5	52.5	124.5	135.3	131.0	127.7
<b>DBT<sup>4</sup></b>	117.7	50.7	36.6	52.4	124.3	135.5	131.1	127.7
<b>DBT<sup>5</sup></b>	117.9	50.7	36.6	52.4	124.2	135.5	131.0	127.7
<b>DBT<sup>6</sup></b>	117.0	50.4	36.9	52.2	124.0	135.5	130.8	127.8
<b>Others</b>	C 21.1, N 103.8							

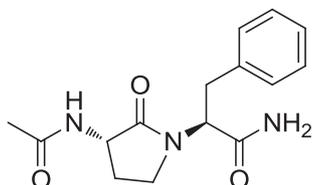
▪ **General procedure for the preparation of dimer 12 and 13**

---

The first amino acid was anchored on the Rink amide resin according to the procedure II. The dipeptide was synthesized with cycle of deprotection, washing and coupling step according to the procedure V, I and IV respectively. The dipeptide was acetylated thanks to the procedure IX. Then the  $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactam was obtained on solid support thanks to the procedure XII and cleaved according to the procedure X and immediately analyzed without purification.

**Ac-Agl-Phe-NH<sub>2</sub>**

---



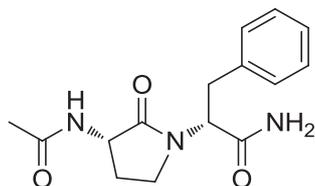
HPLC Retention time 0.91 min

MS(ESI):  $m/z$  [(M+H)<sup>+</sup>] = 290.3

Yield : Product was not isolated

**Ac-Agl-(R)-Phe-NH<sub>2</sub>**

---



HPLC Retention time 0.88 min

MS(ESI):  $m/z$  [(M+H)<sup>+</sup>] = 290.3

Yield : Product was not isolated

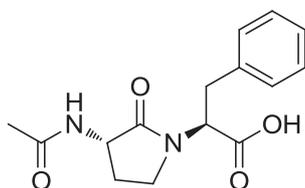
▪ **General procedure for the preparation of dimer 14 and 15**

---

The first amino acid was anchored on the 2-Chloro trytil resin according to the procedure **III**. The dipeptide was synthesized with cycle of deprotection, washing and coupling step according to the procedure **V**, **I** and **IV** respectively. The dipeptide was acetylated thanks to the procedure **IX**. Then the  $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactam was obtained on solid support thanks to the procedure **XII** and cleaved according to the procedure **X** and immediately analyzed without purification.

**Ac-Agl-Phe-OH**

---



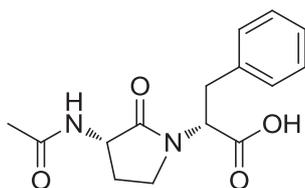
HPLC Retention time 0.97 min

MS(ESI):  $m/z$  [(M+H)<sup>+</sup>] = 291.2

Yield : Product was not isolated

**Ac-Agl-(R)-Phe-OH**

---



HPLC Retention time 0.97 min

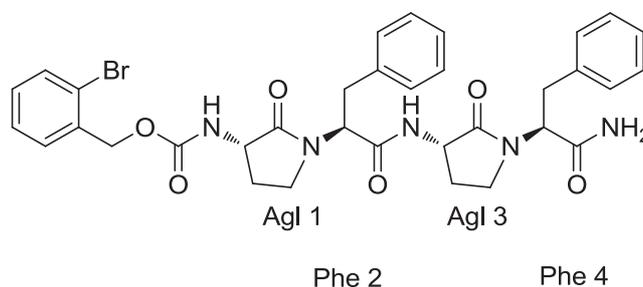
MS(ESI):  $m/z$  [(M+H)<sup>+</sup>] = 291.2

Yield : Product was not isolated

▪ **General procedure for the preparation of oligomers 16 to 21 and 24 to 32**

All peptides were synthesized with automated peptides synthesizer CEM. Resin was transferred into syringes with frits. The 2-BrZ group was incorporated according to the procedure **VIII**. Then the  $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactam oligomers were obtained on solid support thanks to the procedure **XII**, cleaved according to the procedure **X** and purified by preparative HPLC.

**2-BrZ-(Agl-Phe)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (16)**



HPLC Retention time 1.63 min

MS(ESI):  $m/z [(M+H)^+] = 690.0$

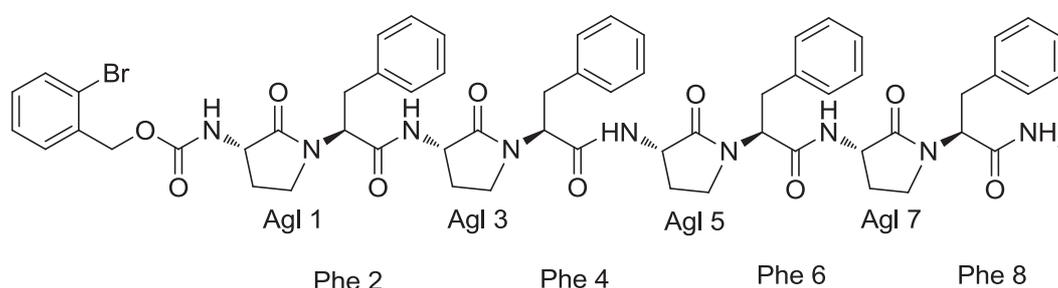
Yield: 27.9%

<sup>1</sup>H chemical shifts for **16** in pyridine-*d*<sub>5</sub> at 298K

<i>Pyridine-d</i> <sub>5</sub>	<i>HN</i>	<i>H</i> <sub>α</sub>	<i>H</i> <sub>β/β'</sub>	<i>H</i> <sub>γ/γ'</sub>	<i>Others</i>
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	CH <sub>2</sub> 5.32
<b>Agl 1</b>	9.09	4.40	2.30, 2.10	3.31, 3.90	
<b>Phe 2</b>	-	5.51	3.90, 3.18	-	
<b>Agl 3</b>	9.44	4.28	2.20	3.37, 3.72	
<b>Phe 4</b>	-	5.63	3.54, 3.07	-	NH <sub>2</sub> 8.30

$^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR chemical shifts for **16** in pyridine- $d_5$  at 298K

Pyridine- $d_5$	N	$C_\alpha$	$C_{\beta/\beta'}$	$C_{\gamma/\gamma'}$	Others
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	C 56.0
<b>Agl 1</b>	88.3	52.5	26.4	34.7	
<b>Phe 2</b>	-	55.9	40.8	-	
<b>Agl 3</b>	117.5	52.0	24.9	41.2	
<b>Phe 4</b>	-	55.9	34.6	-	N 102.1

**2-BrZ-(Agl-Phe) $_4$ -NH $_2$  (17)**

HPLC Retention time 1.89 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+] = 1150.6$  ;  $[(M+2H)^{2+}] = 576.7$ 

Yield: 18.9%

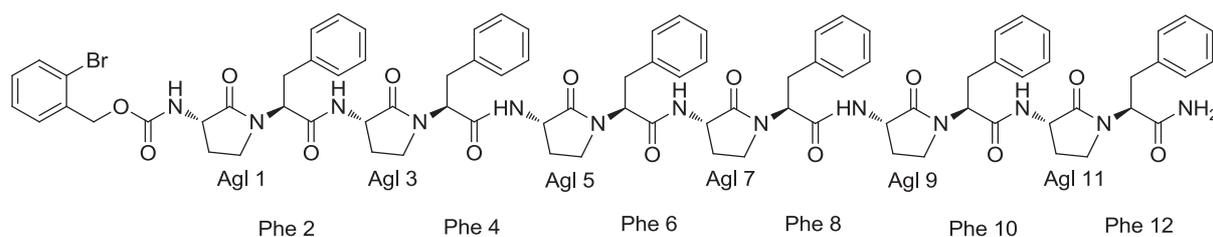
 $^1\text{H}$  NMR chemical shifts for **17** in pyridine- $d_5$  at 298K

Pyridine- $d_5$	HN	$H_\alpha$	$H_{\beta/\beta'}$	$H_{\gamma/\gamma'}$	Others
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	CH $_2$ 5.30
<b>Agl 1</b>	9.05	4.38	2.33, 2.10	3.82, 3.33	
<b>Phe 2</b>	-	5.51	3.51, 3.06	-	
<b>Agl 3</b>	9.39	4.23	2.14	3.79, 3.31	
<b>Phe 4</b>	-	5.53	3.62, 3.03	-	
<b>Agl 5</b>	9.28	4.32	2.19	3.89, 3.36	
<b>Phe 6</b>	-	5.61	3.71, 3.07	-	
<b>Agl 7</b>	9.22	4.38	2.29	3.41, 3.77	
<b>Phe 8</b>	-	5.67	3.95, 3.20	-	NH $_2$ 8.30

$^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR chemical shifts for **17** in pyridine- $d_5$  at 298K

<i>Pyridine-d<sub>5</sub></i>	<i>N</i>	<i>C<sub>α</sub></i>	<i>C<sub>β/β'</sub></i>	<i>C<sub>γ/γ'</sub></i>	<i>Others</i>
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	C 65.7
<b>Agl 1</b>	88.2	52.2	26.3	40.9	
<b>Phe 2</b>	-	55.7	34.0	-	
<b>Agl 3</b>	118.6	51.8	25.0	40.9	
<b>Phe 4</b>	-	55.7	34.0	-	
<b>Agl 5</b>	117.0	51.8	25.0	40.9	
<b>Phe 6</b>	-	55.7	34.0	-	
<b>Agl 7</b>	115.4	52.2	25.1	40.9	
<b>Phe 8</b>	-	55.7	34.0	-	N 102.3

**2-BrZ-(Agl-Phe)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (18)**



HPLC Retention time 2.03 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+2H)^{2+}] = 807.0$

Yield: 11.4%

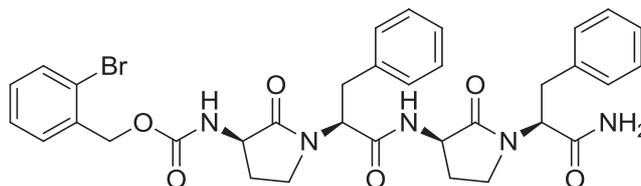
<sup>1</sup>H NMR chemical shifts for **18** in pyridine-*d*<sub>5</sub> at 298K

<i>Pyridine-d</i> <sub>5</sub>	<i>HN</i>	<i>H</i> <sub>α</sub>	<i>H</i> <sub>β/β'</sub>	<i>H</i> <sub>γ/γ'</sub>	<i>Others</i>
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	CH <sub>2</sub> n.d.?
<b>Agl 1</b>	8.97	4.42	2.31, 2.15	3.31, 3.76	
<b>Phe 2</b>	-	5.48	3.56, 3.05	-	
<b>Agl 3</b>	9.36	4.33	2.17	3.28, 3.73	
<b>Phe 4</b>	-	5.51	3.60, 3.00	-	
<b>Agl 5</b>	9.27	4.39	2.22	3.31, 3.79	
<b>Phe 6</b>	-	5.57	3.60, 2.99	-	
<b>Agl 7</b>	9.28	4.34	2.22	3.31, 3.79	
<b>Phe 8</b>	-	5.59	3.65, 3.02	-	
<b>Agl 9</b>	9.25	4.32	2.25	3.34, 3.87	
<b>Phe 10</b>	-	5.63	3.71, 3.05	-	
<b>Agl 11</b>	9.22	4.38	2.34	3.40, 3.73	
<b>Phe 12</b>	-	5.69	3.96, 3.19	-	NH <sub>2</sub> 8.31

<sup>13</sup>C N and <sup>15</sup>N MR chemical shifts for **18** in pyridine-*d*<sub>5</sub> at 298K

<i>Pyridine-d</i> <sub>5</sub>	<i>N</i>	<i>C</i> <sub>α</sub>	<i>C</i> <sub>β/β'</sub>	<i>C</i> <sub>γ/γ'</sub>	<i>Others</i>
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	C n.d.?
<b>Agl 1</b>	88.3	52.5	26.0	40.9	
<b>Phe 2</b>	-	55.7	33.8	-	
<b>Agl 3</b>	118.6	52.0	26.0	40.9	
<b>Phe 4</b>	-	55.6	33.8	-	
<b>Agl 5</b>	117.3	52.0	26.0	40.9	
<b>Phe 6</b>	-	55.6	33.8	-	
<b>Agl 7</b>	117.0	51.8	26.0	40.9	
<b>Phe 8</b>	-	55.6	33.8	-	
<b>Agl 9</b>	116.4	51.8	26.0	40.9	
<b>Phe 10</b>	-	55.6	33.8	-	
<b>Agl 11</b>	115.2	52.0	26.0	40.9	
<b>Phe 12</b>	-	55.8	33.8	-	N 101.9

**2-BrZ-((R)-Agl-Phe)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (19)**

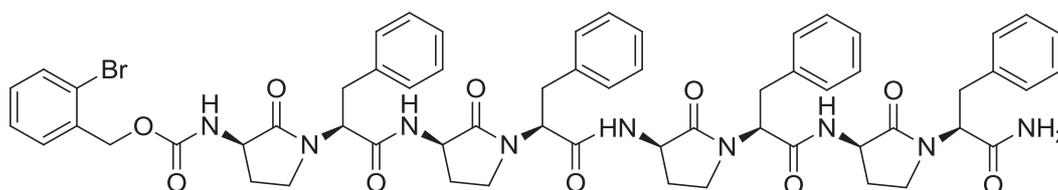


HPLC Retention time 1.62 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+]$  = 690.3

Yield: 12.1%

**2-BrZ-((R)-Agl-Phe)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (20)**

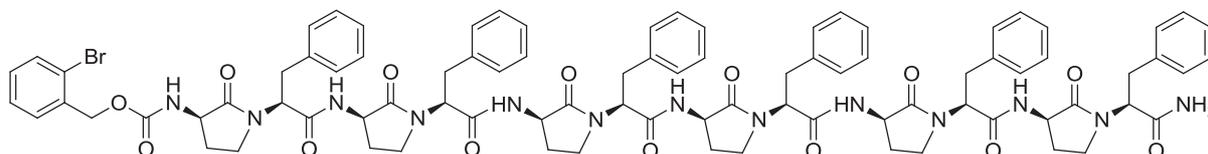


HPLC Retention time 1.79 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+]$  = 1150.4 ;  $[(M+2H)^{2+}]$  = 576.7

Yield: 27.5%

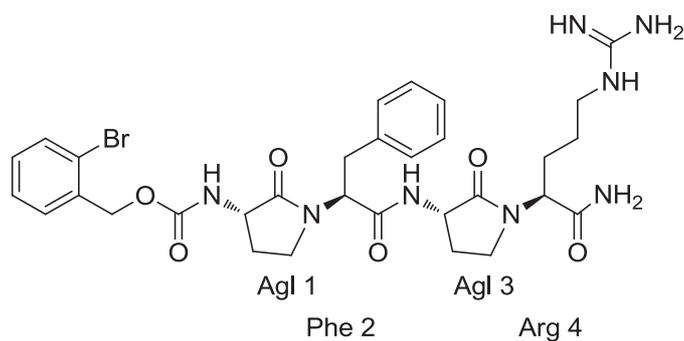
**2-BrZ-((R)-Agl-Phe)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (21)**



HPLC Retention time 1.94 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+]$  = 1610.4 ;  $[(M+2H)^{2+}]$  = 806.9

Yield: 11.6%

2-BrZ-Agl-Phe-Agl-Arg-NH<sub>2</sub> (**24**)

HPLC Retention time 1.29 min

MS(ESI):  $m/z [(M+H)^+] = 699.0$

Yield: 26.3%

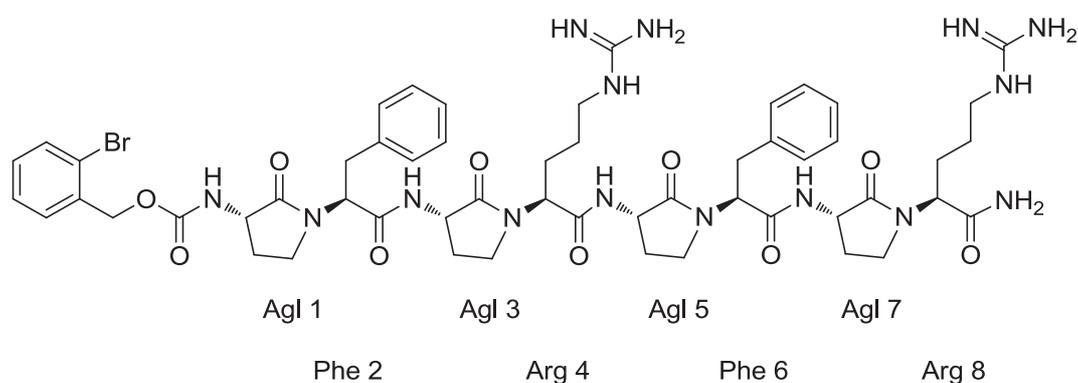
<sup>1</sup>H NMR chemical shifts for **24** in CD<sub>3</sub>OH at 288K

CD <sub>3</sub> OH	HN	H <sub>α</sub>	H <sub>β/β'</sub>	H <sub>γ/γ'</sub>	Others
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	CH <sub>2</sub> 5.17
<b>Agl 1</b>	7.72	3.99	2.02, 2.35	3.39, 3.57	
<b>Phe 2</b>	-	5.02	3.38, 2.97	-	
<b>Agl 3</b>	8.51	4.29	2.13, 2.39	3.43, 3.48	
<b>Arg 4</b>	-	4.63	2.11, 1.74	1.58	<sup>δ</sup> CH 3.22; <sup>ε</sup> NH 7.43; NH <sub>2</sub> 7.65, 7.34

$^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR chemical shifts for **24** in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at 288K

$\text{CD}_3\text{OH}$	$N$	$C_\alpha$	$C_{\beta/\beta'}$	$C_{\gamma/\gamma'}$	Others
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	C 65.8
<b>Agl 1</b>	86.5	52.1	25.2	40.8	
<b>Phe 2</b>	-	55.9	33.5	-	
<b>Agl 3</b>	116.5	51.7	24.3	40.8	
<b>Arg 4</b>	-	54.7	24.3	25.1	$^{13}\text{C}$ 40.4; $^{15}\text{N}$ 83.4; N 103.1

**2-BrZ-(Agl-Phe-Agl-Arg)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (25)**



HPLC Retention time 1.30 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+2H)^{2+}] = 584.8$

Yield: 16.4%

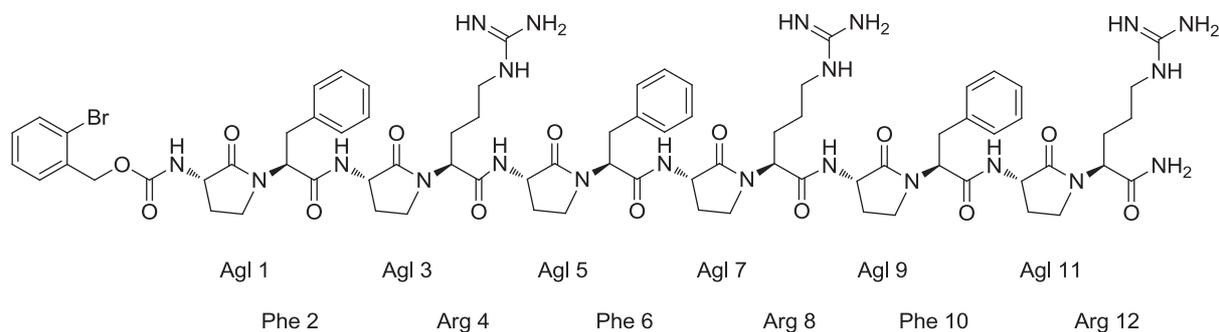
<sup>1</sup>H NMR chemical shifts for **25** in CD<sub>3</sub>OH at 298K.

<i>CD<sub>3</sub>OH</i>	<i>HN</i>	<i>H<sub>α</sub></i>	<i>H<sub>β/β'</sub></i>	<i>H<sub>γ/γ'</sub></i>	<i>Others</i>
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	CH <sub>2</sub> n.d.
<b>Agl 1</b>	7.69	4.02	2.34, 1.95	3.37, 3.49	
<b>Phe 2</b>	-	4.97	3.33, 2.93	-	
<b>Agl 3</b>	8.57	4.24	2.34, 2.00	3.34, 3.44	
<b>Arg 4</b>	-	4.64	2.02, 1.69	1.52	<sup>δ</sup> CH 3.19; <sup>ε</sup> NH 7.44
<b>Agl 5</b>	8.38	4.16	2.27, 2.09	3.38, 3.68	
<b>Phe 6</b>	-	5.03	3.36, 2.97	-	
<b>Agl 7</b>	8.56	4.27	2.32, 2.06	3.34, 3.51	
<b>Arg 8</b>	-	4.59	2.04, 1.71	1.52	<sup>δ</sup> CH 3.19; <sup>ε</sup> NH 7.44, NH <sub>2</sub>

<sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR chemical shifts for **25** in CD<sub>3</sub>OH at 298K.

<i>CD<sub>3</sub>OH</i>	<i>N</i>	<i>C<sub>α</sub></i>	<i>C<sub>β/β'</sub></i>	<i>C<sub>γ/γ'</sub></i>	<i>Others</i>
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	C 65.7
<b>Agl 1</b>	86.3	52.2	25.2	40.9	
<b>Phe 2</b>	-	55.9	33.9	-	
<b>Agl 3</b>	118.4	51.6	24.6	40.7	
<b>Arg 4</b>	-	54.5	24.5	25.0	<sup>δ</sup> C 40.4; <sup>ε</sup> N 83.7
<b>Agl 5</b>	116.6	51.1	24.7	40.9	
<b>Phe 6</b>	-	55.8	34.1	-	
<b>Agl 7</b>	118.6	51.4	24.6	40.7	
<b>Arg 8</b>	-	54.4	24.5	25.0	<sup>δ</sup> C 40.4; <sup>ε</sup> N 83.7; N 103.6

2-BrZ-(Agl-Phe-Agl-Arg)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (26)



HPLC Retention time 1.25 min

MS(ESI):  $m/z$  [(M+2H)<sup>2+</sup>] = 820.2 ; [(M+3H)<sup>3+</sup>] = 547.4

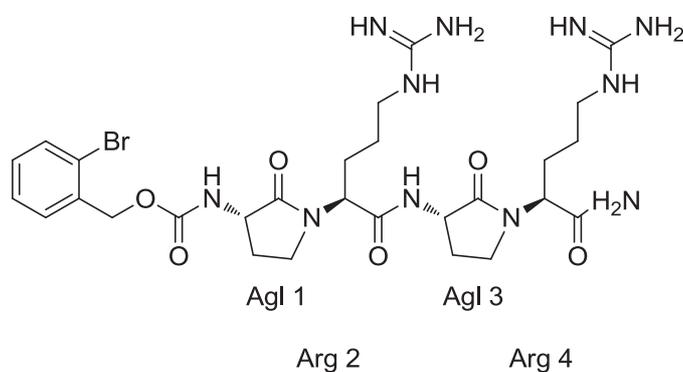
Yield: 10.2%

<sup>1</sup>H NMR chemical shifts for **26** in CD<sub>3</sub>OH at 298K.

CD <sub>3</sub> OH	HN	H <sub>α</sub>	H <sub>β/β'</sub>	H <sub>γ/γ'</sub>	Others
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	CH <sub>2</sub> 5.18
<b>Agl 1</b>	7.61	4.04	2.36, 1.97	3.38, 3.52	
<b>Phe 2</b>	-	4.99	3.35, 2.96	-	
<b>Agl 3</b>	8.52	4.27	2.37, 2.04	3.37, 3.47	
<b>Arg 4</b>	-	4.65	2.07, 1.74	1.56	<sup>δ</sup> CH 3.21, <sup>ε</sup> NH 7.47
<b>Agl 5</b>	8.33	4.22	2.30, 2.09	3.40, 3.67	
<b>Phe 6</b>	-	5.01	3.35, 2.98	-	
<b>Agl 7</b>	8.53	4.26	2.31, 2.01	3.31, 3.47	
<b>Arg 8</b>	-	4.61	2.01, 1.72	1.55	<sup>δ</sup> CH 3.22, <sup>ε</sup> NH 7.47
<b>Agl 9</b>	8.41	4.11	2.28, 2.05	3.40, 3.64	
<b>Phe 10</b>	-	5.06	3.41, 2.98	-	
<b>Agl 11</b>	8.49	4.37	2.37, 2.10	3.39, 3.56	
<b>Arg 12</b>	-	4.62	2.06, 1.76	1.55	<sup>δ</sup> CH 3.22; <sup>ε</sup> NH 7.47; NH <sub>2</sub> 7.65

$^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR chemical shifts for **26** in  $\text{CD}_3\text{OH}$  at 298K

$\text{CD}_3\text{OH}$	$N$	$C_\alpha$	$C_{\beta/\beta'}$	$C_{\gamma/\gamma'}$	Others
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	C 65.8
<b>Agl 1</b>	86.4	52.2	25.2	40.9	
<b>Phe 2</b>	-	56.0	33.9	-	
<b>Agl 3</b>	118.3	51.7	24.6	40.8	
<b>Arg 4</b>	-	54.5	24.4	25.1	$\delta\text{C}$ 40.5; $\epsilon\text{N}$ 83.7
<b>Agl 5</b>	116.8	51.2	24.6	41.0	
<b>Phe 6</b>	-	56.0	33.9	-	
<b>Agl 7</b>	117.8	51.7	24.6	40.7	
<b>Arg 8</b>	-	54.7	24.4	25.1	$\delta\text{C}$ 40.5; $\epsilon\text{N}$ 83.7
<b>Agl 9</b>	117.1	51.3	24.6	41.0	
<b>Phe 10</b>	-	56.0	33.9	-	
<b>Agl 11</b>	116.8	51.5	24.5	40.8	
<b>Arg 12</b>	-	54.5	24.9	25.1	$\delta\text{C}$ 40.5; $\epsilon\text{N}$ 83.7 ; N 103.4

2-BrZ-(Agl-Arg)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (**27**)

HPLC Retention time 0.92 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+] = 708.3$  ;  $[(M+ZH)^{2+}] = 354.6$ 

Yield: 27.4%

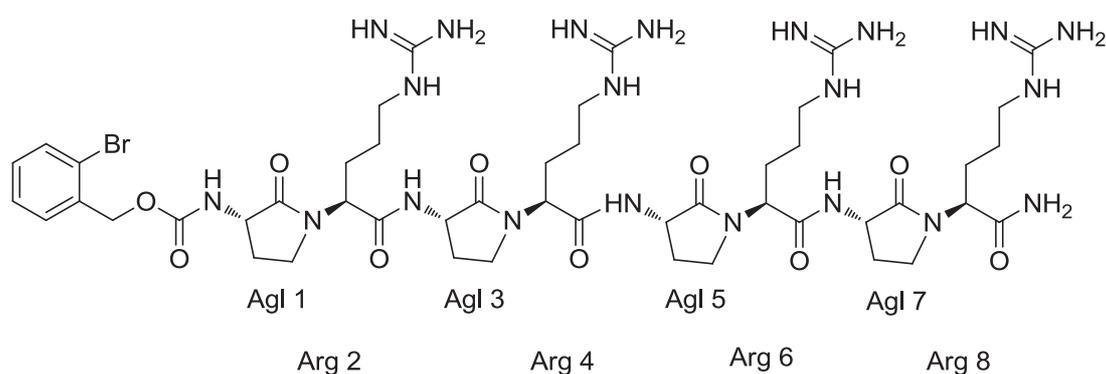
<sup>1</sup>H NMR chemical shifts for **27** in CD<sub>3</sub>OH at 298K

CD <sub>3</sub> OH	HN	H <sub>α</sub>	H <sub>β/β'</sub>	H <sub>γ/γ'</sub>	Others
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	CH <sub>2</sub> 5.20
<b>Agl 1</b>	7.76	4.26	2.50, 2.11	3.38, 3.54	
<b>Arg 2</b>	-	4.66	2.05, 1.77	1.58	<sup>δ</sup> CH 3.23; <sup>ε</sup> NH 7.42
<b>Agl 3</b>	8.39	4.38	2.43, 2.16	3.42, 3.53	
<b>Arg 4</b>	-	4.61	2.08, 1.74	1.58	<sup>δ</sup> CH 3.23; <sup>ε</sup> NH 7.42; NH <sub>2</sub> 7.54, 7.19

<sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR chemical shifts for **27** in CD<sub>3</sub>OH at 298K

CD <sub>3</sub> OH	N	C <sub>α</sub>	C <sub>β/β'</sub>	C <sub>γ/γ'</sub>	Others
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	C 65.8
<b>Agl 1</b>	86.3	52.2	25.2	40.5	
<b>Arg 2</b>	-	54.6	24.6	25.1	<sup>δ</sup> C 40.5; <sup>ε</sup> N 83.4
<b>Agl 3</b>	116.4	51.5	24.4	40.8	
<b>Arg 4</b>	-	54.6	24.6	25.1	<sup>δ</sup> C 40.5; <sup>ε</sup> N 83.4; N 102.9

### 2-BrZ-(Agl-Arg)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (**28**)



HPLC Retention time 0.83 min

MS(ESI): m/z [(M+H)<sup>+</sup>] = 1186.4 ; [(M+2H)<sup>2+</sup>] = 593.8

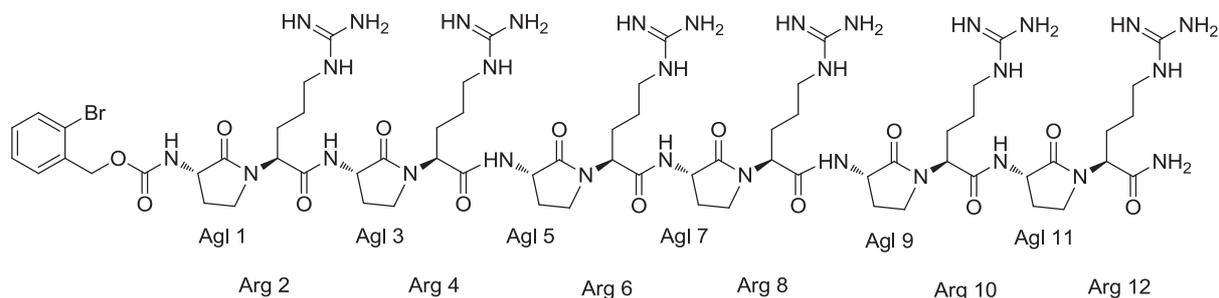
Yield: 17.2%

<sup>1</sup>H NMR chemical shifts for **28** in CD<sub>3</sub>OH at 298K.

<i>CD<sub>3</sub>OH</i>	<i>HN</i>	<i>H<sub>α</sub></i>	<i>H<sub>β/β'</sub></i>	<i>H<sub>γ/γ'</sub></i>	<i>Others</i>
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	CH <sub>2</sub> 5.21
<b>Agl 1</b>	7.71	4.30	2.50, 2.09	3.39, 3.52	
<b>Arg 2</b>	-	4.66	2.06, 1.77	1.57	<sup>δ</sup> CH 3.22; <sup>ε</sup> NH
<b>Agl 3</b>	8.44	4.44	2.43, 2.14	3.40, 3.57	
<b>Arg 4</b>	-	4.66	2.06, 1.77	1.57	<sup>δ</sup> CH 3.22; <sup>ε</sup> NH
<b>Agl 5</b>	8.57	4.39	2.41, 2.15	3.40, 3.57	
<b>Arg 6</b>	-	4.66	2.06, 1.77	1.57	<sup>δ</sup> CH 3.22; <sup>ε</sup> NH
<b>Agl 7</b>	8.48	4.50	2.45, 2.18	3.44, 3.60	
<b>Arg 8</b>	-	4.62	2.06, 1.78	1.58	<sup>δ</sup> CH 3.19; <sup>ε</sup> NH , NH <sub>2</sub> 7.66, 7.22

<sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR chemical shifts for **28** in CD<sub>3</sub>OH at 298K

<i>CD<sub>3</sub>OH</i>	<i>N</i>	<i>C<sub>α</sub></i>	<i>C<sub>β/β'</sub></i>	<i>C<sub>γ/γ'</sub></i>	<i>Others</i>
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	C 65.9
<b>Agl 1</b>		52.3	25.2	40.7	
<b>Arg 2</b>	-	54.7	24.8	25.1	<sup>δ</sup> C 40.4; <sup>ε</sup> N 83.7
<b>Agl 3</b>	117.8	51.5	24.6	40.7	
<b>Arg 4</b>	-	54.7	24.8	25.1	<sup>δ</sup> C 40.4; <sup>ε</sup> N 83.7
<b>Agl 5</b>	117.5	51.5	24.6	40.7	
<b>Arg 6</b>	-	54.7	24.8	25.1	<sup>δ</sup> C 40.4; <sup>ε</sup> N 83.7
<b>Agl 7</b>	116.7	51.4	24.6	40.7	
<b>Arg 8</b>	-	54.6	24.8	25.1	<sup>δ</sup> C 40.4; <sup>ε</sup> N 83.7; N 103.6

2-BrZ-(Agl-Arg)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (**29**)

HPLC Retention time 0.74 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+3H)^{3+}] = 556.3$  ;  $[(M+4H)^{4+}] = 417.4$  ;  $[(M+5H)^{5+}] = 334.1$

Yield: 9.2%

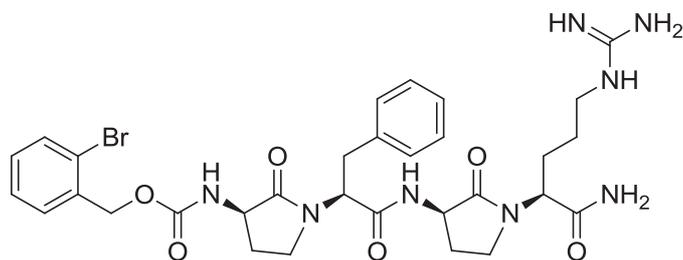
<sup>1</sup>H NMR chemical shifts for **29** in CD<sub>3</sub>OH at 298K.

CD <sub>3</sub> OH	HN	H <sub>α</sub>	H <sub>β/β'</sub>	H <sub>γ/γ'</sub>	Others
BrZ	-	-	-	-	CH <sub>2</sub> 5.21
Agl 1	7.71	4.29	2.49, 2.08	3.39, 3.52	
Arg 2	-	4.66	2.05, 1.78	1.58	<sup>δ</sup> CH 3.24
Agl 3	8.43	4.46	2.44, 2.14	3.42, 3.59	
Arg 4	-	4.64	2.05, 1.78	1.58	<sup>δ</sup> CH 3.24
Agl 5	8.47	4.66	2.40, 2.13	3.40, 3.60	
Arg 6	-	4.64	2.05, 1.78	1.58	<sup>δ</sup> CH 3.24
Agl 7	8.55	4.64	2.44, 2.14	3.40, 3.58	
Arg 8	-	4.64	2.05, 1.78	1.58	<sup>δ</sup> CH 3.24
Agl 9	8.62	4.41	2.45, 2.17	3.43, 3.58	
Arg 10	-	4.68	2.09, 1.77	1.58	<sup>δ</sup> CH 3.23
Agl 11	8.48	4.52	2.45, 2.18	3.44, 3.63	
Arg 12	-	4.63	2.06, 1.78	1.58	<sup>δ</sup> CH 3.24; <sup>ε</sup> NH 7.57

<sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR chemical shifts for **29** in CD<sub>3</sub>OH at 298K.

<b>CD<sub>3</sub>OH</b>	<i>N</i>	<i>C<sub>α</sub></i>	<i>C<sub>β/β'</sub></i>	<i>C<sub>γ/γ'</sub></i>	<i>Others</i>
<b>BrZ</b>	-	-	-	-	C 65.9
<b>Agl 1</b>	86.0	51.4	25.1	40.7	
<b>Arg 2</b>	-	54.7	24.8	25.1	<sup>δ</sup> C 40.5; <sup>ε</sup> N
<b>Agl 3</b>	117.6	51.4	24.6	40.8	
<b>Arg 4</b>	-	54.7	24.8	25.1	<sup>δ</sup> C 40.5; <sup>ε</sup> N
<b>Agl 5</b>	117.0	51.4	24.6	40.8	
<b>Arg 6</b>	-	54.7	24.8	25.1	<sup>δ</sup> C 40.5; <sup>ε</sup> N
<b>Agl 7</b>	117.8	51.4	24.6	40.8	
<b>Arg 8</b>	-	54.7	24.8	25.1	<sup>δ</sup> C 40.5; <sup>ε</sup> N
<b>Agl 9</b>	117.8	51.4	24.6	40.8	
<b>Arg 10</b>	-	54.7	24.8	25.1	<sup>δ</sup> C 40.5; <sup>ε</sup> N
<b>Agl 11</b>	116.6	51.4	24.6	40.8	
<b>Arg 12</b>	-	54.7	24.8	25.1	<sup>δ</sup> C 40.5; <sup>ε</sup> N 83.3; N 103.7

**2-BrZ-((R)-Agi-Phe-(R)-Agi-Arg)-NH<sub>2</sub> (30)**

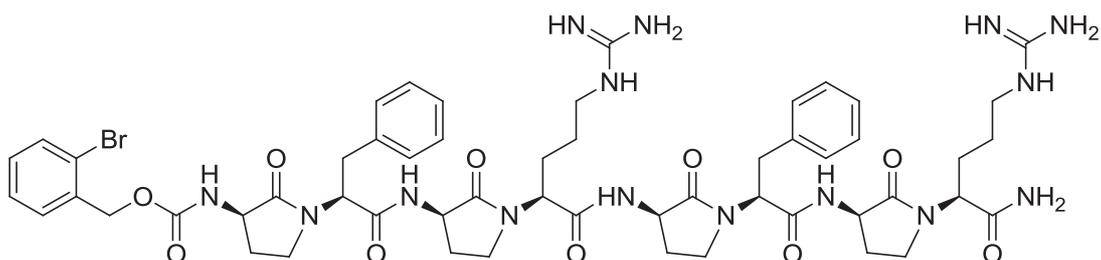


HPLC Retention time 1.24 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+]$  = 699.2

Yield: 23.2%

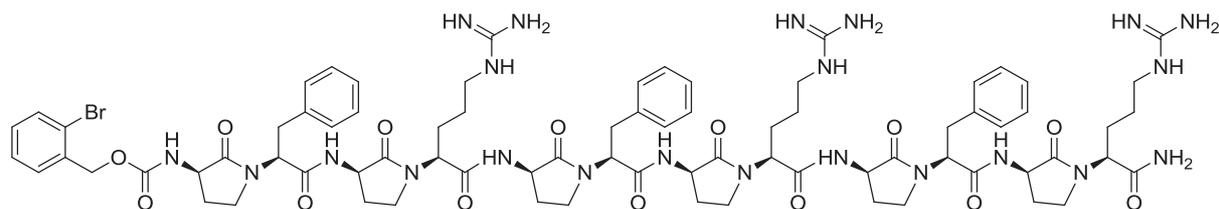
**2-BrZ-((R)-Agi-Phe-(R)-Agi-Arg)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (31)**



HPLC Retention time 1.23 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+]$  = 1168.6 ,  $[(M+2H)^{2+}]$  = 585.9

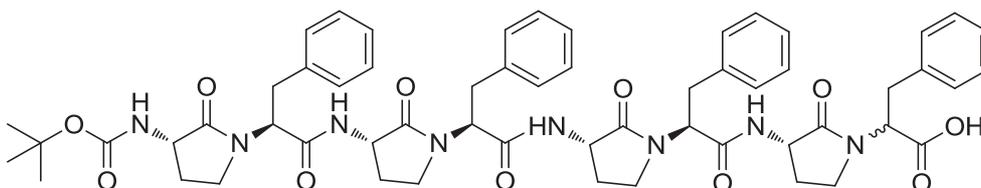
Yield: 15.1%

**2-BrZ-((R)-Agi-Phe-(R)-Agi-Arg)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (32)**

HPLC Retention time 1.18 min m/z

MS(ESI): m/z [(M+2H)<sup>2+</sup>] = 820.7 ; [(M+3H)<sup>3+</sup>] = 547.6

Yield: 9.5%

**Boc-(Agi-Phe)<sub>4</sub>-OH (22)**

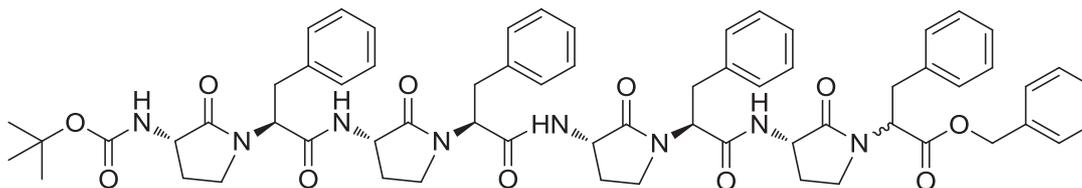
Compound **22** was synthesized on 2-chlorotrityl resin (300 mg, 0.65 mmol/g after UV titration, 1eq). The first Fmoc protected amino acid was anchored on the resin with the procedure **III**, then the peptide was synthesized with repetition of the procedure **IV** and **V** and Boc-Met-OH was used instead of Fmoc-Met-OH for the last coupling step. The foldamer on resin was obtained with the procedure **XII**. The oligomer was cleaved from resin with the adapted procedure **XI** and afforded after lyophilization 180 mg of crude product as a white powder. It was used without purification in the synthesis of compound **23**.

HPLC Retention time 1.80 and 1.84 min

MS(ESI): m/z [(M+H)<sup>+</sup>] = 1039.5 ; [(M+2H)<sup>2+</sup>] = 470.2

Yield : 88.8 %

**Boc-(Agl-Phe)<sub>4</sub>-OBn (23)**



The mixture of diastereoisomers **22** (180 mg, 0.173 mmol) was dissolved in DMF (1 mL) then Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (56 mg, 0.173 mmol, 1 eq) and BnBr (30  $\mu$ L, 0.208 mmol, 1.2 eq) were added to the mixture. The reaction mixture was stirred overnight and then poured in EtOAc (50 mL) and washed three times with KHSO<sub>4</sub> (50 mL, 1M), three times with saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and one time with brine. The solution was then dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The remaining oil was then purified by preparative HPLC in order to afford 5 mg of the product as a white powder.

HPLC Retention time 2.12 min

MS(ESI):  $m/z$  [(M+H)<sup>+</sup>] = 1129.6 ; [(M+2H)<sup>2+</sup>] = 515.3

Yield : 6.3 %

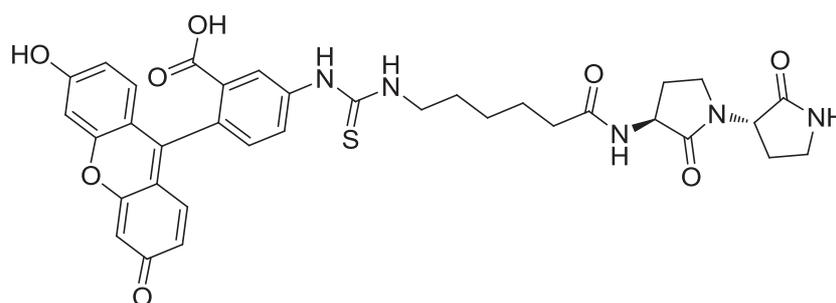
▪ **General procedure for the preparation of fluorescent labelled oligomers 33-44 and 47-50**

---

All peptides were synthesized with automated peptide synthesizer CEM Liberty. The resin was transferred in syringes with frits. Boc-Ahx-OH (115.65 mg, 0.75 mmol, 3 eq), HBTU (284.25 mg, 0.75 mmol, 3 eq) as coupling reagent and DIEA (172  $\mu$ L, 1 mmol, 4 eq) dissolved in DMF were then added to the resin and stirred mechanically for 2 hours. The  $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactam oligomers were obtained on solid support thanks to the procedure **XII**. Then, Boc protecting group was removed in basic condition using the procedure **VI**. Fluorescent label was incorporated using the procedure **VII**. Oligomers were then cleaved from the resin according to the procedure **X** and purified by preparative HPLC.

**FI-Ahx-(Agl)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (33)**

---

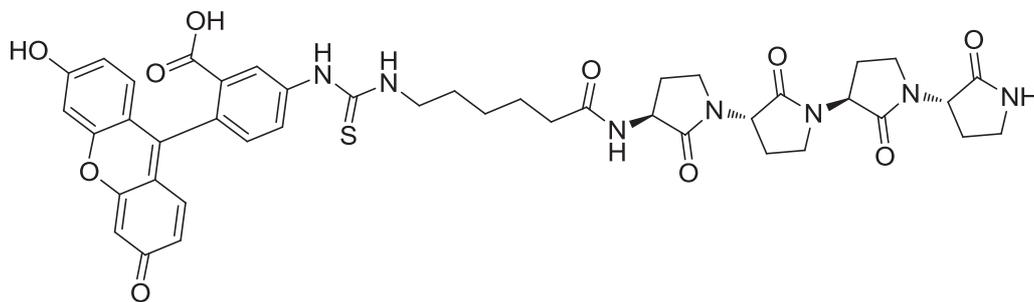


HPLC Retention time 1.19 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^{1+}] = 686.3$  ;  $[(M+2H)^{2+}] = 348.2$

Yield : 37.2%

**FI-Ahx-(Agl)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (34)**

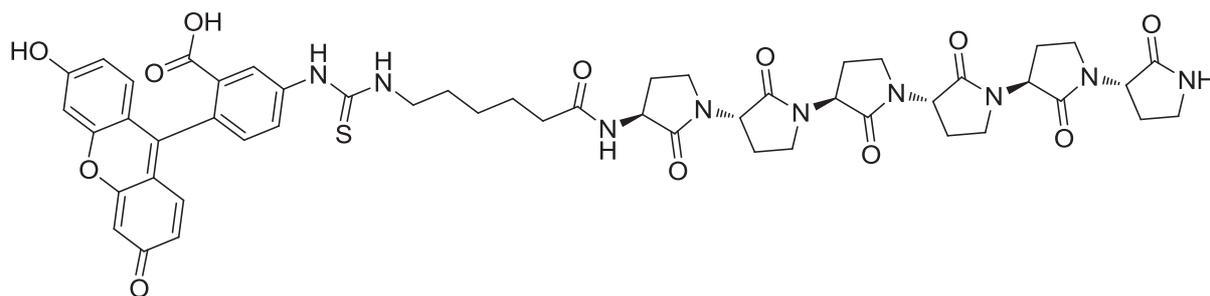


HPLC Retention time 1.18 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+]$  = 852.4 ;  $[(M+2H)^{2+}]$  = 426.8

Yield : 32.8%

**FI-Ahx-(Agl)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (35)**



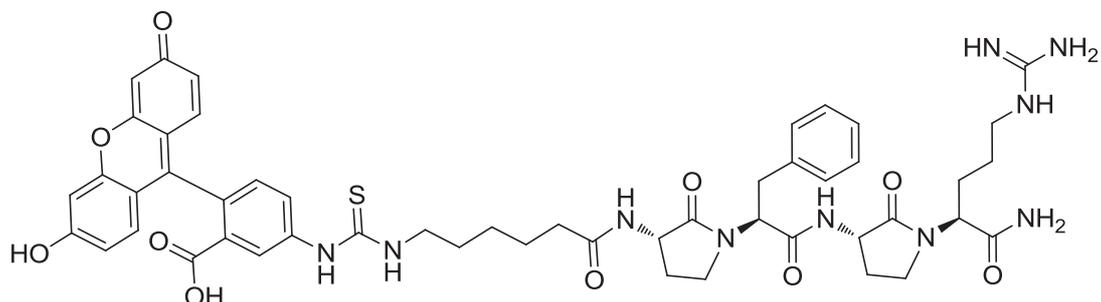
HPLC Retention time 1.20 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+]$  = 1018.8 ;  $[(M+2H)^{2+}]$  = 509.9

Yield : 14.8%

**FI-Ahx-Agl-Phe-Agl-Arg-NH<sub>2</sub> (36)**

---



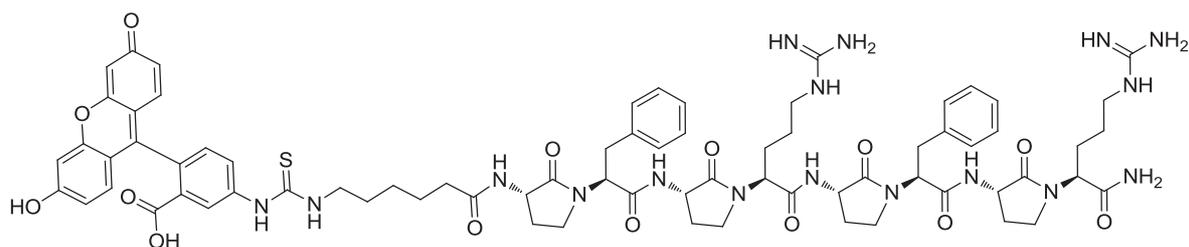
HPLC Retention time 1.23 min

MS(ESI): m/z [(M+H)<sup>+</sup>] = 989.5 ; [(M+2H)<sup>2+</sup>] = 495.3

Yield : 42.2%

**FI-Ahx-(Agl-Phe-Agl-Arg)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (37)**

---

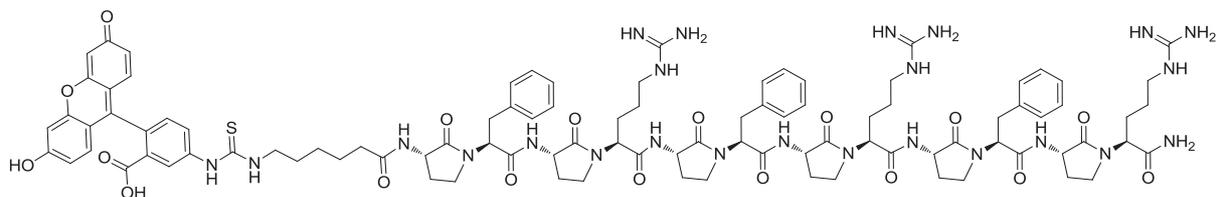


HPLC Retention time 1.22 min

MS(ESI): m/z [(M+2H)<sup>2+</sup>] = 730.1 ; [(M+3H)<sup>3+</sup>] = 487.2

Yield : 37.2%

**FI-Ahx-(Agl-Phe-Agl-Arg)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (38)**

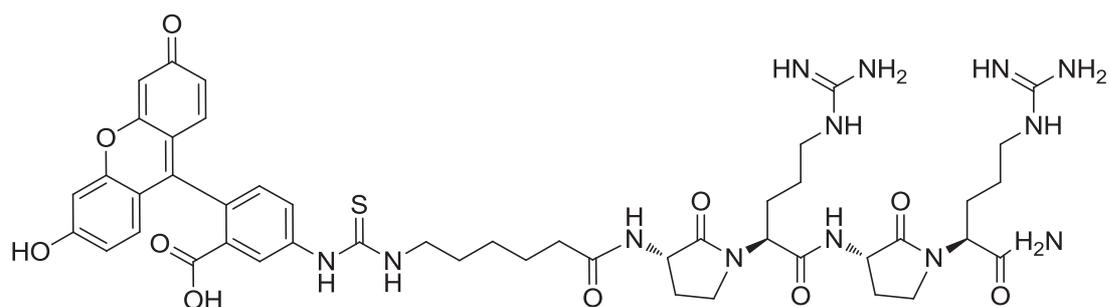


HPLC Retention time 1.22 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+2H)^{2+}] = 965.1$  ;  $[(M+3H)^{3+}] = 643.5$  ;  $[(M+4H)^{4+}] = 483.0$

Yield : 11.5%

**FI-Ahx-(Agl-Arg)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (39)**

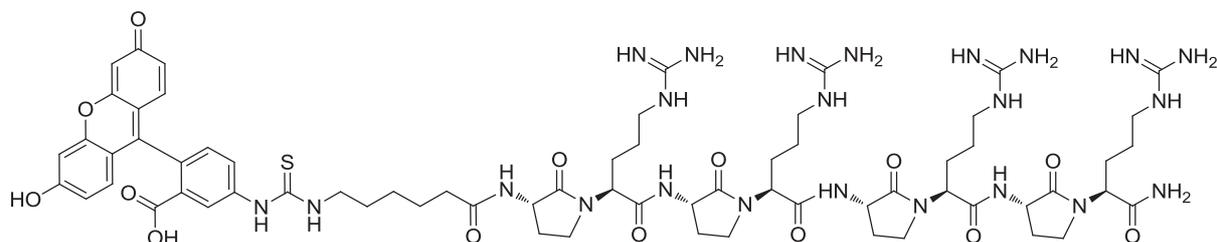


HPLC Retention time 1.00 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+] = 998.5$  ;  $[(M+2H)^{2+}] = 499.9$  ;  $[(M+3H)^{3+}] = 333.7$

Yield : 43.6%

**FI-Ahx-(Agl-Arg)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (40)**

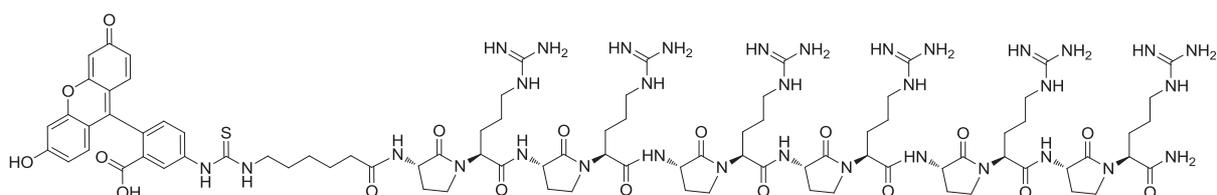


HPLC Retention time 0.90 min

MS(ESI): m/z [(M+2H)<sup>2+</sup>] = 739.1 ; [(M+3H)<sup>3+</sup>] = 493.2 ; [(M+4H)<sup>4+</sup>] = 370.1

Yield : 10.0%

**FI-Ahx-(Agl-Arg)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (41)**

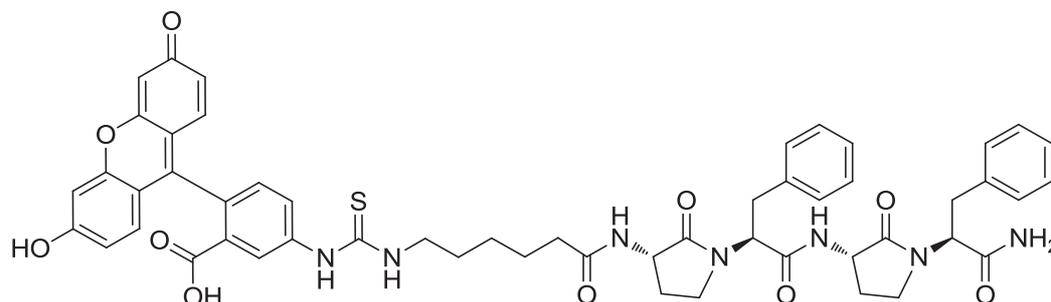


HPLC Retention time 0.79 min

MS(ESI): m/z [(M+3H)<sup>3+</sup>] = 653.5 ; [(M+4H)<sup>4+</sup>] = 489.8 ; [(M+5H)<sup>5+</sup>] = 392.0 ; [(M+6H)<sup>6+</sup>] = 326.9

Yield : 7.2%

**FI-Ahx-(Agi-Phe)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (42)**

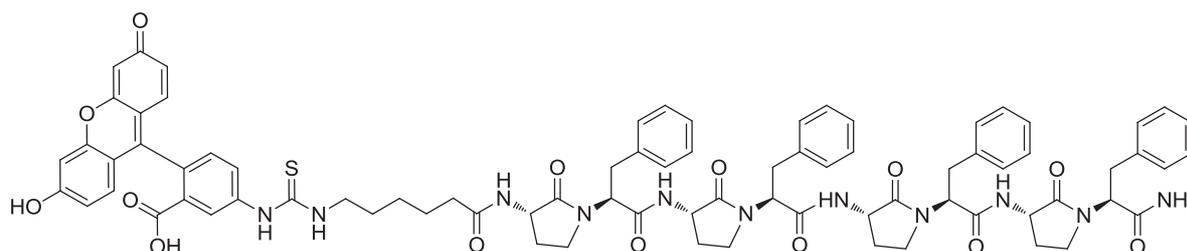


HPLC Retention time 1.51 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+]$  = 980.5 ;  $[(M+2H)^{2+}]$  = 490.8

Yield : 35.3

**FI-Ahx-(Agi-Phe)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (43)**

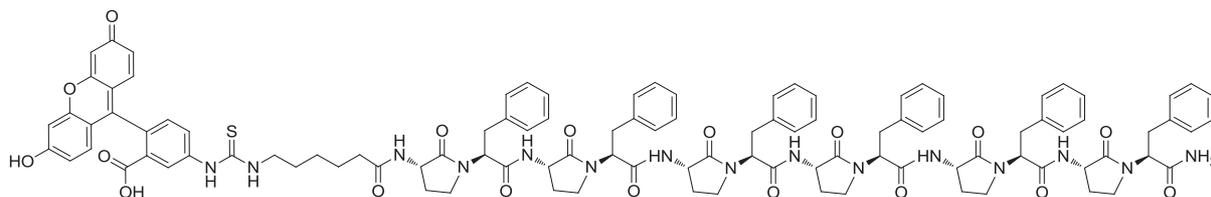


HPLC Retention time 1.72 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+]$  = 1441.8 ;  $[(M+2H)^{2+}]$  = 721.0

Yield : 24.6%

**FI-Ahx-(Agl-Phe)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (44)**

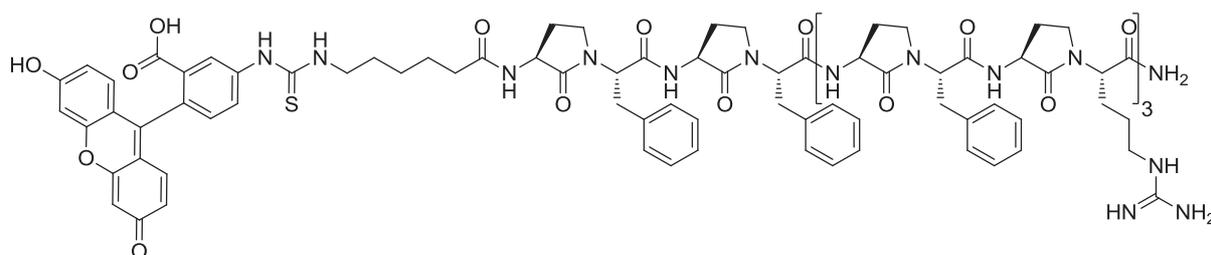


HPLC Retention time 1.85 min

MS(ESI):  $m/z [(M+2H)^{2+}] = 951.6$

Yield : 12.2%

**FI-Ahx-(Agl-Phe)<sub>2</sub>-(Agl-Phe-Agl-Arg)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (47)**

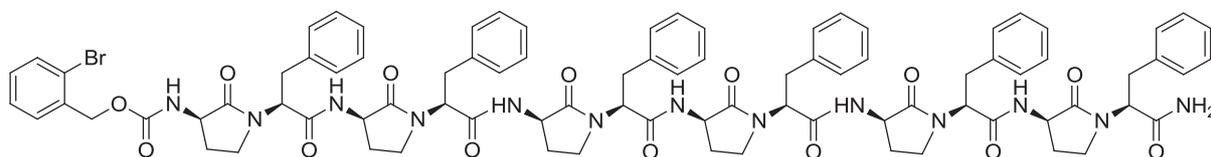


HPLC Retention time 1.38 min

MS(ESI):  $m/z [(M+3H)^{3+}] = 797.1$  ;  $[(M+4H)^{4+}] = 598.2$

Yield : 14.5%

**FI-Ahx-((R)-Agl-Phe)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (48)**

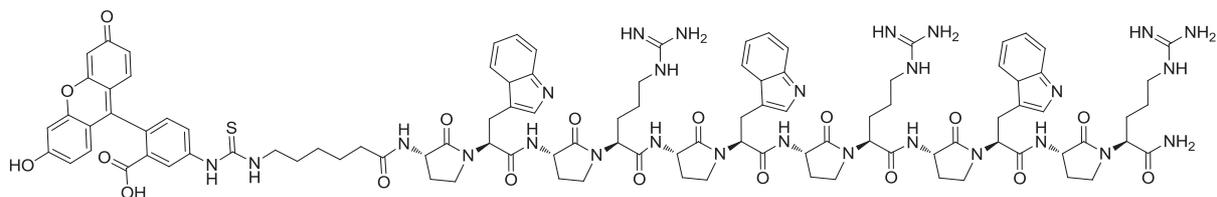


HPLC Retention time 1.81 min

MS(ESI):  $m/z [(M+2H)^{2+}] = 951.6$

Yield : 12.2%

**FI-Ahx-(Agl-Trp-Agl-Arg)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (49)**

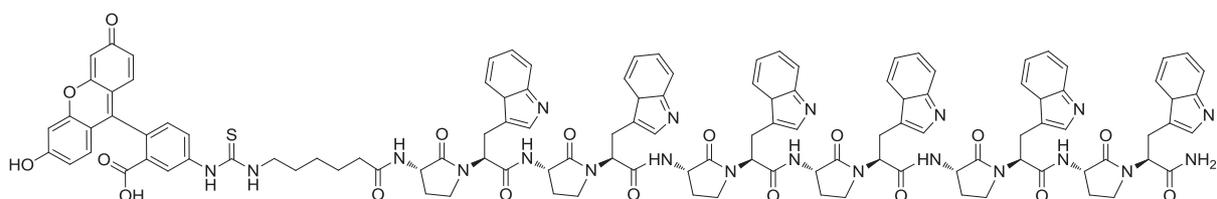


HPLC Retention time 1.25 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+3H)^{3+}] = 682.8$  ;  $[(M+4H)^{4+}] = 512.2$

Yield : 5.4%

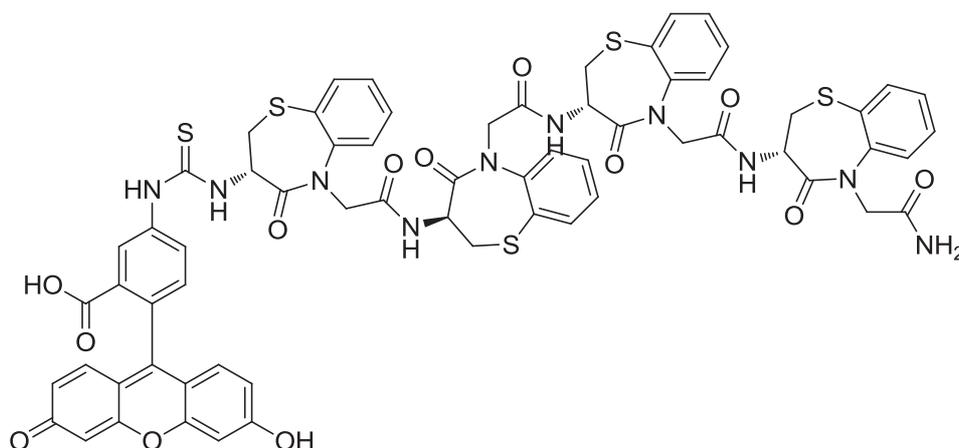
**FI-Ahx-(Agl-Trp)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (50)**



HPLC Retention time 1.84 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+2H)^{2+}] = 1068.5$  ;  $[(M+3H)^{3+}] = 712.9$

Yield : 14.3%

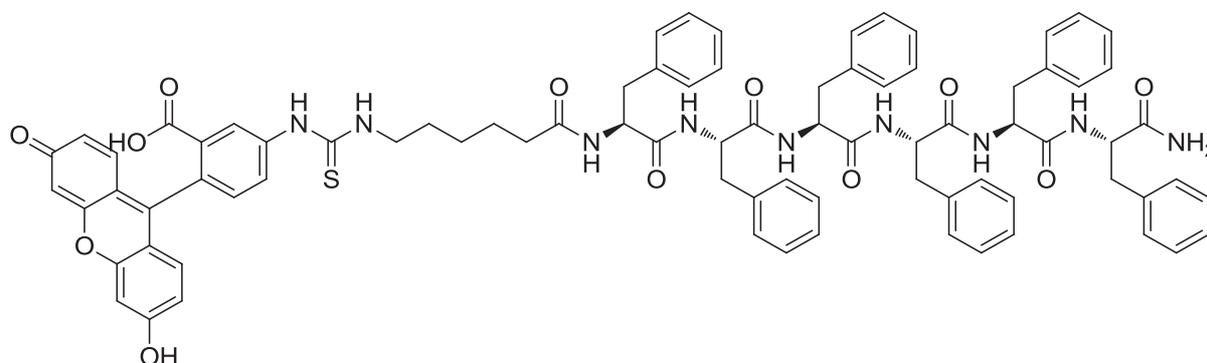
FI-(DBT)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (45)

The first constrained dipeptide mimic of the sequence was anchored on the Rink amide resin (500 mg, 0.45 mmol/g) using the procedure II. Oligomers were then synthesized using cycle of deprotection, washing and coupling steps according to the procedure V, I and IV respectively. Fluorescent label was incorporated using the procedure VII. The oligomer was then cleaved from the resin according to the procedure X and purified by preparative HPLC.

HPLC Retention time 1.80 min

MS(ESI):  $m/z$  [(M+H)<sup>+</sup>]-1343.1 ; [(M+2H)<sup>2+</sup>]-672.1

Yield: 24%

FI-Ahx-(Phe)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (46)

The peptide was synthesized with automated peptide synthesizer CEM Liberty on a 25 mmol scale. Resin was transferred in syringes with frits. Fluorescent label was

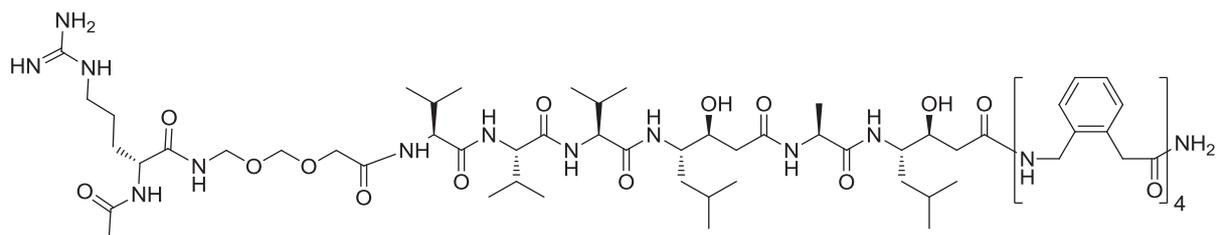
incorporated using the procedure **VII**. The oligomer was then cleaved from the resin according to the procedure **X** and purified by preparative HPLC.

HPLC Retention time 1.93

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+] = 1403.2$  ;  $[(M+2H)^{2+}] = 701.8$

Yield : 15.8 %

### Ac-D-Arg-O<sub>2</sub>Oc-(Val)<sub>3</sub>-Sta-Ala-Sta-(AMPA)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (51)



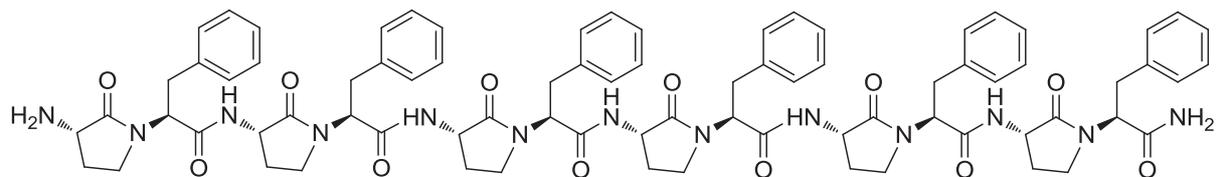
Compound **54** was synthesized on Rink amide resin (6 g, loading of 0.45 mmol/g, 2.7 mmol of linker) following the general procedure for SPPS. First Fmoc-AMPA-OH moiety was anchored following the procedure **II** and peptide was then synthesized following cycle of deprotection and coupling steps according to the procedure **VII** and **VIII** respectively. The final acetylation was done using procedure **IX**. After that, peptide was cleaved from the resin following the procedure **X** and purified by preparative HPLC to yield the pure product as a white powder (450 mg).

HPLC Retention time 1.34 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+] = 1633.3$  ;  $[(M+2H)^{2+}] = 817.1$  ;  $[(M+3H)^{3+}] = 544.9$

Yield : 9.79%

### H-(Agl-Phe)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (52)



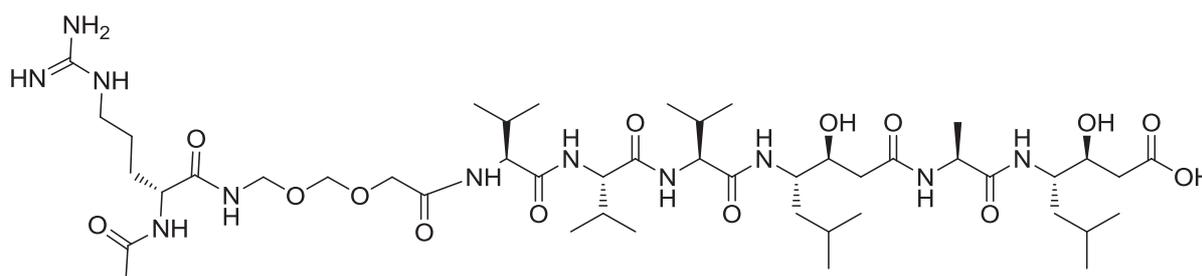
The Boc protected peptides were synthesized on Rink amide resin using the automated peptide synthesizer CEM Liberty on a 10 mmol scale. The Agl-Phe oligomer was

obtained according to the procedure **XII** and was then cleaved from the resin using the procedure **X** to yield the crude oligomer (79 mg) which was used as crude without further purification.

HPLC Retention time 1.58 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+]$  = 1398.7 ;  $[(M+2H)^{2+}]$  = 700.5

### Ac-D-Arg-O<sub>2</sub>Oc-Val-Val-Val-Sta-Ala-Sta-OH (53)

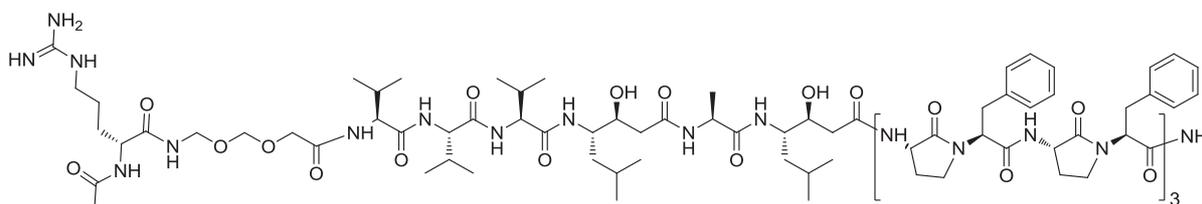


The peptide was anchored on the chlorotriptyl resin (500 mg, 1;44 mmol/g, 0.77 mmol of linker on the resin) using the procedure **V**. Effective loading of 0.5 mmol/g was determined by UV titration after Fmoc removal. Peptide was synthesized with cycle of deprotection and coupling steps according to the procedure **VII** and **VIII** respectively and acetylated using the procedure **IX**. After cleavage from the resin using the procedure **XI**, the crude oligomer (213mg) was obtained as a white powder.

HPLC Retention time 1.12 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+H)^+]$  = 1044.7 ;  $[(M+2H)^{2+}]$  = 522.8

### Ac-D-Arg-O<sub>2</sub>Oc-Val-Val-Val-Sta-Ala-Sta-(Agl-Phe)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (54)



The compound **55** (50 mg, 0.053 mmol, 1 eq) and DIEA (18.9  $\mu$ L, 0.11 mmol, 2 eq) were dissolved in DMF (3 mL) in a round bottom flask. Compound **56** (63.6 g, 0.058 mmol, 1.1 eq) and BOP (16 mg, 0.0058 mmol, 1.1 eq) were dissolved in DMF (2 mL) and added to

the reaction and stirred magnetically during 2 hours. After completion peptide was then precipitated with a solution of saturated  $\text{NaHCO}_3$ , filtered over fritted glass and washed multiple times with saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KHSO}_4$  (1 M) and diethylether. The crude was then purified by preparative HPLC and yield the pure product as a white powder (10 mg).

HPLC Retention time 1.64 min

MS(ESI):  $m/z$   $[(M+2H)^{2+}] = 1213.2$  ;  $[(M+3H)^{3+}] = 809.2$

Yield : 7.8%

- (1) Burla, M. C.; Caliandro, R.; Camalli, M.; Carrozzini, B.; Cascarano, G. L.; De Caro, L.; Giacovazzo, C.; Polidori, G.; Spagna, R. SIR2004 : An Improved Tool for Crystal Structure Determination and Refinement. *J. Appl. Crystallogr.* **2005**, *38*, 381–388.
- (2) Sheldrick, G. M. A Short History of *SHELX*. *Acta Crystallogr. A* **2008**, *64*, 112–122.
- (3) Spek, A. L. Structure Validation in Chemical Crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 148–155.
- (4) Johnson, B. A.; Blevins, R. A. NMR View: A Computer Program for the Visualization and Analysis of NMR Data. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 603–614.
- (5) Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, 1986.
- (6) Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668–1688.
- (7) Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K. MOLMOL: A Program for Display and Analysis of Macromolecular Structures. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 51–55.
- (8) Hancock, W. S.; Battersby, J. E. A New Micro-Test for the Detection of Incomplete Coupling Reactions in Solid-Phase Peptide Synthesis Using 2,4,6-Trinitrobenzene-Sulphonic Acid. *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 260–264.
- (9) Echalié, C.; Al-Halifa, S.; Kreiter, A.; Enjalbal, C.; Sanchez, P.; Ronga, L.; Puget, K.; Verdié, P.; Amblard, M.; Martinez, J.; et al. Heating and Microwave Assisted SPPS of C-Terminal Acid Peptides on Trityl Resin: The Truth behind the Yield. *Amino Acids* **2013**, *45*, 1395–1403.
- (10) Scarborough, P. E.; Dunn, B. M.; Guruprasad, K.; Topham, C.; Blundell, T. L.; Richo, G. R.; Conner, G. E. Exploration of Subsite Binding Specificity of Human Cathepsin D through Kinetics and Rule-Based Molecular Modeling. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 264–276.



## **Synthèse d'oligomères de mimes contraints de dipeptides pour la vectorisation intracellulaire de molécules bioactives.**

### **Résumé**

La synthèse d'une nouvelle famille d'oligomères de mimes contraints de dipeptides est décrite dans ce manuscrit. Les monomères utilisés sont des motifs 3(S)-amino-5-carboxyméthyl-2,3-dihydro-1,5-benzothiazépine-4(5H)-one (DBT), acide 2-aminométhyl-phényl-acétique (AMPA) et  $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames. La structure secondaire de ces édifices a été étudiée par spectroscopies RMN, IR, CD et RX. Nous avons montré tout d'abord que les oligomères de DBT sont capables d'adopter des structures stables et définies en ruban. En se basant sur ces structures, nous avons conçu de nouveaux systèmes beaucoup plus versatiles qui permettent de répartir diverses fonctions (basiques, acides, aromatiques) de part et d'autre de l'axe du ruban. Une stratégie de synthèse originale a été développée à cet effet. Elle consiste en la conversion directe de séquences peptidiques, incorporant des méthionines, en oligomères d' $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames. Ils sont capables, au même titre que ceux de DBT, d'adopter des structures en ruban et de pénétrer dans les cellules. Enfin, une étude *in vivo* chez la souris a montré le fort potentiel anti-tumoral d'un bioconjugué associant des oligomères d'AMPA à un inhibiteur de la cathepsine D, une enzyme lysosomale surexprimée et sécrétée par de nombreuses tumeurs solides.

**Mots clés :** Foldamères, Mimes contraint de dipeptides, Cathepsine D, Structure en ruban, Oligomères d' $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactames, Oligomères pénétrants

**Synthesis of constrained dipeptide mimetic oligomers for the intracellular delivery of bioactive compounds.**

### **Summary**

The synthesis of a new type of constrained dipeptide mimetics oligomers is described. Monomers used are the (3S)-amino-5-(carboxymethyl)-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5H)-one (DBT), the 2-aminomethyl-phenyl-acetic acid (AMPA) and  $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactams. The secondary structure of those architectures has been studied by NMR, IR, CD and X-ray spectroscopies. Firstly, we demonstrated that DBT oligomers are able to adopt stable and well defined ribbon like structures. Based on these structures, we designed new systems, far more versatile which are able to distribute various functions (basic, acidic, aromatic) on each side of the ribbon axis. An original strategy has been developed for this purpose. It consists in the direct conversion of peptidic sequences, incorporating methionine, in  $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactams oligomers. They are able, as the DBT, to adopt ribbon like structures and to be internalized into cells. Finally, an *in vivo* study in mice showed the high anti-tumoral potency of a bioconjugate linking AMPA oligomers to an inhibitor of the cathepsin D, a lysosomal enzyme overexpressed and secreted by numerous solid tumors.

**Key-words :** Foldamers, Constrained dipeptide mimetics, Cathepsin D,  $\beta$  bend ribbon structure,  $\alpha$ -amino  $\gamma$ -lactam oligomers, Cell penetrating oligomers