



Utilisation d'unités γ -lactames pour le développement de vecteurs de pénétration intracellulaire et la conception de foldamères

Alexandre Messerschmitt

► To cite this version:

Alexandre Messerschmitt. Utilisation d'unités γ -lactames pour le développement de vecteurs de pénétration intracellulaire et la conception de foldamères. Autre. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONT018 . tel-02297838

HAL Id: tel-02297838

<https://theses.hal.science/tel-02297838>

Submitted on 26 Sep 2019

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 DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ingénierie Moléculaire

École doctorale Sciences Chimiques Balard

Unité de recherche Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247

**Utilisation d'unités γ -lactames pour le développement de
vecteurs de pénétration intracellulaire et la conception de
foldamères.**

Présentée par Alexandre MESSERSCHMITT

Le 10 janvier 2019

Sous la direction de Mme Muriel AMBLARD

Devant le jury composé de

Mme Nadia PATINO, Professeur, Université Nice Sophia Antipolis

M Claude TAILLEFUMIER, Professeur, Université Clermont Auvergne

M Jean-Louis Bantignies, Professeur, Université de Montpellier

M Jean Martinez, Professeur, Université de Montpellier

M Baptiste Legrand, Ingénieur de recherche, Université de Montpellier

Mme Muriel Amblard, Directeur de recherche CNRS, Université de Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur, Président

Invité

Invité

Directeur de thèse



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

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 "*Acides Aminés, Hétérocycles, Peptides & Protéines*" dirigée par le Docteur Muriel Amblard.

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 Claude Taillefumier pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Je désire aussi exprimer ma gratitude au Professeur Jean-Louis Bantignies qui a accepté de participer à mon jury.

Je tiens à remercier mon Directeur de recherche, Mme Muriel Amblard, pour m'avoir encadré durant mon stage de fin d'études et m'avoir proposé ce sujet de thèse pluridisciplinaire dans lequel j'ai pu développer mes compétences. Je te remercie pour la richesse scientifique que tu m'as apportée.

Je voudrais remercier particulièrement le Docteur Baptiste Legrand qui m'a formé à l'analyse structurale et a été un acteur important dans cette thèse, ainsi que le Docteur Lubomir Vezenkou qui m'a apporté son soutien et son aide pour mes travaux en chimie. Ils m'ont beaucoup appris tout au long de ma thèse.

Je remercie le Professeur Jean-Louis Bantignies et David Maurin pour l'aide qu'ils m'ont apportée lorsque j'ai effectué les études infrarouge au sein de leur laboratoire.

Merci à tous ceux qui ont pris le temps de m'apprendre, de me conseiller, et de m'aider. Je pense à Gilles Subra, Pascal Verdié, Luc Brunel, Jean-Alain Fehrentz, Pierre Sanchez, Jeremie Ciccione et bien d'autres...

Cette expérience n'aurait pas été la même sans mes précieux collègues avec qui j'ai partagé de nombreuses soirées jeux, randos, soirées plage et j'en passe. Un grand merci à mes très chers voisins de bureau Laurent et Kévin et à tous ceux qui ont rendu ces trois années si agréables : Bartholomé, Christophe, Lisa, Alice, Titouan, Julie A., Julie M., Amandine, Matthieu...

Enfin, je remercie Clément et Vittoria pour leur soutien indéfectible. Et un immense merci à ma famille, en particulier à mes sœurs, mon frère, et mes parents.

Abréviations

AA : Aminoacide

ABHC : Acide (1R,2R,3R,5R)-2-amino-6,6-diméthyl-bicyclo[3.1.1]-heptane-3-carboxylique

ABOC : Acide 1-aminobicyclo[2.2.2]octane-2-carboxylique

Ac : Acétyle

ACBC : Acide *trans*-aminocyclobutane carboxylique

ACC : Acide *cis*- β -aminocyclopropane carboxylique

ACHC : Acide 2-aminocyclohexane carboxylique

ACN : Acétonitrile

ACPC : Acide 2-aminocyclopentane carboxylique

ADN : Acide désoxyribonucléique

Agl : α -amino γ -lactame

Ahx : Acide aminohexanoïque

Aib : Acide 2-aminoisobutyrique

Alloc : Allyloxy-carbonyl

APC : Acide 3-aminopyrrolidine-4-carboxylique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ATP : Adénosine triphosphate

Boc : *tert*-Butoxycarbonyl

BOP : Benzotriazolyl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate

CD : Dichroïsme circulaire

COSY : Correlation spectroscopy

CPP : Cell-penetrating peptide

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

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

DCC : Dicyclocarbodiimide

DCHC : Acide diaminocyclohexane carboxylique

DCM : Dichlorométhane

DIEA : Diisopropyléthylamine

DMF : Diméthylformamide

Eq : Equivalent

Et₂O : Diéthyléther

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

Fmoc : 9-Fluorenylmethoxycarbonyl

FPPS : Synthèse peptidique rapide en parallèle

HATU : Hexafluorophosphate de O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tétraméthyluronium

HAc3c : Acide 1-(aminométhyl)cyclopropane-1-carboxylique

HBTU : Hexafluorophosphate de 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium

HMPT : hexaméthylphosphotriamide

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

IRTF : Spectroscopie infra-rouge à transformation de Fourier

LC-MS : Chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse

LH-RH : Hormone de libération de l'hormone lutéinisante

NLS : Séquence de localisation nucléaire

NMP : N-méthyl-2- pyrrolidone

NOE : Nuclear Overhauser effect

NOESY : Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy

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

Oxd : Acide 4-méthyl-oxazolidin-2-one carboxylique

pGlu : Acide pyroglutamique

Pbf : 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl

PBS : Tampon phosphate salin

pip : Pipéridine

PPI : Interaction protéine-protéine

PPII : Polyproline de type II

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROESY : Rotating-frame Overhauser spectroscopy

RX : Cristallographie aux rayons X

SAP(E) : Sweet arrow peptide glutamic acid

siRNA : Petits ARN interférents

SPPS : Synthèse peptidique sur phase solide

TBTU : Tetrafluoroborate 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium

TFA : Acide trifluoroacétique

TNBS : Acide trinitrobenzènesulfonique

TOCSY : Total correlation spectroscopy

Table des matières

Remerciements	3
Abréviations	5
Table des matières	9
Introduction générale.....	13
Chapitre I : Rappels bibliographiques	17
I. Peptides et protéines.....	18
I.1. Les acides aminés	18
I.2. Peptides, Polypeptides et Protéines.....	20
I.3. Les différentes structures des protéines.....	21
II. Les structures secondaires des protéines	22
II. 1. Généralités.....	22
II. 2. Les hélices	25
II. 3. Les Feuilletts β	28
II. 4. Les coudes.....	30
II. 5. Les rubans β	32
III. Mimes de coudes et d'hélices artificielles (Foldamères)	33
IV. Mimes de coudes : le lactame de Freidinger	34
V. Les Foldamères	36
V. 1. Définition	36
V. 2. Les β -peptides	38
V. 3. Les α/β -peptides	45
V. 4. Les α -et β -peptoïdes	49
V. 5. Les oligomères de motifs conformationnellement contraints	51
V. 6. Exemples d'applications biologiques.....	53
VI. Les peptides pénétrants.....	56
VI. 1. La pénétration intracellulaire	56
VI. 2. Structure et Propriétés des CPP	58

VII. Conclusion	65
CHAPITRE II : Synthèse des Oligomères d' α -amino- γ -lactame	67
VIII. La synthèse peptidique	67
VIII. 1. Généralités sur la synthèse peptidique	67
VIII. 2. Les protections	68
VIII. 3. Réactions secondaires.....	68
VIII. 4. Support solide et stratégies de synthèse.....	70
IX. Synthèse d'oligomères de motif contraint γ -lactame	74
IX. 1. Synthèse du monomère γ -lactame Agl-AA.....	76
IX. 2. Synthèse de poly-(Agl- α AA).....	79
IX. 3. Optimisation des synthèses	81
IX. 4. Conclusion.....	95
CHAPITRE III : Développement de vecteurs	97
X. Développement de vecteurs de pénétration intracellulaire à base d'unités γ -lactames .	97
X. 1. Introduction.....	97
X. 2. Synthèse des oligomères fluorescents pour l'étude de la pénétration et localisation intracellulaire.....	100
X. 3. Microscopie confocale	103
X. 4. Evaluation du potentiel de vectorisation	104
X. 5. Evaluation de la résistance à la protéolyse	107
X. 6. Etude structure-activité	108
X. 7. Conclusion.....	113
CHAPITRE IV : Etudes structurales.....	115
XI. Synthèse et étude structurale des oligomères d'Agl- β AA.....	115
XI. 1. Introduction.....	115
XI. 2. Synthèse des poly-(Agl- β AA).....	117
XI. 3. Les techniques d'analyse spectroscopique	119
XI. 4. Les séquences Agl- β (Phe/Ala).....	124
XI. 5. Diversification des séquences et solubilité en milieu aqueux	155
XI. 6. Substitution des Agl par L-Ala et D-Ala	171

XI. 7. Conclusion.....	175
Conclusion générale.....	177
Partie expérimentale	181
Annexes	220
Table des illustrations.....	235
Bibliographie	245

Introduction générale

Les peptides représentent une classe thérapeutique unique, entre les petites molécules et les protéines, et s'en distinguent par leurs propriétés biochimiques et thérapeutiques. Les premiers peptides utilisés en médecine sont extraits de l'animal, en commençant par l'insuline dans les années 1920.¹ L'élucidation de séquences et le développement de la synthèse peptidique dans les années 1950 a permis d'obtenir la première hormone peptidique synthétique, l'ocytocine,² dont l'usage clinique sera approuvé par la FDA dès 1962. Ces dernières décennies, le peptide connaît un accroissement d'intérêt comme outils thérapeutiques et sonde biologique.³ En mars 2017, il existe 60 peptides sur le marché en Europe et aux USA, et 155 en phase clinique.⁴ En 2015, les peptides représentaient 5% du marché pharmaceutique mondial avec 50 milliards de dollars de revenus, un chiffre qui devrait dépasser les 70 milliards en 2019.⁵

A ce jour, plusieurs milliers de peptides naturels ont été identifiés et possèdent souvent un rôle crucial comme molécule signal. L'utilisation des peptides présente cependant quelques inconvénients qui limitent leur potentiel. Leur coût de synthèse et de production est plus important que celui des petites molécules. Les séquences naturelles présentent un temps de demi-vie court et sont rapidement éliminées de la circulation sanguine par les reins et le foie. Généralement hydrophiles, les peptides possèdent une faible biodisponibilité orale et traversent difficilement la membrane plasmique. Leur métabolisme est connu et prévisible, et bien que très bien tolérés par le corps humain, ils peuvent parfois entraîner des effets immunogènes.⁶ Enfin, leur efficacité et sélectivité est réduite par leur liberté conformationnelle. En solution, la plupart ne possèdent pas de structure bien définie et existent sous la forme d'un équilibre de différents conformères qui ne sont pas tous bioactifs.

Pour pallier ces faiblesses, une grande variété de dérivés de peptides a été élaborée parmi lesquels on peut citer les pseudopeptides, les peptides cycliques et les peptidomimétiques. L'utilisation d'acides aminés non protéinogéniques, comme par exemple les acides aminés de configuration D, ou la modification de la liaison peptidique (liaison réduite,⁷ retroinverso,⁸ ...) permet d'augmenter leur résistance aux protéases et donc d'augmenter leur temps de demi-vie. La réduction de leur liberté conformationnelle permet aussi de favoriser le conformère actif et ainsi d'augmenter l'efficacité et la sélectivité du peptide. Cela permet également d'éliminer des conformères aux propriétés biologiques non désirées. Ainsi, les peptoïdes,⁹ la N-méthylation¹⁰ et la cyclisation¹¹ permettent de réduire les degrés de liberté conformationnelle des peptides pour potentiellement augmenter leur sélectivité, leur pénétration cellulaire, ou leur biodisponibilité. Les structures secondaires des

protéines (coudes, feuilletés et hélices) participent à l'établissement de la structure globale d'une protéine mais elles sont aussi des éléments essentiels pour l'interaction avec leurs partenaires (d'autres protéines, l'ADN, les ARN, etc). Ces structures, souvent non conservées une fois enlevées de leur contexte protéique, peuvent être mimées à l'aide de blocs contraints¹² ou favorisées par l'addition d'éléments non naturels comme les agrafes récemment introduites par le groupe de Verdine.¹³ Parmi les systèmes non naturels capables de mimer les structures secondaires des protéines, on peut aussi citer les foldamères.¹⁴ Durant ma thèse nous nous sommes intéressés à cette dernière famille de molécules et à leur application possible dans des problématiques de biologie.

Des études antérieures à ma thèse ont permis d'identifier une famille de foldamères construits par l'enchaînement d' α -amino γ -lactames avec des acides α -aminés (Agl- α AA). Ces α -amino γ -lactames, connus sous le nom de lactames de Freidinger, sont des mimes de coudes β . En 1980, ce motif introduit dans la séquence peptidique de l'hormone de libération de l'hormone lutéinisante a permis de développer un puissant agoniste du récepteur à la LH-RH¹⁵. Depuis, ces dipeptides pontés, mimes de coude β (" β -turn"), sont largement utilisés en chimie médicinale pour augmenter la sélectivité, la stabilité et la pénétration cellulaire de peptides biologiquement actifs.¹⁶ Dans l'équipe "aminoacides, hétérocycles, peptides et protéines" de l'IBMM, nous nous sommes intéressés à ces α -amino γ -lactames pour la construction d'oligomères structurés. Une stratégie originale a été développée pour leur synthèse, et nous avons montré qu'ils sont capables d'adopter une structure en ruban ("ribbon") en assurant une répartition périodique des groupes fonctionnels (correspondant aux chaînes des aminoacides) de part et d'autre de l'axe du ruban.

Un des premiers objectifs de ma thèse a été d'optimiser la méthode de synthèse originale de ces composés.

Nous avons ensuite modulé les propriétés physico-chimiques des oligomères Agl-AA afin de leur conférer des propriétés de pénétration intracellulaire. Pour cela, la sélection d'un choix judicieux d'acides α -aminés pour la construction des oligomères d'Agl- α AA a permis d'obtenir des molécules possédant une forte capacité à pénétrer dans les cellules. La seconde partie de ma thèse a porté sur l'évaluation de la capacité de ces vecteurs à résister à la protéolyse et à véhiculer dans les cellules un composé biologiquement actif. Une étude de relation structure-activité des vecteurs tête de série a également été réalisée et les résultats sont présentés dans ce chapitre de ma thèse.

Dans un autre volet de ma thèse, je me suis intéressé au développement d'une nouvelle famille de foldamères en remplaçant dans les oligomères d'Agl- α AA, les acides α -aminés par des β^3 -homo-amino acides afin de perturber la formation du coude β . La structure

de ces molécules a été étudiée par différentes techniques physico-chimiques (RMN, CD, IR-TF, RX) et leur solubilité a été déterminée (LogP).

Chapitre I : Rappels bibliographiques

Mes travaux de thèse se sont articulés autour de plusieurs disciplines scientifiques, en particulier la chimie, la biologie et l'analyse structurale de molécules complexes. Une partie importante de mes travaux a été consacrée à la synthèse d'oligomères artificiels capables d'adopter des structures tridimensionnelles bien définies (foldamères) ainsi qu'à l'optimisation de leur synthèse. Une autre partie de mes travaux a porté sur l'étude structurale d'une nouvelle famille de foldamères par l'utilisation de différentes techniques spectroscopiques. Une étude biologique des oligomères pour la vectorisation de composés bioactifs dans les cellules a été également réalisée. Ces travaux pluridisciplinaires couvrant de vastes domaines de la recherche, la partie bibliographique les concernant ne donnera que certains éléments clés. On s'attachera à définir les protéines et plus particulièrement les différentes structures secondaires qui les composent et jouent un rôle crucial pour leur activité. Les peptides pénétrants utilisés comme modèles et références dans la conception de nouveaux vecteurs de pénétration intracellulaire seront également présentés. Une partie de la bibliographie des foldamères et leurs applications sera décrite dans ce chapitre pour situer notre famille de composés au sein de cette classe de molécules. L'accent sera également mis sur le motif γ -lactame, qui a été utilisé dans ce travail pour la construction des différents foldamères, certains adoptant une structure en ruban et d'autres en hélice.

I. Peptides et protéines

I.1. Les acides aminés

Les acides aminés font partie des briques élémentaires du vivant. Il existe, pour les organismes eucaryotes, 20 acides aminés dits protéinogènes, « qui donnent naissance aux protéines ». L'être humain, par exemple, est capable d'en synthétiser 11, tandis que les 9 restants, dit essentiels, doivent être procurés par l'alimentation. Comme leur nom le suggère, ces molécules comportent une fonction acide carboxylique (-COOH) et une fonction amine (-NH₂) (Figure 1). Les acides aminés protéinogènes sont des acides α-aminés : la fonction amine est portée par le carbone en alpha (Cα) de la fonction acide carboxylique. Ce carbone est asymétrique et tous les aminoacides protéinogènes sont de configuration L.

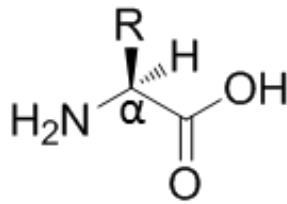


Figure 1 : Représentation générale d'un acide α-aminé

Enfin, ils se différencient par la nature de leur chaîne latérale (R). Les acides aminés protéinogènes peuvent ainsi être regroupés selon la nature du résidu R: hydrophobe, polaire non chargé, cationique et anionique (Figure 2). Les acides aminés sont des briques élémentaires nécessaires à la fabrication de protéines.

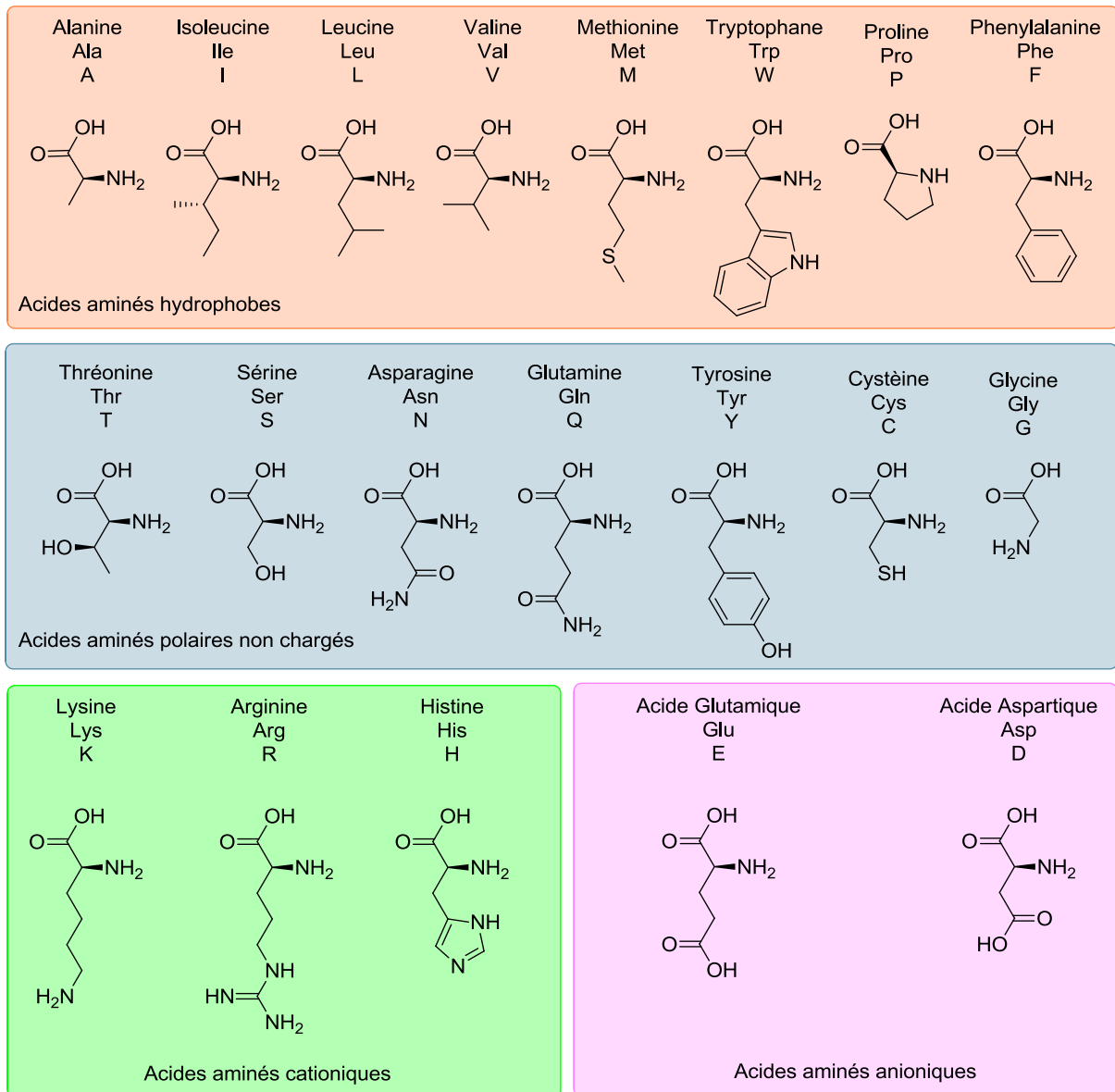


Figure 2 : Les acides aminés protéinogènes

1.2. Peptides, Polypeptides et Protéines

Les polypeptides sont des polymères linéaires d'acides α -aminés liés entre eux par une liaison amide aussi appelée liaison peptidique (Figure 3).

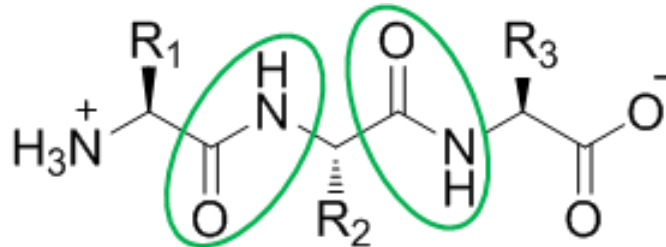


Figure 3 : Représentation générale d'un tripeptide avec les liaisons peptidiques entourées en vert

Ils sont le fruit du transcriptome : Les acides désoxyribonucléiques (ADN) qui stockent l'information sont transcrits en acides ribonucléiques messagers (ARNm) qui va permettre aux acides ribonucléiques de transfert (ARNt) et ribosomiaux (ARNr) de traduire cette information en polypeptides. C'est donc le génome qui code pour déterminer l'ordre d'assemblage des différents acides aminés. Une fois le polypeptide synthétisé, il peut survenir des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, acétylation, amidation, méthylation, glycosylation, lipidation, et la formation de ponts disulfure.

Les protéines sont des macromolécules qui sont constituées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques. Leur taille peut être exprimée en nombre d'acides aminés ou par leur masse moléculaire en kilodaltons (kDa). Une des plus grosses protéines connues, la titine, ou connectine, comprends environ 30 000 résidus et a une masse moléculaire d'environ 3 000 kDa pour une longueur de 1 μ m. De manière arbitraire, dans la littérature, on parle de peptides pour des oligomères de moins de 15 résidus, de polypeptides pour des oligomères allant jusqu'à 50 résidus, et de protéines au-delà de 50 résidus (plus de 5 kDa). Les protéines, qui sont le troisième constituant le plus abondant dans le corps humain après l'eau et les graisses,¹⁷ remplissent de très nombreuses fonctions : structure, transport, régulation, signalisation, stockage, protection, identification, etc... Les fonctions des protéines, sont intimement liées à leurs structures tridimensionnelles.

1.3. Les différentes structures des protéines

La structure d'une protéine dépend des acides aminés qui la composent. Ils ont une propension à favoriser certaines structures plutôt que d'autres. Il y a quatre niveaux hiérarchiques dans l'organisation structurale d'une protéine : primaire, secondaire, tertiaire, quaternaire.

Le premier niveau d'organisation d'une protéine est sa structure primaire qui représente l'enchaînement linéaire des acides aminés. On la nomme séquence peptidique.

L'organisation locale de la chaîne peptidique, qui correspond à une conformation énergétiquement favorable, constitue la structure secondaire. On trouve 3 types de structures : les hélices, les brins et les coudes. Les structures secondaires s'organisent de manière tridimensionnelle dans le repliement global de la protéine pour former la structure tertiaire. Enfin, la structure quaternaire correspond à l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques pour former des homo- ou hétéro-complexes (Figure 4).

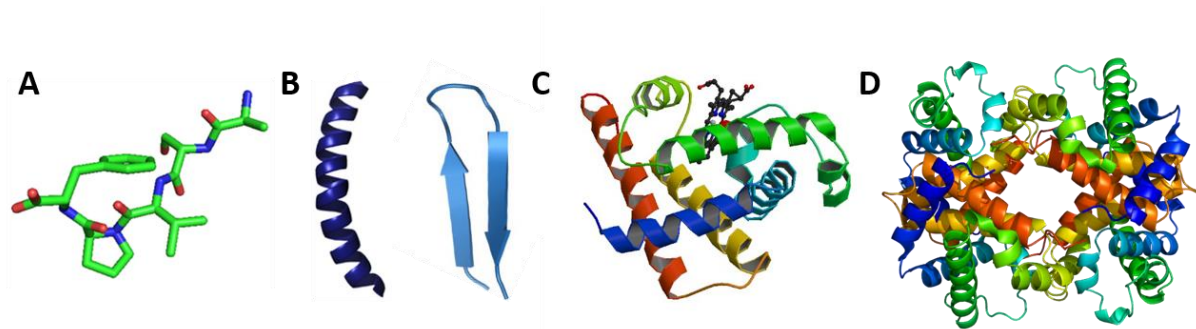


Figure 4 : (A) Séquence peptidique, (B) structure secondaire en hélice α et feuillet β , (C) structure tertiaire de la myoglobine (PDB : 1MBN), (D) Structure quaternaire de l'hémoglobine (PDB : 1A3N)

Les acides aminés sont liés entre eux de manière covalente par des liaisons peptidiques. Le repliement des protéines implique des liaisons non covalentes, à l'exception des ponts disulfures. Ces liaisons non covalentes sont multiples : liaisons hydrogène, liaisons ioniques, interactions de Van der Waals et interactions hydrophobes.

Nous nous intéresserons plus particulièrement dans ce chapitre aux structures secondaires qui contribuent de façon significative à la stabilisation de la structure globale des protéines mais aussi à l'établissement de processus biologiques via des interactions spécifiques comme par exemple des interactions protéine-protéine ou protéine-ADN.

II. Les structures secondaires des protéines

II. 1. Généralités

La chaîne principale d'un peptide (et d'une protéine), appelée aussi squelette peptidique, contient trois liaisons covalentes par aminoacides. Les valeurs des longueurs des liaisons et des angles de valence sont globalement conservées tout au long de la séquence (Figure 5).

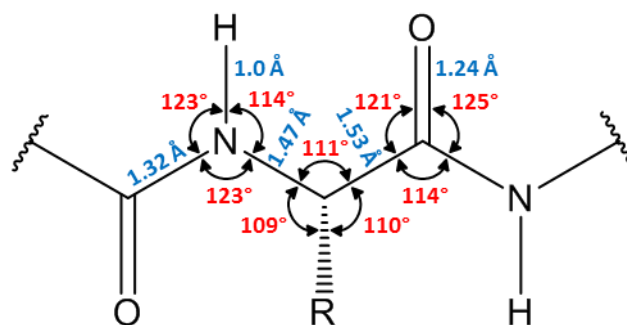


Figure 5 : Angles et longueurs des liaisons dans un peptide

La liaison peptidique est plane, l'angle de torsion ω ne présente que deux valeurs possibles : 180° , auquel cas la liaison peptidique est dite *trans*, ou 0° , la liaison peptidique est alors dite *cis*. Dans la grande majorité des cas, la liaison peptidique est *trans*. L'établissement de structures secondaires est rendue possible par la liberté de rotation autour des deux liaisons C α -C et N-C α . Ces libertés de rotation sont définies par les angles de torsion Φ (phi), Ψ (psi) entre deux plans, aussi appelés angles dièdres. Ces angles, permettent de définir la géométrie du squelette peptidique. (Figure 6, Table 1).

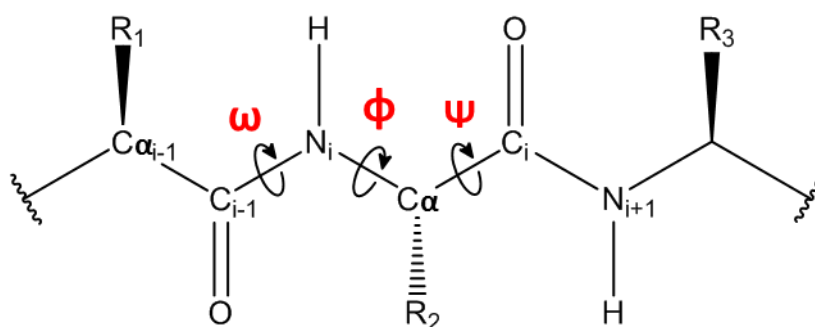
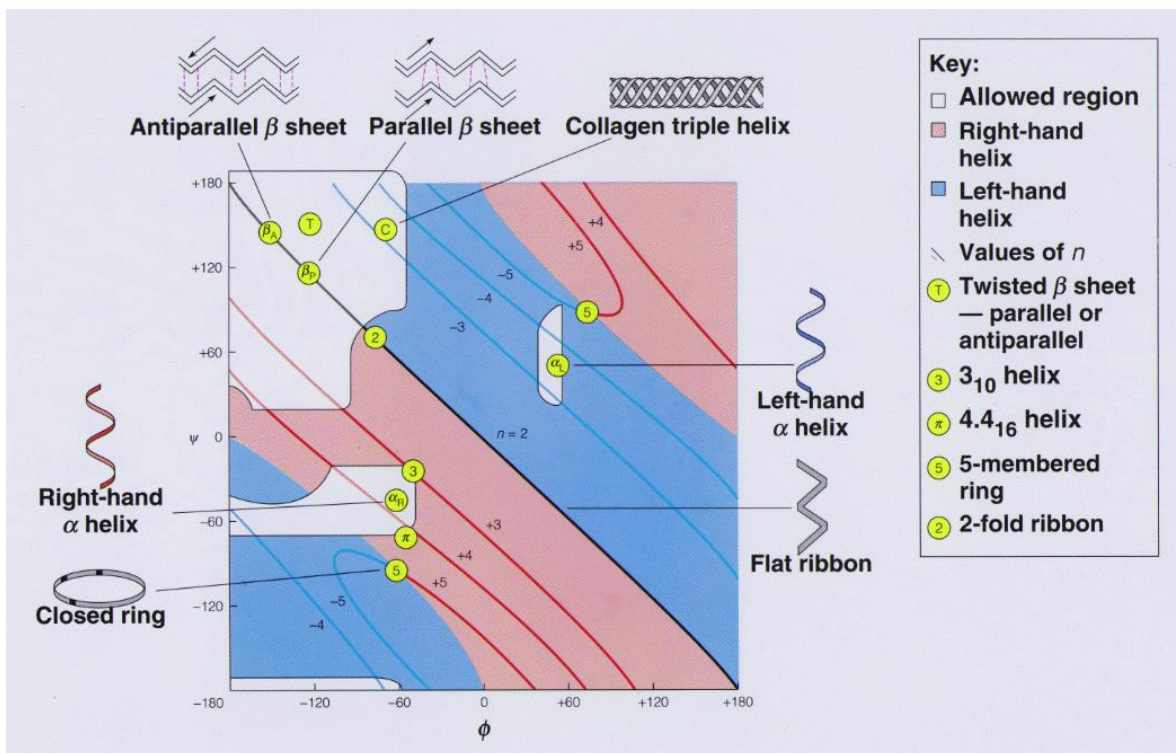


Figure 6 : Angles dièdres du squelette peptidique

Table 1 : Atomes impliqués dans les différents angles dièdres

Angle dièdre	Atomes considérés
Φ	$C_{i-1}-N_i-C\alpha-C_i$
Ψ	$N_i-C\alpha-C_i-N_{i+1}$
ω	$C\alpha-C_i-N_{i+1}-C\alpha_{i+1}$

Toutes les combinaisons d'angles Φ et Ψ ne sont pas permises car certaines induisent un encombrement stérique important entre les chaînes latérales et le squelette peptidique. Ces conformations sont énergétiquement très défavorables. Le diagramme de Ramachandran (du nom de son inventeur) résume les combinaisons autorisées d'angles dièdes ϕ et ψ , et permet de distinguer les structures favorisées en fonction de ces valeurs (Figure 1).^{18,19}

Figure 7 : Diagramme de Rammachandran²⁰

Les zones blanches du diagramme ci-dessus sont les valeurs de Φ et Ψ les plus favorables énergétiquement. On remarque ainsi que les structures les plus stables possèdent généralement une valeur Φ négative (-60° à -180°), que les feuillets existent pour des valeurs de Ψ positives ($+20^\circ$ à $+180^\circ$) et les hélices pour des valeurs Ψ négatives (-20° à -70°).

Dans un peptide, les angles Φ et Ψ sont largement influencés par la nature des chaînes latérales et la gêne stérique qu'elles induisent. Contrairement aux autres acides aminés, la glycine ne comporte pas de chaîne latérale, ce qui lui permet d'adopter des valeurs d'angle beaucoup plus large. Elle est ainsi souvent retrouvée dans les coudes. Il faut aussi noter le cas particulier de la proline qui, contrainte par un cycle pyrrolidine, est limitée dans les valeurs d'angle qu'elle peut adopter.

Plusieurs études ont été menées à partir de la structure 3D de plusieurs protéines afin de déterminer empiriquement des coefficients reflétant la propension de chaque acide aminé à être intégrée dans une structure secondaire.²¹⁻²³ Ainsi il est possible de prédire la préférence conformationnelle d'un résidu pour un type de structure (Table 2).

Table 2 : Abondance relative des résidus par structure (Abondant si $P > 1$, rare si $P < 1$)²³

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

Bien que cet outil permette d'estimer si une structure est favorable pour une séquence donnée, chaque résidu pouvant être présent dans toutes les structures, il ne s'agit pas d'un outil de prédiction totalement fiable.²⁴ Néanmoins, il permet l'identification de résidus défavorables à la formation de certaines structures. Par exemple, les résidus proline et glycine ont une forte propension à former des coudes mais sont défavorables à la formation d'hélices ou de feuillets. Les résidus méthionine et phénylalanine sont au contraire défavorables à la formation de coudes qui s'explique par la gêne stérique imposée par leur chaîne latérale.

II. 2. Les hélices

Les hélices représentent la structure secondaire la plus abondante dans les protéines.²⁵ Elles consistent en l'enroulement de la chaîne peptidique sur elle-même pour former un cylindre stabilisé par des liaisons hydrogène alignées parallèlement à l'axe de l'hélice. Les hélices sont caractérisées par (i) le nombre de résidus d'acides aminés par tour (n), (ii) leur pas (p exprimé en Å) qui correspond à la hauteur d'un tour complet de l'hélice, (iii) le nombre d'atomes impliqués dans le pseudo-cycle formé par les liaisons hydrogène intramoléculaires (C_x où x est égal au nombre d'atomes impliqués dans le pseudo-cycle) et (iv) le rayon de l'hélice (r exprimé en Å). Les hélices sont des objets chiraux qui sont identifiées par le sens de l'enroulement hélicoïdal indiqué par les lettres "P" (plus = droite) lorsqu'elle tourne dans le sens horaire (c'est le cas des hélices naturelles) et "M" (moins = gauche) dans le sens antihoraire. Lorsqu'elles sont situées dans le cœur hydrophobe des protéines, elles jouent un rôle dans la stabilisation de la structure et aident au repliement de la protéine. Quand elles sont exposées à la surface, elles constituent un motif de reconnaissance (autres protéines et ADN par exemple) pour différentes activités biologiques. Il existe quatre types d'hélices présentés dans les protéines à l'état naturel dont les paramètres principaux sont rapportés ci-dessous (Figure 8 et Table 3) : les hélices α , les hélices 3_{10} , les hélices π et les hélices polyproline de type II (PPII).

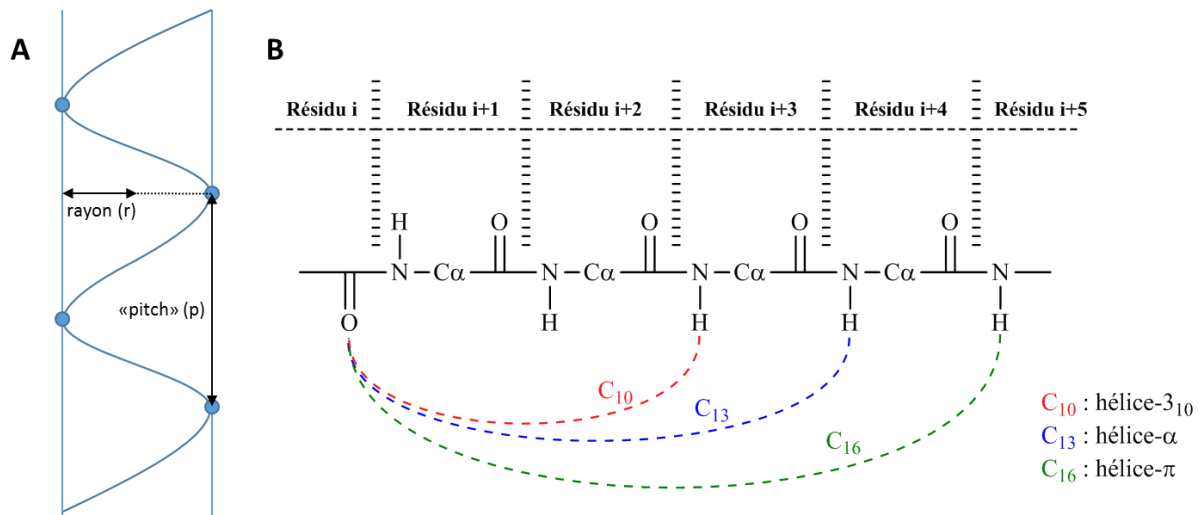


Table 3 : Paramètres principaux des hélices présentes dans les protéines à l'état naturel

Hélice	Fréquence	n	p (Å)	r (Å)	CO...HN	C _x	Rotation	φ	ψ
α	Abondant	3.6	5.5	2.3	i, i+4	C ₁₃	Droite	-58	-47
3 ₁₀	Peu fréquent	3	6	1.9	i, i+3	C ₁₀	Droite	-74	-4
π	Rare	4.4	5	2.8	i, i+5	C ₁₆	Droite	-57	-70
PPII	Peu fréquent	3	9.3	-	-	-	Gauche	-75	150

Les hélices α constituent le type de structure secondaire le plus abondant dans les protéines. Leur structure, élucidée par Pauling et Corey en 1951,²⁶ présente les chaînes latérales des acides aminés vers l'extérieur de l'hélice qui est stabilisée par des liaisons hydrogène intramoléculaires entre le groupement carbonyle d'un résidu *i* et le proton du groupement NH de l'amide d'un résidu *i*+4 (Figure 9). La nomenclature les désigne comme des hélices 3,6₁₃ parce qu'elles présentent 3,6 résidus par tour d'hélice et comptent 13 atomes dans les pseudo-cycles formés par les liaisons hydrogène. L'hélice α est droite avec un pas de 5.4 Å et un diamètre de 4.6 Å. Elle comporte en général 4 à 40 résidus. Un nombre faible de résidus favorise la formation d'hélices 3₁₀.

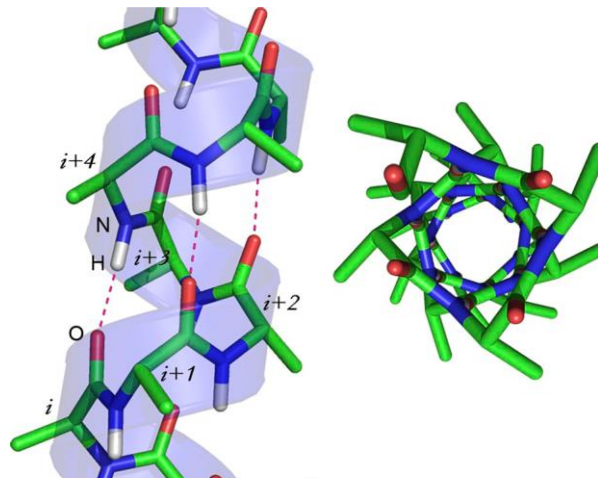


Figure 9 : Représentation de la conformation canonique de l'hélice α ²⁷

Les hélices 3_{10} , dont la structure a été proposée dès 1941,^{28,29} sont généralement courtes, de 4 à 6 résidus, et s'organisent grâce à des liaisons hydrogène intramoléculaires entre les résidus i et $i+3$. Leur forme est plus étirée avec un pas de 6 Å pour 3 résidus et un diamètre plus resserré de 3.8 Å (Figure 10).

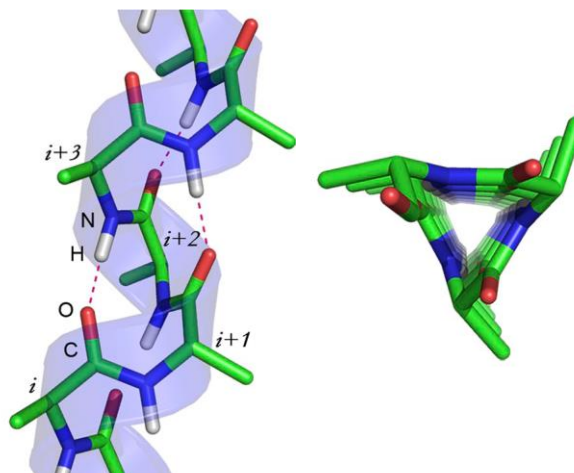


Figure 10 : Représentation de la conformation canonique de l'hélice 3_{10} ²⁷

Les hélices π , proposées en 1952,³⁰ sont au contraire plus compactes avec un pas de 5 Å pour 4.4 résidus et de ce fait, un diamètre plus large de 5.8 Å. C'est la conséquence de liaisons hydrogène entre des résidus plus éloignés (i à $i+5$). Ces hélices de 7 à 10 acides aminés (en orange) sont généralement retrouvées au milieu d'hélices α (en vert), principalement au niveau du site actif des protéines (Figure 11).

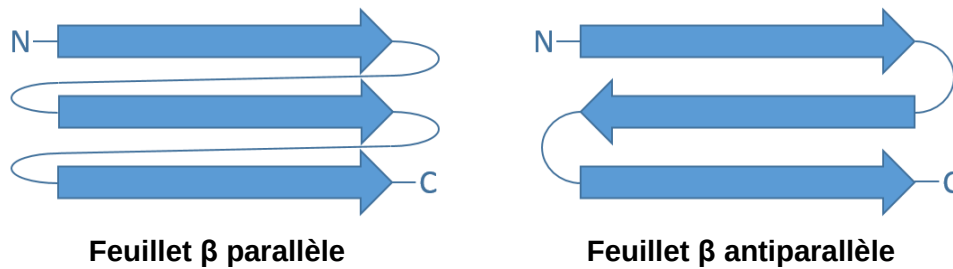


Figure 11 : Représentation de l'hélice π (en orange) dans la protéine Symerythrin oxydée de *Cyanophora paradoxa* (PDBe : 3qhb)³¹

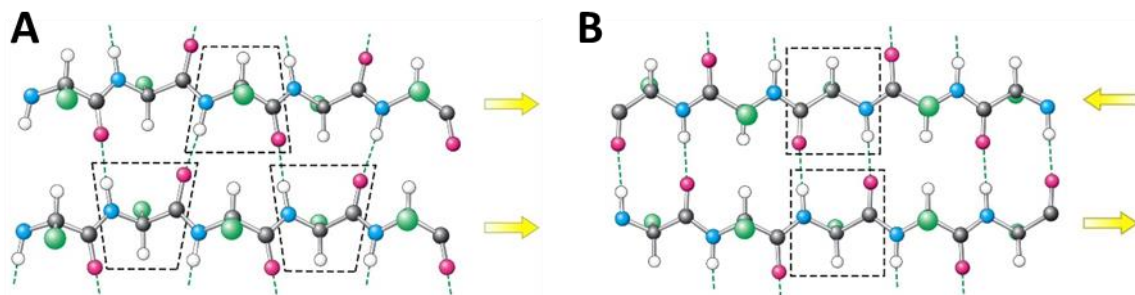
Les hélices polyproline de type II (PPII) sont des hélices gauches très étirées avec un pas de 9.3 Å pour 3 résidus. Contrairement aux autres hélices, elles ne présentent pas de liaisons hydrogène intramoléculaires. Le résidu proline, qui n'est pas favorable à la formation des autres hélices, est le résidu le plus représenté dans les hélices PPII, bien qu'il n'y soit pas obligatoirement présent. Ces hélices se retrouvent surtout à la surface des protéines où elles sont généralement impliquées dans les interactions protéine-protéine ou protéine-acide nucléique.³² Elles jouent un rôle majeur dans la transduction des signaux cellulaires et la formation de complexes protéiques. On peut également citer l'hélice de collagène qui s'apparente à l'hélice PPII et qui joue un rôle fondamental dans la structure des organismes.³³

II. 3. Les Feuilletés β

Les feuilletés β sont la deuxième forme de structure secondaire la plus représentée après les hélices α . Il s'agit de l'arrangement de brins côte à côte liés entre eux par des liaisons hydrogène dans un plan légèrement plissé. L'alignement peut se faire de deux façons différentes suivant l'orientation des chaînes polypeptidiques : parallèle ou antiparallèle (Figure 12).

Figure 12 : Représentation schématique des deux types de feuillet β

Dans le cas du feuillet antiparallèle, les résidus d'acides aminés sont parfaitement alignés dans un même plan, ce qui permet la formation de deux liaisons hydrogène par paire de résidus opposés (Figure 13). Dans le cas du feuillet parallèle, les résidus ne sont pas alignés, ils forment des liaisons hydrogène plus éloignées entre les résidus $i-1$ et $i+1$ de la chaîne opposée, ce qui les rend moins stables (Figure 13).

Figure 13 : Réseau de liaison hydrogène des feuillets β parallèle (A) et antiparallèle (B)³⁴

Il est rare de retrouver des feuillets β parallèles de moins de cinq brins,³⁵ ce qui montre l'importance coopérative d'un certain nombre de brins pour stabiliser la structure.^{36,37} Qui plus est, les feuillets β ne semblent pas tolérer l'accès du solvant à leurs liaisons hydrogène, ils sont essentiellement retrouvés au cœur des protéines. Bien qu'un nombre croissant de brins ait un effet positif sur la stabilité des feuillets β ,³⁸ on retrouve ces derniers dans des structures en épingle à cheveux (" β -hairpin").³⁵ Ces structures sont formées de deux simples brins β séparés un coude β . La présence de ce coude permet un repliement de la chaîne peptique, rendant possible l'interaction des deux brins par de multiples liaisons hydrogène.

II. 4. Les coudes

Les coudes, à la différence des hélices et des feuillets, sont des éléments de structure secondaire non répétitifs constitués de 3 ou 4 résidus consécutifs. Ils induisent un repliement de la chaîne peptidique en inversant sa direction de propagation. Ils sont souvent localisés à la surface des protéines. Ainsi, au-delà de leur rôle structural, ils sont aussi impliqués dans des processus de reconnaissance moléculaire. Il existe quatre types de coudes, caractérisés par le nombre de résidus impliqués dans un pseudo-cycle à x -atomes (C_x) : les coudes α (5 résidus), β (4 résidus), γ (3 résidus) et π (6 résidus). Ils se présentent sous trois catégories différentes : le coude est dit « ouvert » lorsqu'il ne forme pas de liaison hydrogène mais que la distance entre le $C\alpha$ du résidu i et le $C\alpha$ du résidu $i+n$ est inférieure à 10 Å, « standard » lorsqu'il y a la présence d'une liaison hydrogène entre le groupement carbonyle du résidu i et le proton amide du résidu $i+n$, ou « inverse » lorsque la liaison hydrogène implique le groupement carbonyle du résidu $i+n$ avec le proton amide du résidu i .

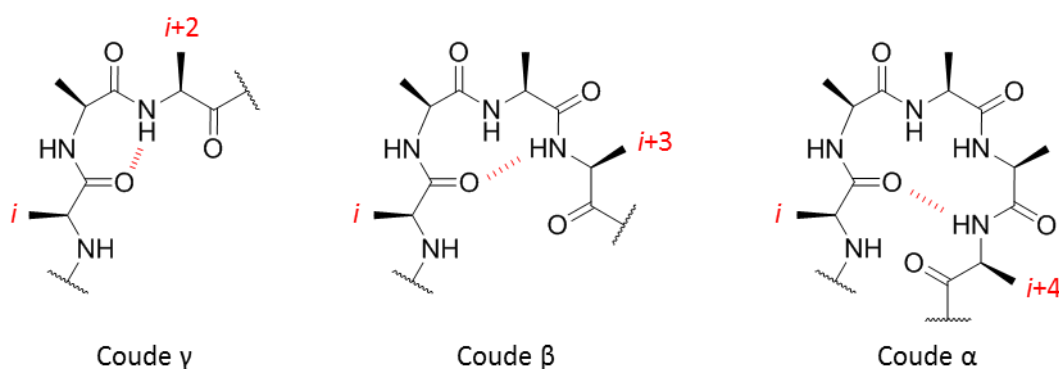


Figure 14 : Représentation schématique des coudes α , β et γ .

Les coudes α comprennent 5 résidus d'acides aminés qui ont été classés en fonction de leurs angles dièdres en 15 types différents.³⁹ Les coudes α existent sous forme « standard » avec une liaison hydrogène entre les résidus i et $i+4$, ainsi que sous forme de coude « ouvert » sans liaison hydrogène.

Les coudes β sont les coudes les plus répandus. Ils constituent la troisième structure secondaire la plus représentée dans les protéines après les hélices α et les feuillets β . Les coudes β comprennent 4 résidus d'acides aminés et présentent les 3 catégories de coudes : ouvert, standard et inverse. Lorsqu'ils sont stabilisés par une liaison hydrogène, celle-ci implique les résidus i et $i+3$. Ils sont classés suivant huit catégories différentes d'après leurs angles dièdres, présentés ci-dessous par ordre de présence dans les protéines et leur

préférence en résidus d'acides aminés (Table 4 et Table 5). Les résidus Pro et Gly sont particulièrement représentés, et la proline est le seul résidu possible à la formation de coude β de type VI.

Table 4 : Angles dièdres des différents coudes β ⁴⁰

Coude β	ϕ (i+1)	Ψ (i+1)	ϕ (i+1)	Ψ (i+1)
I	-60	-30	-90	0
II	-60	120	80	0
VIII	-60	-30	-120	120
I'	60	30	90	0
II'	60	-120	-80	0
VIa1	-60	120	-90	0
VIa2	-120	120	-60	0
VIb	-135	135	-75	160

Table 5 : Résidus les plus représentés dans la composition de coudes β ⁴⁰

Coude β	Résidu i	Résidu $i+1$	Résidu $i+2$	Résidu $i+3$
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, His, 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
VIa1	Lys, Leu	Pro, Tyr	Pro	Phe, Tyr
VIa2	Phe	Phe, Trp	Pro	Gly
VIb	His, Pro	Thr, Tyr	Pro	Pro

Les coudes γ comprennent 3 résidus qui s'organisent avec une liaison hydrogène entre les résidus i et $i+2$ dans un coude standard ou inverse.⁴¹ Les résidus les plus représentés ainsi que les angles dièdres des coudes γ sont indiqués dans les tableaux ci-dessous (Table 6 et Table 7).

Table 6 : Angles dièdres des différents coudes β ⁴⁰

Coude γ	ϕ (i+1)	Ψ (i+1)
Standard	75	-64
Inverse	-79	69

Table 7 : Résidus les plus représentés dans la composition de coudes γ ⁴⁰

Coude γ	Résidu i	Résidu $i+1$	Résidu $i+2$
Standard	Gly	Gly	His>Lys>Ser
Inverse	Gly, Pro, Ile	Pro, Asp, Asn	Asn, Thr, Val, Trp

Les coudes π comprennent 6 résidus organisés dans un coude ouvert, ou standard avec une liaison hydrogène entre résidu i et $i+5$. Cette structure a été observée pour la première fois en 1969 dans la structure de la myoglobine (PDB : 1MBN).⁴²

II. 5. Les rubans β

Les rubans β sont des structures secondaires stabilisées par des liaisons hydrogène qui se chevauchent, entre les groupements carbonyles des résidus i et $i+3$ avec les protons amides des résidus $i+2$ et $i+5$. En ce sens, ils sont parfois considérés comme des hélices 3_{10} ayant perdu certaines de leurs liaisons hydrogène. Le ruban β est la répétition de coudes β I, I', II ou II'. Les rubans β I et I' sont plus abondants, tout comme leurs coudes respectifs, et leur structure est légèrement tordue contrairement aux rubans plats β II et II'. Cette structure est notamment favorisée par la présence de résidus N-alkylés comme la proline en $i+4$, qui empêche la liaison hydrogène entre les résidus $i+1$ et $i+4$, ainsi que par des résidus propices à la formation d'hélices comme le résidu Aib (acide α -amino isobutyrique).^{43,44} Ils sont généralement impliqués dans la reconnaissance moléculaire et les sites actifs des enzymes.

III. Mimes de coudes et d'hélices artificielles (Foldamères)

Les peptides sont une classe importante de composés pour la conception de nouveaux médicaments mais aussi pour la compréhension de phénomènes physiologiques et physiopathologiques. Cependant ils présentent souvent un profil pharmacologique assez défavorable. Ils ont une faible absorption par voie orale, une grande instabilité métabolique liée à leur dégradation rapide par les peptidases et ne traversent pas les membranes cellulaires³. Ainsi, pour augmenter la biodisponibilité des peptides, mais aussi si nécessaire leur sélectivité vis-à-vis de leur cible biologique, diverses stratégies ont été développées. On peut citer la conception de pseudopeptides, de peptides cycliques et de peptidomimétiques qui peuvent mimer les structures secondaires des protéines.⁴⁵ Je ne donnerai pas ici une liste exhaustive de toutes les modifications apportées et décrites dans la littérature mais je m'attacherai en particulier à un mime de coude β , l' α -amino γ -lactame ou lactame de Freidinger, qui a été le fil conducteur de cette thèse, ainsi qu'à la famille des foldamères peptidomimétiques. Les foldamères développés dans mon travail de thèse ont été construits par l'enchaînement d' α -amino γ -lactames avec des acides α - ou β -aminés (Agl- α AA ou Agl- β AA).

IV. Mimes de coudes : le lactame de Freidinger

La plupart des peptides en solution existent sous la forme d'un équilibre de conformères qui ne sont pas tous bioactifs. Afin de privilégier certaines conformations, différentes stratégies ont été développées. Parmi ces stratégies, on peut citer la cyclisation qui a été une des premières techniques appliquées au développement de peptidomimétiques,⁴⁶ et l'introduction de mimes contraints de coudes dans des séquences peptidiques.⁴⁷

Un grand nombre de mimes de coudes ont été développés depuis plus d'une trentaine d'année, comptant parmi eux de simples dipeptides comme le motif « L-Pro-D-Pro », ou « AA₁-N(Me)AA₂ » à des molécules plus complexes.⁴⁸⁻⁵⁰ Je ne donnerai pas ici une liste exhaustive des mimes décrits dans la littérature mais m'attacherai à une description générale des α-amino γ-lactames de Freidinger et al. Au début des années 1980, Roger M. Freidinger a publié une série de dipeptides pontés γ-, δ- et ε-lactames.⁵¹ L'idée d'utiliser ces lactames comme motif contraint est venue de l'étude d'un hexapeptide cyclique, le cyclo(Ala-Sar)₃. Des études de modélisation moléculaire de ce peptide ont indiqué que la construction d'un pont entre le Ca du résidu alanine et l'azote du résidu sarcosine suivant devrait induire davantage de contrainte conformationnelle. L'α-amino γ-lactame α-aminoacide (Agl-AA) ainsi formé adopte une conformation différente de celle d'un dipeptide N-méthylé au niveau de la liaison amide.⁵² Contrairement aux dipeptides N-méthylés, le γ-lactame formé interdit la rotation de la liaison entre l'azote N1 et le carbone C5, contraignant la liaison amide modifiée à adopter une configuration *trans* et restreint la valeur de l'angle Ψ à -120°. La proximité du cycle lactame limite aussi les angles dièdres ϕ1 et ϕ2 (Figure 15). La communauté scientifique a décidé de nommer ces analogues de dipeptides « Lactames de Freidinger », en l'honneur de sa contribution dans le développement de peptidomimétiques.

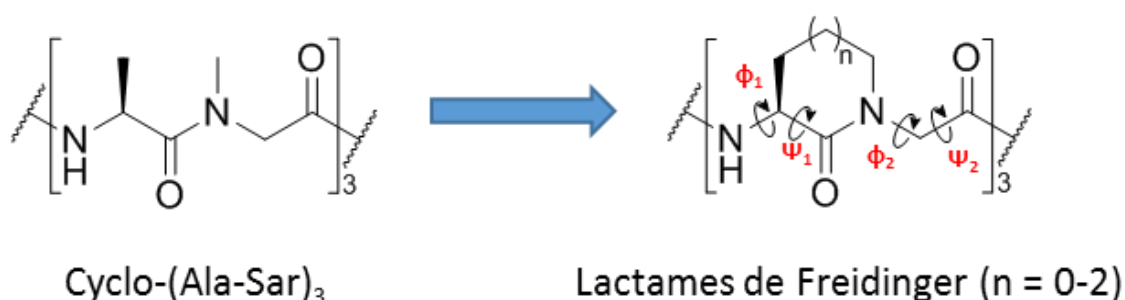


Figure 15 : Première application des lactames de Freidinger⁵³

La même année, R. M. Freidinger *et coll.* ont publié un analogue de l'hormone de libération de l'hormone lutéinisante (LH-RH) comprenant un motif γ -lactame. L'analogue, qui

adopte une conformation en coude β , s'est montré plus efficace que l'hormone originale, ce qui a confirmé la présence d'un coude β dans la conformation active.⁵⁴ En effet, le motif induit un mime de coude β de type II' avec une liaison hydrogène dans un pseudocycle à 10 atomes (Figure 16). Les études ultérieures de R. M. Freidinger *et coll.*, comme le développement d'analogues de la somatostatine,⁵⁵ ont montré que l'incorporation de lactame dans des séquences peptidiques peut augmenter l'efficacité de composés biologiquement actifs et augmenter leur stabilité métabolique. Ces lactames sont, à ce jour, largement utilisés en chimie médicinale pour augmenter la sélectivité, la stabilité et la pénétration cellulaire de peptides biologiquement actifs.¹⁶ Plus récemment, le motif α -amino- γ -lactame d'acide α -aminé (Agl- α AA) a été introduit dans des peptides d'intérêt pour augmenter leur pénétration intracellulaire.⁵⁶ Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé ce motif pour la construction de foldamères pénétrants (Cell-Penetrating Foldamers)⁵⁷ capables de véhiculer des molécules bioactives à l'intérieur des cellules.

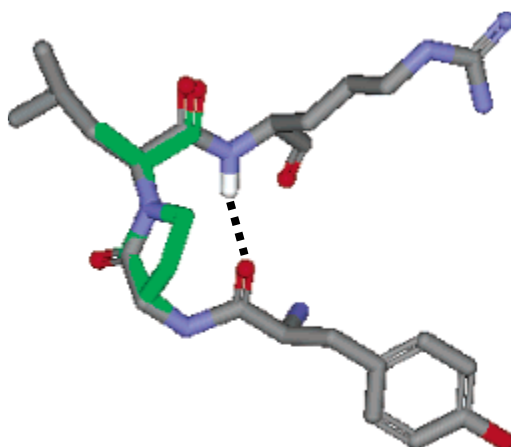


Figure 16 : Superposition du γ -lactame avec le coude β -II' formé par le tetrapeptide Tyr-Gly-Leu-Arg de la séquence LH-RH⁵³

V. Les foldamères

V. 1. Définition

La première définition du terme foldamère a été donnée par S. Gellman en 1998 comme étant “des polymères ayant une forte propension à adopter une structure compacte spécifique”.⁵⁸ Cette définition évolue en 2000 lorsque J.S. Moore les désigne comme “tout oligomère qui se replie dans un état conformationnel ordonné en solution, stabilisé par des interactions non covalentes entre unités monomériques non adjacentes”.⁵⁹ Les premiers foldamères, des β -peptides, sont décrits en 1996 par les équipes de S. Gellman⁶⁰ et D. Seebach⁶¹. Les foldamères sont capables d’adopter des structures secondaires stables à partir de peu de motifs comparés aux α -peptides naturels correspondants, et présentent une résistance accrue aux protéases. Ces structures secondaires sont stabilisées, comme dans les protéines, par des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques ou des interactions avec le solvant. Depuis les premiers travaux de S. Gellman et D. Seebach, de nombreuses familles de foldamères ont été élaborées, des foldamères aliphatiques constitués de dérivés d’acides aminés mais également des foldamères aromatiques comme par exemple les dérivés d’arylamide ou présentant des motifs phénylène éthylène.^{57–59}

Au vu de l’importante production scientifique dans ce domaine, je ne présenterai succinctement dans ce manuscrit que certains foldamères biotiques qui miment les biopolymères et répondent à un mode de repliement similaire. Ces foldamères peuvent être constitués d’acides α -, β -, γ - ou δ -aminés avec des liaisons peptidiques ou des liaisons modifiées (peptoïdes, azapeptides, liens urés, aminoxy...) comme illustré dans la Figure 17. Des foldamères homogènes, formés par la répétition d’une même unité monomérique (β -peptides, γ -peptides...), ou hybrides, c’est-à-dire avec un squelette hétérogène alternant de façon régulière des unités monomériques différentes (α/β , α/γ ...) ont été conçus. Dans cette partie bibliographique, seuls des exemples de foldamères construits à partir de β - et α -acides aminés possédant des liens amides (secondaires ou tertiaires) seront abordés. Comme nous le verrons à travers les exemples reportés ici, les différents niveaux de substitution des positions β et α dans les β -acides aminés ainsi que leur configuration ont permis de générer des oligoamides ayant des repliements inédits et variés. Nous donnerons également dans cette partie des exemples de foldamères obtenus en utilisant des mimes contraints de dipeptides, en particulier des coudes de type β , ces motifs ayant constitué une partie de mon travail de thèse.

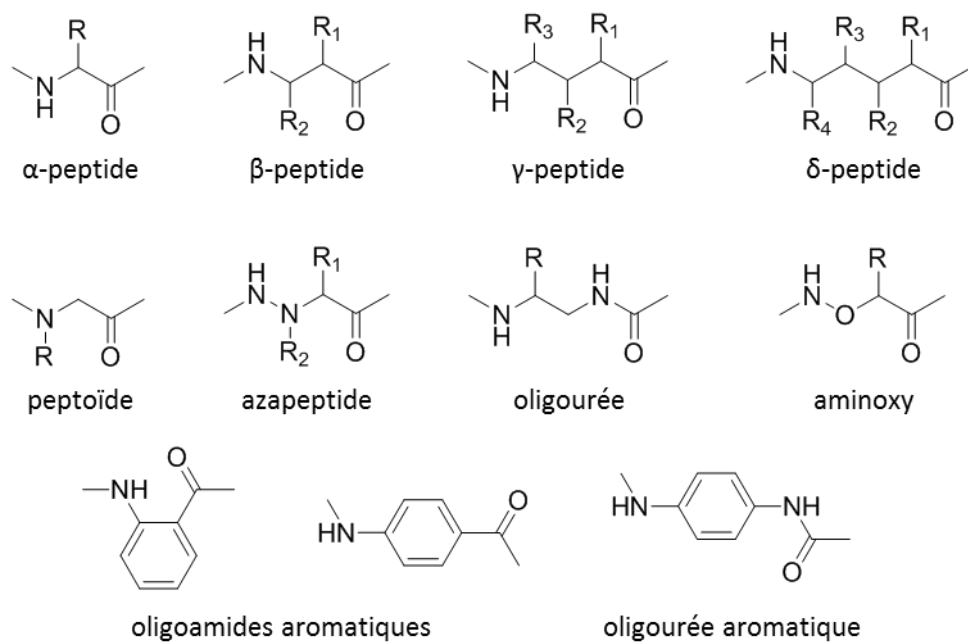


Figure 17 : Différents monomères utilisés dans la conception de foldamères.

V. 2. Les β -peptides

Les oligomères de β -aminoacides, appelés communément β -peptides, ont largement été développés et étudiés depuis les premiers travaux de S. Gellman et D. Seebach. Les β -peptides sont formés de β -aminoacides possédant un méthylène supplémentaire dans leur squelette, avec une chaîne latérale portée soit par le carbone α soit par le carbone β pour donner des β^2 -peptides ou β^3 -peptides, respectivement (Figure 18).

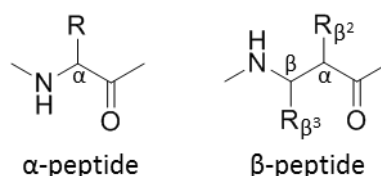


Figure 18 : Nomenclature associée aux β -aminoacides

La présence du méthylène supplémentaire devrait conduire, intuitivement, à une augmentation de flexibilité du squelette de l'oligomère, or les β -peptides ont montré une capacité à adopter une variété de conformations hélicoïdales, avec moins de monomères que les α -peptides correspondants. A titre d'exemple, parmi les différents types d'hélices identifiées à ce jour, l'hélice 3_{14} est l'une des plus caractérisés. Elle est constituée de 3 résidus par tour avec un réseau de liaisons hydrogène entre le C=O d'un résidu i et le HN d'un résidu $i+3$ formant un pseudo-cycle à 14 atomes (hélice 3_{14}). Par comparaison, les α -peptides forment une hélice droite avec 3,6 résidus par tour et un pseudo-cycle à 13 atomes (hélice $3_{6_{13}}$). Quelques exemples d'hélices sont reportés dans la Figure 19.

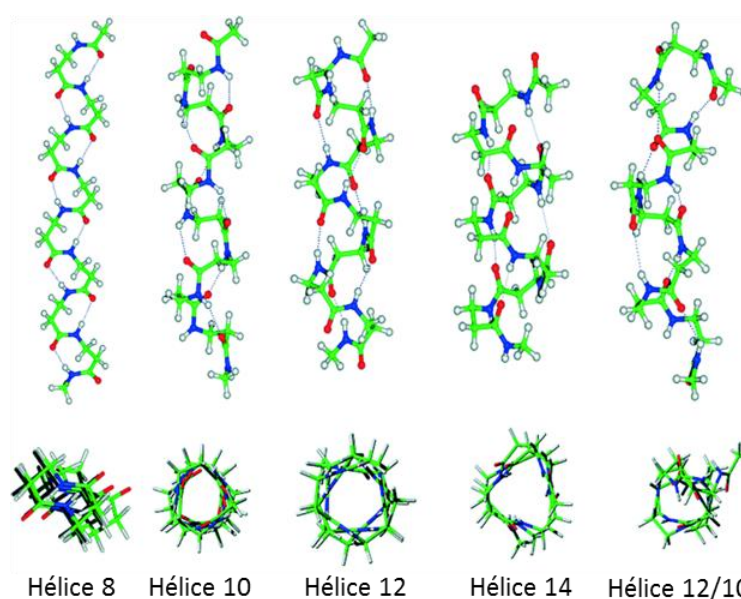


Figure 19 : Représentation des différents types d'hélices adoptées par les β -oligoamides

Le groupe de D. Seebach a montré que des β -peptides préparés à partir de résidus acycliques sont capables d'adopter des structures en hélice gauche ou droite selon la stéréochimie des β -aminoacides.⁶¹⁻⁶³ A titre d'exemple, des L- β^3 -peptides se structurent en hélice gauche 3_{14} avec un pas de 4.8 Å (Figure 20)⁶¹. Le réseau aligné de liaisons hydrogène ($\text{CO}(i) \rightarrow \text{HN}(i-2)$) de la partie C-terminale vers la partie N-terminale le long de l'axe de l'hélice crée un macrodipôle, opposé à celui de l'hélice- α . Les premières séquences décrites, capables de se structurer, ne présentaient que des résidus hydrophobes, mais des études ultérieures réalisées par le groupe de S. Gellman et A. Schepartz,⁶⁴⁻⁶⁵ ont permis l'élaboration de foldamères hydrosolubles, notamment par l'incorporation de résidus β^3 -Lysine ou la mise en place de ponts salins entre les chaînes latérales des résidus i et $i+3$, respectivement.

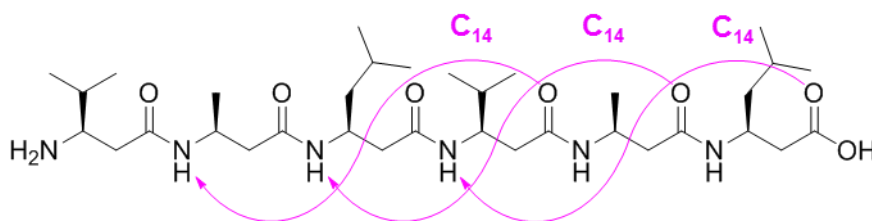


Figure 20 : Exemple de L- β^3 -peptides : H-(β^3 -HVal- β^3 -HAla- β^3 -HLeu)₂-OH⁶¹ et son réseau de liaisons hydrogène.

Le groupe de Seebach a également montré que des β^2 -peptides (configuration R sur le C_α substitué) conduisent comme leurs isomères β^3 -peptides à des hélices 14 .⁶⁶ En revanche, l'utilisation de $\beta^{2,2}$ -aminoacides, en particulier l'acide 1-(aminométhyl)cyclopropane-1-carboxylique ($\beta^{2,2}$ -HAc3c), a conduit à des $\beta^{2,2}$ -peptides capables de se replier pour former une hélice 8 avec un pas de 4.7-4.9 Å avec environ 2 résidus par tour. Ces hélices sont stabilisées par des liaisons hydrogène formées entre les résidus i et $i+2$ (Figure 21).⁶⁷

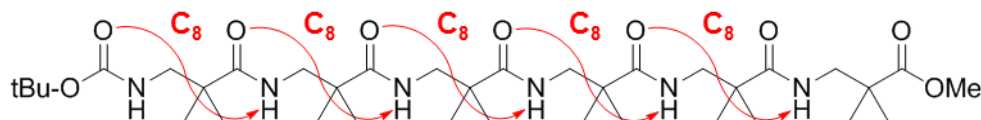


Figure 21 : Hélice 8 de Boc-($\beta^{2,2}$ -HAc3c)₆-OMe⁶⁷.

Les peptides β^2/β^3 mixtes formés par des alternances 1:1 de β^2/β^3 , β^3/β^2 , ou les oligomères constitués par d'autres séries d'alternances comme par exemple des alternances $\beta^2/\beta^2\beta^3$ ou $(\beta^2)_3/(\beta^3)_3$ ne forment pas non plus des hélices 14 comme le font les homo-oligomères de β^2 ou β^3 -amino acides. Ces oligomères donnent des hélices 10/12 stabilisées par des liaisons hydrogène C_{10} et C_{12} entre les résidus i et $i+1$ ou i et $i+3$ respectivement avec un pas de 5.25 Å pour 2.5 résidus (Figure 22).⁶⁸ Contrairement aux alignements homogènes des liaisons hydrogène dans l'axe de l'hélice 14 ou 8 qui donnent naissance à un macrodipôle, il y a deux types d'orientations dans l'hélice-10/12. Les liaisons hydrogène entre le CO et le HN ayant ainsi des directions alternées le long de l'axe de l'hélice, ces oligomères ne présentent pas de macrodipôle puisque les moments dipolaires des liaisons hydrogène s'annulent.

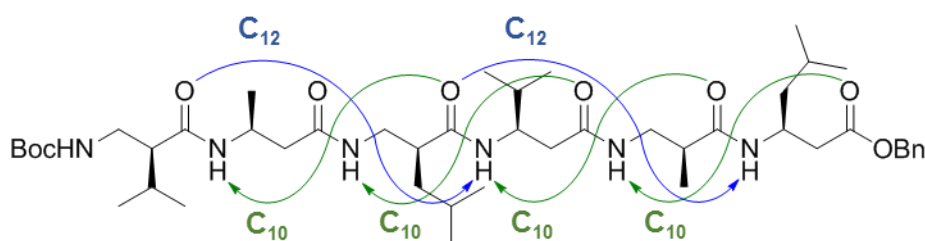


Figure 22 : Hélice 10/12 de β^2/β^3 -peptide⁶⁸

Lorsque les deux carbones $C\alpha$ et $C\beta$ sont substitués pour former des $\beta^{2,3}$ -peptides hétérochiraux (2R,3S), la chaîne alkyl en position α se retrouve en position axiale, elle est donc projetée parallèlement à l'hélice,⁶⁹ empêchant la formation des hélices du fait de la gêne stérique induite. Leur arrangement déplié leur permet cependant de se structurer en feuillet.⁷⁰ En revanche, il a été possible d'obtenir une structure en hélice avec une fonction hydroxy en position β^2 qui favorise des liaisons hydrogène C_8 pour former des hélices 3_8 avec un pas de 4.7-4.9 Å⁷¹ (Figure 23).

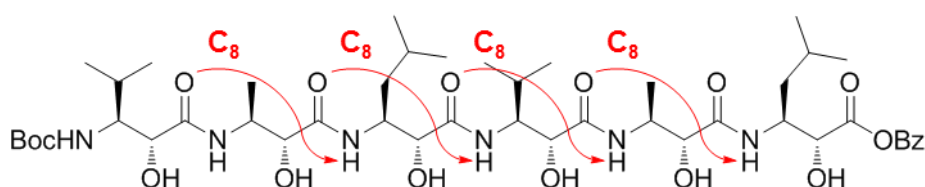


Figure 23 : $\beta^{2,3}$ -Hexapeptide de résidus acides (2R,3S)-3-Amino-2-Hydroxy carboxyliques⁹⁹

Introduits en 1996 par le groupe de Gellman avec l'acide *trans*-2-aminocyclohexane carboxylique (*trans*-ACHC), de nombreux $\beta^{2,3}$ -aminoacides cycliques sont aujourd'hui utilisés pour la construction de foldamères, ceux évoqués dans cette partie du manuscrit sont reportés dans la Figure 24 ci-dessous.

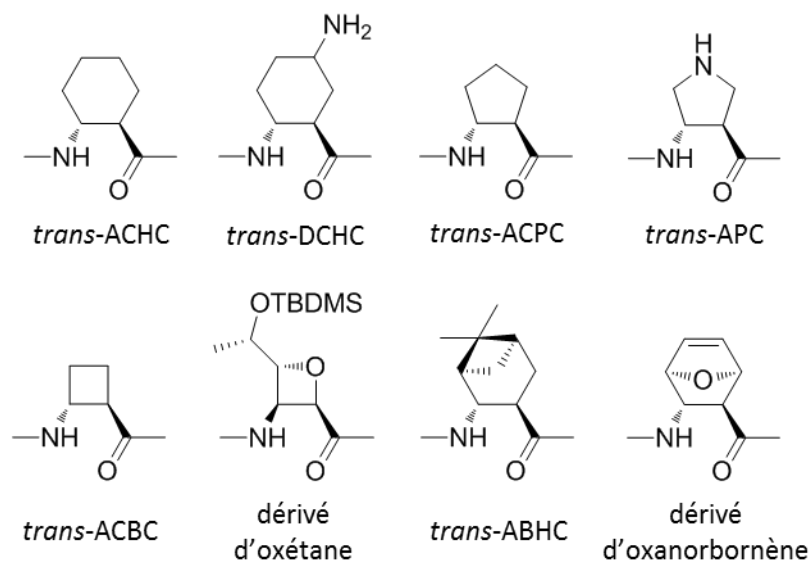


Figure 24 : Monomères $\beta^{2,3}$ -aminoacides cycliques utilisés dans la conception de foldamères.

L'intérêt de tels résidus est de bloquer la rotation autour de la liaison $C_{\alpha}-C_{\beta}$, permettant un renforcement de la structure hélicoïdale. La variation de la taille du cycle ayant un effet direct sur la valeur de l'angle θ , plusieurs conformations préférentielles ont été obtenues. Par exemple, alors que le cycle à 6 chaînons du *trans*-ACHC stabilise une hélice-14 avec un angle $\theta = \pm 60^\circ$ (Figure 25),⁶⁰ le cycle à 5 chaînons de l'acide *trans*-2-aminocyclopentane carboxylique (*trans*-ACPC) stabilise une hélice-12 (Figure 25).⁷²

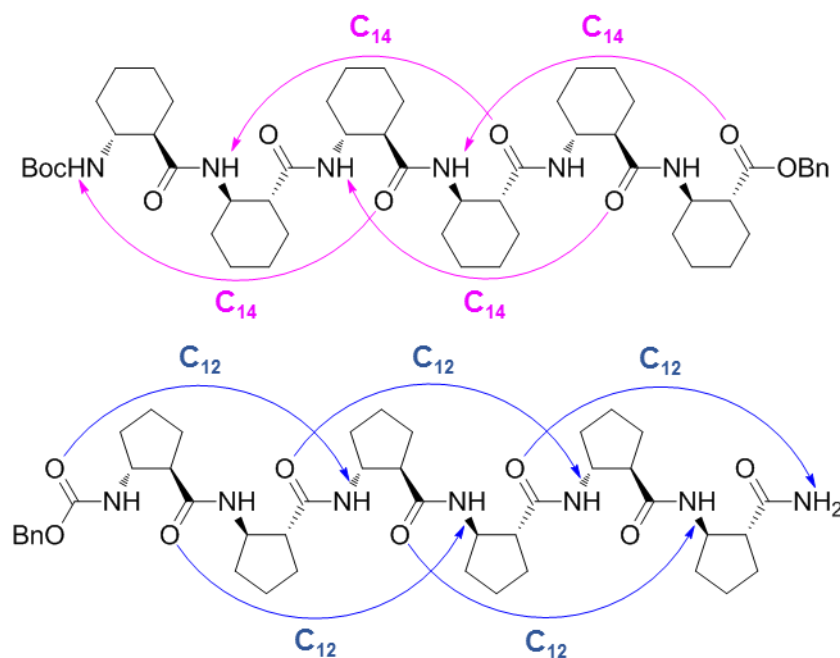


Figure 25 : Hélice 14 de *trans*-ACHC (en haut) et hélice 12 gauche *trans*-ACPC (en bas).

Ces unités monomériques ont également été utilisées pour stabiliser des hélices de β^3 -peptides constituées de résidus acycliques⁷³ et pour générer des oligomères hydrosolubles. On pourra donner à titre d'exemple, les oligomères hydrosolubles obtenus en alternant des résidus *trans*-ACHC avec des résidus d'acide *trans*-diaminocyclohexane carboxylique (*trans*-DCHC) contenant une amine primaire supplémentaire portée par le cyclohexane⁶⁴ ou encore en alternant le monomère *trans*-ACPC avec soit l'acide *trans*-3-aminopyrrolidine-4-carboxylique (*trans*-APC, le cyclopentane incorpore une amine secondaire),⁷⁴ soit le *trans*-3-aminométhyl-ACPC⁷⁵ où une amine primaire est greffée sur le cycle.

Alors qu'une hélice-14 a été observée dans un tétramère alternant des résidus β -Ala et des résidus d'acide *cis*-aminocyclobutane carboxylique (*cis*-ACBC), un $\beta^{2,3}$ -aminoacide contenant un cycle contraint à 4 chaînons, Aitken *et coll.*⁷⁶ ont montré en 2010 que les oligomères du *trans*-ACBC forment une hélice-12 (Figure 26). L'utilisation de motifs incluant le cycle oxétane (cycle à 4 chaînons avec un atome d'oxygène intracyclique) permet d'obtenir une hélice gauche 10 stabilisée par des liaisons hydrogène formées entre les résidus *i* et *i*+1 (Figure 26).⁷⁷

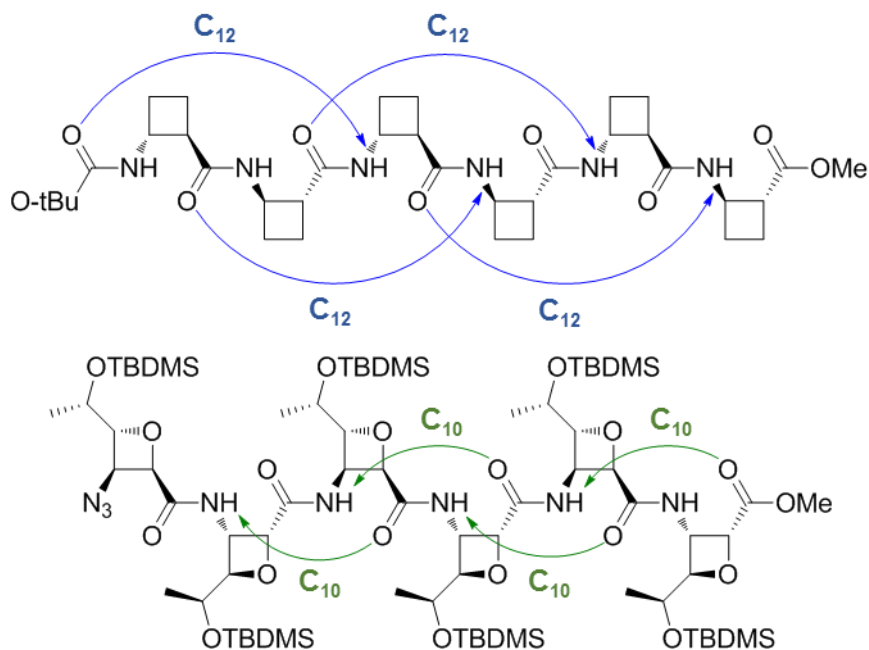


Figure 26 : Hélice 12 de *trans*-ACBC (en haut) et hélice 10 d'acides oxétane β -aminés (en bas).

D'autres foldamères ont été conçus par les groupes de Fülöp et Klein en utilisant des $\beta^{2,3}$ -aminoacides bicycliques, l'acide (1R,2R,3R,5R)-2-amino-6,6-diméthyl-bicyclo[3.1.1]-heptane-3-carboxylique (*trans*-ABHC)⁷⁸ et un β -aminoacide *trans*-oxanorbornène⁷⁹ analogue au *trans*-ACHC, respectivement. Les contraintes angulaires supplémentaires apportées par le bicyclic stabilisent ou induisent de nouveaux modes de repliement. Le *trans*-ABHC conduit à des oligomères adoptant une structure en hélice 12 (Figure 27)⁷⁸ et le dérivé *trans*-oxanorbornène à des oligomères adoptant une hélice 8 (Figure 27)⁷⁹.

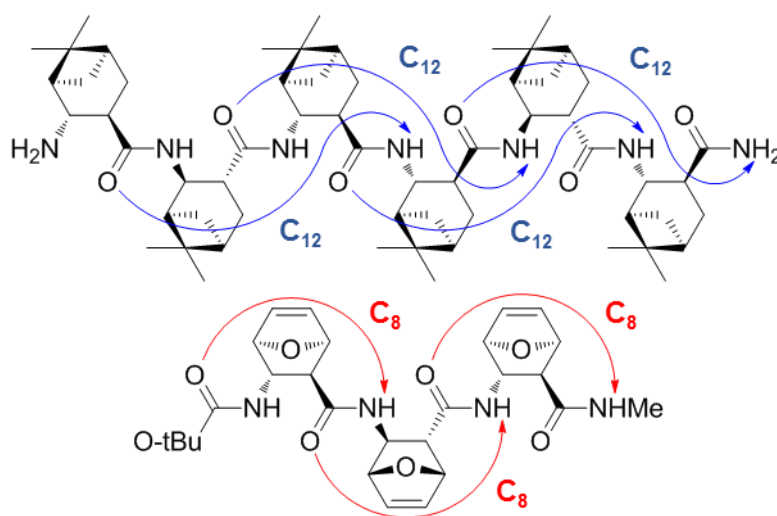


Figure 27 : Hélice 12 de *trans*-ABHC (en haut) et hélice 8 d'un β -peptide composée de dérivés oxanorbornène (en bas).

V. 3. Les α/β -peptides

Les foldamères présentés précédemment ont un squelette homogène c'est-à-dire formé par la répétition d'unités monomériques d'une seule et même classe de composés. Ainsi, les foldamères de β -peptides contiennent exclusivement des résidus β -aminoacides. A côté de ces homo-oligomères, le développement d'oligomères hybrides ayant un squelette hétérogène comme les α/β -, α/γ -, α/δ - et les β/γ -peptides a fait l'objet d'une attention particulière dans le domaine des foldamères. Dans la suite de ce chapitre, pour des raisons de clarté et de longueur du document, nous n'aborderons que les combinaisons de résidus d'acides α - et β -aminés qui sont les plus répandues et qui se rapprochent le plus des composés que nous avons développés durant ma thèse, et quelques exemples seront reportés.

Le développement de foldamères hybrides a permis de considérablement élargir la diversité des structures accessibles avec un nombre restreint de résidus. Plusieurs types de séquences répétitives : 1/1 α/β , 1/2 α/β , 2/1 α/β , ou non répétitives comme par exemple $\alpha\alpha\alpha\beta\alpha\beta$, $\alpha\alpha\beta\beta\alpha\beta$, etc ont été étudiées. L'obtention de nouvelles structures basée sur ces foldamères hybrides permet de projeter des chaînes latérales vers des espaces non explorés par les β -peptides. De plus, l'usage d'acides α -aminés commerciaux disponibles est moins coûteux que les β . La stratégie généralement mise en œuvre lors de la préparation de ce type de foldamères est d'induire un repliement à l'aide de β AA contraints et d'utiliser la diversité des groupements fonctionnels offerts par les chaînes latérales des acides α -aminés disponibles.

En 2004, les groupes de Reiser⁸⁰ et Gellman⁸¹ ont indépendamment rapporté que des petites séquences peptidiques avec des alternances 1:1 d' α/β -aminoacides conduisaient à des structures hélicoïdales stables. L'acide *cis*- β -aminocyclopropane (*cis*- β -ACC) et le (*S,S*)-*trans*-ACPC ont respectivement été utilisés dans leurs études. L'oligomère hybride construit avec l'acide *cis*- β -aminocyclopropane carboxylique (*cis*- β -ACC) se structure en hélice gauche 3_{13} stabilisée par des liaisons hydrogène formées entre les résidus β -aminés i et $i+2$ (Figure 28).⁸⁰ Cet oligomère a notamment été utilisé pour obtenir des analogues du neuropeptide Y sélectif du récepteur Y₁.⁸²

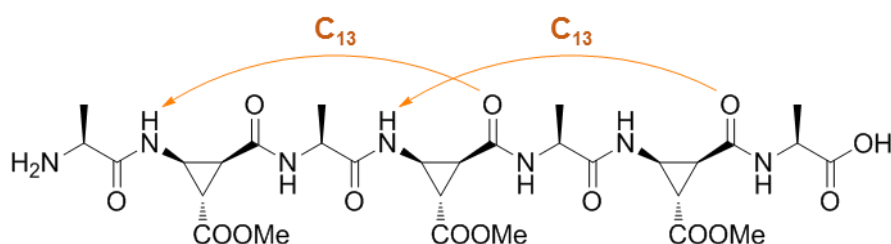


Figure 28 : Structure en hélice 13 de H-Ala-(*cis*- β -ACC-Ala)₃-OH⁸⁰

Dans le cas des oligomères hybrides de *trans*-ACPC en alternance avec des acides α -aminés, l'étude structurale a révélé un système complexe où coexistent deux conformations hélicoïdales : une hélice 11 et une hélice 14/15 (Figure 29).⁸³ L'hélice 2.8₁₁ avec un pas de 5.6 Å est stabilisée par des liaisons hydrogène formées entre les résidus i et $i+3$ alors que l'hélice 3.6_{14/15} avec un pas de 5 Å est stabilisée par des liaisons hydrogène formées entre les résidus i et $i+4$. L'hélice 14/15 est favorisée pour des séquences longues, au-dessus de l'octamère,⁸⁴ une tendance retrouvée pour les α -peptides où l'hélice α est favorisée par rapport à l'hélice 3_{10} pour des séquences plus longues.⁸⁵

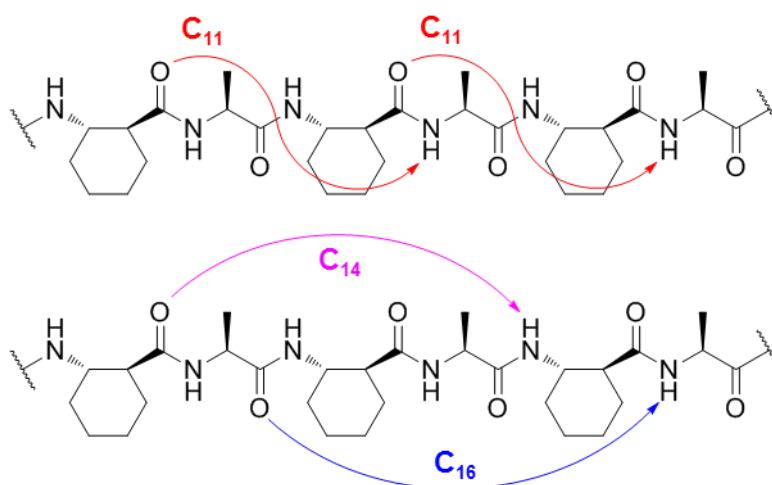


Figure 29 : Hélices 11 (en haut) et hélice 14/16 (en bas) adoptées par les oligomères hybrides de *trans*-ACPC en alternance avec des acides α -aminés

Ce type de phénomène a été également observé dans des oligomères incluant un β -aminoacide bicyclique fortement contraint développé par M. Calmès *et al.*, l'acide 1-aminobicyclo[2.2.2]octane-2-carboxylique (ABOC) et qui s'est avéré être un fort inducteur d'hélice. En effet, l'étude structurale d'oligomères hybrides α /ABOC 1:1 a révélé la présence d'un polymorphisme structural dans cette famille de composés.⁸⁶ Des oligomères courts (tétramères) adoptent une hélice 11/9, tandis qu'une hélice 18/16 est favorisée pour des oligomères plus longs (octamères) (Figure 30).

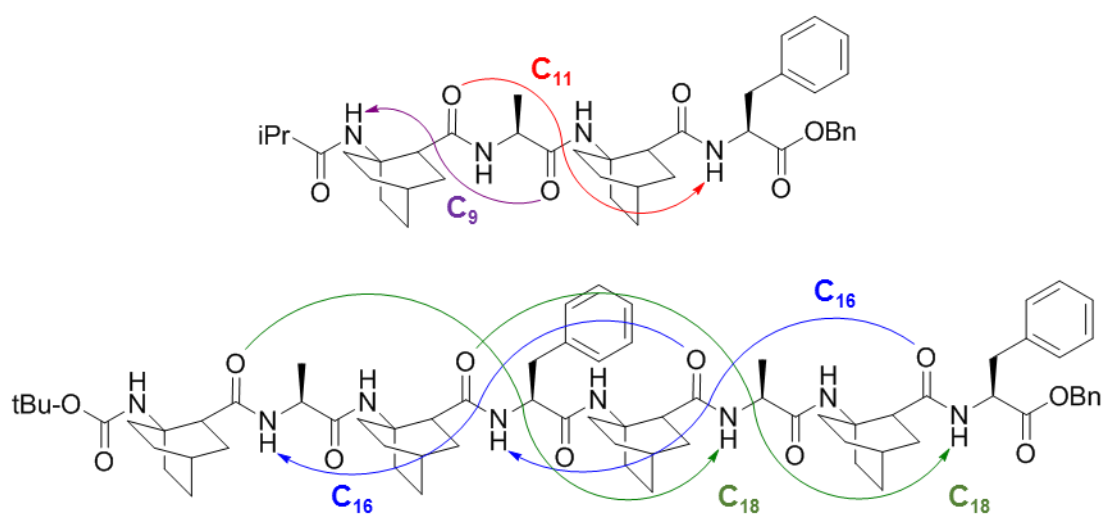


Figure 30 : Hélices 11/9 (en haut) et hélice 18/16 (en bas) adoptées par les oligomères hybrides d'ABOC en alternance avec des acides α -aminés

Il a aussi été montré que l'incorporation de résidus α,α -disubstitués, comme l'Aib, à la place d' α -aminoacides augmente la stabilité des hélices 11⁸⁷ à l'instar de ce qui est observé pour les hélices α ⁸⁸.

Les β^3 -aminoacides acycliques alternés avec des acides α -aminés ont également permis d'obtenir des hélices stables 11/9. Les premières séquences décrites alternent des acides (S)- β -aminés substitués en β^3 par un groupement saccharidique (SAA) avec des acides α -aminés.⁸⁹ Des séquences hétérochirales qui alternent des acides (R)-homo- β^3 -aminés avec des acides α -aminés (D) ont ensuite été décrites (Figure 31).⁹⁰ Ces oligomères adoptent une structure hélicoïdale 11/9. Cette structure est aussi retrouvée pour des oligomères qui alternent des résidus (1R,2S)-2-aminocyclohexanecarboxylique (*cis*-ACHC) avec des acides α -aminés de configuration D.⁹¹ En revanche, l'alternance d'acides β^3 -aminés avec des Aib a donné une structure semblable à l'hélice 14/15 mais dépourvue de liaisons hydrogène.⁹²

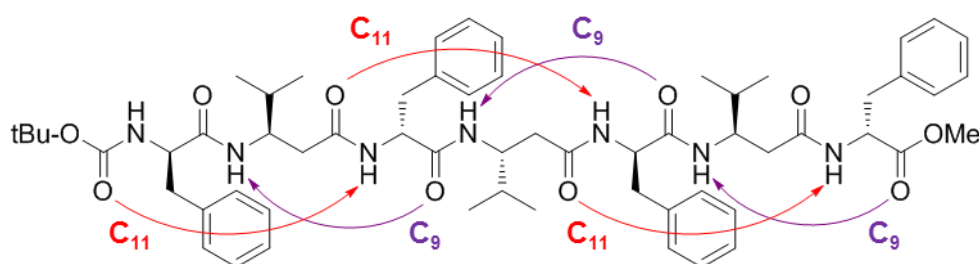


Figure 31 : Structure en hélice 11/9 de tBu-(phe- β^3 hVal)₃-phe-OMe

Comme nous l'avons précisé plus haut, le repliement de séquences α/β -peptidiques ne se limite pas à une alternance 1:1. Les alternances 2:1 et 1:2 ont également conduit à des oligomères ayant une forte capacité à se replier en hélices stabilisées par des liaisons hydrogène formées soit entre les résidus i et $i+3$ ou entre les résidus i et $i+4$ ⁹³. Ce type de séquences n'ayant pas été abordé dans cette thèse nous ne détaillerons donc pas ces travaux ainsi que ceux mettant en jeu des séquences alternées non-répétitives.

V. 4. Les α -et β -peptoïdes

Les α -peptoïdes sont des oligoamides de glycine *N*-substituées dont la « chaîne latérale » est déplacée du carbone α sur l'atome d'azote de la fonction amide.⁹⁴ Cette migration entraîne la disparition de possibles liaisons hydrogène intramoléculaires, favorisant les équilibres *cis/trans* autour des liaisons amides *N,N*-disubstituées. Le squelette achiral résultant ne facilite à priori pas la formation de systèmes structurés. Cependant R. Zuckermann *et coll.*⁹⁵ ont montré qu'il est possible d'induire un repliement dans les peptoïdes en introduisant des chaînes latérales chirales et encombrées sur l'atome d'azote. La chiralité va induire le sens de l'hélice et l'encombrement influencer la conformation de la chaîne principale en jouant notamment sur l'équilibre *cis/trans* autour de la liaison amide. D'autres phénomènes tel que les interactions π et interactions électrostatiques permettent aussi de favoriser une conformation plutôt qu'une autre.

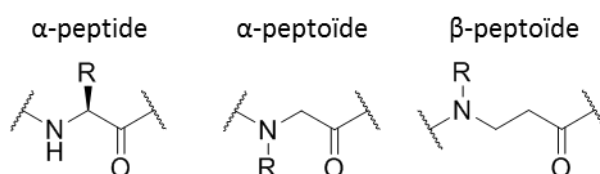


Figure 32 : Représentation schématique des résidus dans les α -peptides, α -peptoïdes et β -peptoïdes

Les peptoïdes *trans*, qui sont favorisés par des substituants *N*-aryles, adoptent une structure PPII avec 3.1 résidus par tour et un pas de 9 Å (Figure 33).⁹⁶ Les peptoïdes *cis* sont eux favorisés par l'introduction de substituants *N*- α -chiraux β -encombrés et adoptent une structure PPI avec 3 résidus par tour et un pas de 6.7 Å (Figure 34).^{95,97-99}

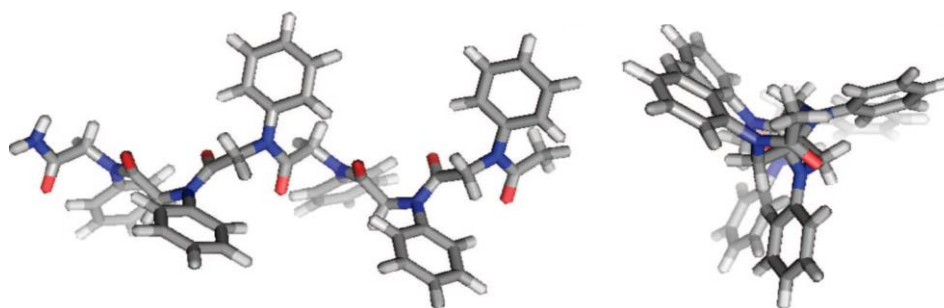


Figure 33 : Structure PPII de l'hexamère de *N*-(phenyl)glycine⁹⁶

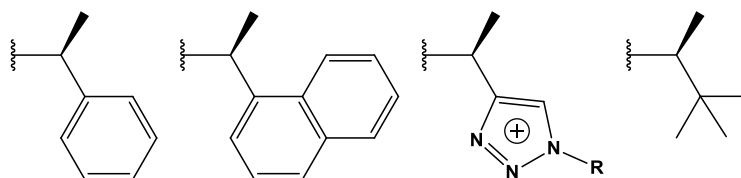


Figure 34 : Exemple de substituents favorisant une conformation *cis* :

(*S*)-1-phenylethyl⁹⁵, (*S*)-1-naphthylethyl⁹⁷, (*S*)-1-(1,2,4-triazolium)ethyl⁹⁸, (*S*)-1-*tert*-butylethyl⁹⁹

Récemment, l'alternance de liens amides *cis* et *trans* obtenue par l'alternance dans la séquence de résidus *N*-aryles et *N*- α -chiraux β -encombrés a permis d'obtenir une structure en ruban (Figure 35).¹⁰⁰

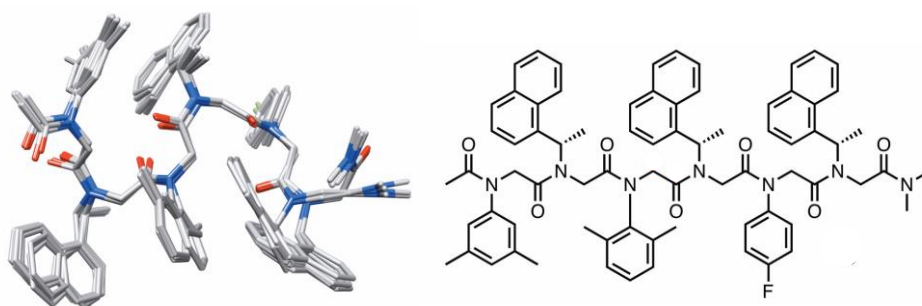


Figure 35 : Structure en ruban d'un peptôïde alternant des liens amides *cis* et *trans*¹⁰⁰

Comme les α -peptôïdes, les β -peptôïdes ont montré une capacité à former des hélices. A titre d'exemple, les oligomères de résidus *N*-1-naphthyléthyl se structurent en hélice à trois faces plus allongée que les PPII avec 3 résidus par tour pour un pas 9.6-9.8 Å (Figure 36).¹⁰¹

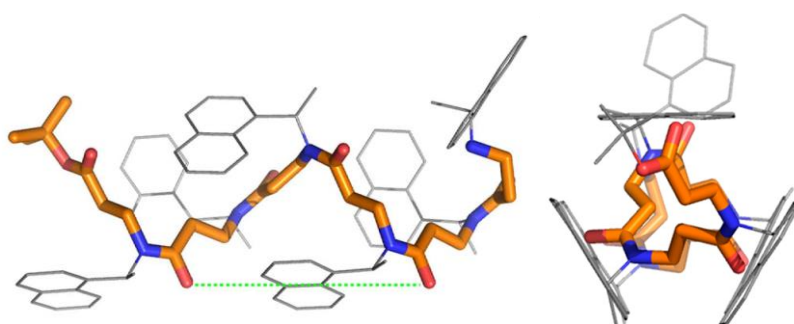


Figure 36 : Structure de l'hexamère de *N*-(1-naphthylethyl) β -alanine¹⁰¹

On peut également citer dans cette partie, les β -polyprolines, qui comme les α -polyprolines, sont capables de former des hélices dépourvues de liaisons hydrogène. En l'occurrence, les oligomères de β^3 -homoproline se structurent en hélice 10¹⁰².

V. 5. Les oligomères de motifs conformationnellement contraints

Les équipes de Balaram et Toniolo ont montré que des peptides contenant des répétitions périodiques de dipeptides Pro-X et X-Pro (avec X = Aib, Ala, ou D-Ala) adoptent des conformations en ruban β , considérées comme un sous-type d'hélice 3_{10} .^{43,44,103,104} Ces résultats ont été appuyés par des études théoriques soulignant également que des répétitions de mimes de dipeptides dans une séquence de protéine conduit à des domaines structurés en ruban plat ou torsadé, selon le type de mimes.¹⁰⁵ Basé sur ces résultats, plusieurs équipes ont utilisé des mimes de coudes β et γ pour générer des oligomères adoptant des structures secondaires bien définies. Ces structures sont orchestrées par la répétition des mimes contraints de dipeptides qui conservent leurs propriétés conformationnelles intrinsèques dans l'oligomère.^{106–112} A titre d'exemple, l'équipe de Tomasini a développé des systèmes structurés à partir d'acide 4-méthyl-oxazolidin-2-one carboxylique (Oxd), et d'acide pyroglutamique (pGlu) (Figure 37). Elle a montré que des oligomères mixtes alternant des α -aminoacides avec un motif Oxd de configuration D se structurent en ruban β à partir de cinq répétitions. Cette structure est stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène formant des pseudo-cycles C_{10} .^{108,113} Quant aux oligomères du motif pGlu contraints par un γ -lactame, ils sont capables de se structurer en hélice PPII, stabilisée par des liaisons hydrogène intramoléculaires particulières, entre le CO du lactame du résidu i et l'atome d'hydrogène du Ca du résidu $i-1$, formant des pseudocycles C_6 .¹¹⁴

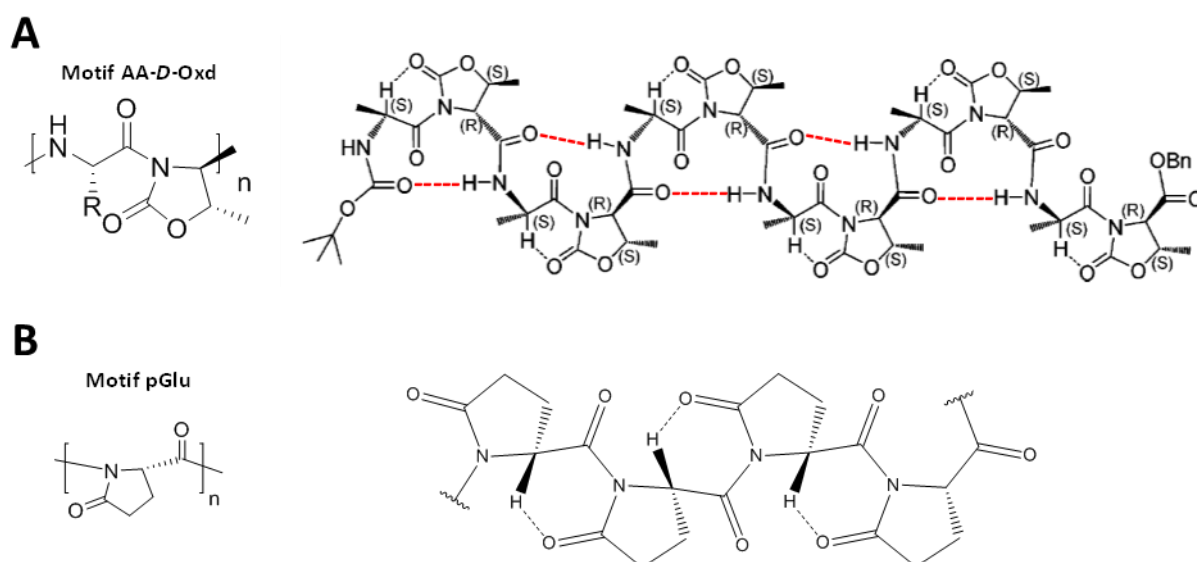


Figure 37 : (A) Motif α -AA-D-Oxd et structure en ruban d'oligomères d'oxazolidinone (Boc-(L-Ala-D-Oxd)₆-OBn)¹⁰⁸ ; (B) Motif L-pGlu et oligomère de L-pGlu.

On peut également citer l'exemple des oligomères d' α -amino γ -lactames α -aminoacides qui ont été développés dans notre équipe et qui seront repris tout au long de ce manuscrit. Ces oligomères construits à partir du mime de coude β développé par R. M. Freidinger *et al.* adoptent des structures en ruban (Figure 38 et chapitre III).¹¹⁵

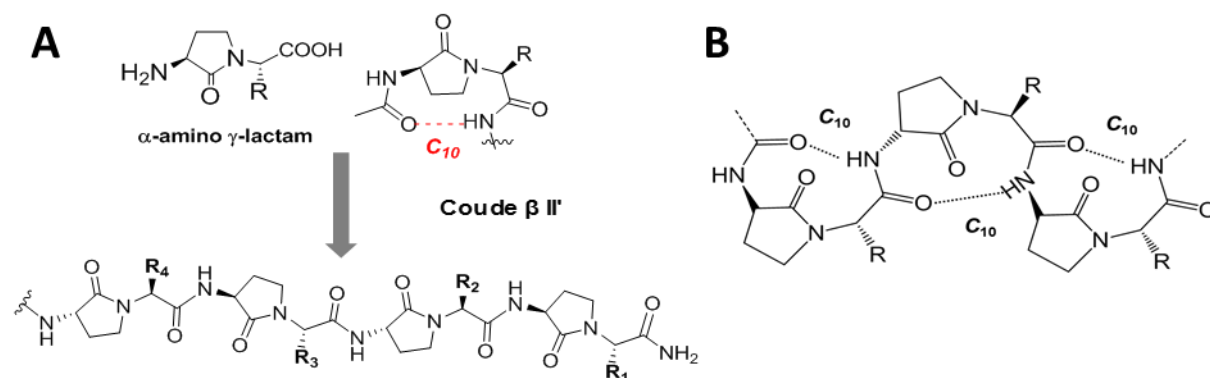


Figure 38 : (A) Structure des α -amino γ -lactames α -aminoacides et leurs oligomères ; (B) Structure des oligomères α -amino γ -lactames α -aminoacides

V. 6. Exemples d'applications biologiques

Ces différentes structures apparaissent comme autant de plateformes d'intérêt pour essayer de mimer les structures naturelles ou répartir de façon contrôlée des groupements fonctionnels dans un espace bien défini. Leur avantage par rapport aux peptides naturels est d'être prévisibles et stables et de nécessiter moins de monomères pour adopter une structure stable. De plus, ils ont une résistance accrue à la protéolyse qui en font des candidats attractifs dans des programmes de chimie médicinale. Ces systèmes peuvent être utilisés pour différentes applications biologiques, parmi lesquelles le développement d'antimicrobiens, d'inhibiteurs d'interaction protéine-protéine ou de vecteurs de pénétration intracellulaire. Au sein de notre laboratoire, cette dernière application a été développée avec des oligomères de γ -lactames d'acides α -aminés repliés en ruban.

Les foldamères antimicrobiens

Les foldamères antimicrobiens s'inspirent des peptides antimicrobiens qui sont un élément important du système immunitaire des organismes vivants. Une partie de ces peptides se structure en hélices amphiphiles qui ségrègent les chaînes polaires et apolaires sur deux faces opposées ou aux deux extrémités de l'hélice. Cette caractéristique a conduit de nombreux groupes à s'intéresser à la conception de structures hélicoïdales amphipathiques basées sur des foldamères. Parmi les foldamères contenant des liens amides, il y a des peptoïdes antimicrobiens,^{116,117} des hétéro-oligomères d' α -peptide/ β -peptoïde^{118,119} mais aussi des β^3 -peptides,¹²⁰⁻¹²³ des $\beta^2\beta^3$ -peptides,¹²⁴ des α/β -peptides alternant des acides α -aminés avec des *trans*-ACPC ou *trans*-APC.^{81,125}

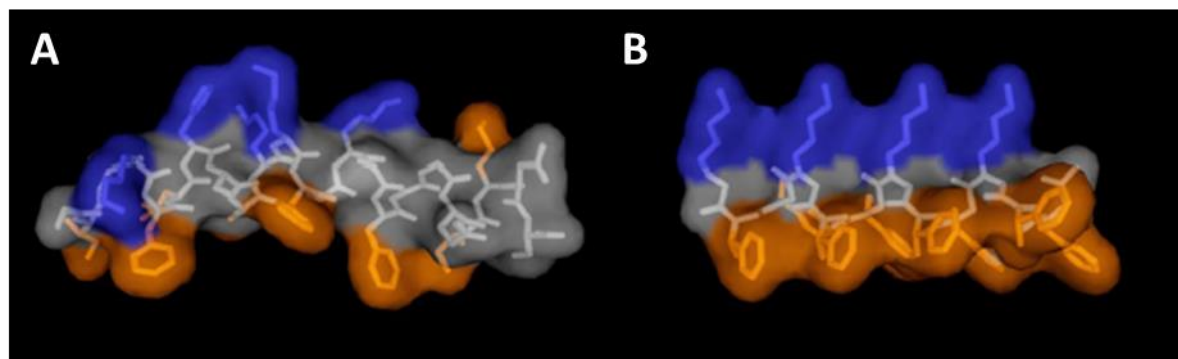


Figure 39 : Exemple de foldamères antimicrobiens : (A) Peptide naturel magainin-2 (PDB : 2MAG) et (B) peptoïde H-(NLys-Nspe-Nspe)₄-NH₂¹²⁶

Les interactions protéine-protéine (PPIs)

Les interactions protéine-protéine (PPIs) représentent un intérêt croissant dans l'industrie pharmaceutique pour le développement de candidats médicaments car elles constituent un point de contrôle et de régulation crucial pour une majorité des processus cellulaires. Cependant, le développement d'inhibiteurs puissants de ces interactions, hautement spécifiques et de taille modérée, est actuellement un véritable défi. En effet, les interfaces entre partenaires sont, dans de nombreux cas, de larges surfaces relativement planes et hydrophobes et une grande majorité de ces interfaces (plus de 60%) mettent en jeu des hélices α . C'est la raison pour laquelle les stratégies de chimie médicinale classique restent, à ce jour, inadaptées pour interagir avec ces interfaces. En revanche, en adoptant des structures stables, bien définies et prévisibles, les foldamères constituent des structures privilégiées pour présenter de manière contrôlée en trois dimensions des éléments de reconnaissance pour ces interfaces. Ces dernières années, les foldamères ont permis d'identifier des inhibiteurs de PPIs pour différentes cibles thérapeutiques. Je vais donner ici quelques exemples. Des hélices 12 de trans-ACPC ont permis d'obtenir des inhibiteurs de γ -sécrétase pour la prévention et le traitement de la maladie d'Alzheimer¹²⁷. Plusieurs protéines impliquées dans l'apoptose (hDM2, hDMX, Bcl-x_L) ont été ciblées avec des foldamères pour des applications anti-cancéreuses. Des hélices 14 de β^3 -peptides ont permis d'inhiber l'interaction p53/hDM2¹²⁸ et p53/hDMX.¹²⁹ Une hélice chimère d' α/β - α peptide mimant l'hélice α de la protéine BH3 a permis de bloquer l'interaction de cette dernière avec sa protéine partenaire anti apoptotique Bcl-x_L (Figure 40)¹³⁰. Par une approche combinatoire, différents peptoïdes ont pu être développés pour l'inhibition du protéasome 19S¹³¹, du récepteur VEGFR2¹³² et le blocage d'anticorps AQP4 responsables de désordre inflammatoire autoimmun¹³³. Des inhibiteurs de fusion du VIH ont été obtenus par le développement de β -peptides¹³⁴ et d' α/β -peptides¹³⁵ mimes de gp41 pour bloquer le complexe gp120/gp41 (VIH). Des hélices des peptides α/β ont permis d'obtenir des agonistes de GLP-1R¹³⁶.

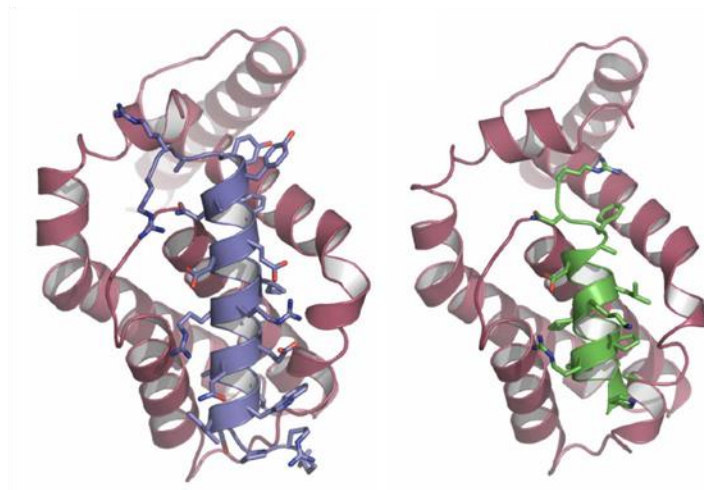


Figure 40 : Structure RX de Bcl-x_L (magenta) en interaction avec l'hélice α de BH3 (bleu) et un foldamère α/β -apeptide (vert)¹³⁰

Les foldamères pénétrants

Les foldamères offrent aussi des outils attractifs pour développer de façon rationnelle des vecteurs de pénétration intracellulaire basés sur les peptides pénétrants de type “Cell Penetrating Peptides” (CPP). Une partie de mon travail de thèse a été de développer et d'utiliser des foldamères pénétrants pour véhiculer un principe actif à l'intérieur des cellules. Dans le chapitre suivant, je vais faire quelques rappels généraux sur les peptides pénétrants, qui ont inspiré la conception des foldamères pénétrants, avant de dresser un état de l'art non exhaustif sur cette famille de composés.

VI. Les peptides pénétrants

VI. 1. La pénétration intracellulaire

Les molécules capables de traverser la membrane cellulaire sont d'une importance majeure pour la médecine car un grand nombre de cibles thérapeutiques sont présentes à l'intérieur des cellules. Cependant, une des limitations majeures au développement de certaines molécules à fort potentiel thérapeutique est leur incapacité à traverser la membrane plasmique. Les cellules eucaryotes des mammifères sont des structures complexes comprenant de nombreux organelles et entourées d'une membrane de 7 à 9 nm d'épaisseur.¹³⁷ Cette membrane est constituée d'une bicouche lipidique où de nombreuses protéines assurent le transport vers l'intérieur et l'extérieur de la cellule. La membrane cellulaire est considérée comme semi-perméable avec des systèmes de transport passifs et actifs. La diffusion passive ne requiert pas d'énergie mais nécessite un gradient de concentration. Des petites molécules apolaires peuvent diffuser à travers la bicouche comme l'oxygène, et de petites molécules polaires comme les acides aminés rentrent dans la cellule pas le biais de protéines transmembranaires.¹³⁸ Le transport actif s'opère contre un gradient de concentration et nécessite donc un apport en énergie sous forme d'ATP. Ce transport se fait par le biais de pompes protéiques transmembranaires, ou par endocytose qui repose sur une modification de la membrane (invagination ou protrusion). Bien que les transporteurs transmembranaires puissent véhiculer dans la cellule de nombreux substrats différents, ils reposent sur une relation structure-fonction très spécifique. L'endocytose au contraire, permet l'internalisation d'une grande variété de composés. Elle peut être divisée en quatre catégories : la phagocytose, la macropinocytose, l'endocytose dépendant de la clathrine, et de la caveoline (Figure 41).¹³⁹ Quel que soit le processus d'internalisation mis en jeu, l'endocytose ou la translocation directe, des domaines lipidiques de la membrane ainsi que des sucres de surface sont impliqués. L'interaction avec la membrane constitue une étape décisive pour son franchissement. Ainsi les propriétés physico-chimiques des CPP ont une influence déterminante sur l'efficacité d'internalisation mais aussi sur le mode d'internalisation. Il est également important de souligner que d'autres paramètres comme la taille du cargo, sa nature ainsi que le lien entre le CPP et le cargo peuvent impacter le processus de pénétration intracellulaire.

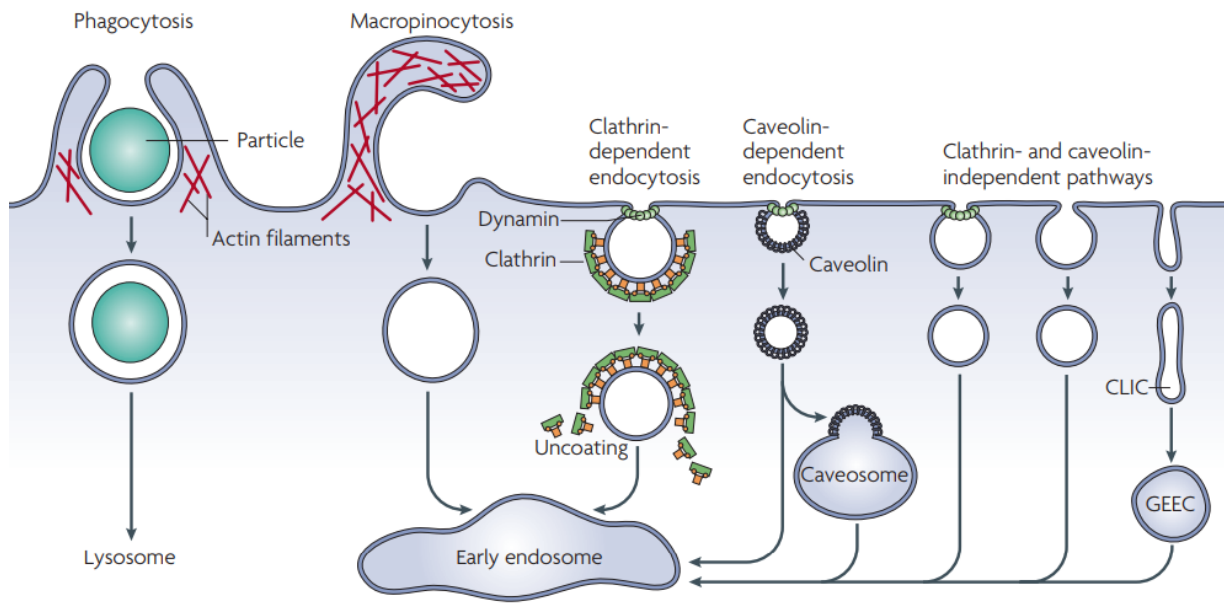


Figure 41 : Représentation schématique des voies d'endocytose¹⁴⁰

Une fois internalisée par endocytose, une molécule thérapeutique doit encore s'échapper de l'endosome pour atteindre sa cible intracellulaire et éviter sa dégradation après fusion au lysosome. Il existe pour cela des composés comme la chloroquine qui, en coadministration avec le principe actif, s'accumule dans le lysosome jusqu'à provoquer sa rupture.¹⁴¹

La chimie thérapeutique a développé de nombreux outils pour adresser à l'intérieur des cellules des principes actifs parmi lesquels nous comptons les polymères,¹⁴² les virus,¹⁴³ les liposomes¹⁴⁴ et les peptides pénétrants (Cell Penetrating Peptides, CPP)¹⁴⁵.

VI. 2. Structure et Propriétés des CPP

Les CPP sont des peptides d'une dizaine d'acides aminés, généralement cationiques. Ils sont capables de traverser la membrane cellulaire et conservent cette propriété lorsqu'une molécule d'intérêt (dit cargo) leur est attachée. Les CPP sont, pour la plupart des fragments de domaine de transduction de protéines leur permettant l'entrée dans une autre cellule, ou un autre organisme, que celui dans laquelle elle a été synthétisée. Une grande partie de ces peptides sont dérivés de protéines virales ou de facteurs de transcription. C'est le cas des premiers CPP décrits, le peptide TAT et la pénétratine. Le peptide TAT identifié par le groupe de Lebleu¹⁴⁶ est un peptide de 13 acides aminés dérivé de la protéine TAT du virus d'immunodéficience humaine (VIH-1).^{147,148} La pénétratine (ou pAntp), décrite par l'équipe de Prochiantz en 1991, est un peptide dérivé de la troisième hélice de l'homéodomaine de la protéine transductrice Antennapedia de la Drosophile.¹⁴⁹ Depuis ces premières découvertes, de nombreux CPP ont été identifiés. Ils peuvent être classés selon leur origine, la nature de leur séquence ou leur mécanisme d'internalisation.¹⁵⁰ Pour mettre en avant à la fois l'importance de la structure et des propriétés physico-chimiques des CPP, on choisira ici de les présenter selon la nature de leur séquence : cationique, amphipatique ou hydrophobe.

Il est important de noter que les CPP cationiques et amphipatiques sont des peptides riches en résidus arginine (Arg) et que ce résidu joue un rôle clé dans l'internalisation. En effet, il permet la première liaison du CPP à la membrane cellulaire via des interactions électrostatiques entre les fonctions guanidinium et les charges négatives des glycosaminoglycanes localisés à sa surface des membranes. D'autres facteurs vont déterminer l'efficacité d'internalisation. Par exemple, le résidu tryptophane dans la pénétratine est également crucial pour son internalisation. Le caractère amphipatique et la structure secondaire, en particulier en hélice α , de certains CPP jouent également un rôle essentiel pour leur pénétration intracellulaire.

Les CPP cationiques

Ces CPP ont une charge nette positive importante à pH physiologique. Les plus représentatifs sont le peptide TAT qui possède dans sa séquence 8 résidus cationiques sur 13 (GRKKRRQRRRPPQ) ; la pénétratine qui en possède 7 sur 16 résidus dans sa séquence (RQIKIWFQNRRMKWKK) et les polyarginines. Les études menées sur le Tat et la pénétratine ont montré l'importance du nombre et de la densité des charges cationiques pour l'internalisation. Ces caractéristiques ont conduit le groupe de Wender et Futaki à développer des CPP cationiques de synthèse uniquement formés de résidus Arg, les poly-arginine^{151,152}, l'octaarginine ayant été identifié comme la séquence minimale pour l'internalisation.¹⁵³ Le groupement guanidinium de l'arginine s'est montré beaucoup plus efficace pour promouvoir l'internalisation que d'autres amines. En effet, les polyArg ont une capacité à pénétrer dans les cellules bien supérieure à celle des poly-lysine ou des poly-citrulline.¹⁵⁴ Cela a été attribué à sa capacité à former des liaisons hydrogène bifides avec les groupes chargés négativement de la membrane plasmique (carboxylique, sulfates et phosphates), permettant ainsi l'internalisation des CPP cationiques à pH physiologique.¹⁵⁵

Les CPP amphipatiques

Ces CPP comprennent un domaine hydrophile et un domaine hydrophobe qui sont nécessaires à l'internalisation. Il existe deux types de CPP amphipatiques : les primaires et les secondaires.

Dans les CPP amphipatiques primaires la séparation des deux domaines hydrophobe et hydrophile se fait par leur position dans la séquence (Figure 42). Ces CPP comptent de nombreux peptides naturels, comme le pVEC issu de la VE-cadhérine¹⁵⁶. Certains CPP amphipatiques sont des peptides chimères, composés d'un domaine hydrophobe qui cible la membrane et d'une séquence de localisation nucléaire (NLS), les peptides MPG et Pep-1, par exemple, contiennent une séquence cationique de localisation nucléaire du virus simien 40 (SV40). En revanche, MPG contient un domaine hydrophobe issu de la séquence de fusion de la glycoprotéine 41 de HIV-1¹⁵⁷, alors que Pep-1 contient un domaine hydrophobe issu du motif de dimérisation de la transcriptase inverse de HIV-1¹⁵⁸.

Dans les CPP amphipatiques secondaires, la séparation des domaines hydrophobe et hydrophile se fait de manière spatiale par la structure secondaire (Figure 42). On y retrouve surtout des hélices α comme la pénétratine,¹⁴⁹ le peptide chimérique transportan¹⁵⁹, issu de la fusion du neuropeptide galanine avec le peptide de venin de guêpe mastoparan ou des CPP

de synthèse comme le MAP¹⁶⁰. Des études sur la pénétратine ont montré la contribution majeure de ce résidu, connu pour sa forte interaction avec les membranes,¹⁶¹ dans l'internalisation contrairement à d'autres résidus aromatiques comme la phénylalanine¹⁴⁹. Cette caractéristique a conduit au développement de CPP amphipatiques de synthèse ne contenant que des résidus Trp et Arg (W/R).^{162,163}

Même si les CPP amphipatiques se replient majoritairement en hélice, certains ont des structures en feuillets β , comme le CPP synthétique VT5¹⁶⁴, ou de type poly-proline. Ces derniers incluent les CPP inspirés de protéines comme la Bactérecine Bac7¹⁶⁵ et les CPP de synthèse cationiques (ProProArg)_n et (ProArgArg)_n (n=3,4,5 ou 6)¹⁶⁶. D'autres CPP riches en résidus proline cationiques et anioniques, ont été développés par l'équipe de Giralt, le (VRLPPP)(3)¹⁶⁷ et le SAP(E) respectivement.

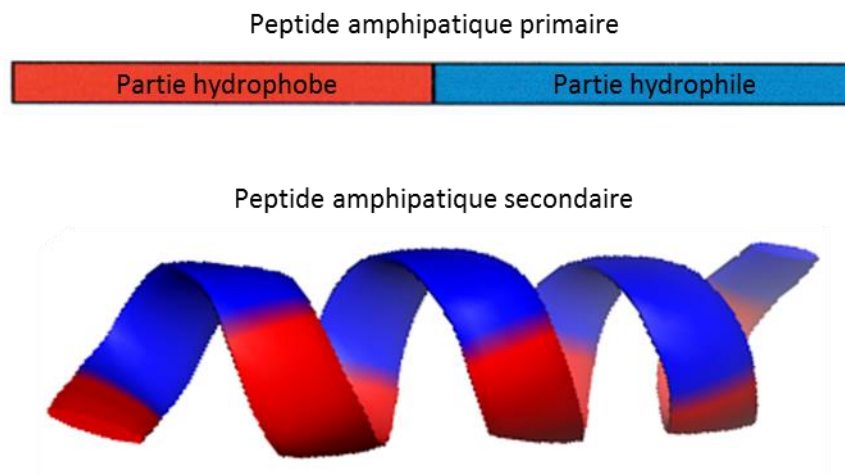


Figure 42 : Représentation schématique de CPP amphipatique primaire (en haut) et secondaire en hélice (en bas).

Les CPP hydrophobes

Ces CPP possèdent une faible charge totale avec des acides aminés majoritairement apolaires. De nombreux CPP hydrophobes sont issus de protéines naturelles comme C105Y issu de l'antitrypsine $\alpha 1^{168}$, et CPP-C issu du facteur de croissance des fibroblastes 12 (FGF12)¹⁶⁹. Néanmoins, la plupart des CPP hydrophobes sont issus de bibliothèques de peptides de synthèse¹⁷⁰. Cette famille inclut aussi des peptides modifiés comme les peptides agrafés¹⁷¹ ou les peptides prénillés¹⁷².

Table 8 : Tableau récapitulatif des CPP énoncés avec, en rouge les résidus/domaines cationiques, en bleu les résidus/domaines hydrophobes et en vert les résidus anioniques.

CPP	Sequence	Nature*	Structure	Origine
Tat	YGRKKRRQRRR	Cat.	-	Naturel
R ₉	RRRRRRRRR	Cat.	-	Synthétique
pVec	LLIILRRRIRKQAHHSK	A. I ^R	-	Naturel
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQ- PKKKRKV	A. I ^R	-	Chimère
Pep-1	KETWWETWWTEWSQ-PKKKRKV	A. I ^R	-	Chimère
Pénétratine	RQIKIWFQNRMRKWKK	A. II ^R	Hélice α	Naturel
Transportan	GWTLSNAGYLLG-K- INLKALAALAKKIL	A. II ^R	Hélice α - α	Chimère
MAP	KLALKLALKALKAALKLA	A. II ^R	Hélice α	Synthétique
(W/R) ₉	RRWWRRWRR	A. II ^R	Hélice α	Synthétique
VT5	DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD	A. II ^R	Feuillet β	Synthétique
Bac ₁₅₋₂₄	PRPLPFPRPG	A. II ^R	Hélice PPII	Naturel
(PRR) ₅	PRRPRRPRRPRR	A. II ^R	Hélice PPII	Synthétique
SAP	VELPPPVELPPPVELPPP	A. II ^R	Hélice PPII	Synthétique
C105Y	CSIPPEVKFNKPFVYLI	H.	-	Naturel
CPP-C	PIEVCMYREP	H.	-	Naturel

*(Cat.) Cationique. (A. I^R) Amphipatique primaire. (A. II^R) Amphipatique secondaire. (H.) Hydrophobe

Les foldamères pénétrants

Bien que les CPP soient des systèmes de délivrance attractifs, ils sont sensibles à la protéolyse. Cette faiblesse a conduit plusieurs groupes à développer des séquences pseudopeptidiques et peptidomimétiques parmi lesquelles on trouve les foldamères.

Le groupe de Wender, après avoir montré l'efficacité des polyarginines à pénétrer dans les cellules, a développé une série d'oligomères riches en guanidinium (guanidinium-rich molecular transporter)¹⁷³ parmi lesquels des peptoïdes dont la structure générale est reportée dans la Figure 43 (A). De manière plus générale, le groupe de Kodadek a mené une étude comparative entre des peptoïdes et leurs homologues α -peptidiques, et montré la supériorité des peptoïdes à franchir la membrane plasmique (3 à 30 fois).¹⁷⁴ Ce phénomène pourrait s'expliquer par la réduction du nombre de protons amides dans les peptoïdes, et par conséquent du nombre de liaisons hydrogène possibles¹⁷⁵. Le nona-peptoïde de lysine a montré une capacité supérieure au peptide nona-lysine à pénétrer les cellules HeLa avec une forte internalisation dans les 5 premières minutes d'incubation et la capacité à cibler le noyau lorsqu'il est couplé à la séquence NLS (Nuclear Location Sequence : séquence de localisation nucléaire) PKKKRKV.¹⁷⁶ Des peptoïdes conjugués à un complexe de ruthénium ont été utilisés avec succès pour la photo-inactivation de protéines intracellulaires.¹⁷⁷ L'équipe de Zuckermann a conçu des peptoïdes (conjugués à un phospholipide) pour l'internalisation de siRNA¹⁷⁸ et d'ADN¹⁷⁹ (Figure 43 B). Des hétéro-oligomères d' α -peptide/ β -peptoïde ont aussi été décrits pour leur capacité à pénétrer dans les cellules (Figure 43 C).¹⁸⁰

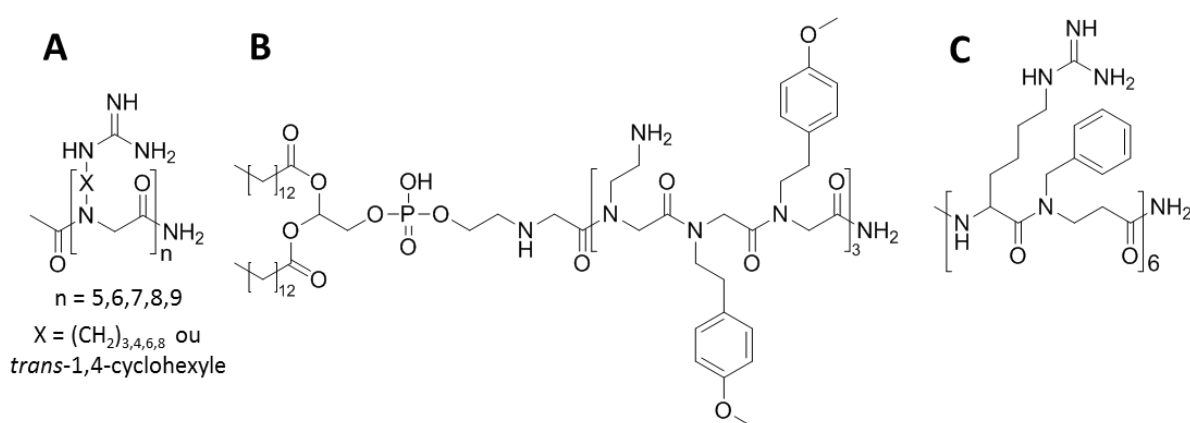


Figure 43 : Exemples de peptoïdes pénétrants : polyArg¹⁷³, lipitoïdes¹⁷⁸ et hétéro-oligomères d' α -peptide/ β -peptoïde¹⁸⁰.

Des β -peptides polycationiques ont aussi été synthétisés sur le modèle des CPP polycationiques pour obtenir des β -polyarginines et β -polylysines^{181–183}, ces dernières ayant montré la capacité à interagir et internaliser de l'ADN¹⁸⁴. Le β -octaarginine ainsi que son

homologue α ont montré des résultats intéressants dans le traitement de *Plasmodium falciparum*. En effet, alors que le β -peptide ne pénètre pas dans les érythrocytes saines, il traverse la membrane des cellules infectées et traverse même la membrane des parasites¹⁸⁵. Couplé à l'agent antiparasitique fosmidomycine, il a permis d'augmenter l'efficacité du traitement contre le parasite.¹⁸⁶ Des hélices α/β -peptidiques basées sur la séquence TAT ont permis de révéler l'effet synergique de la structuration apporté par les résidus β -aminés et le groupement guanidinium porté par des résidus trans-APC.¹⁸⁷ Tous les β -peptides pénétrants se structurent en hélices. Cette structuration est indispensable pour assurer une surface et une orientation des chaînes latérales appropriée afin d'assurer l'activité biologique.

Les équipes de J. Chmielewski¹⁸⁸ et H. Wennemers¹⁸⁹ ont rapporté des vecteurs de pénétration intracellulaire basés sur des hélices polyprolines (Figure 44 A). En permettant une distribution contrôlée de groupes hydrophobes et cationiques et/ou une préorganisation spatiale de groupements guanidinium, ces oligomères augmentent l'internalisation par rapport au peptide non replié (Figure 44 B). Le groupe de H. Wennemers a proposé que l'amélioration de l'absorption cytosolique des oligoprolines pourrait être corrélée à l'arrangement des charges cationiques à une distance d'environ 9 Å (Figure 44 C), semblable à la distance entre les charges négatives des glycanes présents à la surface de la cellule et participant à l'interaction avec les vecteurs (Figure 44 D). Dans notre groupe, nous avons retrouvé cette même distance séparant les groupements guanidinium répartis le long de foldamères d' α -amino γ -lactames structurés en ruban et capables de franchir efficacement la membrane cellulaire.¹⁹⁰

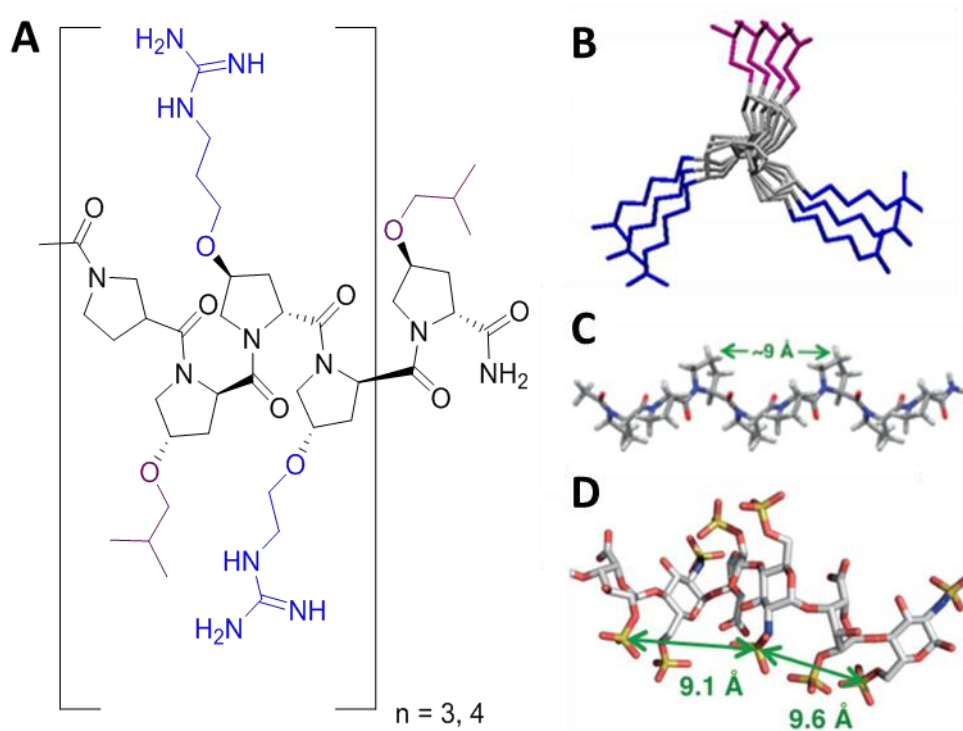


Figure 44 : (A) Vecteur basé sur les PPII en vue (B) axiale et (C) latérale, comparé à l'héparine (D)

Nous pouvons également citer un dimère d'oligourée basé sur la séquence du peptide LAH4, peptide cationique amphipathique riche en résidus histidine, adapté pour la transfection d'ADN,¹⁹¹ des polyamides aromatiques polycationiques¹⁹², ainsi que des polyamides aromatiques neutres qui ont permis l'internalisation d'inhibiteurs de la Cathepsine D pour le traitement du cancer¹⁹³.

Le mécanisme d'internalisation

Le mécanisme d'internalisation des CPP n'est pas unique. Les premières observations de la protéine de fusion TAT qui interagit avec la surface de la cellule de manière électrostatique dans une forme dénaturée ont d'abord fait penser à une translation directe, mais la suite du mécanisme d'interaction et d'internalisation reste assez controversée^{194,195}. Bien que plusieurs phénomènes d'endocytose semblent rentrer en jeu, la contribution de chaque mécanisme semble être dépendante de la nature du CPP.¹⁹⁶ Pour les CPP amphiphiles comme la pénétratine, le peptide se lierait de manière électrostatique à la membrane provoquant la formation de micelles inverses qui transportent alors les peptides et les libèrent dans la cellule.¹⁹⁷ D'autres modèles de translocation directe indépendante en énergie ont aussi été proposés comme la formation de pores¹⁹⁸ ou de tapis¹⁹⁹. Mais bien que les CPP amphipatiques soient majoritairement cationiques, il existe aussi des peptides amphipatiques anioniques capables de rentrer dans les cellules, ce qui montre que leur internalisation est aussi le produit de leur nature amphipatique, et pas seulement de leur charge.

VII. Conclusion

Les données issues de tests cliniques et précliniques²⁰⁰ montrent que les CPP sont capables de transporter des molécules thérapeutiques de tailles variées comme des petites molécules, des peptides, des protéines ou des acides nucléiques²⁰¹ à travers les membranes cellulaires. En revanche, ces peptides vecteurs souffrent d'un temps de demi-vie faible dans le plasma dû à la dégradation par les protéases extracellulaires. Des modifications de séquences de peptides pour obtenir des pseudopeptides ou l'utilisation d'oligomères non naturels tels que les foldamères permettent de pallier ce problème et ainsi améliorer la biodisponibilité des vecteurs peptidiques.

CHAPITRE II : Synthèse des oligomères d' α -amino- γ -lactame

VIII. La synthèse peptidique

Les oligomères d' α -amino- γ -lactame d'acides α -aminés (Agl- α AA) et β -aminés (Agl- β AA) développés dans ce travail ont été obtenus par conversion de séquences peptidiques linéaires alternant des résidus méthionines avec des résidus d'acides α -aminés (pour la série Agl- α AA) ou de résidus d'acides β -aminés pour la série Agl- β AA. Quelle que soit la série, les peptides linéaires ont été synthétisés suivant des stratégies de synthèse peptidique classique sur support solide. Nous donnerons de façon succincte en début de ce chapitre quelques principes généraux de la synthèse peptidique avant de décrire les synthèses et l'optimisation des deux séries d'oligomères d' α -amino- γ -lactame.

VIII. 1. Généralités sur la synthèse peptidique

La synthèse peptidique repose sur la formation de liaisons amides, appelées liaisons peptidiques entre la fonction acide carboxylique d'un aminoacide et la fonction amine d'un autre aminoacide. La synthèse consiste en une succession de réactions de couplage et de déprotection. Avant de débiter la synthèse de peptides un ensemble de paramètres doivent être considérés comme les groupements protecteurs, les conditions de couplage (réactifs pour l'activation) et de déprotection.

Afin de procéder au couplage peptidique, la fonction acide carboxylique de l'aminoacide N-protégé doit être activé afin de faciliter l'attaque nucléophile de l'amine d'un autre aminoacide (ou d'une séquence en élongation). Il existe un grand nombre de méthodes d'activation, parmi les plus courantes on trouve : les cabodiimides, les esters activés, les halogénures d'acide et les anhydrides symétriques ou mixtes et enfin les sels de phosphonium et les sels d'uronium.²⁰² Le premier sel de phosphonium décrit est le BOP. Aujourd'hui, dû aux problèmes de toxicité liés à la libération d'hexaméthylphosphotriamide (HMPT), il a largement été remplacé par les sels d'uroniums comme le HBTU, le TBTU ou encore l'HATU que nous avons principalement utilisé dans le cadre de cette thèse pour toutes les synthèses de peptides.

Différentes protections chimiques sont nécessaires pour contrôler l'élongation de la chaîne peptidique et différentes stratégies peuvent être employées pour effectuer les synthèses. On peut distinguer la stratégie pas à pas, où les résidus sont incorporés les uns après les autres de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale ou par fragments, où l'allongement de la chaîne se fait par l'introduction de blocs de plusieurs résidus préalablement préparés (stratégie convergente). La synthèse peut s'effectuer en phase homogène ou en phase solide.

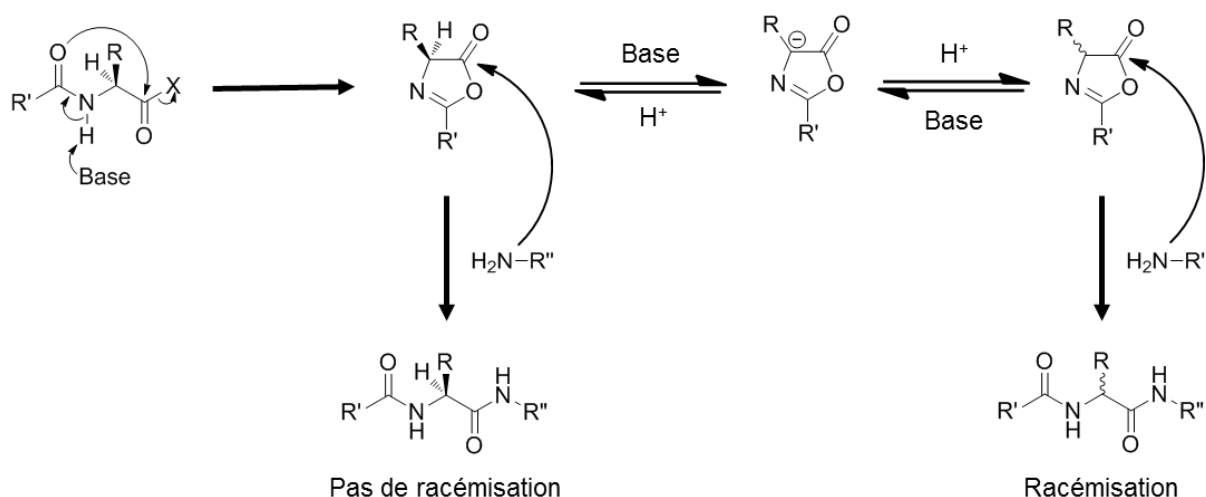
VIII. 2. Les protections

Chaque acide aminé possède une fonction amine, une fonction acide carboxylique et parfois des fonctions réactives sur sa chaîne latérale. Afin d'éviter une polymérisation ou la ramification du peptide par élongation sur les chaînes latérales et de s'assurer que l'élongation de la chaîne peptidique se fasse dans la bonne direction, il est nécessaire de protéger les fonctions non engagées dans la liaison peptidique que l'on désire former. Ces protections ne doivent pas entraîner de réactions secondaires, doivent être stables durant le couplage mais facilement éliminables et elles doivent être orthogonales entre elles pour pouvoir continuer l'élongation du peptide en éliminant seulement la protection désirée. On distinguera ainsi les protections dites temporaires qui sont retirées après chaque couplage pour permettre le couplage suivant, et les protections permanentes qui sont éliminées en fin de synthèse.

VIII. 3. Réactions secondaires

Epimérisation

Un des problèmes majeurs en synthèse peptidique est le risque d'épimérisation du carbone α de l'acide aminé à coupler. Le choix des stratégies de synthèse va être déterminant pour préserver l'intégrité chirale de chaque carbone α et ainsi obtenir un peptide énantiomériquement pur. Cette épimérisation vient principalement de la formation d'oxazolone lors de l'activation de la fonction acide d'un acide aminé protégé ou d'un fragment peptidique (Figure 45).

Figure 45 : Racémisation du α par formation d'oxazolone

Un fois l'oxazolone formée, le proton α peut être arraché car le carbanion est stabilisé par résonance. Mais l'acidité de ce proton peut être diminuée par introduction d'un groupement électrodonneur sur l'amine de l'acide aminé activé. L'utilisation d'une protection N-terminale sous forme uréthane permet ainsi d'éliminer, ou du moins de largement minimiser, le risque d'épimérisation (Figure 46). Ceci implique que la synthèse soit effectuée de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale et pas à pas. Les seuls aminoacides pouvant être activés sans risque d'épimérisation, et donc engagés dans des couplages par fragments, sont la proline et la glycine. En effet, la Pro ne permet pas la formation d'oxazolone et la Gly ne possède pas de centre stéréogène. Il faut également noter que la présence d'un carbone supplémentaire entre les fonctions amine et acide dans les β -aminoacides évite le risque d'épimérisation, dû à la formation d'oxazolone. Dans ce dernier cas, le choix des méthodes d'activation et/ou de stratégies utilisables peut être élargi (voir synthèse des Agl- β AA, chapitre IV).

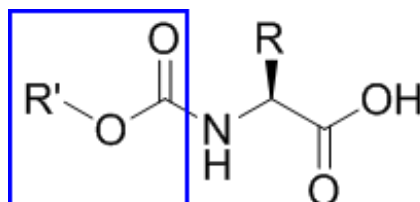


Figure 46 : Protection de type uréthane encadrée en bleu

Autres réactions secondaires

La synthèse peptidique doit aussi faire face à d'autres réactions secondaires comme la formation de dicétopipérazine, la cyclisation en δ -lactame de l'arginine ou encore la transposition α/β de l'acide aspartique qui n'ont pas été observés pendant ce travail et ne seront donc pas détaillées ici.²⁰³

VIII. 4. Support solide et stratégies de synthèse

Dans le cadre de ma thèse, la synthèse sur support solide a été mise en œuvre. Une stratégie Fmoc/tBu a été choisie : l'élimination de la protection temporaire de l'amine en position α s'est fait en milieu basique (amine secondaire de type pipéridine) et le clivage final et l'élimination des protections permanentes (chaînes latérales) en milieu acide (TFA). La stratégie générale est résumée dans la Figure 47.

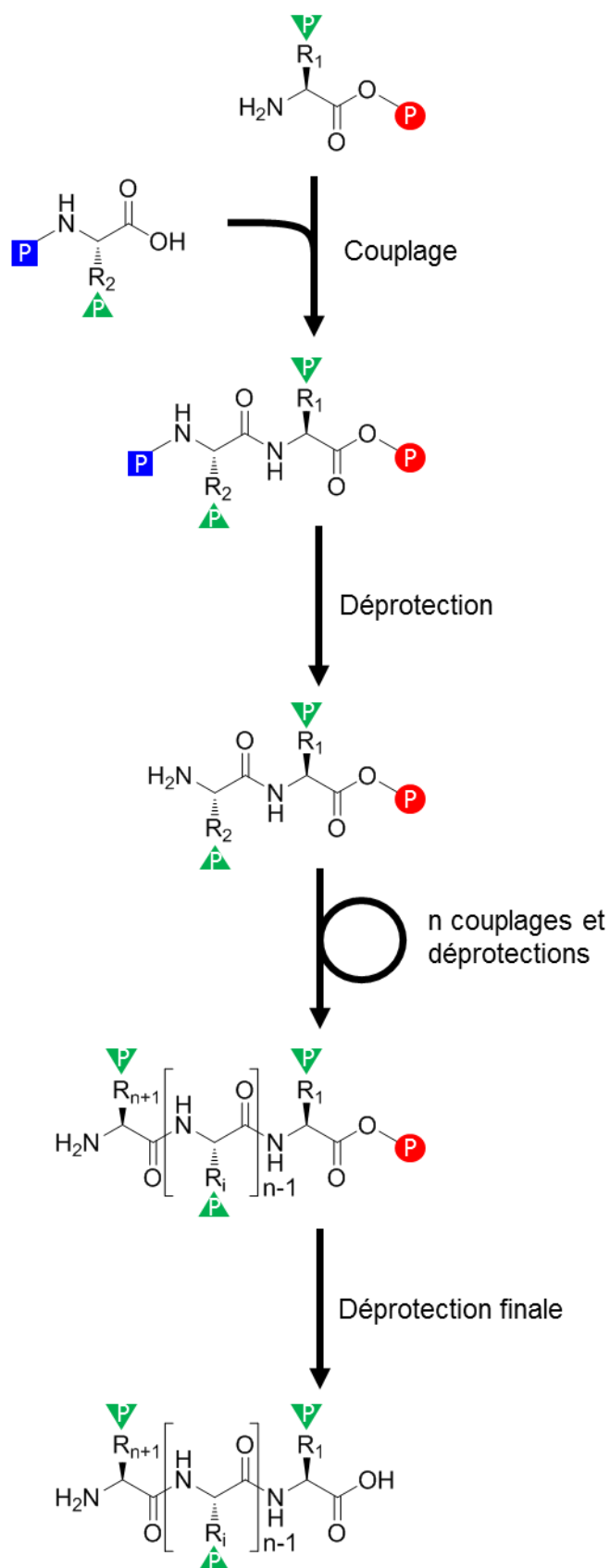


Figure 47 : Stratégie générale de la synthèse pas à pas.

La synthèse pas à pas consiste à l'incorporation des acides aminés les uns après les autres pour obtenir le peptide. Elle s'opère en alternant des réactions de couplage d'un acide aminé et de déprotection de la fonction amine terminale pour le couplage suivant. La dernière étape est la déprotection totale des chaînes latérales et le décrochage du peptide de la résine pour obtenir le peptide attendu (Figure 47).

La synthèse sur support solide de peptides (SPPS) est décrite pour la première fois en 1963 par Bruce Merrifield.²⁰⁴ Cette technique consiste à ancrer le peptide naissant sur un polymère insoluble constitué de billes de résines polyester, polyamide ou d'un mélange polyester/polyéthylène glycol de 50 à 500 µm de diamètre. Ces billes de résine sont fonctionnalisées par des bras (linkers) qui permettent l'accrochage et le décrochage du peptide selon des conditions chimiques spécifiques. Le nombre de fonctions chimiques disponibles à la surface de la résine constitue sa charge qui est exprimée en millimoles par gramme de résine. Les excès de réactifs et les produits de déprotection sont éliminés facilement par simple lavages et filtration, ce qui permet de s'affranchir des étapes de purifications intermédiaires. Cela permet un important gain de temps, des rendements proches de 100% par l'utilisation d'excès de réactifs et cette technique est totalement automatisable. En revanche, le suivi réactionnel est plus difficile à mettre en œuvre qu'en solution. Il existe des tests colorimétriques pour le couplage peptidique par révélation des amines libres, comme le test Kaiser²⁰⁵ ou l'acide trinitrobenzènesulfonique (TNBS)²⁰⁶. Ces tests sont cependant qualitatifs et des méthodes plus longues comme le clivage d'une toute petite partie de la résine sont nécessaires pour une analyse quantitative par HPLC ou LC/MS. Le micro-clivage n'est donc pas utilisé de manière systématique à chaque étape de couplage du peptide. La stratégie de synthèse Fmoc/tBu est la plus couramment utilisée pour la SPPS :²⁰³ La protection 9-Fluorenylmethoxycarbonyle (Fmoc) est clivée en milieu basique par une amine secondaire et la déprotection des chaînes latérales ainsi que le décrochage du peptide de la résine s'effectue en milieu acide. La protection Fmoc, difficile à éliminer en solution, est facilement filtrée en phase solide. Une fois décroché de la résine, le peptide est précipité dans du diéther pour éliminer les produits de déprotections qui y sont solubles. Le peptide est ensuite récupéré par centrifugation et purifié par HPLC-préparative. Le clivage des protections acidolabiles peut cependant engendrer la formation de carbocations susceptibles de réagir avec les chaînes latérales d'acides aminés riches en électrons comme les résidus Cys, Met, Ser, Tyr, Trp, et nécessite l'utilisation de « scavengers » pour les piéger.

Les peptides présentés dans ces travaux ont été synthétisé par SPPS suivant une stratégie Fmoc/tBu. La résine employée est un polymère mixte de polystyrène/polyéthylène glycol avec un bras Rink amide (AmphiSpheres™) pour obtenir une fonction amide C-terminale après clivage (Figure 48). Les couplages ont été effectués dans du *N,N*-Diméthylformamide (DMF) ou de la *N*-méthyl-2-pyrrolidone (NMP). L'agent de couplage utilisé pour les acides α-aminés est un sel d'uronium, l'HATU. La protection Fmoc a été déprotégée par de la pipéridine à 20% dans du DMF (pip/DMF). Le clivage de la résine a été effectué dans du TFA pur, et dans un mélange TFA/Tis/H₂O pour piéger les carbocations générés par l'élimination des protections 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) et *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) pour les séquences comportant des Arg et Trp respectivement.

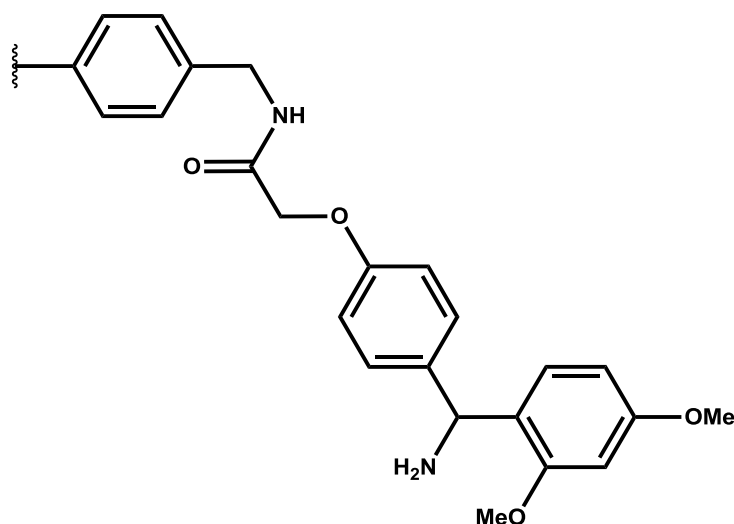


Figure 48 : Linker rink amide

IX. Synthèse d'oligomères de motif contraint γ -lactame

Dans le chapitre précédent ont été présentés de nombreux foldamères ainsi que certaines applications. L'accent a été mis sur la capacité de ces systèmes à se structurer de manière bien définie par le tissage d'un réseau de liaisons hydrogène, ainsi que l'importance de la structure secondaire de ces systèmes pour leur fonction. La plupart des foldamères sont construits par l'oligomérisation d'acides β , γ ou δ -aminés, mais d'autres structures ont aussi été obtenues par l'utilisation de blocs contraints. Dans notre équipe, nous nous sommes particulièrement intéressés aux α -amino γ -lactames, mimes de coude β II', pour la construction de foldamères (Figure 49). Une stratégie de synthèse originale a été développée pour leur synthèse.¹¹⁵ Elle consiste en la conversion directe de séquences peptidiques alternant des résidus méthionine avec n'importe quel autre α -aminoacide en oligomères d' α -amino γ -lactames α -aminoacides (nommés oligomères d'Agl- α AA avec Agl = α -amino- γ -lactame et AA = α -aminoacide). Il a été montré par différentes méthodes spectroscopiques que ces oligomères sont capables de se structurer en ruban (ribbon) en assurant une répartition périodique des groupes fonctionnels (correspondant aux chaînes latérales des aminoacides) de part et d'autre de l'axe du ruban.¹¹⁵ Dans cette nouvelle famille de foldamères, la modulation et le positionnement spatial des groupes fonctionnels sont directement contrôlés par la séquence peptidique native. Ceci permet de moduler les propriétés physico-chimiques de ces architectures moléculaires de façon directe et simple. Sur la base de leurs propriétés structurales, des oligomères de nature hydrophobe, amphipatique et cationique ont ensuite été synthétisés et testés pour leur capacité à pénétrer dans les cellules. Cette étude nous a permis d'identifier et de décrire une nouvelle famille de vecteurs de pénétration intracellulaire (chapitre III). Durant ma thèse, j'ai optimisé la synthèse de ces oligomères initialement décrite par Martin et al.¹¹⁵ Je présenterai dans cette partie l'optimisation de la synthèse qui a permis de considérablement diminuer les temps de réactions de certaines étapes, qui représentaient une limitation à la synthèse de certains oligomères, mais aussi d'obtenir des oligomères difficilement accessibles en utilisant les conditions opératoires initialement décrites.

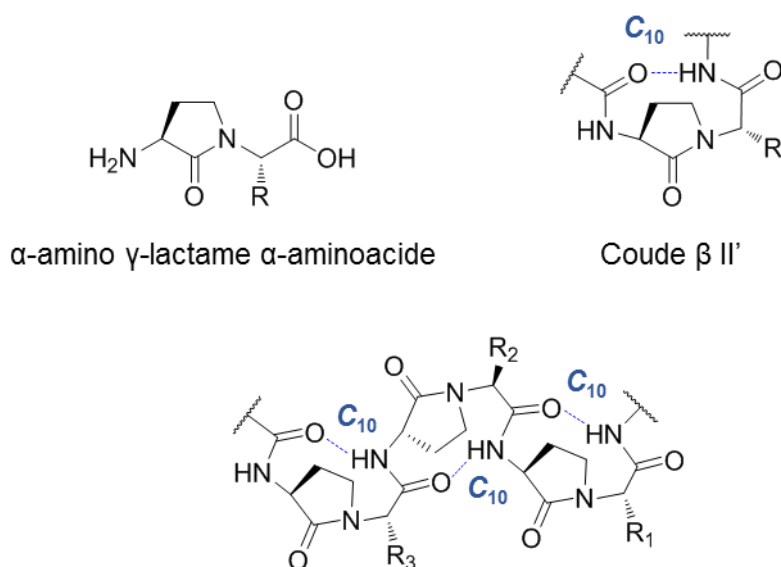


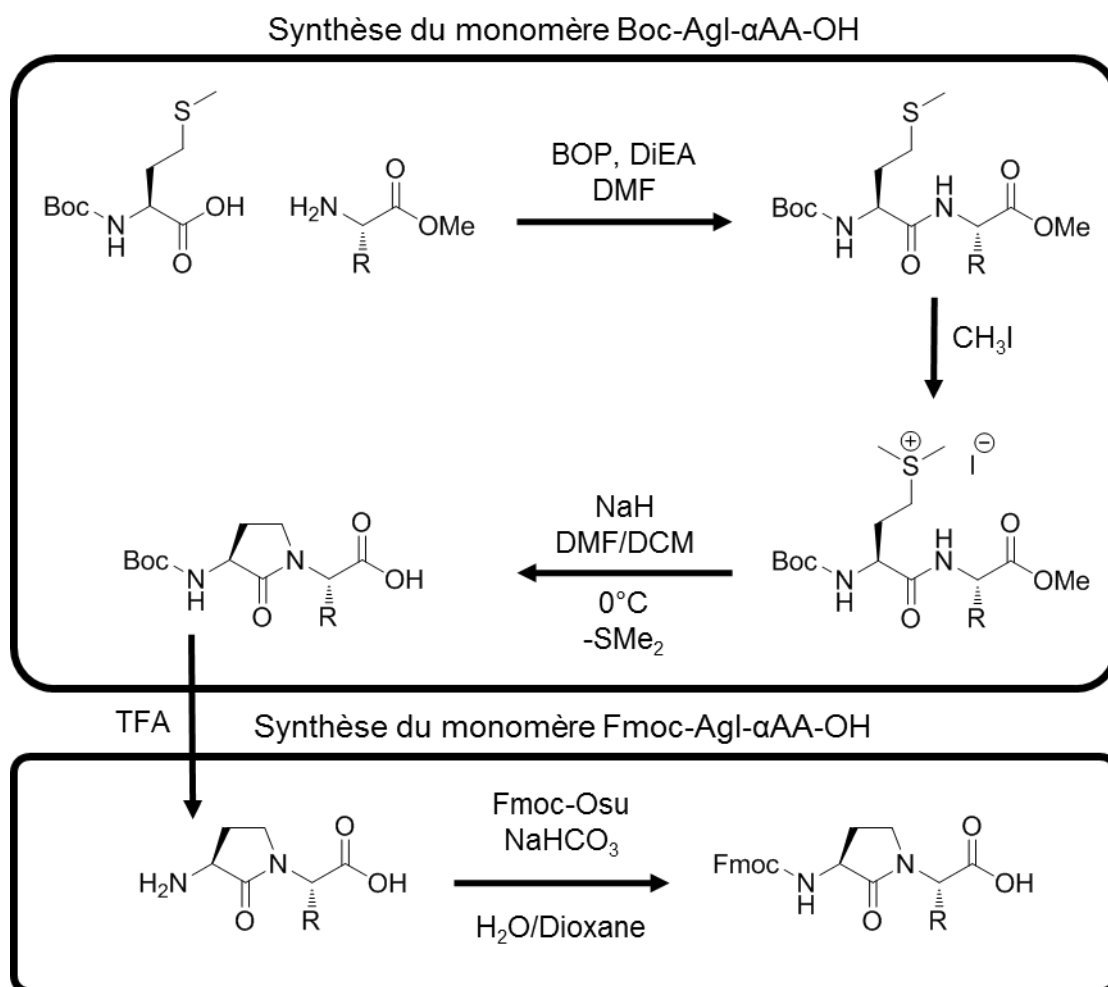
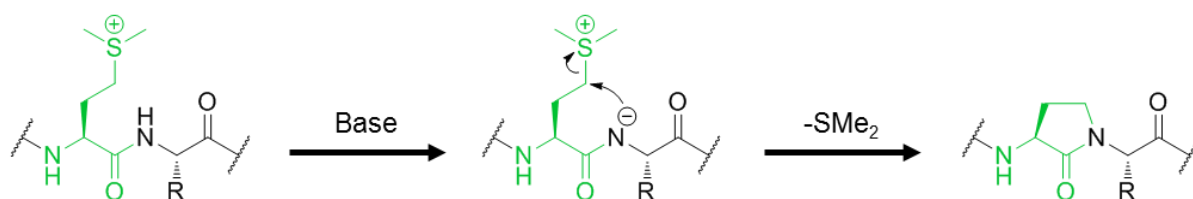
Figure 49 : Représentation schématique du motif AgI- α AA, de la liaison hydrogène en pseudocycle C_{10} inductrice de coude β II', et de la structure en ruban de l'oligomère poly(AgI- α AA)

Nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse d'oligomères incorporant des motifs α -amino γ -lactames β -aminoacides, que nous avons nommés AgI- β AA. Pour la synthèse de ces nouveaux oligomères, nous avons utilisé la même stratégie générale que celle développée pour les d'AgI- α AA. La présence de β -aminoacides a, en revanche, nécessité quelques modulations des conditions opératoires. La synthèse et la structure de ces composés seront décrites dans le chapitre IV.

IX. 1. Synthèse du monomère γ -lactame Agl-AA

Pour incorporer un motif Agl- α AA dans une séquence peptidique, il est nécessaire de le synthétiser au préalable en solution, dans la plupart des cas d'introduire sur ces fonctions réactives des protections adaptées à la stratégie de synthèse et de le purifier.

La synthèse du motif Agl- α AA en solution a été décrite à la fin des années 70 par Freidinger et al.⁵¹ et utilisés avec succès pour la synthèse d'un analogue de l'hormone de libération de l'hormone lutéinisante (luteinizing hormone-releasing hormone, LH-RH)¹⁵. La synthèse de ce motif, protégé par un groupement N-Boc, se déroule en 3 étapes (Figure 50). Une méthionine, dont l'amine est protégée par une fonction Boc (Boc-Met-OH), est couplée avec un acide α -aminé, dont la fonction acide carboxylique est protégée par un ester méthylique. La fonction thioéther de la méthionine est ensuite méthylée en présence d'iodométhane. La méthylation permet d'introduire sur la chaîne latérale de la Met un bon groupement partant et ainsi de faciliter l'attaque nucléophile dans l'étape suivante. Cette étape clé pour la formation du lactame s'effectue en milieu basique par attaque nucléophile de l'azote de l'amide (Figure 50), déprotonée sous l'action d'hydrure de sodium, pour former un γ -lactame avec départ d'un sel de sulfonium, et déprotection de la fonction acide carboxylique dans le même temps. On obtient ainsi le mime contraint de dipeptide Boc-Agl- α AA-OH adapté à la stratégie de synthèse Boc/Bzl. Pour utiliser ce motif en stratégie Fmoc/tBu, qui est la stratégie de choix pour la synthèse sur support solide, il est nécessaire d'éliminer la protection Boc en présence de TFA, et d'incorporer une protection Fmoc sur l'amine (Figure 50). Les composés obtenus sont énantiomériquement purs, à l'exception du motif Agl-Phe qui présente des problèmes d'épimérisation, en effet 12 à 15 % d'épimérisation au niveau du C α du résidu Phe ont été reportés.²⁰⁷ Cette méthode de préparation du motif monomérique est applicable à tous les acides aminés, ce qui apportent une grande versatilité au niveau de la chaîne latérale R.


 Figure 50 : Synthèse en solution des monomères Boc-Agl- α AA-OH et Fmoc-Agl- α AA.⁵¹

 Figure 51 : Cyclisation intramoléculaire conduisant au γ -lactame. P = protection N terminale, capping ou fluorophore.

Cependant, pour obtenir des oligomères d'Agl- α AA sur support solide en stratégie Fmoc/tBu (Figure 52), il est nécessaire de synthétiser au préalable chaque motif, de les protéger par un groupement Fmoc et de les purifier avant oligomérisation. De plus, la conversion de la protection Boc en Fmoc pose des problèmes pour des motifs Boc-Agl- α AA-OH portant des protections de chaînes latérales acido-labiles, puisqu'elles seront également éliminées lors du traitement par le TFA.

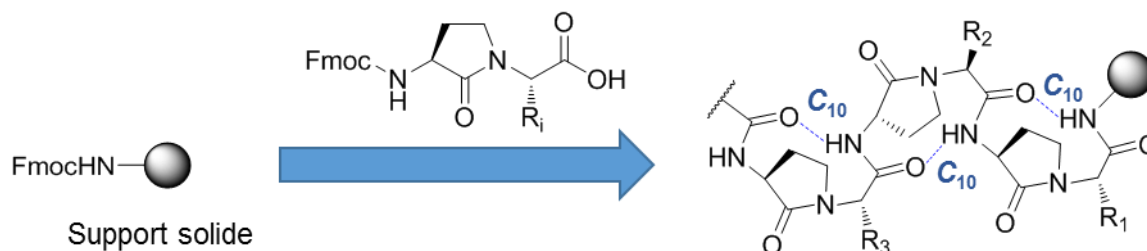


Figure 52 : Synthèse pas à pas des oligomères d'Agl- α AA suivant une stratégie Fmoc/tBu

Afin d'éviter la pré-préparation de chaque bloc Agl-AA pour la synthèse des oligomères, une stratégie de synthèse plus simple, plus rapide et adaptée au support solide a été développée au sein de notre laboratoire durant la thèse du Dr Vincent Martin.¹¹⁵ Cette stratégie repose sur la conversion de séquences peptidiques, alternant des résidus méthionine avec n'importe quel autre α -aminoacide en poly-(Agl- α AA), directement sur support solide (Figure 53).

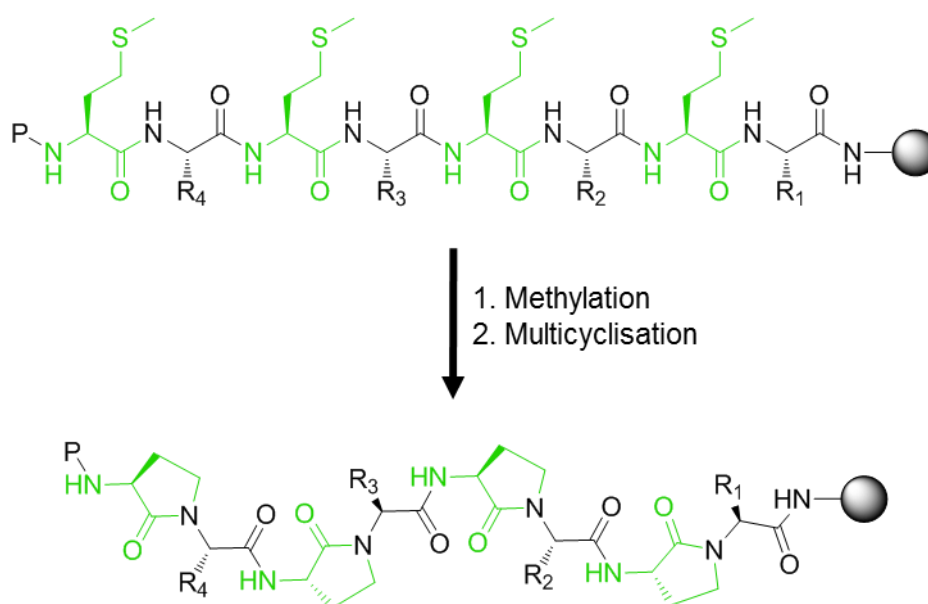


Figure 53 : Conversion d'un α -peptide en poly-(Agl- α AA) sur support solide. P une protection N terminale

IX. 2. Synthèse de poly-(Agl- α AA)

Pour obtenir des oligomères d'Agl- α AA sur support solide, il a fallu transférer et adapter la synthèse au support solide. Comme nous l'avons déjà évoqué, l'originalité de la stratégie a été de directement convertir sur la résine un peptide en un oligomères d'Agl- α AA. Tout d'abord, le peptide alternant des résidus d'acides aminés portant les chaînes latérales désirées avec des résidus méthionine est synthétisé sur support solide selon une stratégie Fmoc/tBu. Une fois le peptide désiré synthétisé, la protection Fmoc en position N-terminale est éliminée, et un groupement acétyle est introduit à la place. Ensuite, les étapes clés de méthylation et multi-cyclisation sont réalisées. Dans le procédé initialement développé,¹¹⁵ la méthylation des fonctions thioéthers des résidus méthionine a été effectuée en présence de 30 équivalents d'iodométhane pendant 48h. L'étape de multicyclisation intramoléculaire a été effectuée en présence de base pendant 48h. La 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) avait été choisie comme base. Il faut noter que l'intégrité chirale des aminoacides a été conservée en utilisant cette base. Les étapes de méthylation et de multicyclisation sont répétées jusqu'à conversion totale du peptide en poly-(Agl- α AA). Une fois la réaction complète, le peptide est clivé de la résine en milieu acide dans une solution de TFA, avec des scavengers si nécessaire, pour obtenir l'oligomère d'Agl- α AA attendu. Le schéma de synthèse général des poly-(Agl- α AA) est présenté ci-dessous (Figure 54).

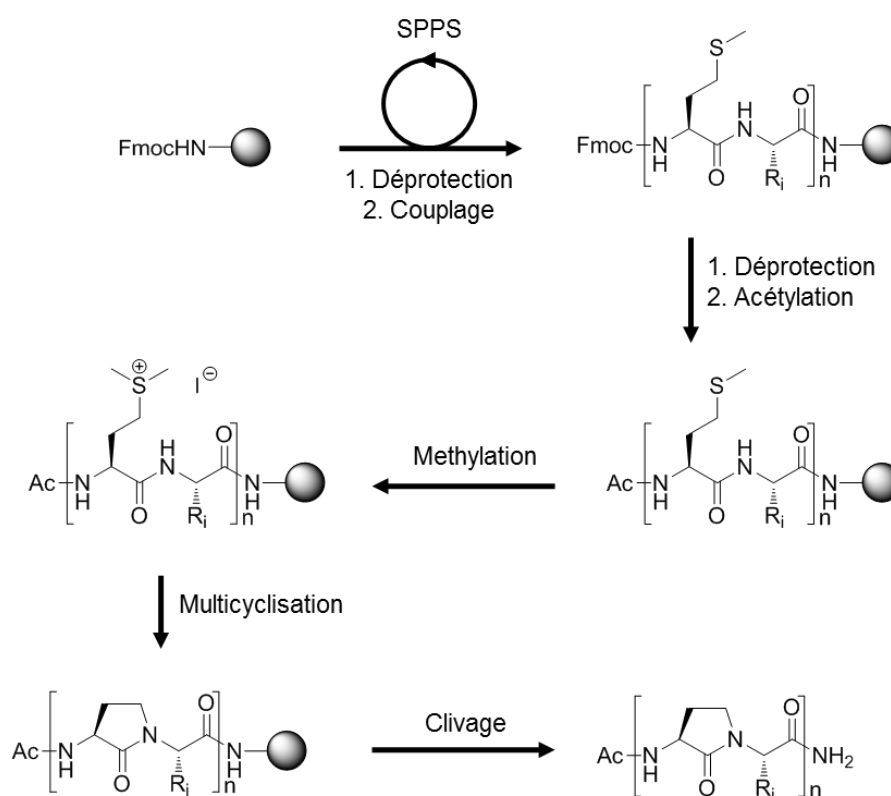


Figure 54 : Schéma général de la synthèse de poly-(Agl- α AA) sur support solide

Cette stratégie permet d'avoir facilement et directement accès à des oligomères de tailles et natures différentes à partir de la conversion d'une simple séquence peptidique. Cependant, même si cette méthodologie a permis d'accéder à un grand nombre d'oligomères d'Agl- α AA, nous avons été confrontés à des problèmes de complétion de réaction. Ces problèmes pouvaient être liés à la séquence même des peptides mais surtout à leur taille. En effet, les temps de réaction pour la méthylation et la multi-cyclisation qui sont relativement longs pour des séquences courtes à moyennes (48h pour chaque étape) se sont avérés insuffisants pour des séquences longues, à commencer par les hexamères. Ainsi, les étapes clés de la synthèse n'ayant pu être menées à complétion pour certaines séquences ciblées, nous avons décidé d'optimiser tout le procédé de synthèse. Si les étapes clés ont fait l'objet d'une attention particulière, nous avons également modifié le procédé de synthèse des peptides linéaires.

Dans cette partie je décrirai le développement d'une méthodologie de synthèse de peptidique rapide en parallèle (*fast parallel peptide synthesis (FPPS)*) grâce à l'utilisation d'une plateforme de synthèse par agitation vortex. L'optimisation des étapes clés de méthylation et multicyclisation par l'utilisation de solvants différents et de réactions assistées par micro-ondes sera également présentée. Afin de suivre l'évolution des réactions (synthèse du peptide, étapes de méthylation et de cyclisation) qui ont lieu sur un support solide, nous avons procédé au clivage d'une infime partie de la résine durant la synthèse pour pouvoir analyser le composé brut par HPLC et LC/MS.

IX. 3. Optimisation des synthèses

Synthèse des peptides

La première optimisation concerne la synthèse manuelle des peptides sur support solide pour laquelle nous avons développé une méthodologie appelée « synthèse de peptidique rapide en parallèle » (*fast parallel peptide synthesis (FPPS)*). L'élément clés de cette méthodologie est l'utilisation d'une plateforme vortex qui permet une agitation efficace à forte concentration en réactifs. Cette méthode permet la synthèse rapide de peptides, si besoin en parallèle, avec des puretés avant purification élevées. Il est intéressant de noter que l'installation requise pour la FPPS est extrêmement abordable, facile à assembler et à utiliser manuellement. L'agitation vortex est assurée par une plateforme d'agitation commercialisée par VWR™ (VMR® Microplate Shaker) normalement utilisée en biologie (Figure 55). Cet appareil peut facilement être équipée de 4 plateformes de filtration Torvix™ qui possèdent chacune 6 positions de filtration. La synthèse peptidique est réalisée dans des seringues qui constituent les réacteurs, munies d'une fritté et d'un robinet (Figure 55). L'avantage d'un tel système est la possibilité d'alterner les différentes réactions et lavages sans retirer ou fermer le réacteur pendant la totalité de la synthèse. Pour gagner du temps pendant les étapes de couplage, des solutions stock des différents acides aminés ainsi que l'agent de couplage ont été préparées.

La mise au point de cette méthode de synthèse a été réalisée au laboratoire en synthétisant divers peptides (non publiée). Dans le cadre de ma thèse, je l'ai appliquée à la préparation des peptides alternant des résidus Met et les acides aminés sélectionnés pour nos synthèses. Une stratégie SPPS classique en utilisant les protections Fmoc/tBu a été choisie.

Deux types de résine ont été testées, AmphiSpheres™ (polystyrène/polyéthylène glycol) et ChemMatrix® (Polystyrène). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une résine AmphiSpheres™ qui présente des propriétés de gonflement idéales et ne colle pas aux parois du réacteur.

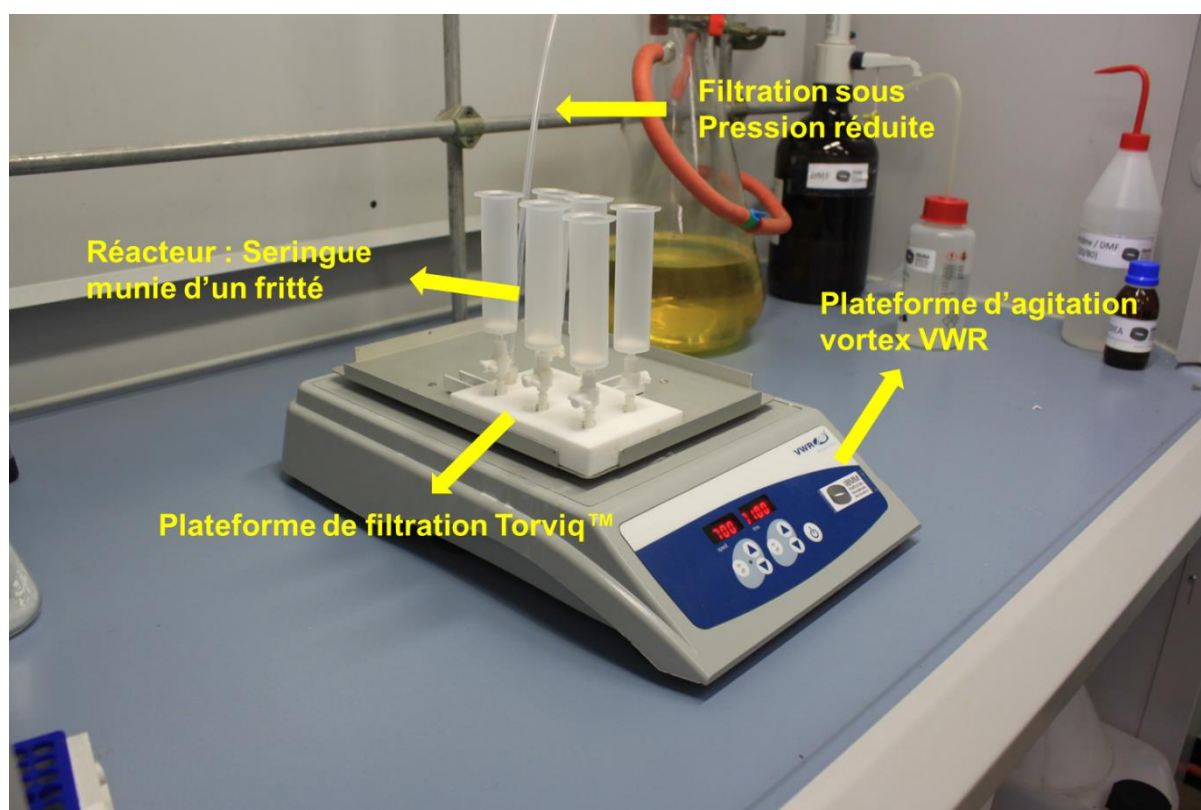


Figure 55 : Plateforme FPPS

Classiquement, les couplages étaient effectués avec 3 eq d'AA, 3 eq d'HATU et 6 eq de DIEA, dans un réacteur fermé soumis à une agitation modérée pendant 3 heures. La méthodologie FPPS consiste en l'addition des acides aminés en double couplage de 2 fois 5 minutes avec 5 eq d'AA, 5 eq d'HATU et 10 eq de DIEA. De la même manière, l'élimination de la protection Fmoc qui nécessitait une double déprotection de 2 fois 15 minutes dans une solution de pipéridine/DMF (2:8) sous agitation modérée est maintenant obtenue par un double traitement de 2 fois 2 minutes dans une solution de pipéridine/DMF (2:8) sous agitation vortex.

Le développement d'une plateforme de synthèse rapide de peptides par agitation vortex au sein du laboratoire a permis de réduire considérablement les temps de couplage et de déprotection pour obtenir rapidement des peptides avec une très bonne pureté avant purification. Par exemple, le décapeptide ACP⁶⁵⁻⁷⁴ (H-VQAAIDYING-NH₂), une séquence décrite comme étant difficile à préparer par SPPS dans plusieurs articles²⁰⁸, a pu être obtenu par FPPS en moins de 3h avec une pureté brute de 97%. Cette technique est aussi compatible avec des réactions complexes comme la déprotection de groupements Alloc et la cyclisation par métathèse.

Etape de méthylation

La réaction de méthylation a nécessité une adaptation et une optimisation des conditions en phase solide. Parmi les différents agents de méthylation testés durant la thèse de Vincent Martin, l'iodométhane (MeI) s'est avéré le plus efficace pour la monométhylation des fonctions thioéthers des résidus méthionine et a été utilisé à hauteur de 30 éq. Dans ce premier processus d'optimisation, un mélange DCM/DMF (1:1) avait permis d'obtenir les meilleurs taux de conversion, après au moins 48h de réaction à température ambiante.

Nous nous sommes ici attachés à modifier certains paramètres, en particulier l'agent de méthylation, le solvant et la concentration en agent de méthylation. Pour cela, nous sommes partis d'un tétrapeptide modèle incorporant un résidu arginine et un résidu tryptophane qui seront les résidus utilisés lors de la synthèse de poly-(Agl-αAA) pour le développement de vecteurs de pénétration intracellulaire décrits dans le chapitre III.

Le composé Alloc-MetTrpMetArg-NH₂ (**1**) a été obtenu par FPPS sur support solide et conservé sur résine pour l'optimisation de la réaction de méthylation. Le clivage d'une infime partie de la résine a permis de vérifier la pureté (HPLC à 214 nm) du composé **1** par LC-MS ($t_R = 1.30$ min, $[M+H]^+ = 706.3$ g.mol⁻¹, 88%)

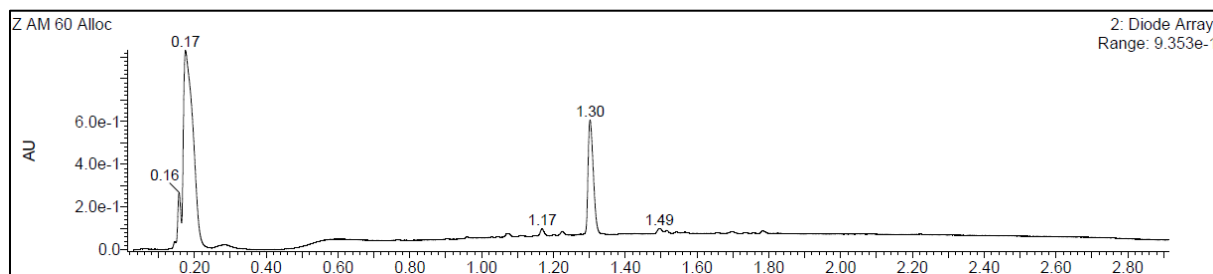


Figure 56 : HPLC du composé **1** à 214 nm

Le procédé général d'optimisation de la réaction de méthylation est résumé dans la figure ci-dessous (Figure 57)

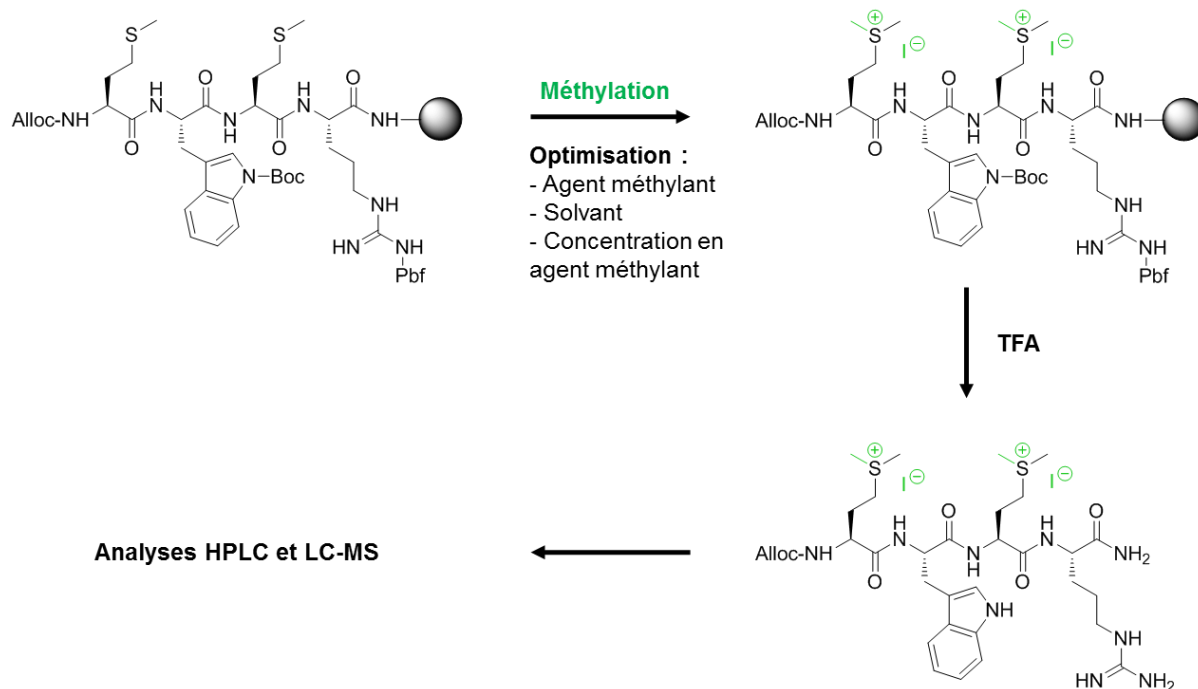


Figure 57 : Procédé général d'optimisation de la réaction de méthylation

Tout d'abord, l'utilisation de tétrafluoroborate de triméthylloxonium (agent de Meerwein) moins toxique que l'iodométhane, a conduit à une « surméthylation » et dans certains cas à la dégradation de la résine, quel que soit le nombre d'équivalents utilisés. Pour la suite de l'optimisation, l'iodométhane a donc été conservé.

L'efficacité de différents solvants, utilisés de manière classique en synthèse peptidique comme le DCM, le DMF et la NMP, a ensuite été évaluée. Dans la synthèse décrite par Martin et al.¹¹⁵ la méthylation ayant été effectuée dans le DMF/DCM (1 :1) à 30eq de MeI pendant 48h, nous avons évalué dans un premier temps les différents solvants dans ces mêmes conditions. Les analyses LC-MS ont permis d'identifier 3 produits possibles présents dans les mélanges réactionnels, en fonction des conditions : le peptide de départ (peptide 1), les composés monométhylés (**2** et **3**) (t_R : 1.01 et 1.03 min, $[M+H]^+ = 720.3 \text{ g.mol}^{-1}$) et le composé diméthylé (**4**) (t_R : 0.90 min, $[M+H]^+ = 736.5 \text{ g.mol}^{-1}$) (Figure 58).

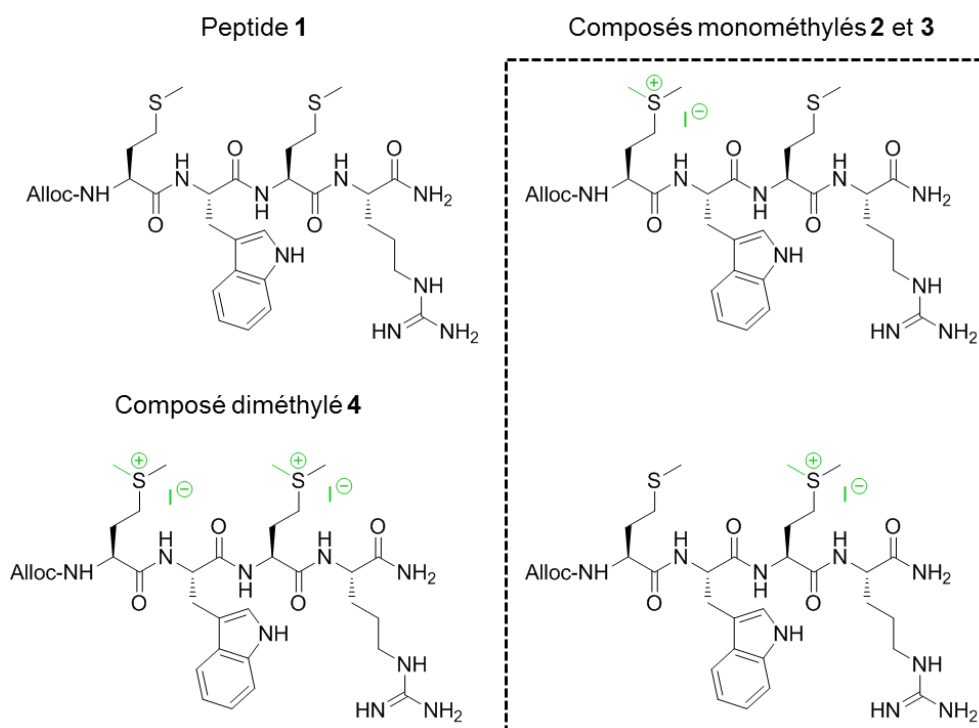


Figure 58 : Représentation schématique des composés 1, 2, 3 et 4

L'avancement des réactions a été suivi par HPLC après clivage d'une infime partie de la résine traitée au TFA pendant 15 minutes. Ce procédé permet de suivre rapidement la réaction, mais le temps de clivage est souvent trop court pour une déprotection efficace du résidu Trp. Dans ce cas, le composé attendu a un incrément de masse de 44, correspondant à la présence de CO₂ sur l'azote de l'indole²⁰⁹. Ainsi le pic à 2.40 min en HPLC correspond au composé **5** (Figure 59).

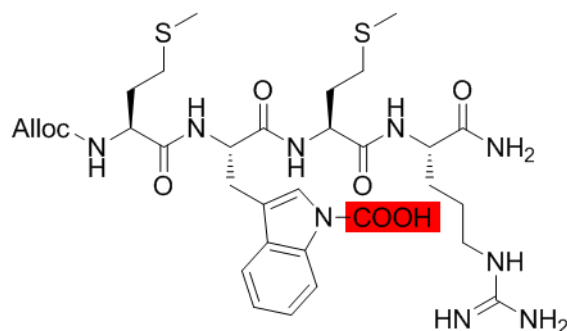


Figure 59 : Représentation schématique du composé 5

L'avancement des réactions après 48 h à 30eq en MeI dans les différents solvants est présenté dans la Figure 60 et résumé dans la Table 9. Premièrement on observe que la réaction dans les conditions initiales, DMF/DCM (1 :1), est incomplète avec seulement 27% de produit diméthylé attendu (composé **4**). Le DCM s'avère être encore moins efficace avec seulement 4% de composé diméthylé. C'est le DMF qui a permis d'obtenir le meilleur taux de conversion en composé **4** (50%). Dans le cas de la NMP, les analyses montrent qu'il y a seulement 28% de composé diméthylé **4** mais en revanche un autre composé (temps de rétention 2.01min) a été formé. Il correspond à un composé monométhylé-monolactame (composé **6**, t_R : 0.91, $[M+H]^+ = 672.3 \text{ g.mol}^{-1}$) (Figure 61). L'étape réactionnel suivante étant la cyclisation en lactame des résidus méthionine, la NMP nous a donc paru d'un intérêt particulier et a été retenue pour la suite des réactions d'optimisation.

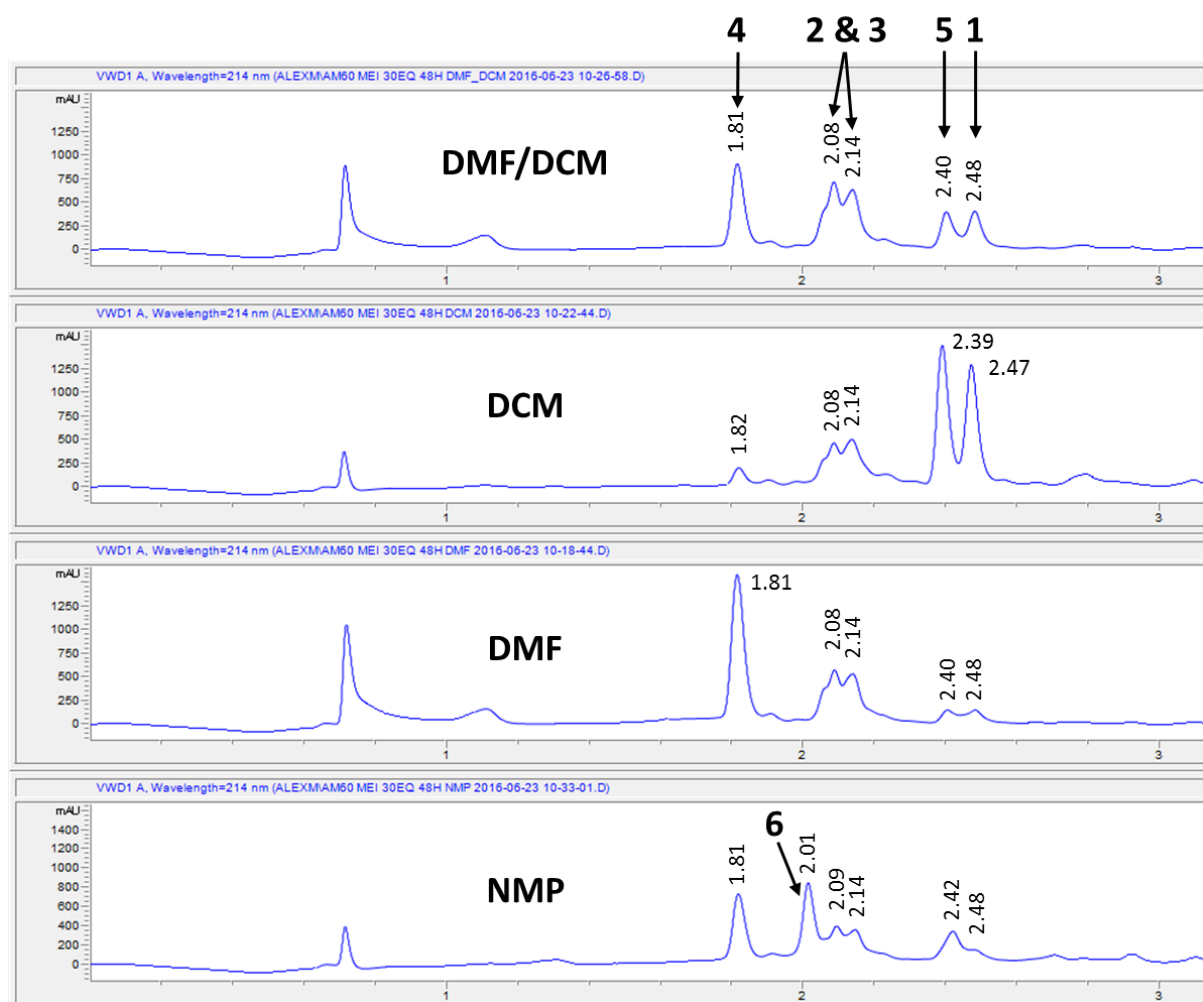
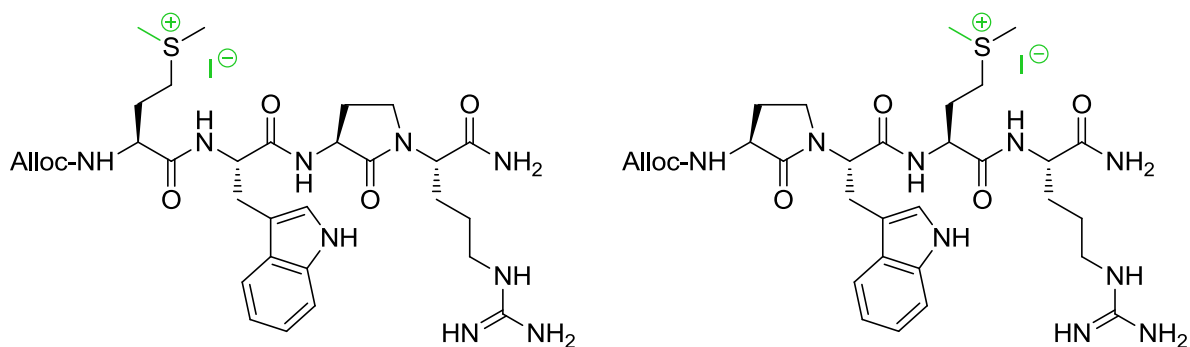


Figure 60 : HPLC après réaction du composé **1** avec 30éq de MeI sur support solide pendant 48h dans le DMF/DCM, le DCM, le DMF et la NMP.

Table 9 : Pourcentage HPLC des différents composés présent après réaction du composé **1** avec 30éq de MeI sur support solide pendant 48h dans le DMF/DCM, le DCM, le DMF et la NMP

Solvant	Composés (%)				
	4	6	2 et 3		5
DMF/DCM	27	0	26	21	13
DCM	4	0	12	14	37
DMF	50	0	20	19	5
NMP	28	30	13	10	15

Figure 61 : Structures possibles du composé **6**

Nous avons ensuite modifié les conditions de méthylation en faisant varier la concentration en MeI. Les conditions initiales à 30eq correspondent à une solution de DMF/DCM à 0.25 M. Nous avons étudié l'influence de la concentration à 0.5, 1 et 2 M sur 1, 2 et 4 h dans la NMP. Les résultats sont présentés dans la Figure 62 et récapitulés dans la Table 10. Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant une solution 2 M en MeI pendant 2 et 4 heures (75% et 78% respectivement). La différence de conversion entre 2h et 4h de réaction n'étant pas significative, nous avons gardé pour la suite des protocoles opératoires les conditions suivantes : 2 M de MeI dans la NMP pendant 2 h.

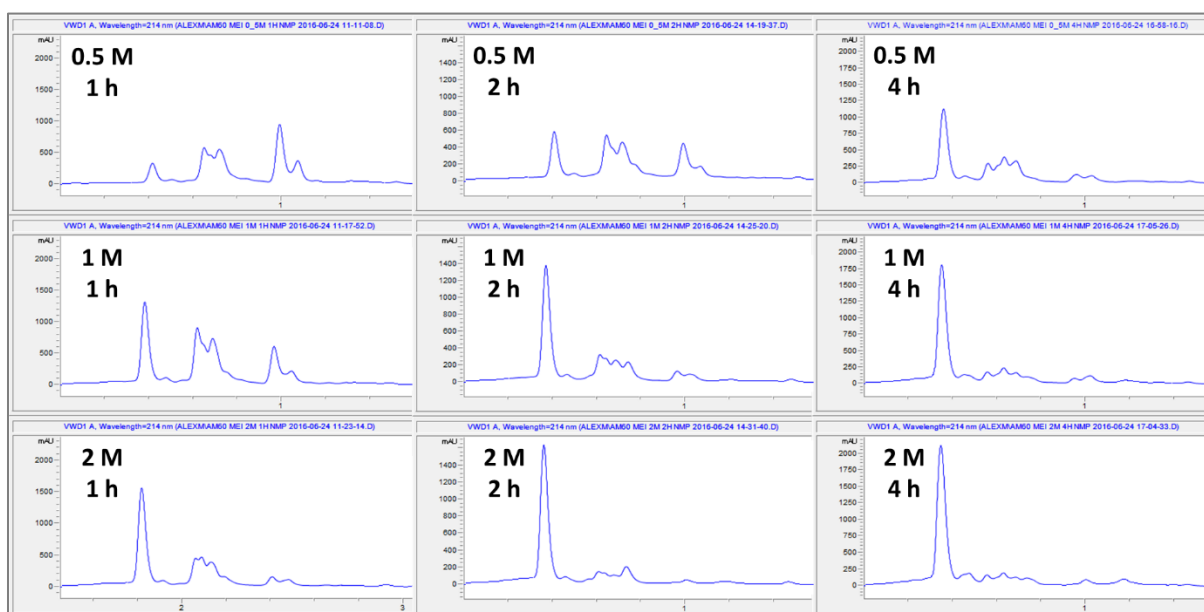


Figure 62 : HPLC après réaction du composé **1** avec une concentration de MeI de 0.5, 1 et 2 M sur support solide pendant 1, 2 et 4h dans la NMP.

Table 10 : Pourcentage HPLC du composé **4** après réaction du composé **1** avec une concentration de MeI de 0.5, 1 et 2 M sur support solide pendant 1, 2 et 4h dans la NMP.

Conversion (%)	1 h	2 h	4 h
0.5 M	10	24	44
1 M	31	55	68
2 M	52	75	78

Alors que les conditions dans le mélange DMF/DCM (1 :1) à 30eq (0.25M) de MeI n'avait pas permis d'obtenir plus de 50% de conversion en composé **4** au bout de 48h, les nouvelles conditions de méthylation ont permis d'obtenir 75% de conversion en 2 h avec une solution à 2M de MeI dans la NMP. Nous utiliserons par la suite ces conditions opératoires, sachant que les cycles de méthylation et multicyclisation ont dû être répétés pour des séquences plus longues.

Réaction de multicyclisation

Dans l'équipe, nous nous sommes intéressés à la synthèse de poly-(Agl- α AA) riches en résidus lysine pour le développement d'hydrogels et de vecteurs pour le transport de siRNA dans les cellules. Cette partie ne sera pas décrite dans cette thèse. Toutefois, nous donnerons ici l'optimisation de l'étape de multicyclisation qui a été un facteur limitant à l'obtention de ces composés. En effet, les meilleures conditions de multicyclisation initialement déterminées par Martin et al¹¹⁵, c'est-à-dire 5% de DBU dans un mélange DMF/DCM (1:1) pendant 48h, se sont avérées inefficaces pour des séquences incorporant des résidus lysine.

Pour améliorer cette étape de cyclisation nous sommes partis d'un tétrapeptide modèle supporté incorporant un résidu lysine et un résidu phénylalanine pour faciliter les analyses HPLC, i.e. Ac-Met-Phe-Met-Lys(Boc)-résine. Afin de vérifier leur présence et leur pureté, chaque intermédiaire a été analysé après clivage par du TFA d'une infime quantité de résine.

Le composé Ac-Met-Phe-Met-Lys-NH₂ (**7**) a été obtenu par FPPS sur support solide dans les conditions précédemment décrites. Le composé diméthylé Ac-Met(Me)⁺Phe(Me)⁺Lys-NH₂ (**8**) a ensuite été obtenu par réaction avec une solution de MeI à 2M dans de la NMP pendant 24h et conservé sur résine pour l'optimisation de la réaction de multicyclisation. Le clivage d'une infime parti de la résine a permis de vérifier la pureté des composés **7** et **8** par LC-MS (**7** : t_R = 1.07 min, [M+H]⁺ = 597.0 g.mol⁻¹, 88%, **8** : t_R = 0.24 min, [M+2H]²⁺ = 313.6 g.mol⁻¹, 68%) (Figure 63). Les composés diméthylés (**8**), monométhylés (**9** et **10**), et monométhylé-monolactame (**11**) du composé **7** sont représentés ci-dessous (Figure 64 et Figure 65).

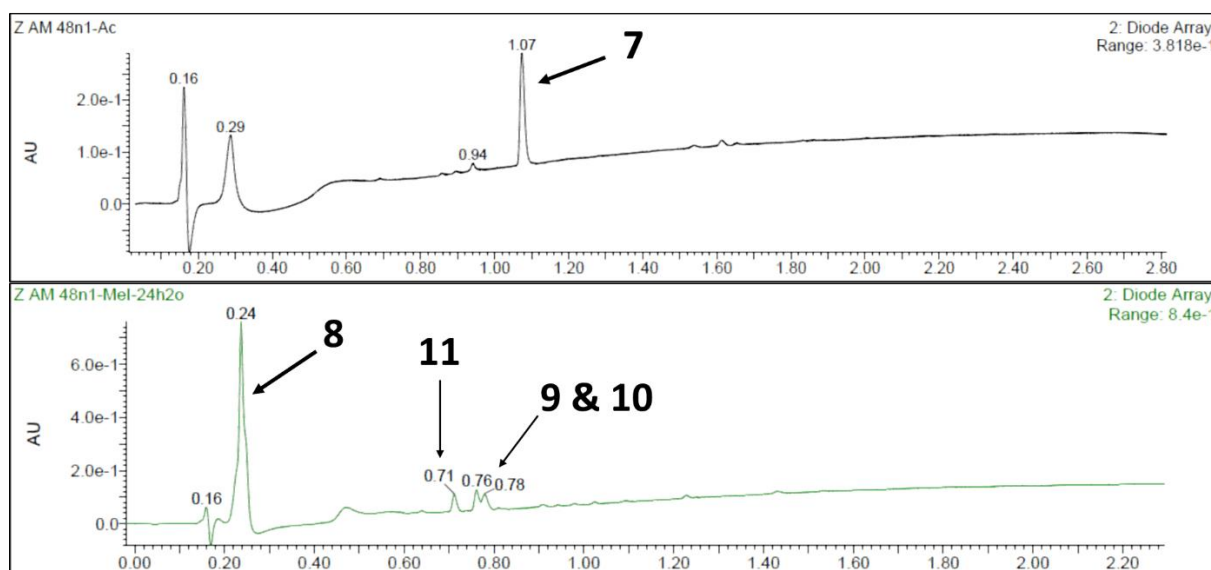


Figure 63 : HPLC des composés 7 et 8 à 214 nm

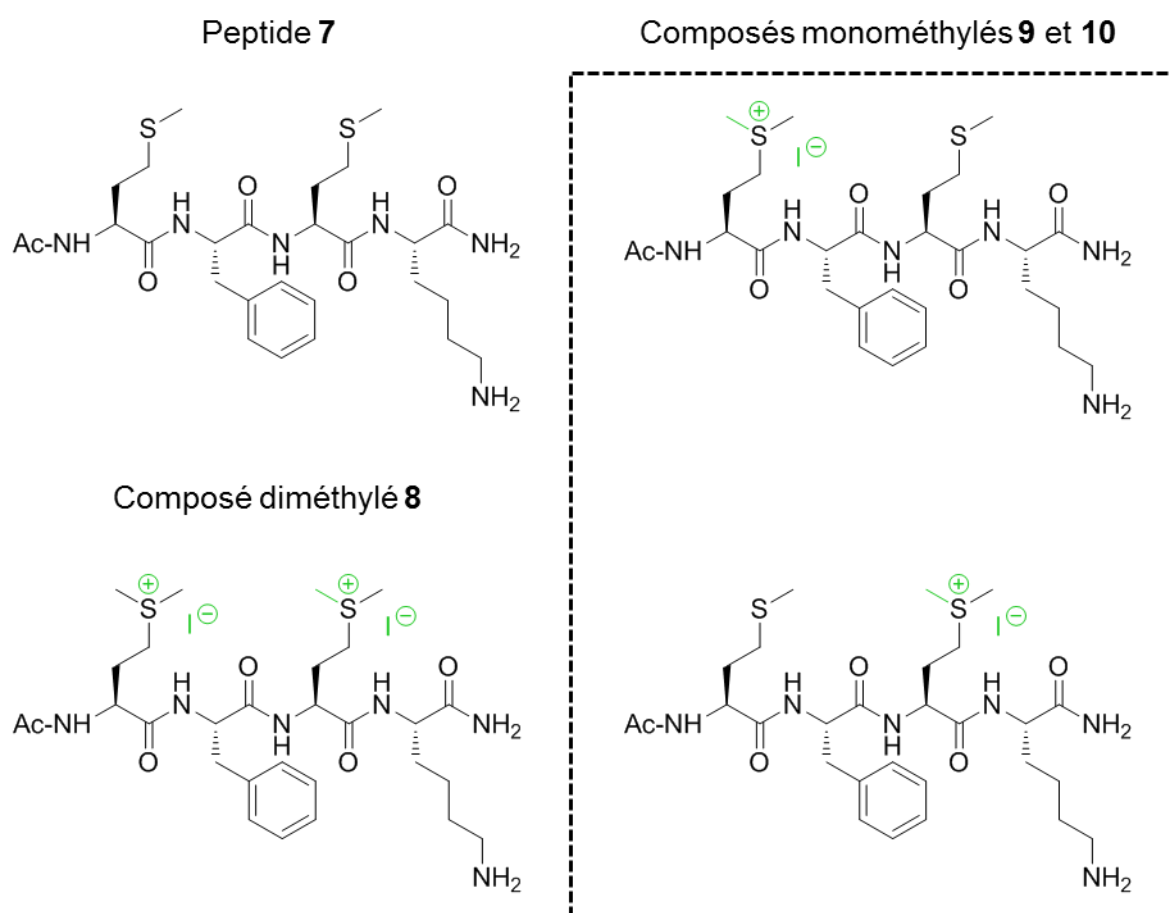
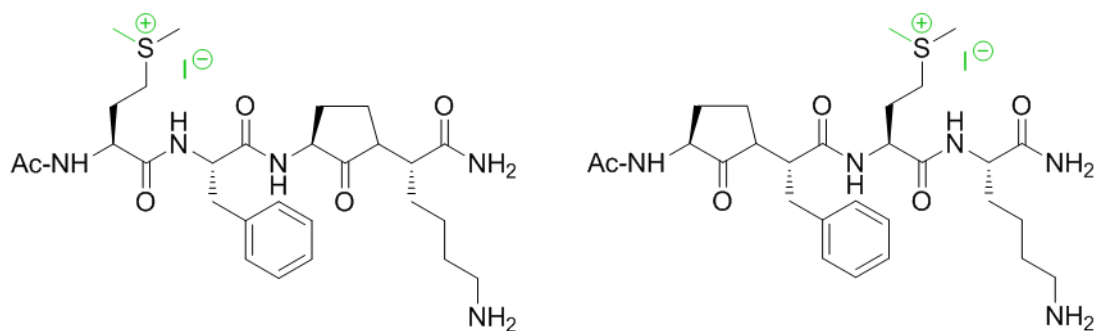


Figure 64 : Représentation schématique des composés 7, 8, 9 et 10.


 Figure 65 : Structures possibles du composé **11**

Le procédé générale d'optimisation de la réaction de multicyclisation en lactames est résumé dans la figure ci-dessous (Figure 66).

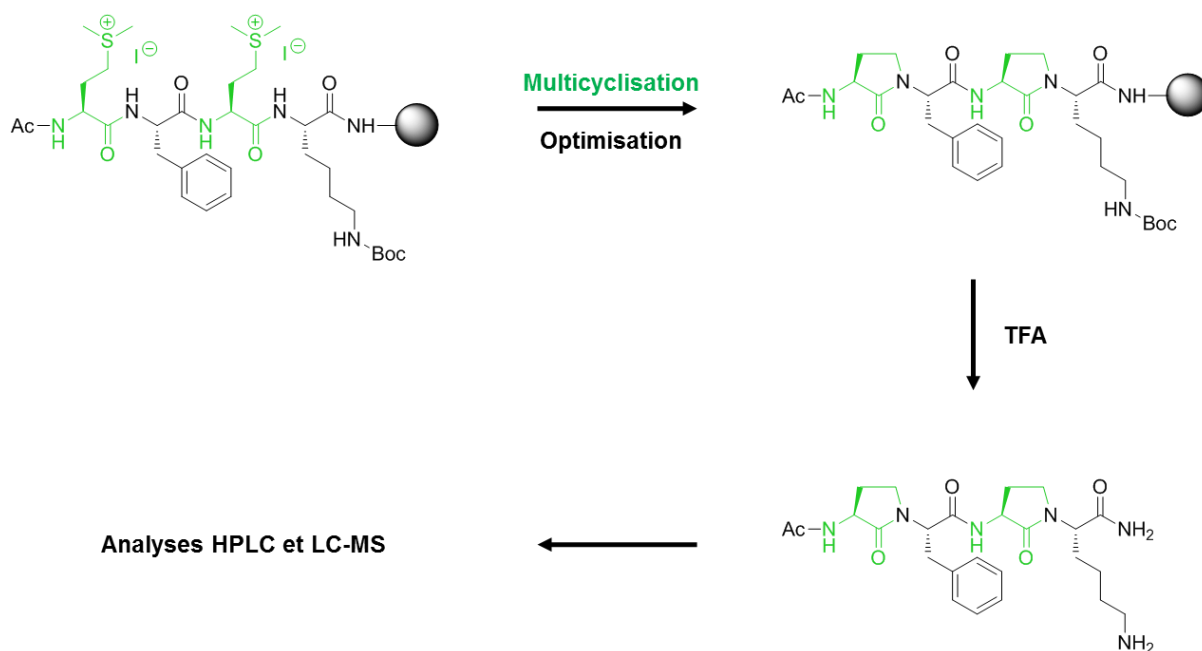


Figure 66 : Procédé général d'optimisation de la réaction de cyclisation en lactames

Nous avons dans un premier temps remplacé le mélange DCM/DMF par de la NMP. Les résultats obtenus montrent que ce solvant permet une meilleure conversion en dilactame Ac-AgIPheAgILys-NH₂ (**12**) mais que la réaction reste incomplète après 48h (seulement 44% de conversion) (Figure 67). De plus, la déméthylation observée avec les conditions de multicyclisation initialement déterminées par Martin et al¹¹⁵ est aussi observée avec l'utilisation de la NMP. Cette déméthylation est illustrée par la réapparition du composé **7** dans la figure ci-dessous.

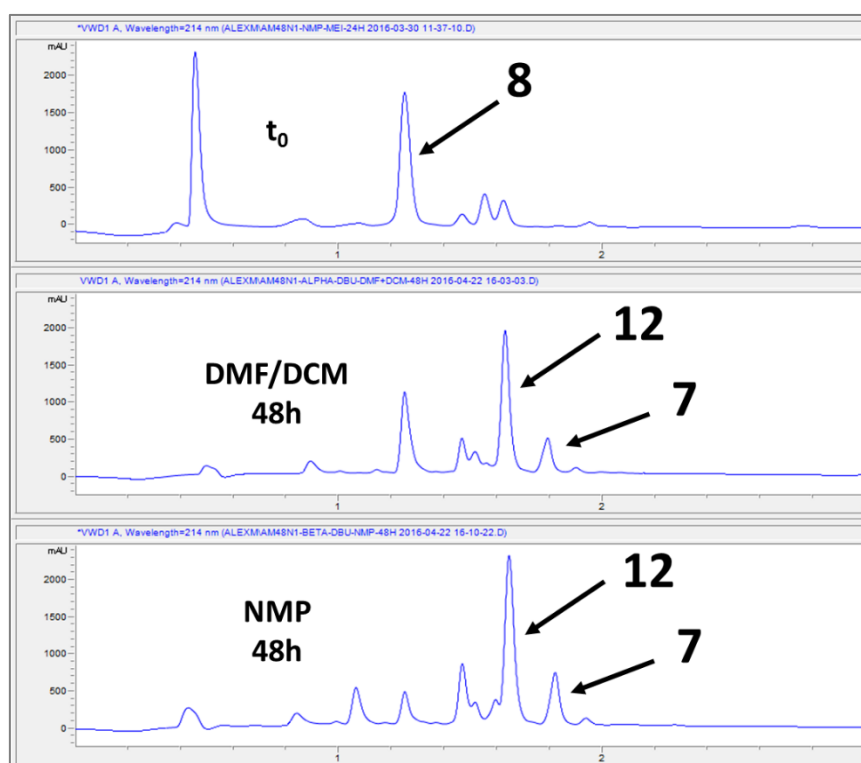


Figure 67 : HPLC après réaction du composé **8** pendant 48 h dans une solution à 5% de DBU dans du DMF/DCM ou de la NMP.

Nous avons alors décidé de réaliser la réaction sous irradiation micro-ondes, une technique utilisée en routine pour la synthèse automatisée de séquences peptidiques. Ainsi, le composé Ac-AgIPheAgILys-NH₂ (**12**) a été obtenu à partir du composé **8** en présence de DBU dans le DMF sous irradiation micro-ondes. Bien que la réaction soit largement incomplète à température ambiante après 48 heures, le composé **12** a été obtenu de manière quasi complète au micro-onde à 60°C en seulement 15 minutes (Figure 68). Le clivage d'une infime partie de la résine a permis de vérifier la pureté du composés **12** par LC-MS (t_R = 0.87 min, $[M+H]^+$ = 501.1 g.mol⁻¹, 90%, Figure 69).

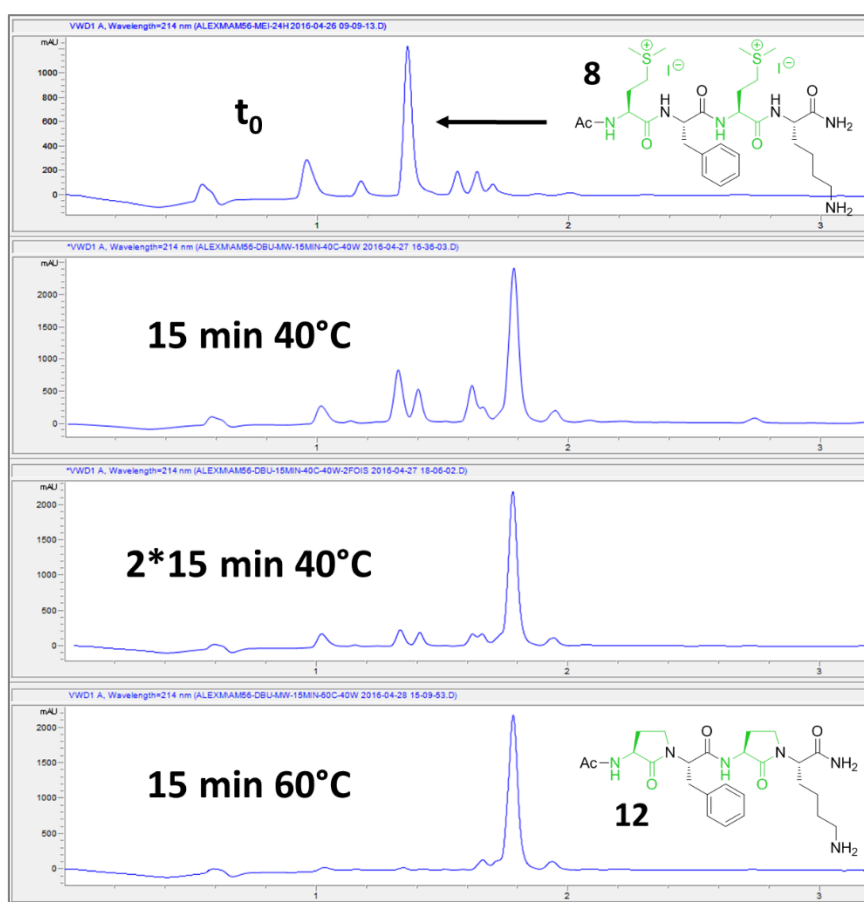


Figure 68 : HPLC après réaction du composé **8** avec une solution de DBU 5% dans le DMF assisté par micro-ondes

Les mêmes conditions ont ensuite été appliquées au peptide diméthylé **4** pour obtenir le composé di-lactame Alloc-AgiTrpAgiArg-NH₂ (**13**), avec également un très bon taux de conversion ($t_R = 1.16$ min, $[M+H]^+ = 610.4$ g.mol⁻¹, 88%, Figure 69).

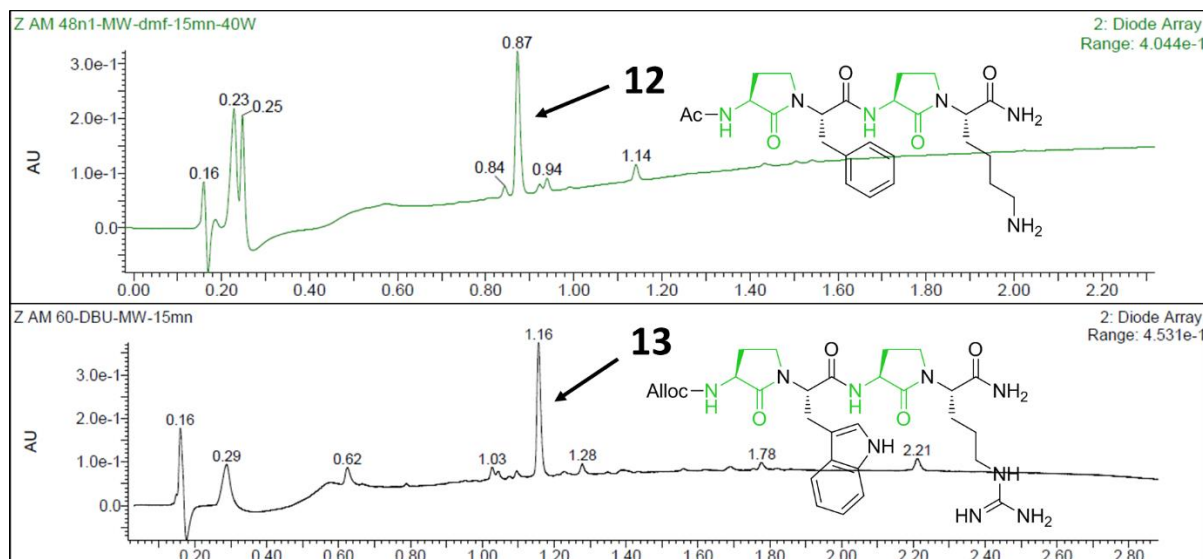


Figure 69 : HPLC des composés **12** et **13**

Les nouvelles conditions de multicyclisation, c'est à dire une solution de DBU à 5% dans du DMF chauffé à 60°C par irradiation micro-ondes, permettent d'obtenir un très bon taux de conversion (environ 90%) en seulement 15 minutes. Nous utiliserons donc par la suite ces conditions opératoires, sachant que les cycles de méthylation et multicyclisation ont dû être répétés pour des séquences plus longues.

IX. 4. Conclusion

Ces différentes optimisations nous ont permis de réduire les temps de réactions et d'augmenter les taux de conversion de manière considérable. Les composés décrits dans ce manuscrit ont été obtenus en utilisant les conditions optimisées dans cette partie de mon travail de thèse. Les séquences peptidiques ont été obtenus par SPPS assisté par vortex (FPPS) avec un double couplage de 2 fois 5 minutes à 5éq d'AA, 5éq d'HATU et 10éq de DIEA et une déprotection du Fmoc en 2 fois 2 minutes par une solution de pipéridine/DMF (2:8). L'acétylation a été obtenue sur vortex en 2 fois 5 minutes par une solution d'Ac₂O/DCM (1:1). La méthylation a été effectuée en réacteur fermé sous agitation standard dans une solution de MeI à 2M dans la NMP à température ambiante. Ces conditions ont permis d'augmenter le taux de conversion en peptide multi-méthylé et de considérablement réduire les temps de réaction, de 48 h à 2 h. La multicyclisation a été effectuée sous irradiation micro-ondes dans une solution de DBU 5% dans la NMP pendant 15 min à 60°C. La réaction sous micro-ondes a permis d'augmenter le taux de conversion en poly-lactame et de considérablement diminuer les temps de réaction, de 48h à 15 min. Pour les séquences plus longues (hexamère d'Agl- α AA et supérieur), les étapes de multiméthylation et multicyclisation ont été répétées. Ce processus d'optimisation a permis la synthèse de nombreux oligomères d'Agl- α AA pour des études biologiques et structurales.

CHAPITRE III : Développement de vecteurs

X. Développement de vecteurs de pénétration intracellulaire à base d'unités γ -lactames

X. 1. Introduction

Une partie de mes travaux de thèse a consisté en la conception et la synthèse de nouveaux oligomères d' α -amino γ -lactame (Agl-AA) pour l'internalisation et la vectorisation de composés bioactifs dans les cellules. Ce travail s'inscrit dans la continuité du projet de thèse du Dr Vincent Martin au sein l'équipe Acides Aminés, Hétérocycles, Peptides & Protéines de l'IBMM. Les études menées par le Dr Vincent Martin ont permis d'identifier une nouvelle famille de vecteurs de pénétration intracellulaire stables et non toxiques. Ces vecteurs sont des oligomères d' α -amino γ -lactames capables de se structurer en ruban en permettant une répartition périodique des groupes fonctionnels (correspondant aux chaînes latérales des aminoacides) de part et d'autre de l'axe du ruban¹¹⁵. Dans cette famille d'oligomères appelés foldamères, la modulation et le positionnement spatial des groupes fonctionnels sont directement contrôlés par la séquence peptidique native. Ceci nous a permis de moduler les propriétés physico-chimiques de nos architectures moléculaires de façon directe et simple. Sur la base de leurs propriétés structurales, des oligomères de nature hydrophobe, amphipatique et cationique ont ensuite été synthétisés et testés pour leur capacité à pénétrer dans les cellules. En particulier, des résidus cruciaux pour l'internalisation de CPP (Cell Penetrating Peptides) comme les résidus Trp¹⁶¹ et Arg^{151,152,154} ont été introduits sur ces structures en ruban. Ils ont permis de générer une nouvelle famille de vecteurs de pénétration intracellulaire très efficace, comme nous le verrons plus en détail dans ce chapitre.

Durant mes travaux de thèse, nous avons tout d'abord étudié leur localisation intracellulaire par imagerie confocale. Nous avons ensuite montré que ces vecteurs sont très stables dans le sérum humain et vis-à-vis de la dégradation enzymatique. Un des composé tête de série a été utilisé avec succès pour délivrer un peptide proapoptotique (KLA) qui ne pénètre pas dans les cellules cancéreuses¹⁹⁰. Nous avons également mené une étude de relation structure-activité pour définir l'importance du positionnement des chaînes latérales des résidus Trp et Arg le long de l'axe du ruban et l'importance de la longueur de l'oligomère pour la pénétration intracellulaire.

Comme discuté précédemment, plusieurs séries d'oligomères de taille et de nature différentes ont été testés pour leur capacité à rentrer dans les cellules par mesure de fluorescence totale (Figure 70). Cette technique permet d'évaluer la concentration d'un composé fluorescent par mesure de la lumière qu'il émet après excitation par un faisceau lumineux. La quantification du produit fluorescent est possible par cette technique car l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à sa concentration (à faible concentration). La série d'oligomères inspirée des polyarginines (en bleu), incorporant uniquement des chaînes latérales arginine, a montré une faible internalisation comparée à celle des peptides vecteurs de référence : la pénétratine et le peptide R_6W_3 (en vert). Cette faible internalisation peut s'expliquer par le fait que ces oligomères ne présentent pas plus de 6 charges positives alors que les différentes études des CPP cationiques ont montré qu'au moins 8 charges étaient nécessaires pour une internalisation efficace¹⁵³. Le rôle crucial du résidu tryptophane pour assurer l'internalisation de la pénétratine a également été démontré²¹⁰, et son utilisation en alternance avec des résidus arginine a permis le développement de puissants CPP^{211,212}. Une série d'oligomères d'Agl-AA amphipatiques alternant des résidus arginine et tryptophane a donc été synthétisée. Les résultats obtenus montrent que l'internalisation de ces composés (en violet) augmente avec leur longueur, avec une internalisation plus de 6 fois supérieure aux CPP de référence pour le composé alternant 3 résidus arginine avec 3 résidus tryptophane FI-Ahx-(Agl-Trp-Agl-Arg)₃-NH₂ (Figure 71). En accord avec les résultats de la littérature montrant que la substitution du Trp14 par une Phe diminuait de manière considérable l'internalisation de la pénétratine²¹⁰, l'importance du motif indole dans les oligomères d'Agl-AA a également été mise en évidence. En effet, la substitution des résidus Trp par des résidus Phe (en orange) conduit à la perte totale de la capacité à pénétrer dans les cellules. L'importance du motif Agl, et donc probablement de la pré-organisation structurale des molécules, a également été mise en évidence par l'incapacité du composé linéaire FI-Ahx-(Ala-Trp-Ala-Arg)₃-NH₂ (en noir) à traverser la membrane plasmique. De plus, le composé FI-Ahx-(Agl-Trp-Agl-Arg)₃-NH₂ a montré une capacité à traverser la membrane plasmique bien supérieure à celle du peptide R_6W_3 qui présente le même type de chaînes latérales. Il est intéressant de noter que même si le peptide R_6W_3 , comme la plupart des séquences CPP²¹³, est capable d'adopter une hélice α amphipatique à proximité des membranes lipidiques, il ne présente aucune conformation privilégiée en solution²¹⁴. Ces résultats appuient non seulement l'importance de la structure mais aussi le bénéfice de la pré-organisation structurale pour une internalisation plus efficace. Cette influence a déjà été mise en évidence par l'étude de peptides cycliques dérivés du Tat et de poly-arginines afin de mieux comprendre le rôle de la distribution spatiale des chaînes latérales dans l'internalisation^{215,216}. Plus récemment, le groupe de H. Wennemers, a montré que des oligomères de polyproline portant des groupements guanidinium distants les uns des autres de 9 Å présentaient une forte capacité à pénétrer dans les cellules¹⁸⁹. Cette distance

semble être optimale pour une bonne interaction avec les protéoglycanes de la membrane plasmique et ainsi l'internalisation. La distance qui séparent les chaînes latérales d'une même face des rubans Agl-AA est de 10 Å. L'espacement des chaînes latérales des arginines le long du ruban des Agl-AA pourrait alors expliquer l'efficacité d'internalisation de nos systèmes. Pour conclure sur cette étude, la pré-structuration des oligomères d'Agl-AA permettant de positionner de façon contrôlée les chaînes latérales des résidus cationiques et aromatiques semble important pour un passage efficace dans les cellules.

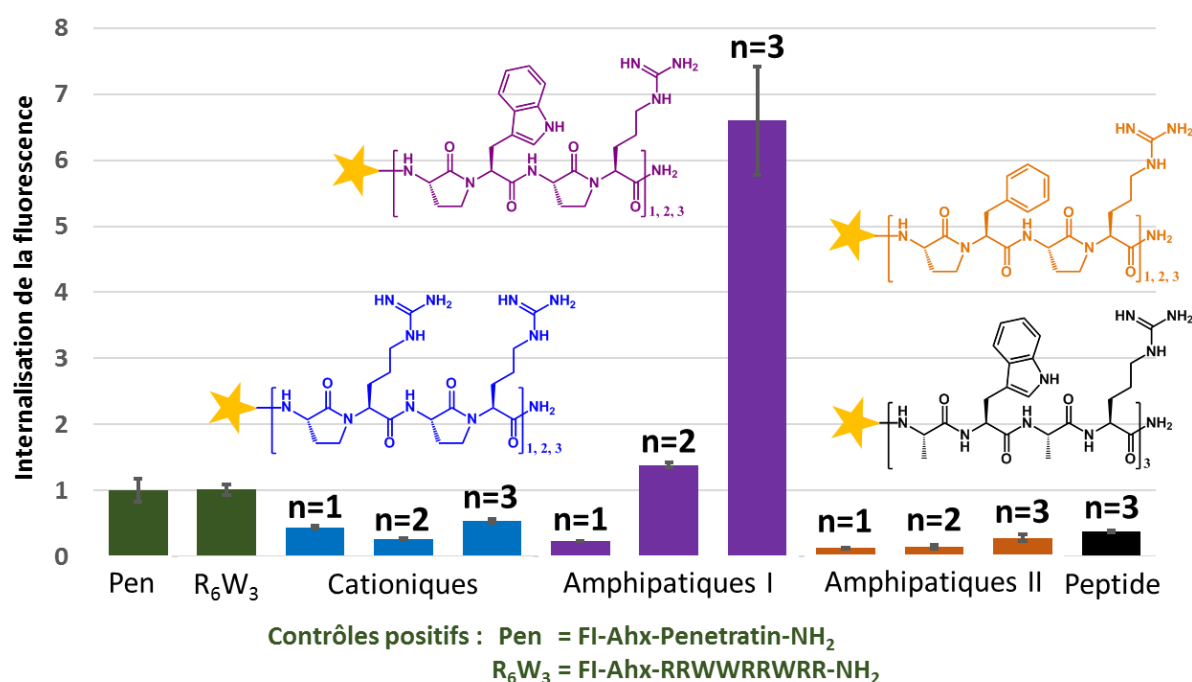


Figure 70 : Internalisation de la fluorescence dans des cellules MDA-MB-231 après 3 h à 10 µM

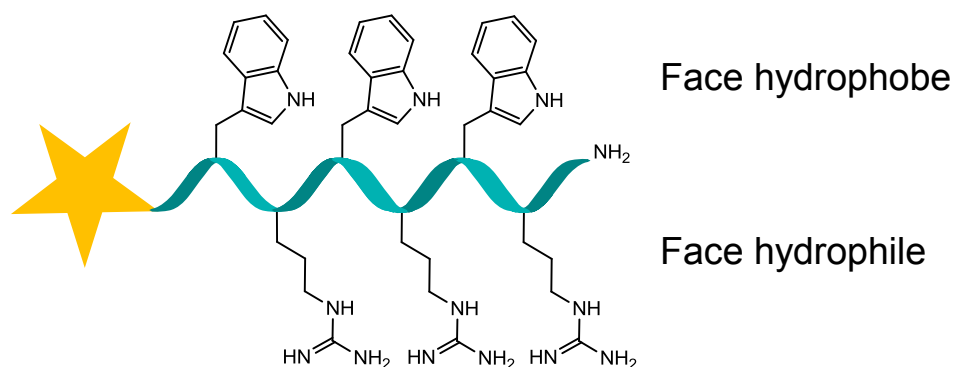


Figure 71 : Représentation schématique du composé FI-Ahx-(Agl-Trp-Agl-Arg)₃-NH₂ (**14**)

De cette première étude est ressorti un composé particulièrement efficace, le composé **FI-Ahx-(Agl-Trp-Agl-Arg)₃-NH₂**. Pour la suite de ce projet, nous avons sélectionné cette tête de série (composé **14**) et nous nous sommes attachés à définir sa localisation intracellulaire, à évaluer sa capacité à résister à la protéolyse et à véhiculer dans les cellules un composé biologiquement actif. Enfin, nous avons réalisé une étude de relation structure-activité afin de mesurer l'impact de la disposition des groupements cationiques et indoliques le long de l'axe du ruban, ainsi que celui de la longueur des foldamères sur l'efficacité d'internalisation.

X. 2. Synthèse des oligomères fluorescents pour l'étude de la pénétration et localisation intracellulaire

La sonde fluorescente qui a été choisie pour les études d'internalisation est la fluorescéine. Ce fluorochrome possède une bande d'absorption à 494 nm et une bande d'émission à 521 nm. Elle permet d'évaluer la capacité d'internalisation des oligomères par mesure de fluorescence totale et leur localisation intracellulaire par microscopie confocale. Le bras espaceur choisi pour la conception de ces oligomères fluorescent a été l'acide aminohexanoïque (Ahx). Les différents foldamères ont été synthétisés selon la stratégie schématisée ci-dessous (Figure 3) en suivant les protocoles optimisés et précédemment décrits (chapitre II). Ces foldamères incluent les composés synthétisés pour les études plus approfondies de localisation intracellulaire et résistance à la protéolyse ainsi que les oligomères pour l'étude des relations entre la structure et l'activité (RSA).

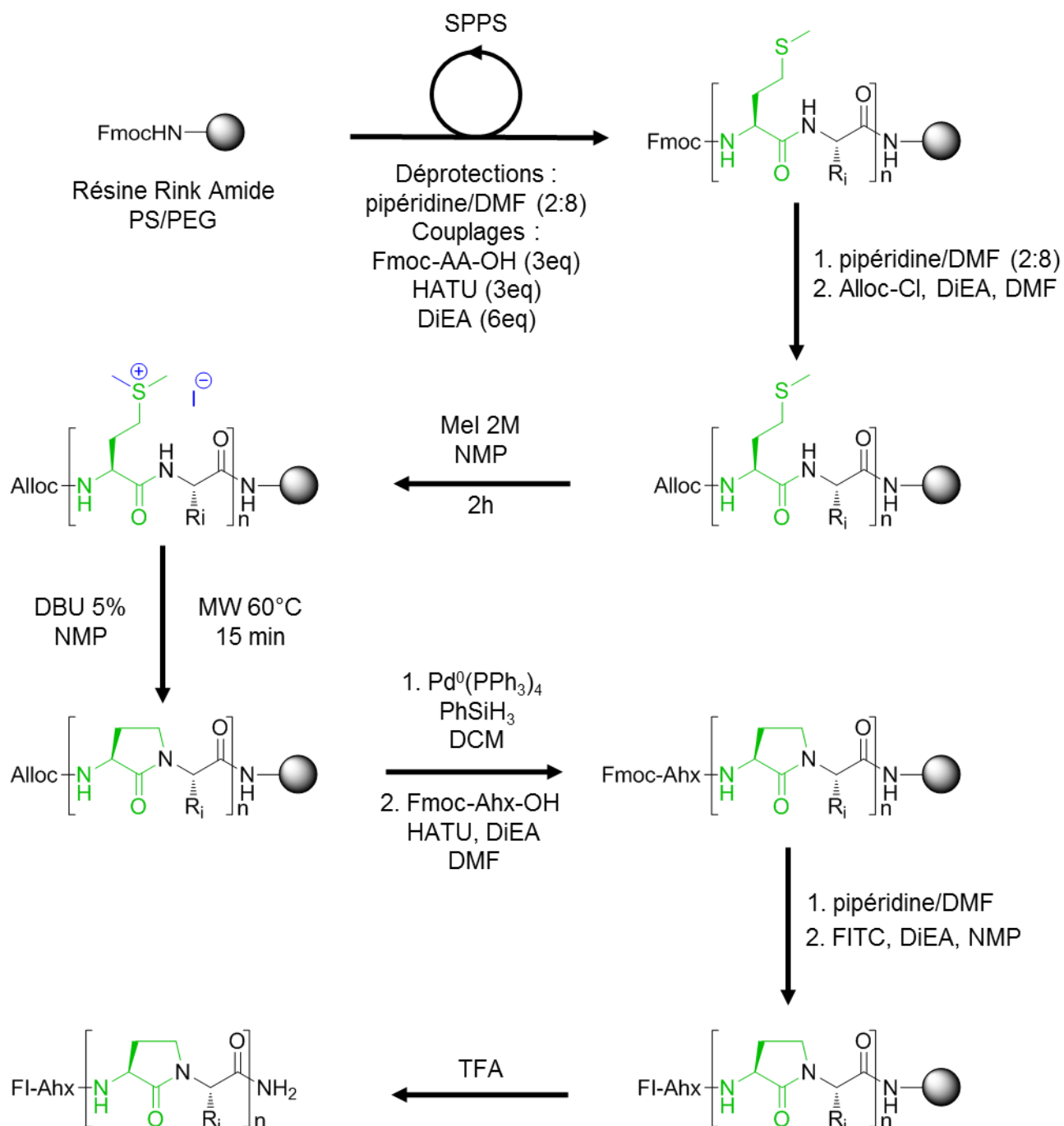


Figure 72 : Stratégie générale de synthèse des oligomères Agl-αAA fluorescents

Le peptide alternant les résidus méthionine avec les résidus d'acides α-aminés sélectionnés pour cette étude est obtenu par SPPS sur une résine PS/PEG AmphiSpheres® avec un lien Rink amide. La protection Fmoc de la dernière méthionine est ensuite remplacée par une protection Alloc par réaction entre l'amine terminale avec du chloroformiate d'allyle en milieu basique. Après la réaction de multicyclisation, cette protection est retirée par traitement au tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) permettant de conserver le peptide sur le support

solide. Le bras espaceur Ahx est alors introduit par couplage de Fmoc-Ahx-OH au peptide supporté en suivant la procédure classique de SPPS. Après déprotection du Fmoc, le FITC est couplé en présence de base (DIEA) dans la NMP, directement sur la résine. Les oligomères fluorescents sont obtenus par clivage et déprotection totale par un traitement au TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5). Cette stratégie nous a permis d'obtenir le composé **14** ainsi que les composés **15** à **24** pour l'étude des relations structure-activité (Table 11). Afin de comparer ces oligomères à des CPP de référence, à savoir les peptides pénétratine, R₆W₃ et Arg₈, nous avons synthétisé les composés FI-Ahx-R₆W₃-NH₂ (composé **25**), FI-Ahx-pénétratine-NH₂ (composé **26**) et FI-Ahx-Arg₈-NH₂ (composé **27**). Pour évaluer l'influence des γ -lactames, un analogue peptidique linéaire du composé **14** a aussi été synthétisé : FI-Ahx-(Ala-Trp-Ala-Arg)₃-NH₂ (composé **28**).

Table 11 : Séquences des composés pour l'étude structure activité

N°	Séquence
14	FI-Ahx-AglTrpAglArgAglTrpAglArgAglTrpAglArg-NH ₂
15	FI-Ahx-AglTrpAglArgAglArgAglArgAglTrpAglArg-NH ₂
16	FI-Ahx-AglTrpAglArgAglTrpAglArgAglArgAglArg-NH ₂
17	FI-Ahx-AglTrpAglArgAglArgAglArgAglArgAglArg-NH ₂
18	FI-Ahx-AglArgAglArgAglTrpAglArgAglArgAglArg-NH ₂
19	FI-Ahx-AglTrpAglArgAglArgAglTrpAglTrpAglArg-NH ₂
20	FI-Ahx-AglTrpAglArgAglTrpAglTrpAglArgAglArg-NH ₂
21	FI-Ahx-AglTrpAglTrpAglTrpAglArgAglArgAglArg-NH ₂
22	FI-Ahx-AglTrpAglArgAglTrpAglArg-NH ₂
23	FI-Ahx-AglTrpAglTrpAglArgAglArg-NH ₂
24	FI-Ahx-AglArgAglTrpAglTrpAglArg-NH ₂
25	FI-Ahx-RQIKIWFQNRRMKWKK-NH ₂
26	FI-Ahx-RRWWRRWRR-NH ₂
27	FI-Ahx-Arg ₈ -NH ₂
28	FI-Ahx-AlaTrpAlaArgAlaTrpAlaArAlaTrpAlaArg-NH ₂

X. 3. Microscopie confocale

Il existe dans la cellule différents compartiments comme le cytosol, le noyau ou les différents organites de la cellule. Pour qu'un principe actif atteigne sa cible thérapeutique il est donc important de choisir un vecteur capable d'atteindre le compartiment souhaité. La microscopie confocale est une technique d'imagerie optique qui, couplée au marquage des différents organites de la cellule, permet la localisation intracellulaire de composés fluorescents. Cette technique repose sur l'augmentation du contraste et de la résolution optique par l'utilisation d'un sténopé qui élimine les photons hors du plan focal de l'objectif. Elle permet de réaliser des balayages à faible profondeur de champ (< 600 nm) qui peuvent être utilisés pour une reconstitution tridimensionnelle par traitement informatique. Ainsi, des expériences de microscopie confocale ont été réalisées afin déterminer la localisation intracellulaire de la tête de série marqué à la fluorescéine (composé **14**) sur des lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231. Le composé linéaire FI-Ahx-(Ala-Trp-Ala-Arg)₃-NH₂ (**28**) comme contrôle négatif et le composé de référence FI-Ahx-pénétratine-NH₂ (**25**) ont également été évalués. En accord avec les études d'internalisation par mesure de fluorescence totale, la microscopie confocale a montré une accumulation importante du composé **14** dans les cellules, comparé à la pénétратine (**25**) et au composé linéaire (**28**) qui ne pénètre pas du tout (Figure 73). Ces expériences ont également permis de mettre en évidence la localisation préférentielle du composé **14** au niveau du cytosol. Cette localisation présente un intérêt particulier pour véhiculer des composés biologiquement actifs visant des cibles présentes dans ce compartiment de la cellule. Afin d'évaluer sa capacité à "vectoriser" des cargos biologiquement actifs dans le cytosol, nous nous sommes intéressés à la vectorisation d'un peptide pro-apoptotique non-pénétrant, i.e. le peptide KLA^{217,218} qui exerce son action au niveau des mitochondries présentes dans le cytosol.

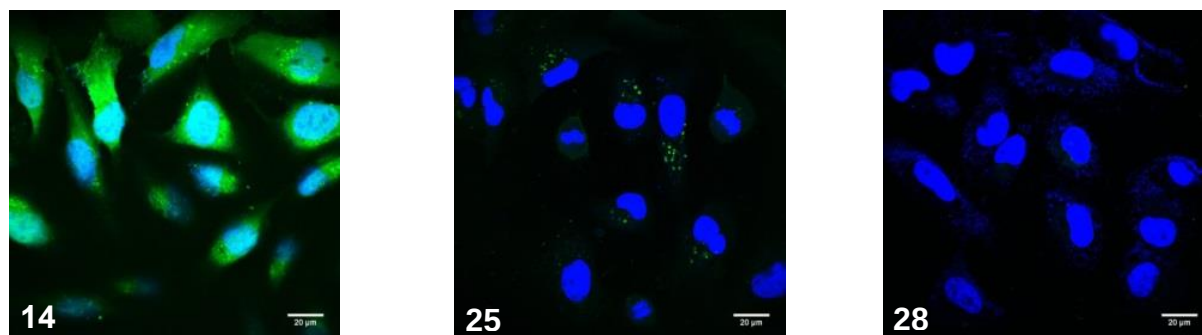


Figure 73 : Images obtenues par microscopie confocale sur des lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 incubées pendant 3h avec les composés **14**, **25** et **28** à $10 \mu\text{M}$ (Noyaux colorés en bleu par le DAPI)¹⁹⁰.

X. 4. Evaluation du potentiel de vectorisation

Le peptide proapoptotique KLA, de séquence KLAKLAKKLAKLAK, a une activité cytotoxique par lyse des membranes mitochondriales. Cependant, ce peptide n'a aucun effet sur la croissance tumorale car il est incapable d'atteindre le cytosol par lui-même et ainsi exercer son activité proapoptotique. Afin de pallier ce problème, nous nous sommes intéressés à sa vectorisation par des oligomères d'Agl- α AA qui sont capables de traverser les membranes cellulaires et d'atteindre le cytosol. Ainsi, nous avons construit un conjugué qui associe la séquence (Agl-Trp-Agl-Arg)₃ du composé **14** à un dérivé du peptide KLA en série D (peptide klaklak). Ce peptide est aussi puissant que son homologue L mais plus résistant à la protéolyse et possède donc un temps de demi-vie plus long. Le conjugué vecteur-klaklak a été obtenu selon la stratégie de synthèse schématisée ci-dessous (Figure 74). D'une part, une séquence Alloc-(Agl-Trp-Agl-Arg)₃-NH-résine, obtenue comme précédemment décrit (Figure 72) est déprotégée du côté C-terminal par un traitement au Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) avant d'être couplée à l'acide 6-maléimido-caproïque en présence d'HATU et DIEA pour obtenir le composé **29**. D'autre part, le composé **30** Ac-Cys-Ahx-(klaklak)₂-NH₂ est obtenu par SPPS. Enfin, le conjugué **31** est obtenu par réaction thiol-maléimide des composés **29** et **30** dans un mélange acétonitrile/tampon phosphate pH 7.4.

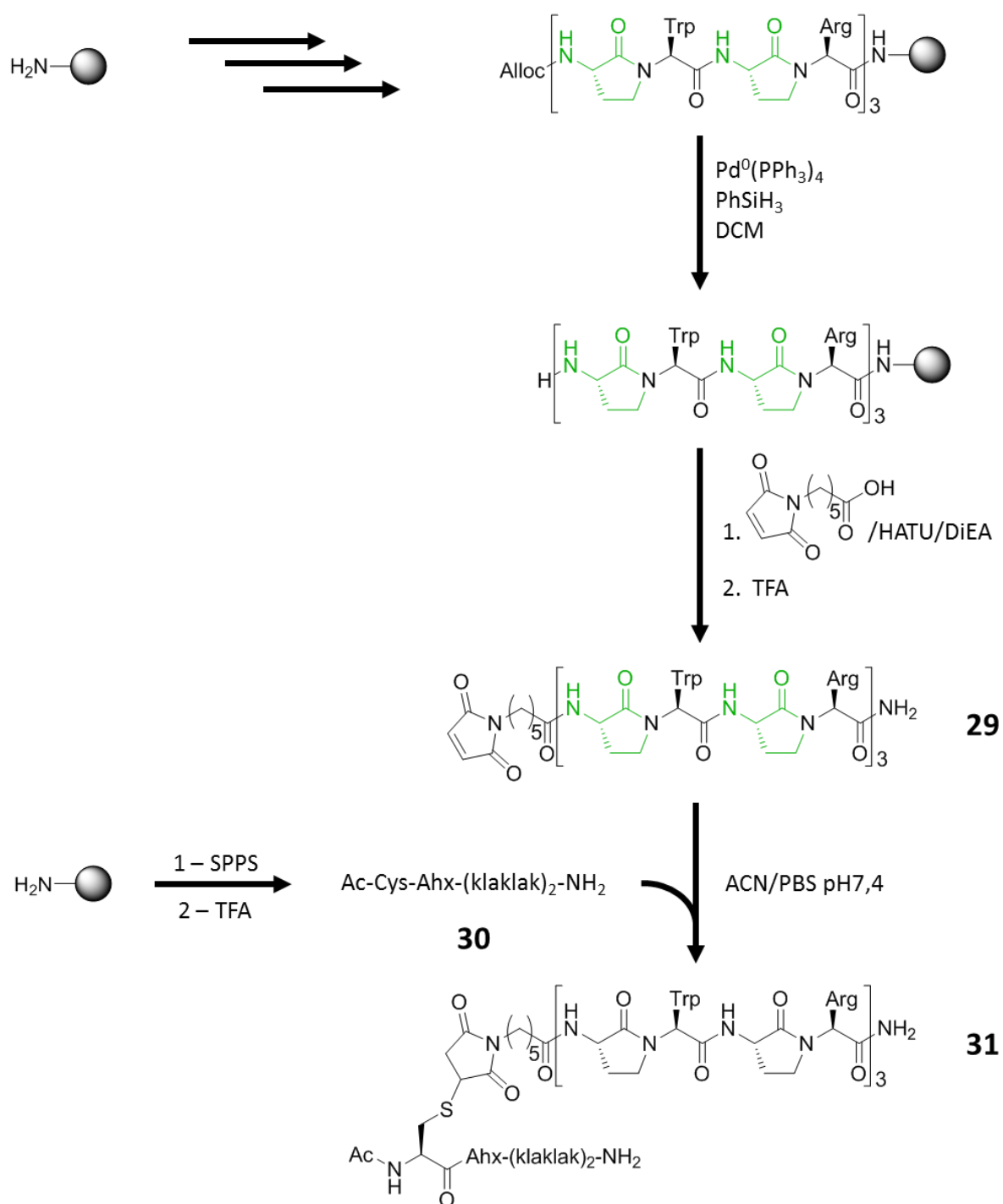


Figure 74 : Stratégie de synthèse du conjugué **8**

La cytotoxicité de ce composé a ensuite été évaluée à différentes concentrations sur des cellules du cancer du sein MDA-MB-231 après 48 heures d'incubation (Figure 75). Le vecteur seul (**14**) et le composé Ac-(klaklak)₂-NH₂ ont été utilisés comme contrôles négatifs. Le vecteur seul (**14**) ne présente pas de cytotoxicité, et le composé Ac-(klaklak)₂-NH₂ ne présente pas non plus de cytotoxicité car, incapable de pénétrer dans la cellule, il ne peut pas exercer ses propriétés proapoptotiques. En revanche, les résultats montrent que le conjugué **31** est cytotoxique avec une IC₅₀ d'environ 7.5 μ M et il est capable d'inhiber 90% de la croissance cellulaire à 20 μ M. Cela démontre la capacité de la séquence (Agl-Trp-Agl-Arg)₃ à vectoriser un cargo biologiquement actif à l'intérieur des cellules et dans le cytosol. Nous nous sommes alors intéressés à la capacité de ces systèmes non naturels à résister à la dégradation enzymatique.

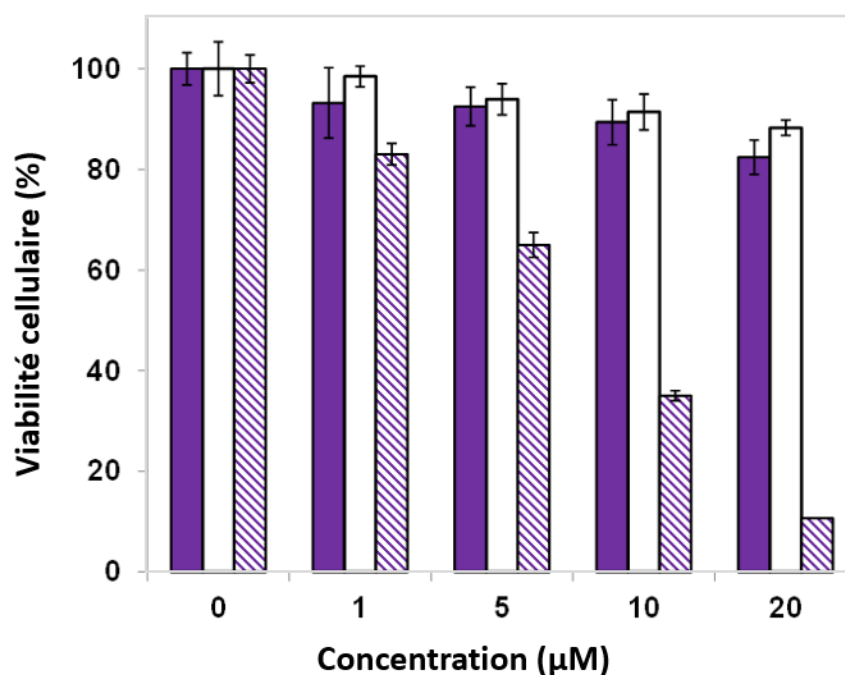


Figure 75 : Viabilité cellulaire moyenne après 48h d'incubation avec le vecteur **14** (violet), la séquence proapoptotique Ac-(klaklak)₂-NH₂ (blanc) ou le conjugué **31** (hachuré)¹⁹⁰

X. 5. Evaluation de la résistance à la protéolyse

Malgré le potentiel des CPP pour la vectorisation de composés bioactifs, leur utilisation est limitée par leur dégradation rapide par les protéases endogènes. Pour surmonter cette limitation, de nombreuses stratégies ont été employées pour augmenter leur stabilité comme l'introduction d'acide aminés non protéinogéniques ou l'augmentation de la rigidité structurale, par cyclisation par exemple^{219,220}. Dans ce travail, nous avons évalué si la conversion d'une séquence peptidique en oligomère structuré d'Agl- α AA permettait d'augmenter sa résistance protéolytique. Nous avons étudié la stabilité du composé **14** dans le sérum humain à 37°C ainsi que sa résistance à la chymotrypsine et la pepsine, deux principales enzymes du système digestif humain. Pour cela, nous avons suivi sa dégradation au cours du temps par HPLC à 214 nm et par LC/MS. Pour comparer leur résistance vis-à-vis de la protéolyse à celle d'un CPP de référence, le composé **14** a été comparé au composé FI-Ahx-R₆W₃-NH₂ (composé **26**). Les résultats présentés dans la Figure 76 montrent une rapide hydrolyse du composé **26** dans le sérum humain (demi-vie d'environ 1 heure) alors que le composé **14** possède une très bonne résistance. Cet oligomère d'Agl- α AA n'est pas dégradé après 24 heures d'incubation. De la même manière, alors que le composé **26** est rapidement dégradé par la chymotrypsine et la pepsine (demi-vie de 30 minutes et 2 heures respectivement) le composé **14** montre une résistance protéolytique remarquable vis-à-vis de chaque enzyme. En effet, aucune dégradation n'a été observée après 24 heures d'incubation. Cette stabilité dans le sérum humain et la résistance protéolytique du composé **14** peut-être liée à l'introduction d'amides tertiaires par les motifs Agl- α AA et la conformation repliée de l'oligomère qui empêchent les protéases d'hydrolyser les liens amides, ces derniers étant engagés dans un réseau de liaisons hydrogène. Les résultats de cette analyse montrent que contrairement aux CPP qui sont sensibles à la protéolyse, le composé **14** présente une très bonne résistance et stabilité. Cette propriété est intéressante pour des applications *in vivo*.

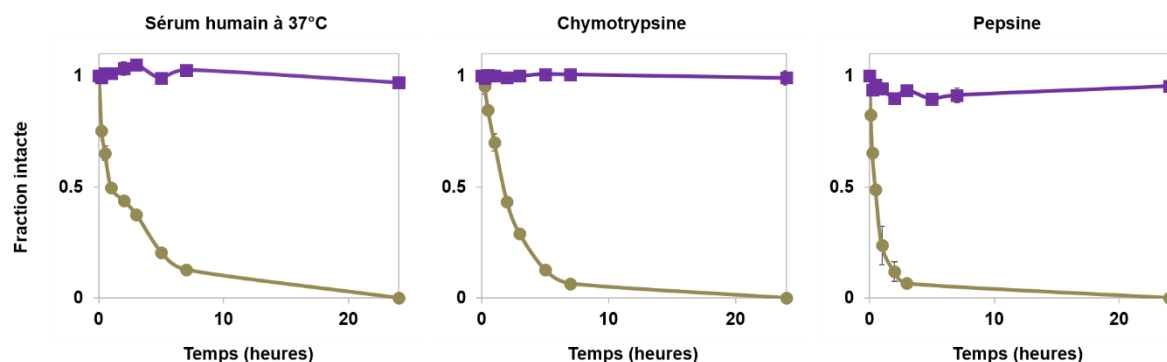


Figure 76 : Stabilité à la protéolyse des composés **14** (violet) et **26** (marron)¹⁹⁰

X. 6. Etude structure-activité

L'identification de cet oligomère d'Agl-AA possédant une très bonne capacité à pénétrer dans les cellules, malgré leur faible nombre de charges positives, et à y véhiculer un composé actif nous a poussé à conduire une étude de relation structure activité un peu plus approfondie. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'impact de la disposition des fonctions indoliques et cationiques le long de la structure en ruban ainsi qu'à l'influence du nombre de résidus tryptophane sur la capacité des oligomères à traverser la membrane plasmique. Dans un deuxième temps, la taille des oligomères a été modulée, en particulier en réduisant le nombre d'unités Agl-AA de 6 à 4 unités. Les différents oligomères d'Agl-AA ont été synthétisés selon la méthode précédemment décrite. Tous les composés ont été marqués à l'aide de la fluorescéine afin d'évaluer leur capacité à pénétrer dans les cellules. Les dix composés fluorescents synthétisés sont reportés dans la Table 12.

Une première série de composés, de même taille que le composé **14**, c'est-à-dire comportant 6 chaînes latérales d'acides aminés, a été synthétisée. Ces oligomères présentent des résidus Arg et 1, 2 ou 3 résidus Trp afin d'étudier l'impact du nombre de tryptophane sur la capacité des oligomères à traverser la membrane plasmique. De plus, les résidus tryptophane ont été placés à différentes positions pour pouvoir également étudier l'influence de la position des chaînes latérales le long de la structure en ruban. Dans un premier temps, à partir de la tête de série (composé **1**) nous avons fait varier la position des résidus Trp et par conséquent la répartition et la densité des charges positives qui sont des critères importants pour la pénétration intracellulaire. Alors que le composé **1** adopte une structure en ruban amphipathique avec une face lipophile opposée à une face hydrophile, le caractère amphipathique du composé **21** réside dans le positionnement des 3 résidus Trp du côté N-terminal et des trois résidus cationiques du côté C-terminal. Dans les composés **19** et **20**, la répartition des Trp et Arg de part et d'autre du ruban conduit à une rupture de l'amphipathie. Ensuite, nous avons réduit le nombre de Trp contenu dans le composé **14**. Un puis deux résidus ont été substitués par des résidus Arg. Le composé **15** comporte 2 résidus Trp chacun à une extrémité d'une même face du ruban, alors que le composé **16** présente ses chaînes latérales Trp sur la même extrémité d'une même face du ruban. Le composé **17** présente 1 seul résidu Trp à l'extrémité N-terminale alors que le composé **18** comporte 1 seul Trp au milieu de 2 résidus arginine sur l'une des faces du ruban.

Enfin, une deuxième série de composés a été synthétisée. Ces composés ne présentent plus que quatre unités AgI-AA avec 2 résidus arginine et 2 résidus tryptophane, selon différents arrangements le long de l'oligomère (composés **22-24**). Le composé **22** présente les chaînes latérales arginine et tryptophane sur 2 faces opposées, à l'image du composé **14**. Le composé **23** a les 2 résidus tryptophane du côté N-terminal alors que ses 2 résidus arginine sont du côté C-terminal. Le composé **19** présente les deux types de résidus sur chaque face du ruban.

Table 12 : Représentation schématique des différents oligomères fluorescents

N°	Structure	N°	Structure
15		16	
17		18	
19		20	
21		22	
23		24	

Ces différents composés ont été testés pour leur capacité à rentrer dans les cellules par mesure de fluorescence totale sur différentes lignées cellulaires. Comme évoqué précédemment, cette technique permet d'évaluer la concentration d'un composé fluorescent par mesure de la lumière qu'il émet après excitation par un faisceau lumineux. Les cellules sont incubées pendant 3 heures à 37°C avec 5 μ M d'oligomère fluorescent. Les oligomères qui ne sont pas internalisés sont ensuite éliminés par lavage avec un tampon phosphate (PBS). Pour éviter les faux positifs liés à l'adsorption de composés sur la membrane plasmique, les cellules sont traitées à la trypsine pendant 5 minutes. Elles sont ensuite centrifugées pour récupérer le culot cellulaire qui sera lysé avant la mesure de la fluorescence à 530 nm (Figure 77). La mesure de fluorescence avant et après traitement par la trypsine des différents composés sur la lignée cellulaire MDA-MB-231 n'ont pas montré de différence significative. Cette étape lourde et contraignante n'a donc pas été répétée pour l'ensemble des lignées cellulaires où nous avons réalisé la lyse directe après les étapes de lavage.

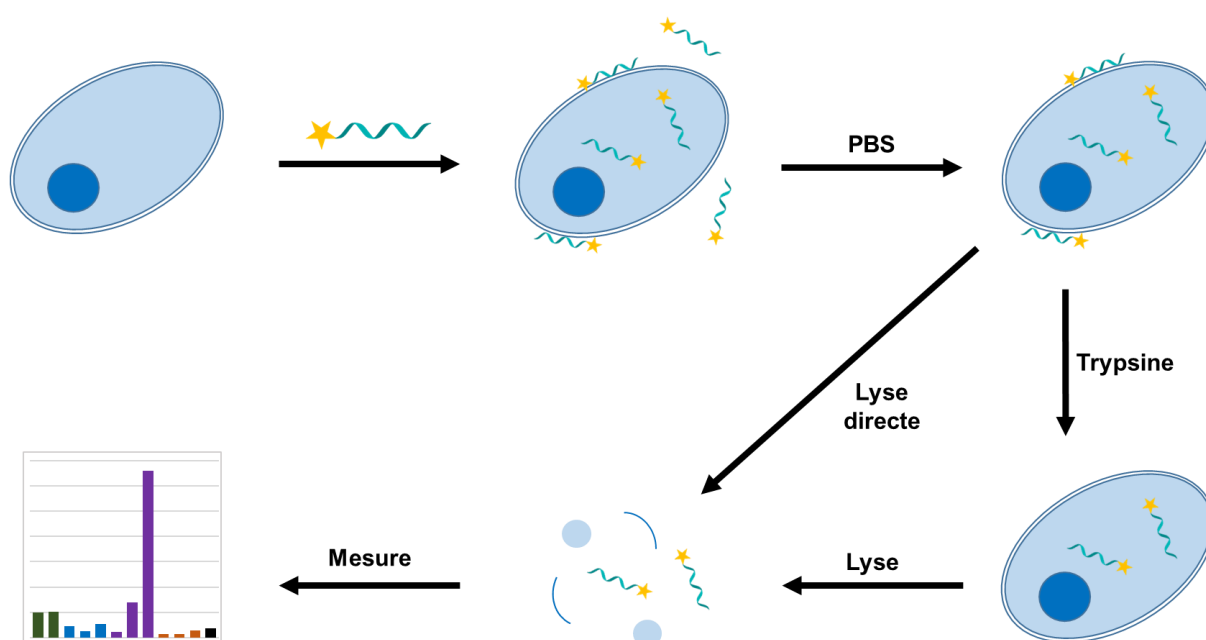


Figure 77 : protocole pour la mesure de fluorescence totale pour l'évaluation de la pénétration cellulaire de composés fluorescents

La capacité des différents oligomères à traverser la membrane plasmique a été comparée à celle du composé **14** et celle des CPP de référence marqués à la fluorescéine, c'est-à-dire les composés FI-Ahx-pénétratine-NH₂ (composé **25**) et FI-Ahx-Arg₈-NH₂ (composé **27**). Les composés ont été testés sur 5 lignées de cellules cancéreuses: RD, RMS, YN (trois lignées de Rhabdomyosarcoma embryonal), MDA-MB-231 (Adenocarcinoma du sein), LNCaP (Carcinoma de la prostate) (Figure 78). De manière générale, les résultats montrent que la capacité des différents composés à traverser les membranes cellulaires n'est pas dépendant du type de lignées. En revanche le nombre de résidus Trp impacte fortement l'efficacité de pénétration.

Grâce à ces expériences nous avons tout d'abord pu identifier 3 composés un peu plus efficaces que le composé **14** : les composés **19**, **20** et **21**. Comme discuté précédemment, le composé **1** a été élaboré pour obtenir un composé amphiphile présentant tous les résidus Trp et Arg sur deux faces opposées du ruban. Les résultats obtenus pour les composés **16-18** montrent que le caractère amphipathique pour ce type de vecteurs, qu'il soit structural (**14**) ou séquentiel (**21**), n'est pas requis pour une bonne internalisation. Il est même intéressant de noter que la présence de résidus Trp de chaque côté du ruban (composés **19-21**) a permis d'augmenter sensiblement la pénétration intracellulaire.

Les composés comportant deux tryptophanes (**15** et **16**) ou un seul tryptophane (**17** et **18**) ont une capacité moindre à traverser la membrane plasmique. L'ensemble des résultats montrent que trois résidus Trp sont nécessaires pour obtenir des oligomères d'Agl-AA possédant une forte capacité à pénétrer dans les cellules. Ils indiquent également que le caractère amphipathique ainsi que la densité de charge n'a que peu d'impact sur l'efficacité de pénétration sur ce type de vecteurs.

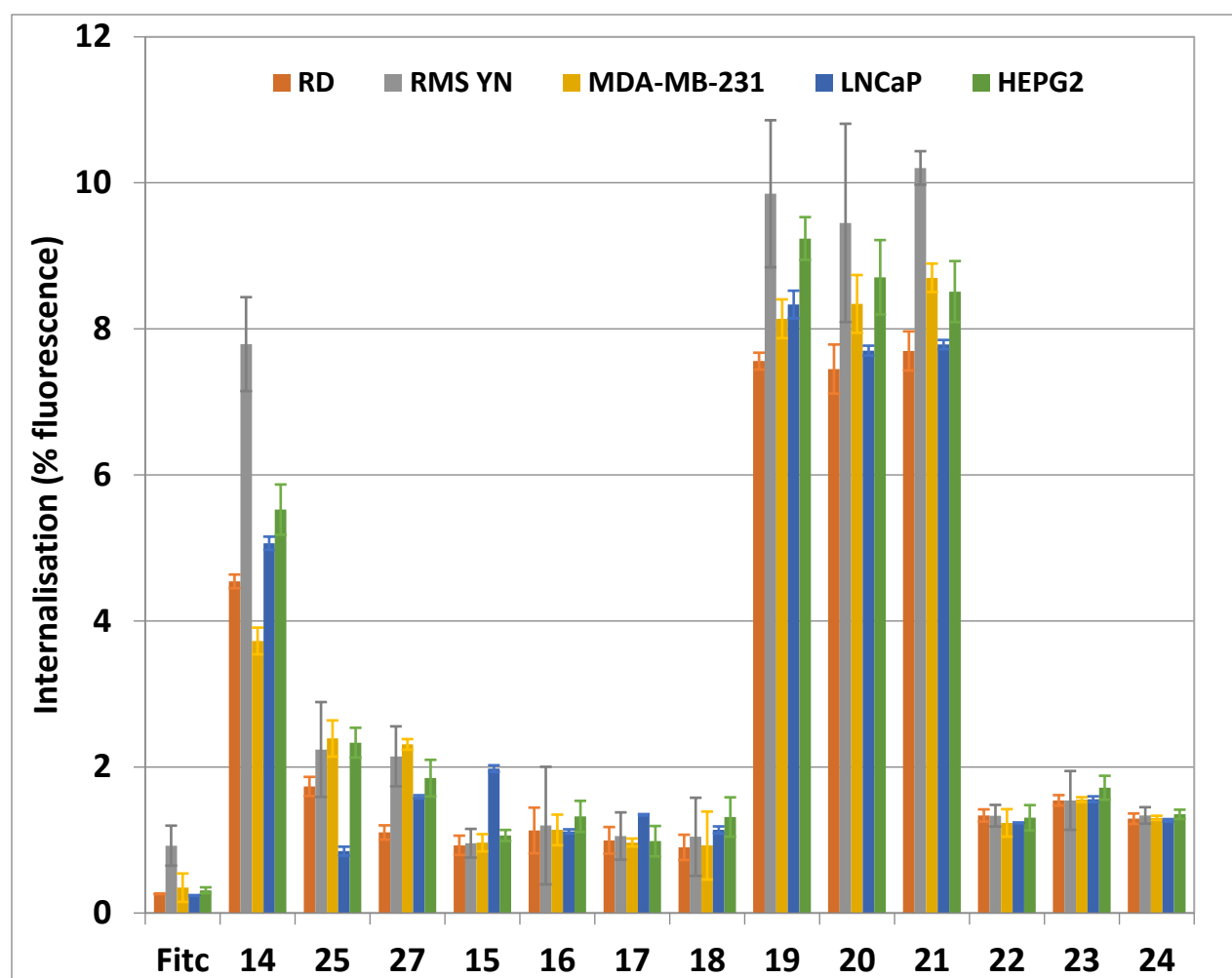


Figure 78 : Mesures de fluorescence totale des composés sur différentes lignées cellulaires

X. 7. Conclusion

Une étude antérieure à mes travaux de thèse a permis d'identifier une nouvelle classe de foldamères pénétrants. En particulier, l'oligomère d'Agl-AA alternant des résidus arginine et tryptophane, le composé **14** FI-Ahx-(Agl-Trp-Agl-Arg)₃-NH₂, s'est avéré très efficace pour pénétrer dans les cellules. Lors de mes travaux de thèse, nous avons pu déterminer par microscopie confocale que cet oligomère fluorescent, après internalisation, est localisé dans le cytoplasme. Nous avons ensuite démontré sa capacité à internaliser un cargo biologiquement actif dans le cytosol, ce qui en fait un vecteur intéressant pour viser des cibles présentes dans ce compartiment de la cellule. Nous avons aussi montré la forte résistance de ce composé à la dégradation par diverses protéases ainsi que dans le sérum humain, une propriété intéressante pour des applications *in vivo*. Enfin, l'étude des relations structure-activité a permis de montrer la nécessité d'au moins 3 résidus Trp pour l'internalisation de cette famille de foldamère dans les cellules. Des études préliminaires sur des lignées cellulaires de MDA-MB-231 à 37°C et 4°C laissent penser que l'internalisation de ces composés se fait par translocation directe, du moins en partie. En revanche, l'influence exacte de la disposition et de l'orientation spécifique des chaînes latérales nécessitent des études physico-chimiques plus approfondies afin de définir leurs importances pour l'internalisation de cette famille de composés. Des études plus poussées seront aussi nécessaires afin d'élucider le mode d'internalisation de cette famille de composés.

CHAPITRE IV : Etudes structurales

XI. Synthèse et étude structurale des oligomères d'Agl- β AA

XI. 1. Introduction

Lors de la thèse du Dr. Vincent Martin, il a été démontré au laboratoire que les oligomères d'Agl- α AA adoptent une structure en ruban composée d'une succession de mimes peptidiques de coudes β ¹¹⁵. Cette structure en ruban aussi appelée « β -bend ribbon » permet la projection des chaînes latérales des acides aminés sur deux plans opposés du ruban¹⁰⁵.

Dans ce contexte, la seconde partie de mon projet de thèse a été dédiée à la découverte de nouvelles structures originales incorporant de manière périodique le motif Agl. Pour cela, nous avons conservé l'unité Agl et remplacé les α -aminoacides par des β -aminoacides (Figure 79). En effet, comme évoqué dans la partie bibliographique, les peptides alternant des résidus α -aminoacides et β -aminoacides sont capables d'adopter des structures hélicoïdales stables avec peu de résidus, contrairement à l'hélice α qui nécessite au moins une quinzaine de résidus. Dans ce travail de thèse, nous souhaitons rajouter un méthylène supplémentaire par unité monomérique d'Agl- α AA afin de perturber localement la structure en coude β et par conséquent la structure en ruban, et étudier la possibilité de générer de nouvelles structures incorporant le motif Agl.

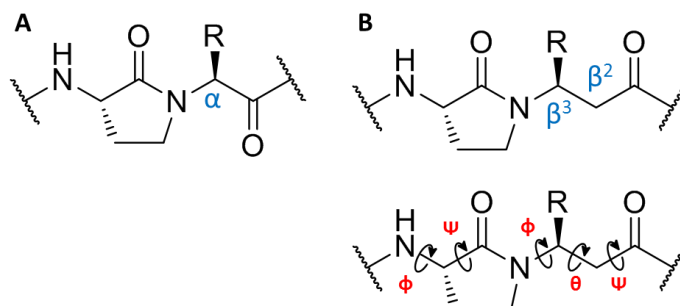


Figure 79 : Dipeptides Agl- α AA (A) et Agl- β AA avec ses angles dièdres associés

Nous avons synthétisé des oligomères poly-(Agl- β AA) alternant des résidus AgI et des acides β -aminés et étudié leurs structures en utilisant des techniques physico-chimiques variées : la résonance magnétique nucléaire (RMN), la cristallographie aux rayons X (RX), la spectroscopie infrarouge (IR) et le dichroïsme circulaire (CD). Les spectres RMN et CD ont été enregistrés au Laboratoire de Mesures Physiques (LMP), les études IR ont été menées en collaboration avec le Pr. Jean Louis Bantignies du Laboratoire Charles Coulomb (L2C) et les analyses cristallographiques ont été effectuées par les Drs. Dan Dumitrescu du synchrotron de Trieste (Sincrotrone Elettra Trieste, XRD2 beamline) et Arie Van der Lee de l'Institut Européen des Membranes (IEM) de l'université de Montpellier. Des calculs quantiques utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) effectuées par le Pr. Young Kee Kang de l'université de Chungbuk (Cheongju, Corée du Sud) ont permis de compléter ces études.

XI. 2. Synthèse des poly-(Agl- β AA)

Les oligomères d'Agl- β AA sont obtenus en suivant la même stratégie que celle décrite pour les oligomères d'Agl- α AA. Brièvement, les séquences peptidiques alternant des résidus méthionine avec des aminoacides homologués et substitués en position 3 (notés β -AA à la place de β^3 -hAA, pour faciliter l'écriture) sont synthétisés sur une résine PEG/PS (AmphiSpheres™) selon une stratégie Fmoc/tBu. Ces séquences peptidiques sont ensuite converties en oligomères d'Agl- β AA en utilisant les conditions optimisées (chapitre II), mais légèrement modifiées. En effet, la difficulté de multicyclisation de longues séquences et l'incapacité à en synthétiser certaines, en particulier celles contenant des résidus β Arg, nous ont contraint à changer de base. Ainsi, l'utilisation de la 1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene (TBD), plus puissante que le DBU²²¹, à 4% dans la NMP a permis d'obtenir ces oligomères (Figure 80). D'autre part, par souci d'économie de matière première, les acides β -aminés ont été couplés non pas par la méthode de couplage au Vortex décrite dans le chapitre II mais par irradiation microondes par des doubles couplages de 2 fois 30 minutes à 70°C avec 1,2 éq d'AA, 1,2 éq de DCC, 1,2 éq d'Oxymapure® et 3 éq de DiEA.

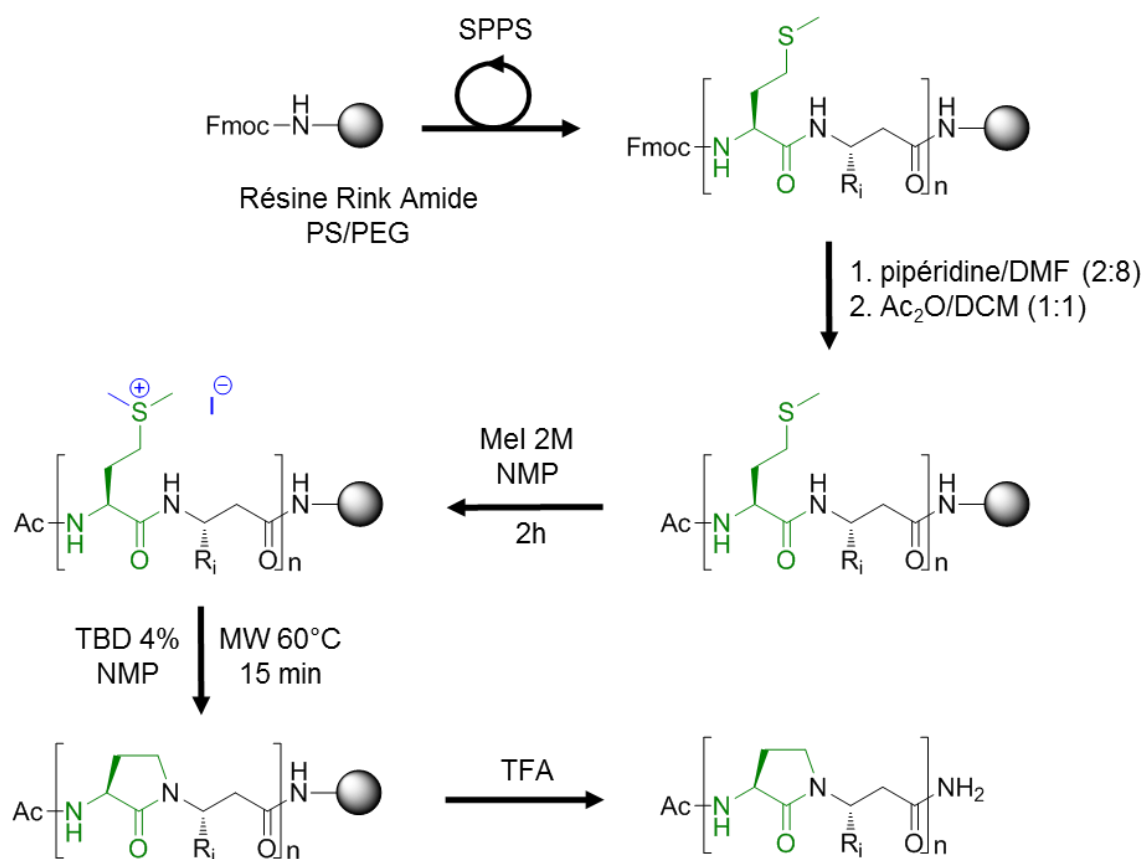


Figure 80 : Schéma de synthèse des poly-(Agl- β AA)

Cette stratégie de synthèse a permis d'obtenir des oligomères d'Agl- β AA de nature et de taille variées (Table 13). Une première série a été synthétisée en alternant des résidus aliphatiques avec des chaînes latérales courtes et aromatiques, le β -hAla et β -hPhe, respectivement. L'introduction de ce type de résidus permet de suivre facilement la formation et la pureté des composés par UV et facilite leur étude par RMN. Il est particulièrement intéressant de noter que cette première série d'oligomères est étonnamment soluble en milieu aqueux malgré des chaînes latérales exclusivement hydrophobes. D'autres séries d'oligomères avec différentes chaînes latérales lipophiles ont ensuite été synthétisées afin d'étudier les limites de solubilité de ces oligomères en milieu aqueux. Pour cette étude, nous avons choisi comme β -aminoacides hydrophobes, la β -hIle et le β Trp.

Table 13 : Composés poly-(Agl- β AA) synthétisés

Composé	Séquence
32	Ac-Agl- β Phe-Agl- β Ala-NH ₂
33	Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala) ₂ -NH ₂
34	Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala) ₃ -NH ₂
35	Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala) ₄ -NH ₂
36	Ac-Agl- β Ile-Agl- β Ala-NH ₂
37	Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ala) ₂ -NH ₂
38	Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ala) ₃ -NH ₂
39	Ac-Agl- β Ile-Agl- β Ile-NH ₂
40	Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ile) ₂ -NH ₂
41	Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ile) ₃ -NH ₂
42	Ac-Agl- β Trp-Agl- β Ala-NH ₂
43	Ac-(Agl- β Trp-Agl- β Ala) ₂ -NH ₂
44	Ac-(Agl- β Trp-Agl- β Ala) ₃ -NH ₂

XI. 3. Les techniques d'analyse spectroscopique

Afin de déterminer la structure tridimensionnelle des composés synthétisés, nous avons utilisé différentes techniques d'analyses spectroscopiques complémentaires dont le principe général, les avantages et limites sont décrites ci-dessous.

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN est une technique haute résolution qui permet d'obtenir des informations sur la nature et la structure des molécules en solution. L'étude RMN d'un composé se fait en solution concentrée de l'ordre du millimolaire et nécessite que le composé soit pur, monodisperse et stable. Cette technique repose sur les variations du moment magnétique de noyaux atomiques ayant un spin non nul (^1H , ^{13}C , ^{15}N etc...) lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique externe. Cette variation est influencée par les atomes environnants, ce qui permet de mettre en évidence des interactions chimiques (couplage scalaire) ou spatiales (couplage dipolaire ou effet nucléaire Overhauser). Nous avons déterminé les déplacements chimiques ^1H , ^{13}C , ^{15}N des oligomères combinant des expériences bidimensionnelles COSY, TOCSY et ROESY ou NOESY. Les corrélations observées sur les spectres COSY (CORrelation SpectroscopY) sont issues d'interactions entre atomes directement reliés par une liaison covalente tandis que les expériences TOCSY (TOtaly CORrelated SpectroscopY) permettent l'identification de réseaux interconnectés de couplage de spins. Ainsi, ces deux expériences combinées permettent l'attribution des déplacements chimiques des protons des acides aminés. Néanmoins, l'attribution séquentielle des acides aminés n'est possible que par l'acquisition des spectres ROESY (Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY) ou NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY). Lors des expériences ROESY/NOESY, il y a des couplages dipolaires entre atomes spatialement rapprochés de moins de 5 Å basés sur l'effet nucléaire Overhauser (NOE) peu importe s'ils sont liés ou non de manière covalente. Sur les spectres, l'intensité des corrélations NOE est proportionnelle en $1/r^6$ à la distance entre les protons. Des contraintes de distances peuvent ainsi être collectées et introduites lors de calculs de dynamique moléculaire afin de déterminer la structure tridimensionnelle du composé étudié. On considère comme représentatif le panel des 10 à 20 structures de plus basses énergies. Elles peuvent ensuite être optimisées par des méthodes quantiques basées sur la DFT.

D'autres observables peuvent également être utilisées pour décrire la préférence conformationnelle de nos oligomères comme les constantes de couplages $^3J(\text{HNH}\alpha)$ et les

coefficients de température. Les valeurs de constantes de couplage $^3J(\text{HNH}\alpha)$ permettent d'obtenir des plages de valeurs pour les angles dièdres ϕ du squelette. Si $^3J(\text{HNH}\alpha) < 6$ Hz, la valeur de ϕ se situe aux alentours de -60° et si $^3J(\text{HNH}\alpha) > 8$ Hz, $\phi \sim -120^\circ$. Plusieurs conformations sont possibles pour des valeurs de $^3J(\text{HNH}\alpha)$ entre 6 et 8 Hz et la valeur de ϕ ne peut être déterminée. Des expériences à températures variables dans le DMSO- d_6 et en milieu aqueux permettent d'obtenir des informations sur la présence ou non de liaisons hydrogène. En effet, des coefficients de température des protons amides inférieures à 5 ppb/K coïncident typiquement avec la présence de liaisons hydrogène. Il faut néanmoins être prudent avec leurs interprétations car l'orientation de cycles aromatiques dont l'orientation varie avec la température à proximité des protons amides peut influencer ces valeurs de coefficients de température.

La RMN est une technique qui permet d'obtenir de nombreuses informations sur la conformation et la dynamique d'une molécule en solution. Ainsi, couplée avec des calculs de dynamique moléculaire et de DFT, on peut calculer des structures 3D représentatives. Néanmoins, cette technique est consommatrice de produit, les acquisitions et les analyses sont relativement longues. De plus, certaines molécules sont peu solubles ou présentent de nombreuses superpositions de signaux, ce qui empêche leur étude complète par RMN. La flexibilité intrinsèque de certains oligomères et la présence de conformations multiples peut également conduire à une perte d'information et à une moyenne des NOE biaisant les contraintes de distance introduites dans les calculs de dynamique moléculaire.

La diffraction des rayons RX (DRX)

La diffraction des rayons X est un outil d'analyse structurale utilisé pour identifier la nature et la structure des produits cristallisés. Elle peut ainsi être utilisée pour étudier les conformations spatiales à l'état solide de petites molécules ou d'oligomères artificiels jusqu'à la résolution structurale de larges macromolécules biologiques comme les acides nucléiques et les protéines.

Si la DRX permet d'obtenir des structures tridimensionnelles de larges systèmes avec une haute résolution, la molécule étudiée est soumise à des forces d'empilement et de cohésion dans un cristal qui peuvent stabiliser une conformation différente de celle observée en solution. De plus, cette technique dépend de la capacité des molécules à former des monocristaux de bonne qualité et suffisamment gros pour diffracter correctement le rayonnement. De nombreux essais sont nécessaires en variant les méthodes et les conditions,

ce qui demande une quantité importante de produit. Les différents solvants et méthodes que nous avons utilisés pour obtenir des cristaux sont décrits plus loin dans mon manuscrit.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)

La spectroscopie d'absorption infrarouge dans le domaine des excitations des modes des vibrations intramoléculaires ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) est couramment appelée spectroscopie moyen infrarouge en référence au domaine spectral sondé (MIR). Elle donne lieu à un phénomène de résonance où l'absorption du rayonnement d'énergie E_i correspond à une transition entre deux états vibrationnelles pour un mode de vibration donné. Les spectres infrarouges sont représentés en fonction des nombres d'onde (inverse de la longueur d'onde du rayonnement) directement proportionnels à la fréquence du rayonnement donc à son énergie. Les positions des bandes de vibration dépendent des constances de forces des liaisons chimiques et sont affectés par les interactions avec leur environnement. Les positions caractéristiques des modes des vibrations internes des molécules organiques sont bien documentées et permettent le plus souvent une identification des groupes fonctionnels impliqués dans les vibrations des molécules organiques étudiées. Expérimentalement, l'étude IR-TF des molécules en solution est limitée par le choix des solvants qui ne doivent pas présenter de bandes d'absorption significatives dans les domaines où les vibrations des composés étudiés apparaissent.

L'IR peut être utilisé afin d'étudier les structures secondaires et la stabilité des liaisons hydrogène des peptides et protéines. Les principales bandes d'absorption sont dues aux modes de vibration des groupements amides du squelette peptidique. Les amides A, I, II et III permettent de mettre en évidence l'existence de liaisons hydrogène inter- ou intramoléculaires et d'identifier des structures secondaires canoniques^{222,223}. L'utilisation de l'IR pour l'étude de la conformation d'oligomères artificiels permet de confirmer la présence de liaisons hydrogène et d'étudier leur stabilité. Voici les différentes régions d'intérêt des spectres IR des peptides, protéines et foldamères peptidiques.

On observe les bandes des amides A entre 3200 et 3500 cm^{-1} . Elles correspondent à l'élongation de la liaison NH, $\nu(\text{NH})$. Ce mode de vibration ne dépend pas de la conformation du squelette mais il est très sensible à la présence de liaisons hydrogène. Les NH libres ont des fréquences de vibration typiquement vers $3450\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$. Lorsque les NH sont engagés dans des liaisons hydrogène intramoléculaires, la bande d'absorption se déplace vers des fréquences plus basses, (typiquement autour de 3300 cm^{-1}). La fréquence et la largeur de la

bande donne des indications sur la force moyenne et la dispersion des interactions par liaisons hydrogène dans le système étudié.

Les bandes amide I sont observées entre 1800 et 1600 cm^{-1} . Elles correspondent en première approximation à l'élongation de la liaison C=O ($\nu(\text{CO})$) couplée aux élongations C-N et C-(C-N). La fréquence des amides I (appelés $\nu(\text{CO})$ amidiques par la suite) de ce mode de vibration est influencée par la conformation du squelette ainsi que le réseau de liaison hydrogène. Comme pour la bande amide A, les interactions par liaisons hydrogène engendrent un ramollissement du mode de vibration vers les basses fréquences par rapport aux molécules libres.

Les bandes amide II sont observées entre 1575 et 1480 cm^{-1} . Ces modes sont associées à l'élongation de la liaison C-N ainsi que la torsion de la liaison N-H (on utilisera la dénomination $\delta(\text{N-H})$ amidiques par la suite). Pour cette bande, les interactions par liaisons hydrogène entraînent un durcissement vers les hautes fréquences. Avec la bande amide I, elles constituent un moyen quantitatif de caractériser la force moyenne des liaisons hydrogène entre NH et CO.

Les bandes amide III sont observées entre 1350 et 1200 cm^{-1} . Il s'agit d'une bande complexe, moins intense, mais très sensible à la structure secondaire. Ces bandes sont relativement fines et éclatées, et permettent l'estimation de structure secondaire des protéines.²²⁴

Nous avons rencontré des difficultés pour attribuer les différentes bandes d'absorption IR des oligomères car la dynamique vibrationnelle de ces composés dans le MIR est riche et complexe. La comparaison de nos spectres avec ceux de composés modèles plus simples s'avère délicate (structures parfois non transposables, synthèse chronophage...). En conséquence, nous avons décidé de coupler notre étude expérimentale avec des calculs *ab initio* des spectres IR des molécules. On notera que les structures moléculaires sont obtenues à partir de données DRX sur les systèmes cristallisés et par RMN en solution. Un avantage significatif de la spectroscopie IR est le peu de produit nécessaire aux analyses (de 1 à 3 mg de produit par mesure). En résumé, cette spectroscopie permet d'avoir des informations directes sur la présence et la force des liaisons hydrogène et, par conséquent, sur la stabilité relative des oligomères qu'il est judicieux de coupler avec des expériences RMN d'échange HD ou à des études par dichroïsme circulaire.

Le dichroïsme circulaire (CD)

Le dichroïsme circulaire est une technique spectroscopique qui permet d'enregistrer des signatures caractéristiques de molécules optiquement actives. Soumis à un faisceau de lumière circulairement polarisée, les composés absorbent de manière inégale les composantes gauche ou droite qui polarise le faisceau. Cette capacité apparaît pour toute molécule chirale, ainsi un mélange racémique présente un signal nul. Le CD est particulièrement utilisé pour l'étude de la conformation des macromolécules biologiques en solution dont l'étude des structures secondaires des peptides et protéines. En effet, les hélices α , feuillets β , hélices polyproline et même l'absence de structure (*random coil*) donnent des signatures caractéristiques. Il est possible de déconvoluer le spectre d'une protéine et de déterminer le pourcentage de chaque type de structure secondaire qui la compose.

Cependant, l'interprétation des spectres CD de pseudopeptides ou foldamères est plus délicate. En effet, les spectres sont atypiques. Il est possible que des composés de familles différentes partagent une signature comparable malgré des structures différentes et inversement des structures très proches peuvent avoir des profils différents. De plus, certains acides aminés non naturels possèdent des chromophores qui masquent les transitions électroniques de la liaison peptidique. Le CD ne permet donc pas de déterminer le type de structure secondaire adopté par les oligomères. Néanmoins, elle constitue une méthode rapide et peu consommatrice pour comparer les signatures au sein d'une même famille de composés et évaluer leur stabilité relative dans différents solvants et à différentes températures. Il faut noter que les solvants transparents utilisables pour des études CD sont typiquement les alcools, l'acétonitrile et les milieux aqueux (la concentration en ion Cl^- doit rester raisonnable). On ne peut utiliser ni le CHCl_3 , ni le DMSO.

XI. 4. Les séquences AgI- β (Phe/Ala).

Structure cristallographique de l'oligomère 34 d'Agl- β (Phe/Ala)

Nous avons tout d'abord synthétisé des séquences AgI- β (Phe/Ala) de différentes tailles comme séquences modèles afin d'étudier la préférence conformationnelle des oligomères AgI- β AA. Nous avons fait des essais de cristallisation en utilisant différents solvants, seuls ou en mélange, par évaporation lente. Différentes températures d'évaporation ont été testées sur les différents composés. Nous n'avons à ce jour obtenu des cristaux exploitables que pour le composé **34** (Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala)₃-NH₂) par évaporation lente du méthanol à 4°C. La structure à l'état solide de ce composé a pu être déterminée et nous offre une information précieuse sur le type de structure secondaire adoptée par cette famille de composés. La superposition des deux structures présentes dans la maille cristalline est présentée ci-dessous (Figure 81).

Le composé **34** se replie en hélice gauche stabilisée par des liaisons hydrogène formant des pseudocycles C₁₂ (Figure 82). Les liaisons hydrogène entre les C=O(i) et HN(i-2) stabilisant la structure du composé **34** ont toutes sensiblement la même longueur avec une valeur moyenne de $2,0 \pm 0,1$ Å. Elles sont toutes orientées de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale générant un macrodipôle. Les carbonyles des résidus AgI engagés dans des liaisons hydrogène pointent vers l'intérieur de l'hélice alors que les carbonyles des β AA pointent vers l'extérieur (Figure 81B). Les deux structures dans la même unité asymétrique sont similaires, seul l'extrémité C-terminale varie. L'hélice est légèrement courbée et possède un pas moyen de 6 Å avec deux motifs dipeptidiques AgI- β AA par tour d'hélice. Les chaînes latérales sont en alternance de chaque côté de l'hélice et sont espacées de 5 Å sur une des faces de l'hélice (les résidus β Ala) et de 7 Å sur l'autre face (résidus β Phe) (Figure 81A). Cette hélice n'est pas cylindrique, la représentation axiale révèle une forme ovale. Un rayon de 3 Å sépare les faces avec les AgI tandis qu'une distance de 6 Å sépare les faces composées de β AA (Figure 81D).

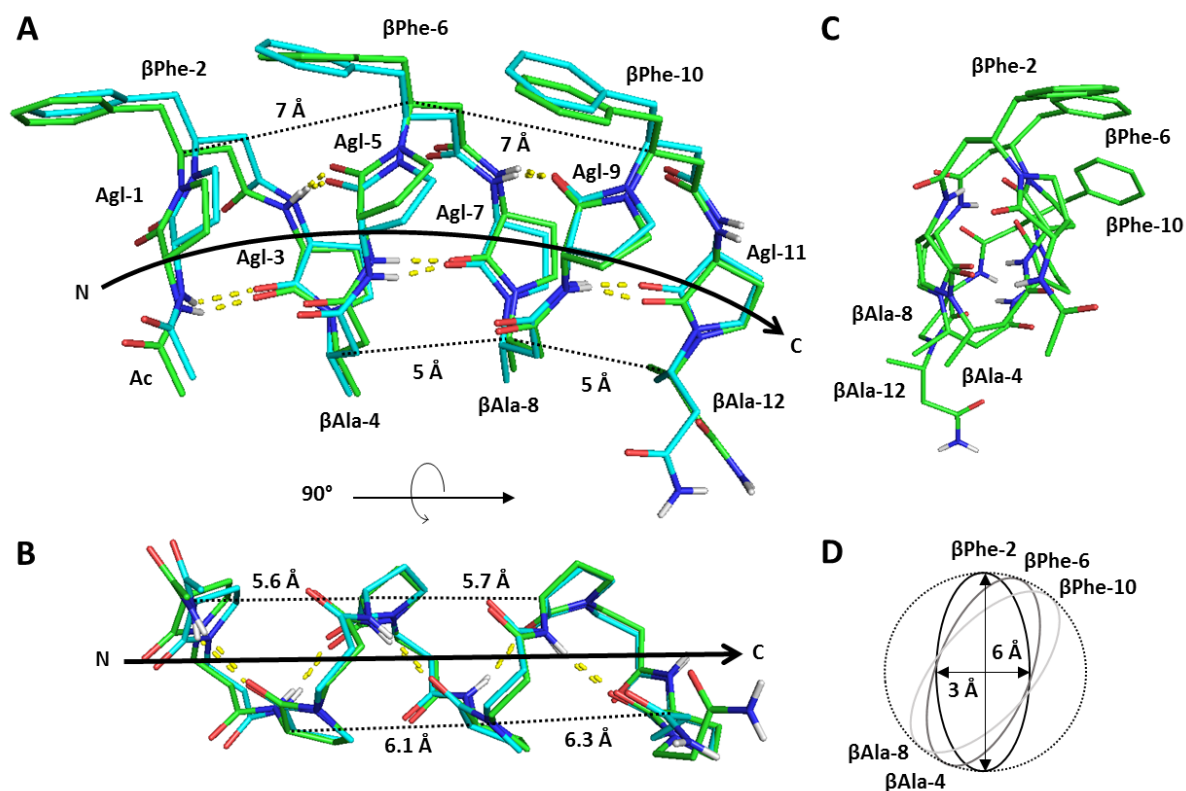


Figure 81 : (A) Superposition des deux structures cristallines du composé **34** dans la maille cristalline. Les atomes d'hydrogène non polaires ne sont pas affichés par souci de clarté. L'axe de l'hélice est représenté par une flèche noire et différentes distances illustrées en pointillé. (B) Vue latérale après rotation de 90°. Les chaînes latérales des β AA ont été omises pour plus de clarté. (C) Représentation axiale de l'hélice. (D) Représentation axiale de la forme ovale de l'hélice.

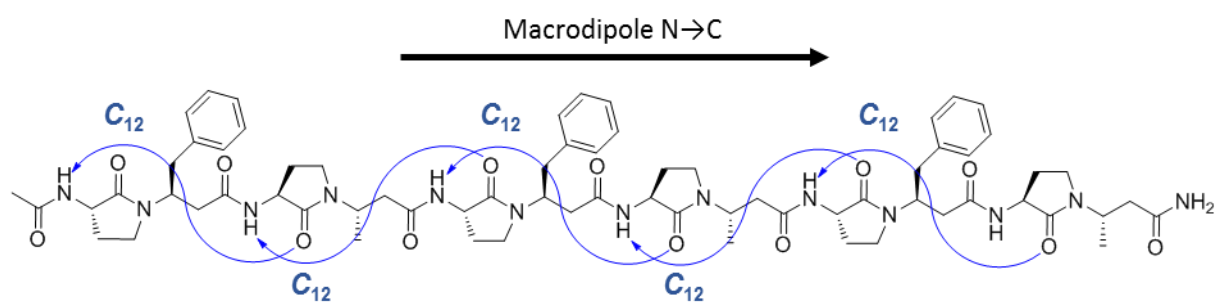


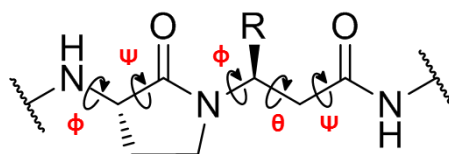
Figure 82 : Réseau de liaisons hydrogène stabilisant l'hélice C_{12}

Les moyennes des valeurs des angles de torsion du squelette sont reportées dans le tableau ci-dessous (Table 14). Les valeurs des angles du résidu βAla 12 à l'extrémité C-terminale de l'oligomère **34** dévient significativement et n'ont pas été pris en compte pour le calcul des valeurs moyennes. On remarque des variations entre les valeurs moyennes des angles dièdres des dipeptides Agl-βPhe et Agl-βAla. La déviation majeure concerne les valeurs de l'angle ϕ des résidus Agl ($-97 \pm 3^\circ$ et $-138 \pm 13^\circ$ pour les dipeptides Agl-βPhe et Agl-βAla, respectivement). Cette différence est responsable de la courbure globale de l'hélice.

Table 14 : Angles dièdres moyens et déviations (entre parenthèses) des 2 structures cristalline du composé **34**.

Motif	Résidus	ϕ (°)	θ (°)	ψ (°)
Agl-βPhe	Agl	-138(13)		-118(16)
	βPhe	-123(8)	61(1)	-122(5)
Agl-βAla	Agl	-97(3)		-141(4)
	βAla*	-104(2)	58(1)	-107(6)

*β³Ala 12 non compris



Nous avons ensuite étudié la conformation des oligomères d'Agl-β(Phe/Ala) par RMN afin de vérifier si cette structure est stable en solution et s'il y a des variations conformationnelles entre les états solide et liquide.

Etude RMN des oligomères d'Agl- β (Phe/Ala)

Les spectres RMN ^1H , COSY, TOCSY, ROESY/NOESY des composés **32-34** ont été enregistrés dans le DMSO- d_6 , le méthanol- d_3 et le tampon phosphate à pH 6.8. Dans la plupart des cas, nous avons obtenu des spectres de bonnes qualités avec des raies fines et des résonances relativement éclatées.

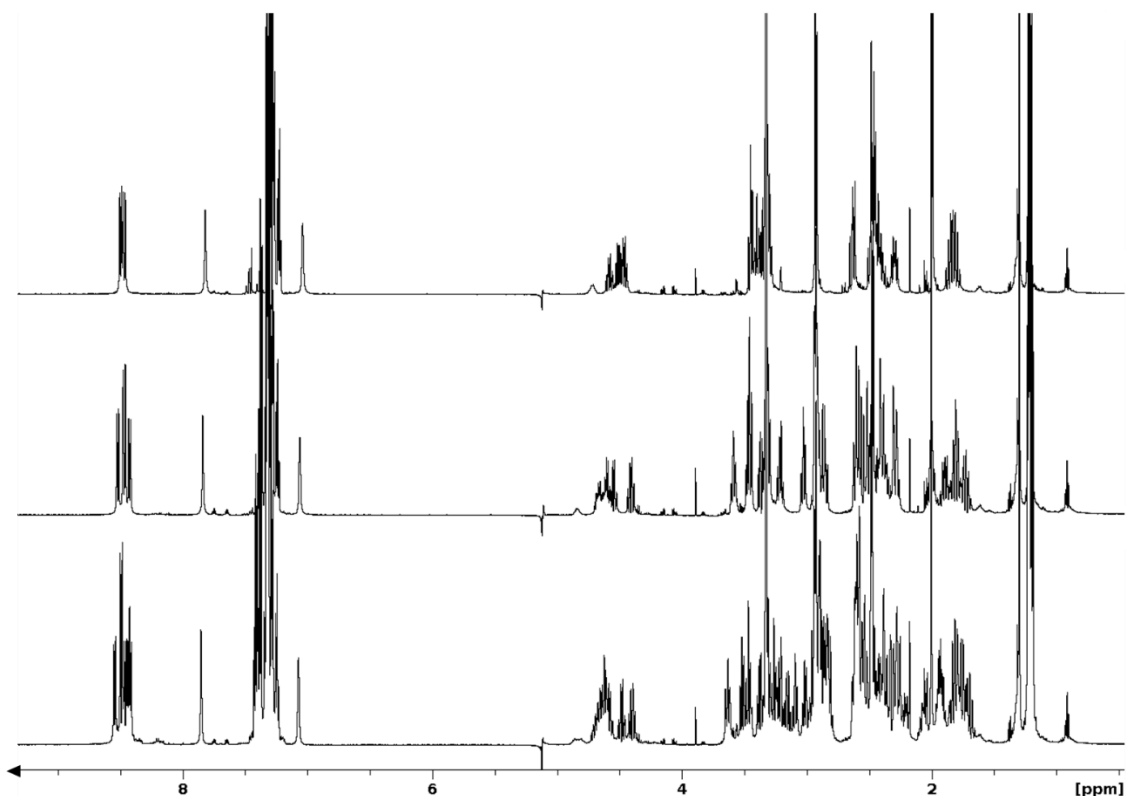


Figure 83 : Spectres RMN dans le méthanol- d_3 des composés **32** (en haut), **33** (au milieu) et **34** (en bas) à 273 K.

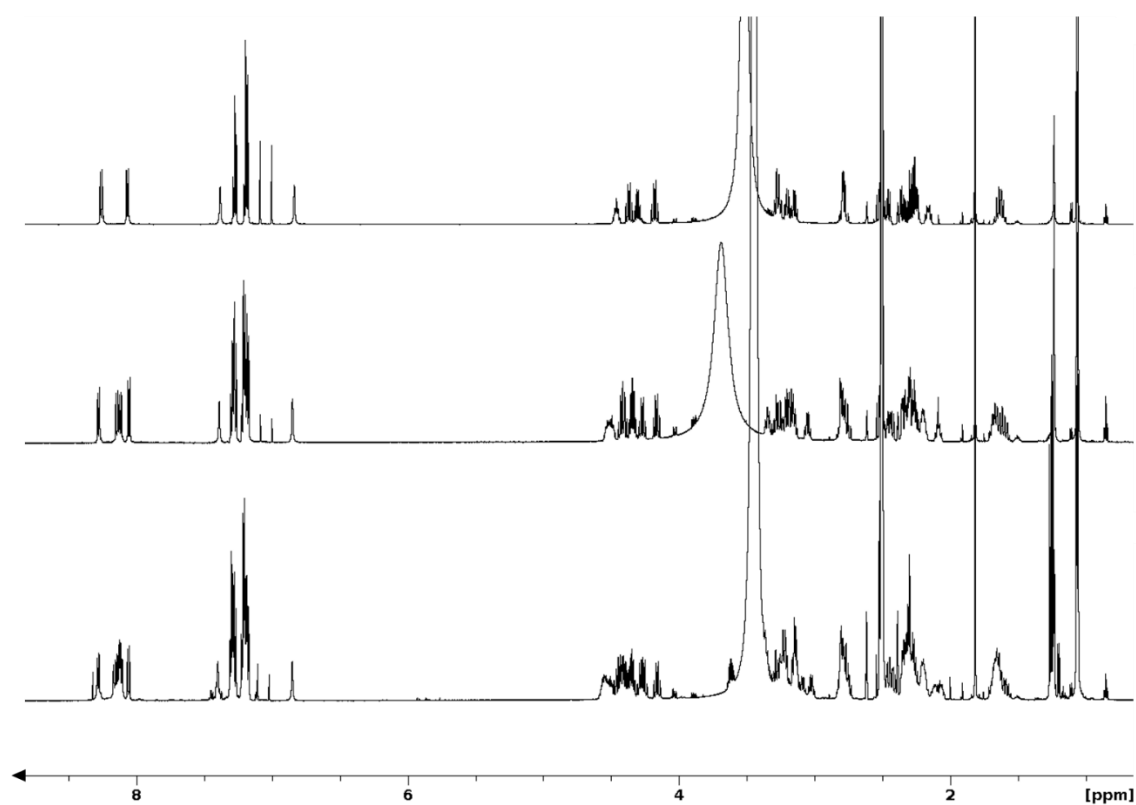


Figure 84 : Spectres RMN dans le DMSO- d_6 des composés **32** (en haut), **33** (au milieu) et **34** (en bas) à 293 K.

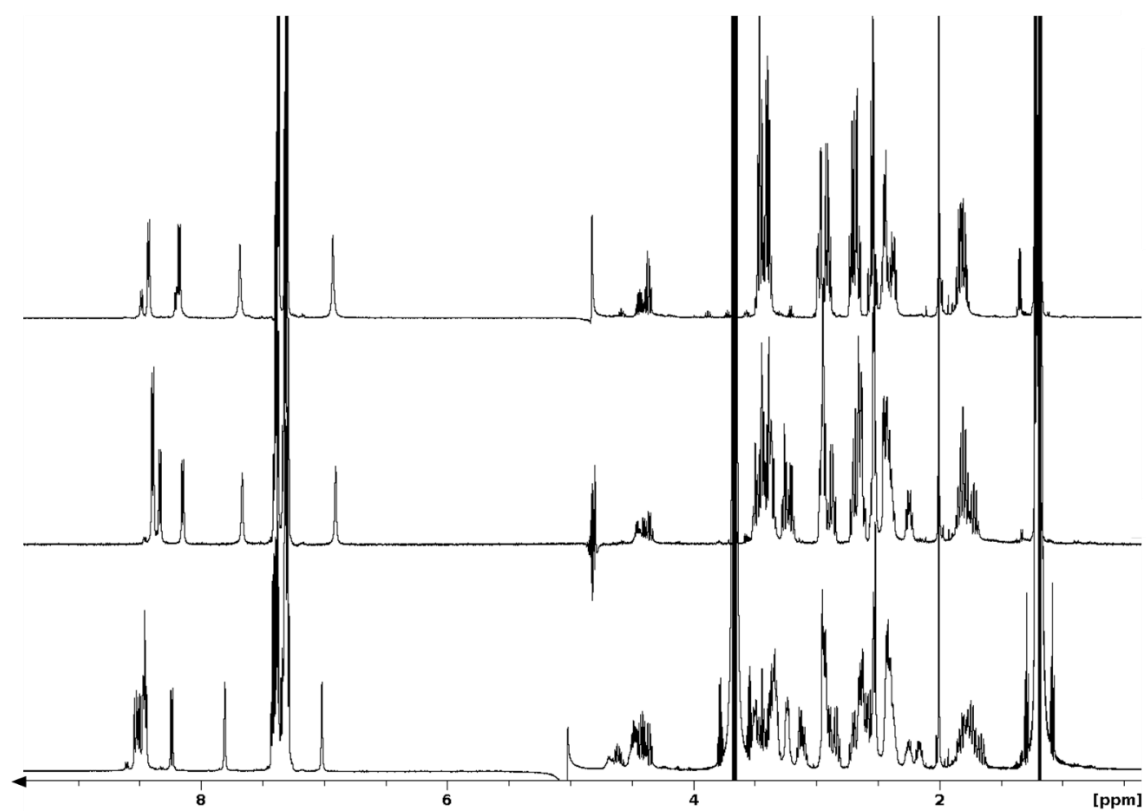


Figure 85 : Spectres RMN dans le tampon phosphate pH 6.4 des composés **32** (en haut), **33** (au milieu) et **34** (en bas) à 298 K.

Nous avons pu attribuer les déplacements chimiques ^1H , ^{13}C et ^{15}N de tous les oligomères malgré une forte superposition des signaux RMN de l'oligomère **34** dans le tampon phosphate qui complique significativement l'attribution de ses déplacements chimiques. Nous avons attribué stéréospécifiquement les protons diastéréotopiques des méthylènes des cycles lactames. Les corrélations NOE observés sur les spectres ROESY/NOESY sont similaires dans les trois solvants et sont compatibles avec la structure hélicoïdale observée à l'état solide. Ceci suggère que les composés AgI- β (Phe/Ala) adoptent aussi une hélice 12 dans le DMSO- d_6 , le méthanol- d_3 et le tampon phosphate. Nous avons identifié un set de NOE non ambiguës caractéristiques : HN(i)-H γ / γ' (i-2), HN(i)-H β' (i-2), HN(i)-H β' (i-4) et H α (i)-H β' (i-4).

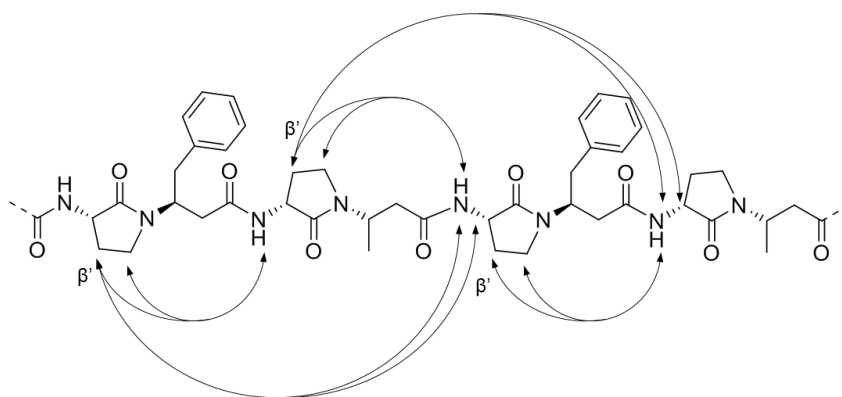


Figure 86 : Corrélations NOE non séquentielles caractéristiques dans les différents solvants à pH 6.4 des oligomères d'AgI- β (Phe/Ala)

Les constantes de couplage $^3\text{J}(\text{HNH}\alpha)$ des résidus AgI sont comparables dans les différents solvants avec des valeurs autour de 9 Hz qui coïncident avec les valeurs de ϕ des AgI aux alentours de -120° en adéquation avec celles mesurées dans la structure cristallographique (Table 15, Table 16 et Table 17). On pourrait s'attendre à des variations systématiques suivant le type de dipeptides comme les valeurs des angles ϕ entre les dipeptides AgI- β Phe et AgI- β Ala sont différentes or ce n'est pas le cas. Ces valeurs sont relativement plus faibles dans le DMSO- d_6 , ce qui pourrait indiquer une plus faible stabilité dans ce solvant. Nous avons également mesuré des valeurs globalement plus faibles pour le composé **32** (Ac-AgI- β Phe-AgI- β Ala-NH $_2$) et pour les résidus AgI aux extrémités des autres séquences. Ces valeurs plus faibles coïncident avec une flexibilité accrue du composé **32** et des extrémités des oligomères plus longs.

Table 15 : Constantes de couplage $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ des résidus Agl des composés **32**, **33** et **34** dans le méthanol- d_3 .

Résidu	32	33	34
Agl.1	8.5	9.2	9.2
Agl.3	8.9	9.2	9.4
Agl.5	-	9.3	9.5
Agl.7	-	8.9	9.6
Agl.9	-	-	9.3
Agl.11	-	-	9.1

Table 16 : Constantes de couplage $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ des résidus Agl des composés **32**, **33** et **34** dans le DMSO- d_6 .

Résidu	32	33	34
Agl.1	8.3	8.5	8.7
Agl.3	8.4	8.7	8.8
Agl.5	-	8.7	8.8
Agl.7	-	8.5	8.5
Agl.9	-	-	8.8
Agl.11	-	-	8.9

Table 17 : Constantes de couplage $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ des résidus Agl des composés **32**, **33** et **34** dans le tampon phosphate pH 6.4.

Résidu	32	33	34
Agl.1	8.8	9.3	9.4
Agl.3	8.4	9.2	9.0
Agl.5	-	9.2	9.9
Agl.7	-	8.8	9.2
Agl.9	-	-	8.6
Agl.11	-	-	8.7

Nous avons collecté des jeux de NOE complets pour les composés **32-34** dans le méthanol- d_3 mais aussi dans le DMSO- d_6 et le tampon phosphate à pH 6.8 pour le composé **33**. Ces corrélations ont été converties en contraintes de distance afin d'être introduites lors de calculs de dynamique moléculaire. Les calculs sur l'oligomère **32** le plus court n'ont pas convergés, dû probablement à un nombre limité de NOE et une trop grande flexibilité de cet oligomère. Plusieurs conformations peuvent satisfaire le jeu de contraintes de distance correspondant. Lors d'une recherche conformationnelle utilisant la méthode de *Monte Carlo* sur le composé **32** associé à une optimisation par DFT (SMD M06-2X/6-31G*) nous avons trouvé trois conformères de basses énergies dont deux sont des coudes C_{12} comparables tandis que le troisième est un coude stabilisé par une liaison hydrogène formant un pseudocycle C_{16} (Figure 87).

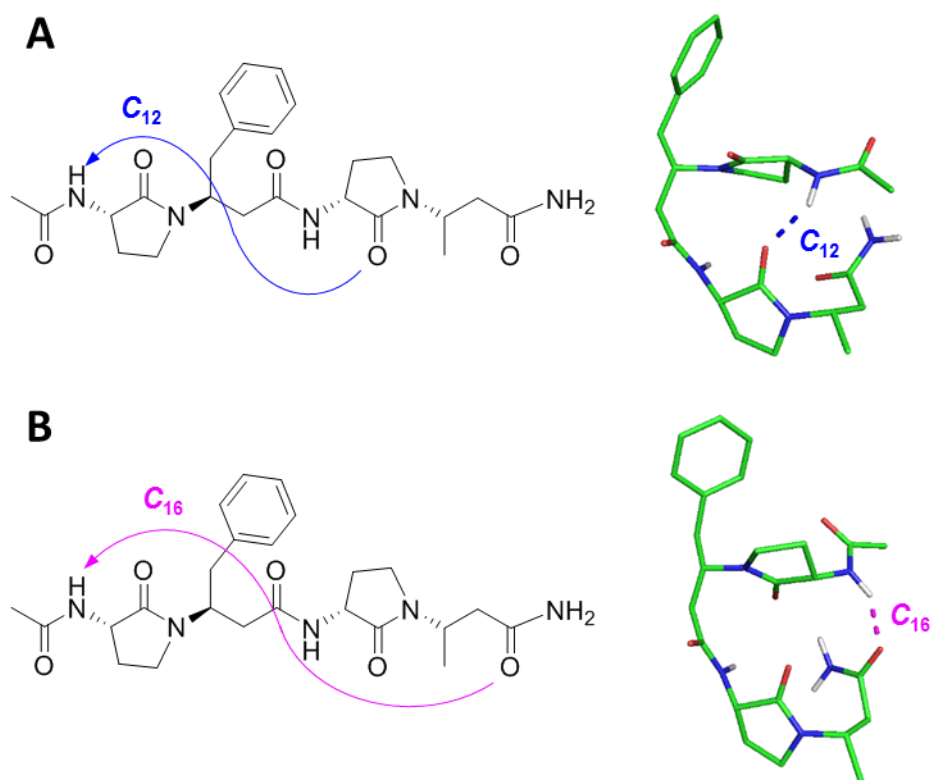


Figure 87 : Conformère C_{12} (A) et C_{16} (B) observés pour le composé **32** en solution.

Les calculs pour les oligomères **33**, dans les trois solvants, et pour l'oligomère **34** dans le méthanol- d_3 et le DMSO ont convergés. Les déplacements chimiques pour le composé **34** dans le NaP n'était pas suffisamment éclatés pour une attribution des signaux NOE de manière non ambiguë et n'as pas permis d'obtenir une bonne convergence des structures par calculs de dynamique moléculaire dans ce solvant. Les 20 structures de plus basse énergie pour chacun des composés et dans les différentes conditions sont superposées sur la Figure 88, ci-dessous.

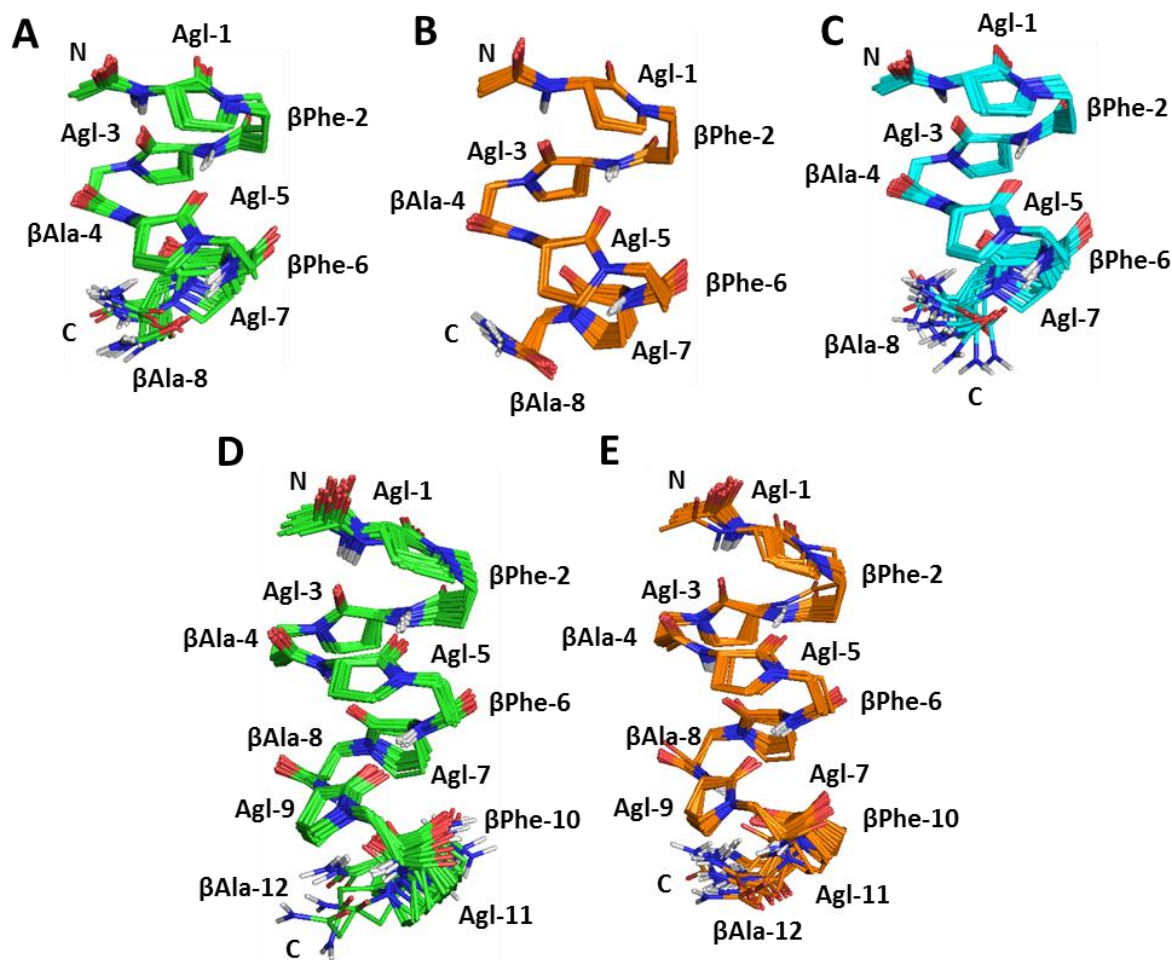


Figure 88 : Superposition des 20 structures RMN de l'oligomère **33** dans le méthanol- d_3 (A), le DMSO- d_6 (B) et le tampon phosphate pH 6.4 (C) ainsi que le composé **34** dans le méthanol- d_3 (D) et le DMSO- d_6 (E).

Les structures sont parfaitement superposables, avec des écarts quadratiques moyens (RMSD, *root mean square deviation*) très faibles (Table 18). Les RMSD sont inférieurs à 0,3 Å quand on considère les atomes lourds du squelette des oligomères en excluant les résidus aux extrémités.

Table 18 : RMSD des 20 structures RMN de plus basses énergies du composé **33** dans le méthanol- d_3 , le DMSO- d_6 et le NaP, ainsi que le composé **34** dans le méthanol- d_3 et le DMSO- d_6 .

Composé	33			34	
Solvent	CD ₃ OH	DMSO	NaP	CD ₃ OH	DMSO
All atoms	1.166	0.643	0.919	1.092	0.795
All atoms ^a	1.193	0.690	0.815	0.986	0.781
Heavy atoms	0.951	0.417	0.699	0.886	0.589
Heavy atoms ^a	0.931	0.465	0.560	0.762	0.545
Backbone heavy atoms	0.478	0.127	0.556	0.653	0.396
Backbone heavy atoms ^a	0.164	0.092	0.148	0.232	0.180

^aPremier et dernier résidus non compris

Les oligomères d'Agl-β(Phe/Ala) adoptent en solution une hélice 12 comme celle observée par DRX dans les trois solvants étudiés. Il est intéressant de souligner que cette structure est stable dans le méthanol mais également dans un solvant chaotropique comme le DMSO et en milieu aqueux. Cette dernière propriété est particulièrement importante afin d'envisager des applications biologiques pour ce type de foldamères.

La meilleure structure RMN du composé **33** dans les trois solvants a ensuite été optimisée par DFT par la méthode SMD M06-2X/6-31G. Après optimisation, les structures restent semblables avec seulement de légères variations qui n'impactent pas la structure globale de la molécule (Figure 89).

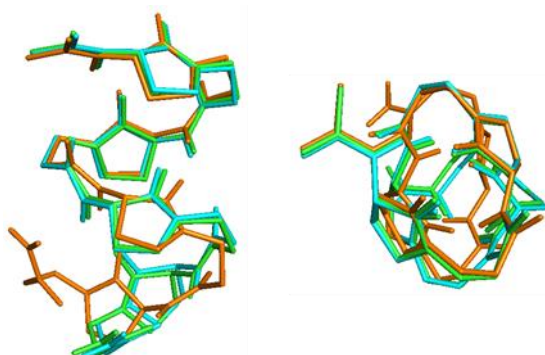


Figure 89 : Superposition des structures optimisées par DFT du composé **33** dans le DMSO- d_6 (orange), le méthanol- d_3 (vert) et le tampon phosphate pH 6.4 (cyan) en vue latérale (à gauche) et axiale (à droite).

Les RMSD des structures dans les trois solvants, optimisées par DFT est de 0,354 Å quand on considère les atomes lourds du squelette des oligomères en excluant le dernier résidu (Table 19). Cette valeur relativement faible illustre la bonne superposition des structures calculées dans les différents solvants.

Table 19 : RMSD des structures du composé **33** après optimisation par DFT dans chaque solvant (DMSO- d_6 , méthanol- d_3 et NaP).

Atoms considered	RMSD
All atoms	0.974
All atoms ^a	0.949
Heavy atoms	0.773
Heavy atoms ^a	0.719
Backbone heavy atoms	0.544
Backbone heavy atoms ^a	0.354

^aPremier et dernier résidus non compris

Malgré des structures comparables à l'état solide et en solution, on note dans certaines structures RMN dont celles de plus basses énergies dans le méthanol- d_3 et le tampon phosphate pH 6.4, une liaison hydrogène additionnelle formant un pseudocycle en C₉ à l'extrémité C-terminale, impliquant le CO de l'homo- β^3 Ala 8 et le HN de l'Agl 7. La présence de cette liaison hydrogène explique la différence de conformation de l'extrémité C-terminale après optimisation par DFT entre les structures dans le méthanol- d_3 et le tampon phosphate par rapport au DMSO- d_6 . Néanmoins, cette liaison hydrogène est peu représentative avec des occurrences de 11/20 et 7/20 structures à l'issue des calculs sous contraintes RMN dans le méthanol- d_3 et le tampon phosphate, respectivement. La présence de cette dernière reste à être démontrée de manière expérimentale par des expériences RMN d'échange H/D par exemple.

Lors de l'optimisation par DFT de l'hélice 12 dans le tampon phosphate, on a observé une légère rotation de l'angle dièdre ϕ du résidu Agl 5 qui induit la formation d'une liaison hydrogène bidentate formant une C_{12/16} au centre de la séquence (Figure 90). Malgré cela, les valeurs des angles dièdres sont périodiques tout au long des structures en solution et non fonction du type de dipeptide comme observée dans les structures à l'état solide. (Table 20). L'hélice d'Agl- β (Phe/Ala) calculée à partir de dynamique sous contraintes RMN et optimisée par DFT est par conséquent droite contrairement à l'hélice courbée observée à l'état solide. La distance entre les chaînes latérales d'une même face est d'environ de 6 Å (distance entre les C α).

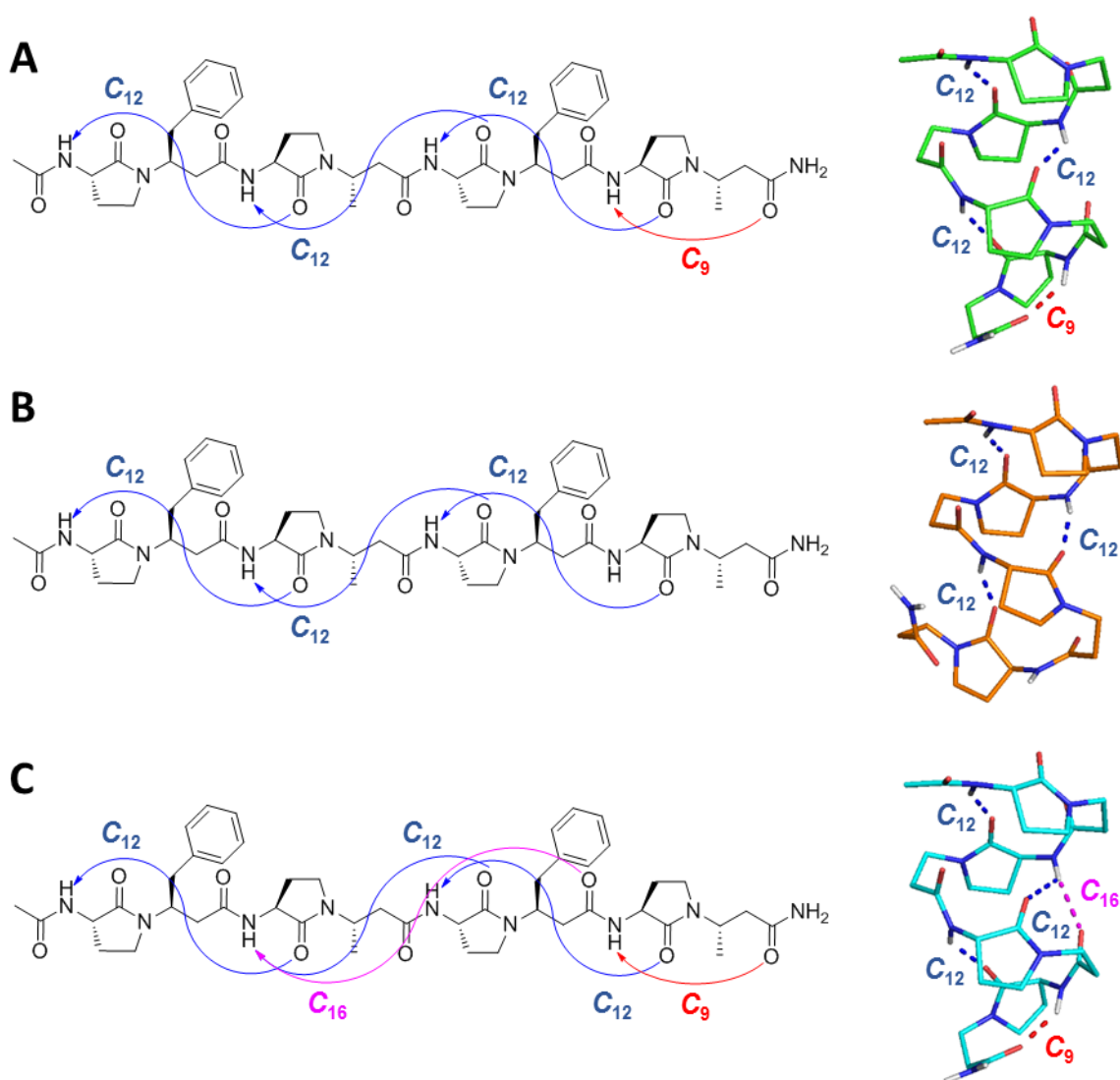


Figure 90 : Réseau de liaison hydrogène du composé **33** en solution dans le méthanol- d_3 (A), le DMSO- d_6 (B) et le NaP (C) d'après optimisation des structures RMN par DFT

Table 20 : Angles dièdres moyens (et déviations) des structures du composé **33** par DFT dans le DMSO, le méthanol et l'eau.

Résidus	ϕ (°)	θ (°)	ψ (°)
Agl	-114(8)		-138(15)
$\beta^3\text{AA}^*$	-114(8)	58(2)	-114(10)

* $\beta^3\text{Ala-8}$ non compris

Les études RMN associées à des calculs de dynamique moléculaire et de DFT ont ainsi permis de confirmer que la conformation en hélice C_{12} observée à l'état solide pour le composé **34** est stable pour les composés Agl- β (Phe/Ala) dans le méthanol- d_3 , le DMSO- d_6 et le tampon phosphate pH 6.4 à partir de l'octamère (Figure 91). La présence ou l'absence de liaisons hydrogène formant un pseudocycle C_9 en C-terminal reste à être démontrée bien qu'elle n'impacte pas la structure globale de l'hélice mais seulement son extrémité. Les forces d'empilement dans le cristal peuvent être à l'origine de la courbure de l'hélice. Si les variations structurales induites entre l'hélice droite et courbée ne sont pas suffisantes pour être discriminée via une analyse fine des corrélations NOE, l'absence de variations significatives des constantes de couplage $^3J(\text{HNH}\alpha)$ des résidus Agl sont en faveur d'une l'hélice droite. Des optimisations des structures cristallographiques par DFT sont actuellement en cours afin de vérifier la subsistance de cette courbure hors du cristal.

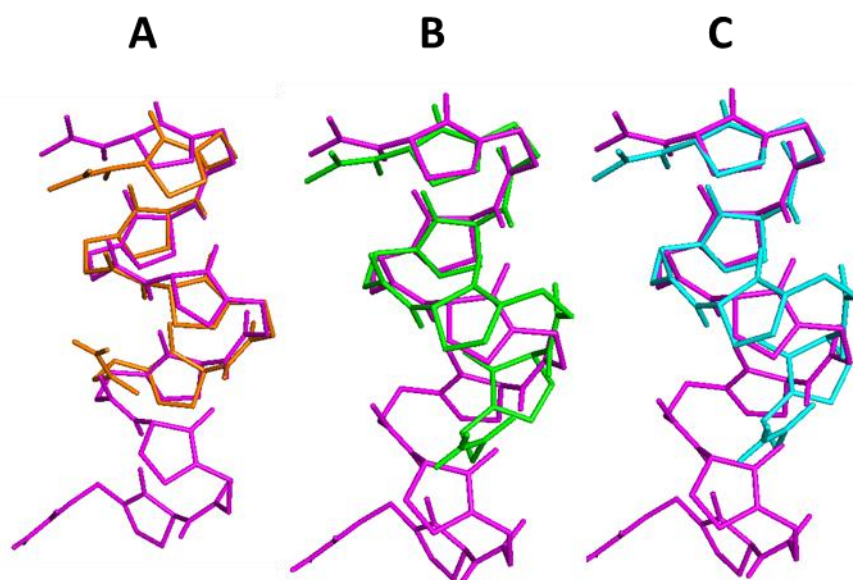


Figure 91 : Superposition des structures du composé **33** prévues par DFT dans le DMSO- d_6 (orange), le méthanol- d_3 (vert) et le NaP (bleu) sur la partie N-terminale de la structure cristalline du composé **34**

Etude de la structure et de la stabilité des oligomères d'Agl- β (Phe/Ala) par dichroïsme circulaire

La structure des oligomères **32-35** ont ensuite été étudiée par dichroïsme circulaire afin d'obtenir des informations sur leur stabilité en fonction de leur longueur et de la température. Les spectres CD des oligomères ont été enregistrés dans le méthanol et le tampon phosphate pH 7,4 (NaP, 100 mM) à 20°C. Des mesures ont été effectuées à 55°C et 90°C dans le méthanol et le tampon phosphate, avant d'être de nouveau enregistrées à 20°C. Toutefois, le composé **35** n'étant pas soluble dans le tampon phosphate, les mesures dans ce solvant pour ce composé n'ont pas pu être effectuées.

Les profils dichroïques des oligomères **33-35** d'Agl- β (Phe/Ala) possèdent deux minima dans les deux solvants, un à 201-206 nm et un autre à 212-214 nm (Figure 92). Dans le cas du méthanol, ce premier minimum est plus intense que le second et inversement dans le tampon phosphate. Cependant, dans les deux cas, les deux contributions sont relativement larges et la variation de l'intensité de l'un influe sur celle de l'autre. Le composé **32** ne présente pas la même signature dichroïque avec un seul minimum vers 212-214 nm. On remarque que le minimum autour de 204 nm apparaît à partir du composé **33**, se déplace de 201 vers 206 nm et augmente avec la taille de l'oligomère. Cette augmentation semble être corrélée à un effet coopératif de la taille de l'oligomère sur la stabilité de l'hélice 12. L'intensité du signal CD par résidu augmente encore de manière importante entre les oligomères **34** et **35**. A l'inverse, l'absence de ce minimum vers 204 nm dans la signature du composé **32** confirme son absence de structure bien définie préalablement observée par RMN et DFT.

De manière globale, les intensités absolues des signaux sont bien plus intenses dans le méthanol que dans le tampon phosphate. De même, le gain de signal dichroïque avec la taille des oligomères est plus important dans le méthanol que dans le tampon. L'ensemble de ces résultats semble montrer que l'hélice 12 serait plus stable dans le MeOH que dans le tampon phosphate.

L'augmentation de la température induit une perte d'intensité sans changement global du profil dichroïque des AgI- β (Phe/Ala) (Annexes : Figure S20). Cette variation est réversible lorsqu'on enregistre le spectre à 20°C à nouveau. On observe donc une flexibilité accrue de la structure des composés (probablement aux extrémités) sans perte de structure totale lorsque l'on augmente la température comme attendu pour ce type de composé.

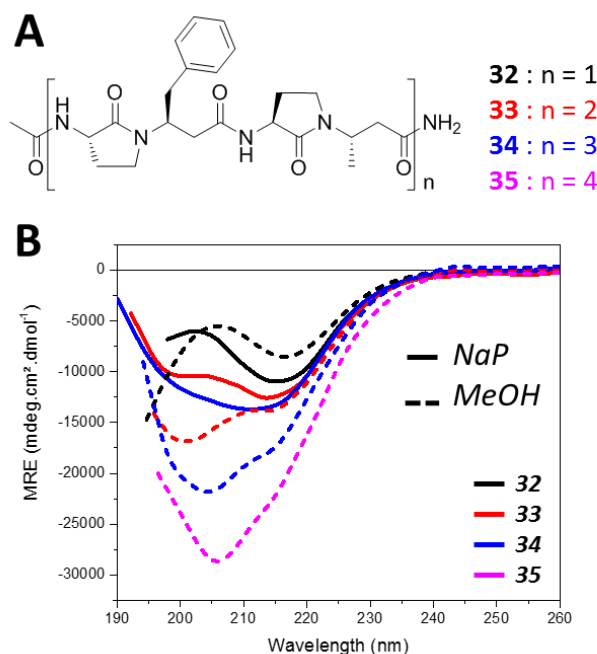


Figure 92 : Structure des oligomères **32-35** (A) et spectre de dichroïsme circulaire des oligomères **32-35** (magenta) dans le tampon phosphate (trait plein) et le méthanol (tirets) (B).

Nous avons ensuite enregistré des spectres CD dans le tampon phosphate pH 7,4 avec un pourcentage croissant en trifluoroéthanol (TFE), à 20°C (Figure 83). le TFE est connu comme co-solvant qui stabilise les structures secondaires des peptides en solution.²²⁵ Toutefois, le TFE est aussi un compétiteur d'interaction hydrophobe qui déstabilise les structures tertiaires de certaines protéines.²²⁶ Les spectres ont été mesurés dans le NaP avec une augmentation du pourcentage en TFE jusqu'à obtenir un maximum de structuration. Le composé **35** n'étant pas soluble dans le tampon phosphate, les mesures ont débutées à 10% en TFE pour ce composé.

Tout d'abord, on observe aucune variation du spectre CD de **32** en absence et en présence de 50% de TFE (Figure 83A) en accord avec la très faible variation de profil dans le tampon phosphate et le méthanol. Le composé **32** ne possédant pas de structure bien définie dans le tampon phosphate, l'ajout de TFE n'a aucun effet et ne privilégie pas la stabilisation d'un conformère plutôt qu'un autre. Au contraire, l'addition de TFE a pour conséquence d'augmenter l'ellipticité molaire des composés plus longs **33-35**. Le maximum de structuration est observé à 40% de TFE pour le composé **33** (Figure 83B), et dès 30% pour les composés **34** et **35** (Figure 83C et D), avec une augmentation de l'ellipticité molaire par résidu (MRE) la plus importante entre 10 et 20% de TFE. Le gain maximum de MRE est de 22%, 55% et 59% pour les composé **33**, **34** et **35** respectivement (le gain du composé **35**, calculé sur la base du signal à 10% TFE, est sous-estimé). On note que les spectres enregistrés dans le tampon

phosphate avec seulement 20-30% de TFE sont comparables à ceux enregistrés dans le méthanol et que les oligomères sont moins stables en milieu aqueux. Ces résultats confirment que la maximum négatif autour de 204 nm constitue un marqueur dichroïque de la structure des oligomères d'Agl(β AA). Cette transition caractéristique sera validée et utilisée dans des travaux présentés dans la suite de mon manuscrit. Quel que soit le solvant, il semble que 8 résidus minimum soient nécessaires pour la formation de l'hélice 12 d'après les résultats obtenus par CD et par RMN.

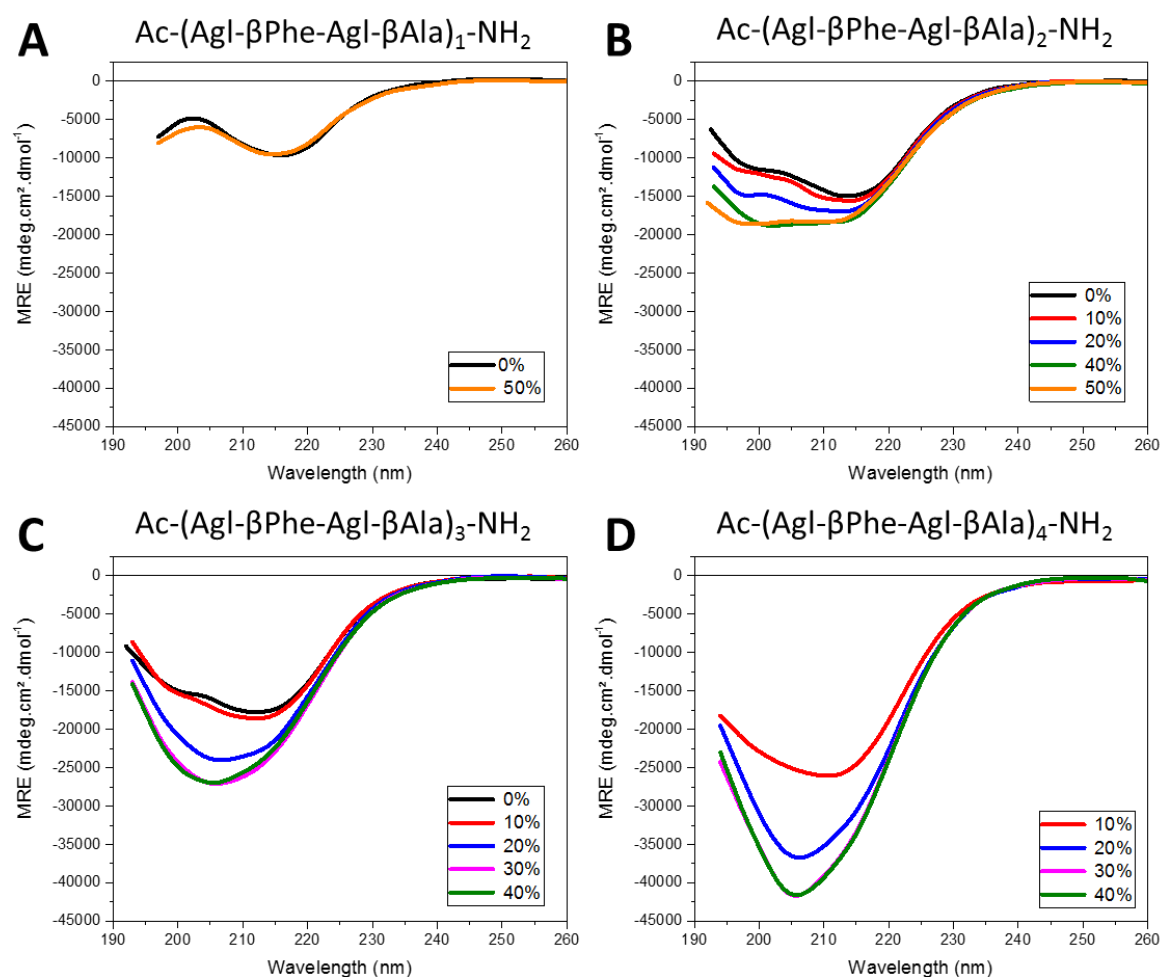


Figure 93 : spectre de dichroïsme circulaire des oligomères **32** (A), **33** (B), **34** (C) et **35** (D) dans le tampon phosphate avec un pourcentage croissant de TFE

Etude de la structure et de la stabilité des oligomères d'Agl- β (Phe/Ala) par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF).

Nous avons ensuite caractérisé ces composés par IR-TF en solution afin d'étudier la présence et la stabilité des liaisons hydrogène présente dans l'hélice 12 des Agl- β (Phe/Ala) **32-35**. En effet, on rappelle que la présence de liaisons hydrogène déplace les bandes de vibration amide I dominées par les $\nu(\text{C}=\text{O})$ vers les basses fréquences et les vibrations amides II dominées par les $\delta(\text{NH})$ vers les hautes fréquences. Plus la liaison hydrogène est importante et plus la variation de fréquence attendue est importante. Nous avons étudié les composés dans le CD_3OD et le D_2O afin de s'affranchir des bandes de vibrations $\nu(\text{O}-\text{H})$ des solvants entre 1750 et 1550 cm^{-1} qui masquent la région des amides I. Ces solvants ont permis une analyse des régions amide I ($1800\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), amide II ($1575\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$) et amide III ($1350\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) (Figure 94). En revanche, la bande amide A ($3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$), une bande communément employée dans l'étude des protéines dans des solvants comme le chloroforme, n'a pas été pertinente dans l'étude de nos composés dû à une perte de résolution totale dans les solvants utilisés. D'autre part, il est important de noter que l'utilisation de solvants deutérés implique des échanges NH en ND dont les vibrations sont alors observables dans la zone amide II' ($1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$).

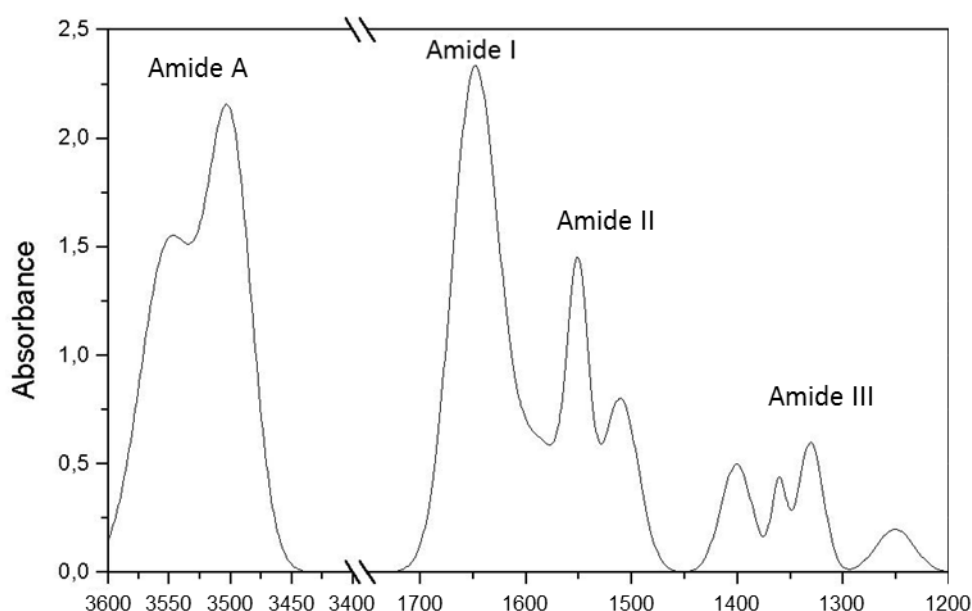


Figure 94 : Représentation schématique des bandes de vibration caractéristiques des amides.

Nous avons enregistré les spectres IR-TF des composés **32-34** dans le D₂O. Le composé **35** n'est pas soluble dans le D₂O et n'a donc pas pu être étudié en solution dans ce solvant (Chapitre IV : XI.5.). On remarque tout d'abord que les spectres IR-TF des composés **32, 33 et 34** dans le D₂O présentent des bandes de vibration de fréquences comparables mais d'intensités différentes (Figure 95). Tous les composés ont 2 bandes de vibration à 1673 et 1632 cm⁻¹ dans la région des amides I. Les bandes des amides II entre 1575 et 1480 cm⁻¹ sont déplacées vers les basses fréquences lors de l'échange NH/ND. Nous observons alors 3 pics à 1489, 1462 et 1441 cm⁻¹ qui correspondent aux vibrations $\delta(\text{N-D})$. Les bandes amides II' n'étant pas présentes dans H₂O, La comparaison des spectres IR-TF du composé **34** dans H₂O et D₂O entre 1550 et 1250 cm⁻¹ normalisés par leur concentration nous a permis d'identifier une contribution qui correspond aux modes de déformation des CH₂ des résidus AgI (Figure 96), cette contribution étant minoritaire. Enfin, une bande de vibration complexe est observée dans la zone des amides III à 1302 cm⁻¹ identifiée par la suite comme une bande dominée par les vibrations de balancement $\delta_{\text{hp,s}}(\text{C-H})$ des CH₂ des résidus AgI. Les positions des bandes amide I et II identiques de **32, 33 et 34** indiquent la présence de liaisons hydrogène similaires. Les intensités croissantes des contributions avec la longueur de l'oligomère, correspondant à leurs absorbances, s'explique par le nombre croissant de chromophores à concentration équivalente dans la solution, le signal n'étant pas normalisé par le nombre de résidu.

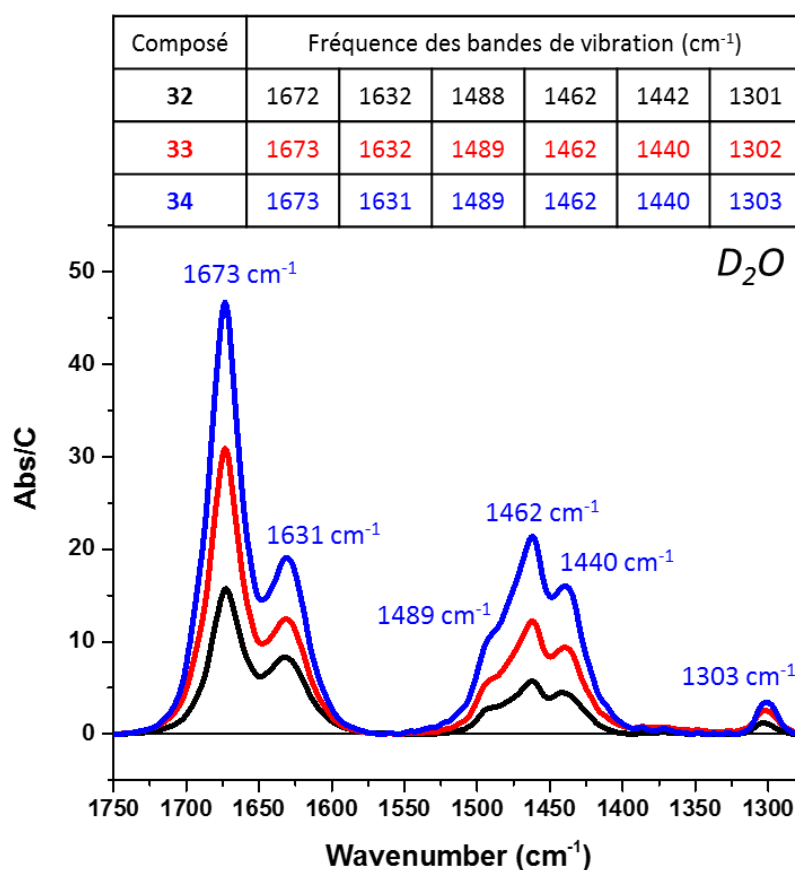


Figure 95 : Spectres IR-TF des composés **32** (en noir) , **33** (en rouge) et **34** (en bleu) dans le D_2O à 20°C et la table des valeurs de fréquences des bandes de vibration observées

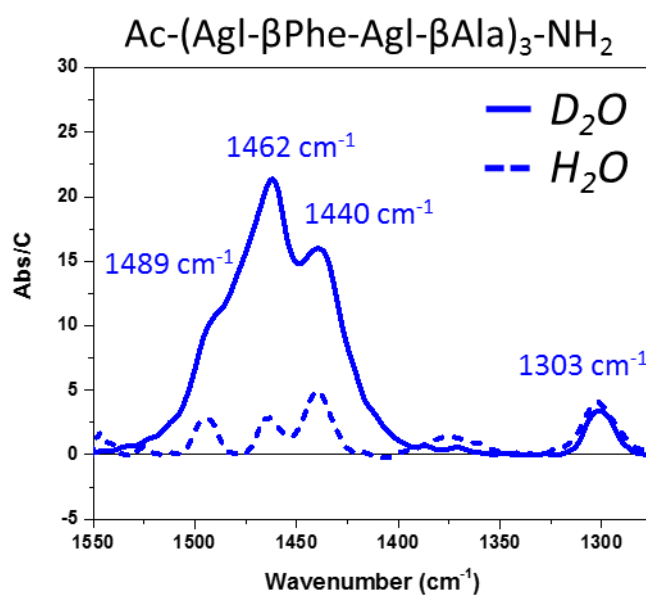


Figure 96 : Spectres IR-TF du composé **34** dans D_2O (trait plein) et H_2O (tirets).

Pour identifier les différentes bandes de vibrations, nous nous sommes appuyés sur le calcul théorique par DFT (SMD M06-2X/6-31G) des spectres infrarouges à partir des conformations putatives du composé **32** et de la structure expérimentale du composé **33**. Chacune des bandes de vibration est ensuite modélisée avec une lorentzienne de résolution spectrale de 4 cm^{-1} . Les spectres théoriques générés présentent de manière assez précise les positions et les intensités relatives des signaux IR-TF avec, comme attendu, un déplacement systématique des valeurs des fréquences de vibration vers les hautes fréquences. Dans le cas du composé **32**, le spectre théorique a été calculé à partir de la conformation la plus représentée par calcul de dynamique moléculaire, la conformation C_{12} (Figure 97).

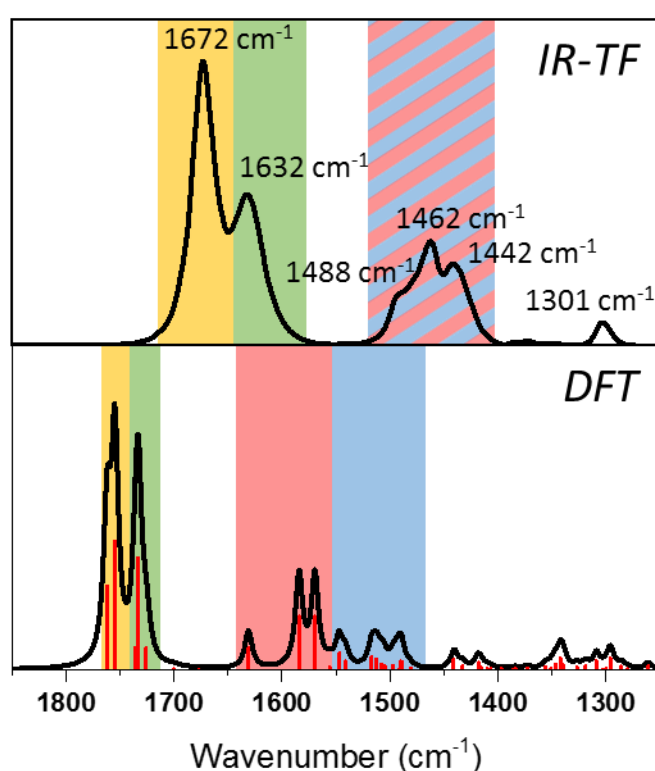
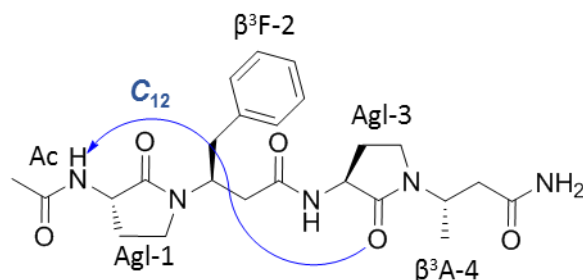


Figure 97 : Spectres IR-TF expérimental (en haut) et théorique (en bas) du composé **32** dans le D_2O

La bonne concordance des positions et des intensités relatives des bandes IR entre le spectre expérimental et le spectre calculé par DFT des composés **32** et **33** dans l'eau a permis d'identifier les différentes bandes vibrationnelles dans les zones Amide I et II. Nous avons utilisé le logiciel Gaussian²²⁷ pour relier les groupements associés aux fréquences de vibrations calculées. L'attribution détaillée de chaque bande de vibration dans les différentes régions (amide I, II et III) est répertoriée dans la Table 21, ci-dessous.

D'après la DFT, la fréquence de vibration d'élongation $\nu(\text{C=O})$ des C=O lactames des résidus Agl est attendue entre 1754 à 1762 cm^{-1} pour le C=O du résidu Agl-1, non engagé dans une liaison hydrogène, et de 1743 à 1758 cm^{-1} pour les C=O liés des résidus Agl-3, Agl-5 et Agl-7, engagés dans des liaisons hydrogène. Comme attendu, l'implication des C=O dans des liaisons hydrogène induit un déplacement des fréquences de vibration $\nu(\text{C=O})$ vers les basses fréquences. Cependant, la bande $\nu(\text{C=O})$ des C=O acycliques des résidus β^3 -aminoacides sont attendus à des fréquences encore plus basses, de 1718 à 1727 cm^{-1} , alors qu'ils ne sont pas impliqués dans des liaisons hydrogène. Nous montrons que l'attribution des $\nu(\text{C=O})$ des C=O lactames et acycliques est un prérequis pour étudier l'influence de la mise en place de liaisons hydrogène sur la dynamique de ces modes. En d'autres termes, on ne peut comparer les fréquences de vibration des amides que de résidus de même nature. Expérimentalement, la première bande amide I à 1672 cm^{-1} correspond donc aux $\nu(\text{C=O})$ des C=O intra-cycliques des résidus Agl. Les populations engagées et non engagées dans une liaison hydrogène sont présentes dans un seul pic. La bande de vibration $\nu(\text{C=O})$ est dominée par la nature intrinsèque des C=O lactames des résidus Agl et est peu sensible à la présence de liaisons hydrogène dans la limite de la résolution expérimentale de nos expériences. La seconde bande Amide I, observée à 1632 cm^{-1} , correspond aux $\nu(\text{C=O})$ des C=O acycliques des β -aminoacides.

L'attribution des bandes entre 1500 et 1400 cm^{-1} est en revanche plus compliquée. Les bandes de vibration de balancement $\delta(\text{N-H})$ amidiques prévues par la DFT entre 1650 et 1580 cm^{-1} ne sont pas observées car les protons des fonctions NH ont été échangés par du deutérium et se décalent vers les basses fréquences dans la zone des amides II'. Les bandes de vibration $\delta(\text{N-D})$ chevauchent alors les bandes attendues entre 1550 et 1470 cm^{-1} qui correspondent à la vibration de déformation des CH_2 des résidus Agl. Les bandes à 1489, 1462 et 1441 cm^{-1} sur le spectre IR-TF du composé **32** seraient donc dominées par la vibration $\delta(\text{N-D})$ du NH_2 terminal pour la première, et la vibration $\delta(\text{N-D})$ des résidus Agl pour les 2 autres. L'attribution de la bande observée à 1302 cm^{-1} est plus complexe, elle est la résultante de nombreuses vibrations mais semble dominée par les modes de vibration des CH_2 des résidus Agl. Les bandes de vibration de plus basse fréquence n'ont pas pu être observées dû à l'absorption importante du solvant dans ce domaine de fréquences, et les bandes de vibration $\nu(\text{C-C})$ des cycles aromatiques sont trop faibles pour être observées.

Table 21 : Attribution des signaux IR-TF dans le D₂O basé sur la DFT du composé **32**.

Expérimental (cm ⁻¹)	Calculé (cm ⁻¹)	Intensité calculée	Résidu	Vibration	Commentaire
1672	1762.02	902	Agl-1	v(C=O)	Bande Amide I des C=O lactames
	1754.77	1388	Agl-3		
1632	1736.03	570	β ³ A-2	v(C=O)	Bande Amide I des C=O acycliques
	1733.28	641	Ac		
	1725.78	551	β ³ F-4		
N.O.	1699.99	9	β ³ F-2	v(C-C)	Bande d'élongation C-C et de déformation C-H des aryls
	1676.53	1	β ³ F-2	δ(C-H)	
N.O.	1631.08	182	NH ₂	δ(N-H)	Bande Amide II
	1584.28	532	Agl-1		
	1569.59	686	Agl-3		
N.O.	1556.43	32	β ³ F-2	v(C-C) δ(C-H)	Bande d'élongation C-C et de déformation C-H des aryls
1489	-	-	ND ₂	δ(N-D)	Bandes dominées par les déformations N-D couplées aux élongations C-N et C-C
	1547.28	89	Agl-3	δ(C-H) des γCH ₂	
	1541.34	78	Agl-1		
1462	-	-	Agl-1	δ(N-D)	
	1517- 1505	15-138	-	δ(C-H)	
1442	-	-	Agl-3	δ(N-D)	
	1497- 1481	3-91	-	δ(C-H)	
1303	~1340	122	-	δ(C-H)	Bande complexe

N.O. : Non observé.

Un travail similaire d'attribution a ensuite été effectué sur le composé **33** (Figure 98 et Table 22)

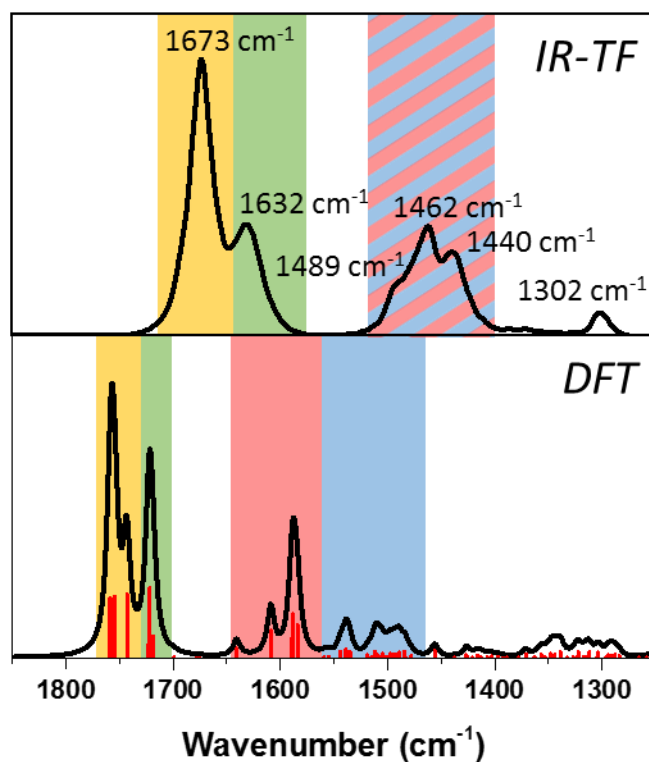
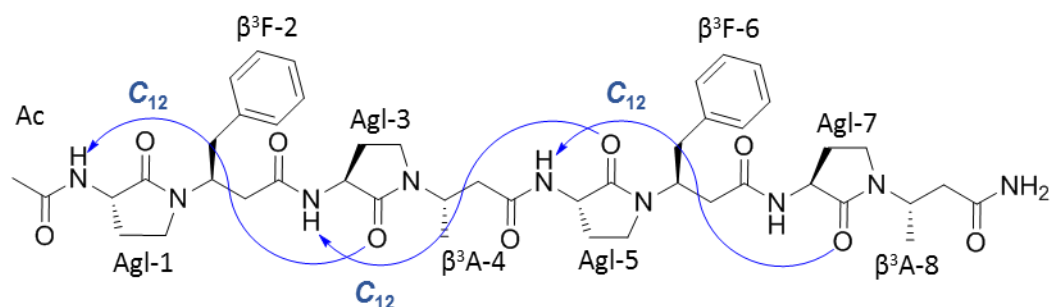


Figure 98 : Spectres IR-TF expérimental (en haut) et théorique (en bas) du composé **33** dans le D₂O

Table 22 : Attribution des signaux IR-TF dans le D₂O basé sur la DFT du composé **33**.

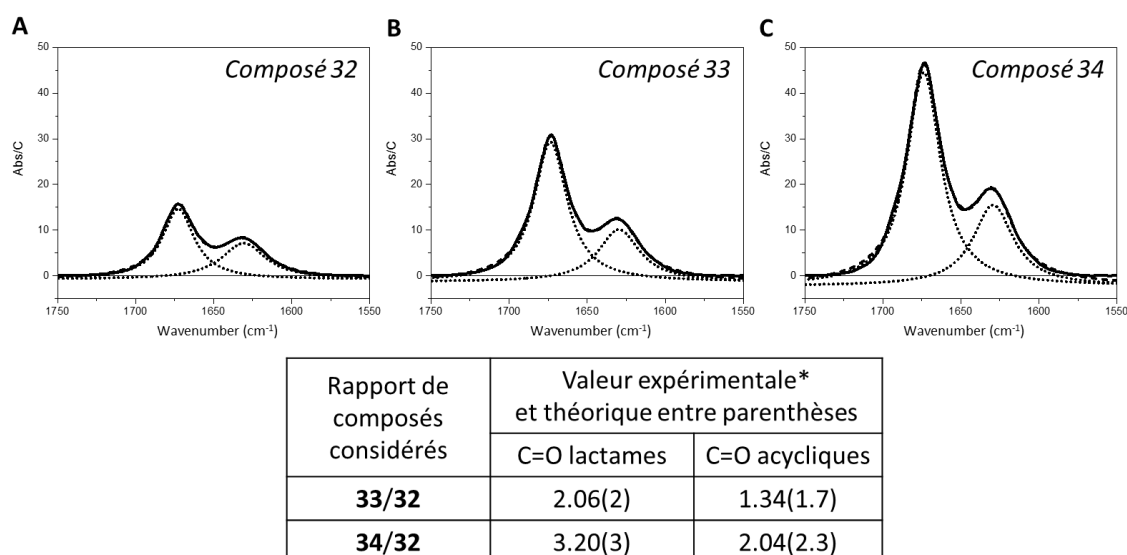


Expérimental (cm ⁻¹)	Calculé (cm ⁻¹)	Intensité calculée	Résidu	Vibration	Commentaire
1673	1758.70	1205	Agl-5	v(C=O)	Bande Amide I des C=O lactames
	1757.09	1179	Agl-3		
	1754.39	1248	Agl-1		
	1743.26	1281	Agl-7		

1632	1724.06	147	β^3A-4	$\nu(C=O)$	Bande Amide I des C=O acycliques
	1722.87	275	β^3A-8		
	1722.08	1420	Ac		
	1719.86	446	β^3F-6		
	1718.13	383	β^3F-2		
N.O.	1699.59	9	β^3F-2	$\nu(C-C)$ $\delta(C-H)$	Bande d'élongation C-C et de déformation C-H des aryls
	1698.93	10	β^3F-6		
	1678.48	1	β^3F-6		
	1675.27	1	β^3F-2		
N.O.	1640.71	190	NH ₂	$\delta(N-H)$	Bande Amide II
	1608.81	552	Agl-3		
	1589.17	394	Agl-1		
	1588.07	886	Agl-5		
	1584.34	664	Agl-7		
N.O.	1558.66	28	β^3F-2	$\nu(C-C)$ $\delta(C-H)$	Bande d'élongation C-C et de déformation C-H des aryls
	1555.89	31	β^3F-6		
1489	-	-	ND ₂	$\delta(N-D)$	Bandes dominées par les déformations N-D couplées aux élongations C-N et C-C
	1543.81	132	Agl-3	$\delta(C-H)$ des γCH_2	
	1539.12	179	Agl-1		
	1537.78	130	Agl-7		
	1535.56	116	Agl-5		
1462	-	-	Agl-3	$\delta(N-D)$	
	1518-1504	10-134	-	$\delta(C-H)$	
1440	-	-	Agl-1,5,7	$\delta(N-D)$	
	1501-1478	5-134	-	$\delta(C-H)$	
1302	~1340	125	-	$\delta(C-H)$	Bande complexe

N.O. : Non observé.

Nous avons ensuite déconvolué les signaux des bandes amides I afin de valider l'attribution des bandes $\nu(\text{C}=\text{O})$. Les composés **32**, **33** et **34** comportent 2, 4 et 6 C=O lactames et 3, 5 et 7 C=O acycliques, respectivement. Les composés **33** et **34** possèdent 2 et 3 fois plus de C=O lactames que le composé **32**, et environ 1.7 et 2.3 fois plus de C=O acycliques. Après déconvolution, en utilisant des lorentziennes, nous avons calculé les rapports des aires des bandes à 1674 et 1631 cm^{-1} des composés **33** et **34** avec celles du composé **32** (Figure 99). Les rapports expérimentaux obtenus sont cohérents avec les valeurs théoriques calculées. Ces résultats sont donc en bon accord avec les assignations proposées sur la base des calculs DFT. On notera néanmoins que des écarts relatifs de 12 et 21 % sont obtenus pour la quantification des C=O acycliques tandis que cet écart se réduit à 6 et 3% pour les C=O lactames. Ce point n'est pas élucidé à ce jour.



*rapport des aires de déconvolution des bandes à 1673 et 1630 cm^{-1}

Figure 99 : Déconvolution des bandes amides I des composés **32** (A), **33** (B), **34** (C) dans le D_2O et la comparaisons des rations des différentes population de groupement C=O théorique et expérimental

Nous avons ensuite effectué une étude du comportement des bandes de vibration $\nu(\text{C}=\text{O})$ amides I et les bandes de vibration $\delta(\text{N}-\text{D})$ amide II' en température. Les mesures IR-TF ont été effectuées sur les composés **32** à **34** dans le D_2O à des températures allant de 5°C à 70°C (composés **32** et **34** en Annexe : Figure S18 et Figure S19). La montée en température conduit classiquement à un comportement pseudo harmonique avec un élargissement des modes internes de vibrations de liaisons non engagées dans des interactions non covalentes (liaisons hydrogène par exemple) concomitant d'une baisse d'intensité. Les aires des bandes

sont en principe conservées avec le désordre thermique. Les positions des bandes se déplacent vers les basses fréquences avec le ramollissement des constantes de force associées à l'augmentation de l'agitation thermique. Quand des modes internes correspondent à des vibrations de liaisons chimiques engagées dans des interactions faibles avec d'autres espèces (liaisons hydrogène, solvation...), les modes se déplacent classiquement vers les hautes fréquences car ces interactions s'affaiblissent avec la montée en température si l'anharmonicité thermique n'est pas dominante. On observe pour nos composés une diminution globale des intensités de toutes les bandes avec la montée en température, conséquence du désordre thermique (Figure 100). D'autre part, un déplacement des vibrations $\nu(\text{C=O})$ amide I vers les hautes fréquences et les vibrations $\delta(\text{N-D})$ vers les basses fréquences, concomitant de l'affaiblissement des interactions de solvation ou des liaisons hydrogène est observé. Il est intéressant de noter que la vibration $\nu(\text{C=O})$ des C=O lactames engagés dans les liaisons hydrogène, contraint par le motif AgI, est moins sensible à l'agitation thermique ($\Delta\nu = +3 \text{ cm}^{-1}$) que la vibration $\nu(\text{C=O})$ acycliques ($\Delta\nu = +9 \text{ cm}^{-1}$).

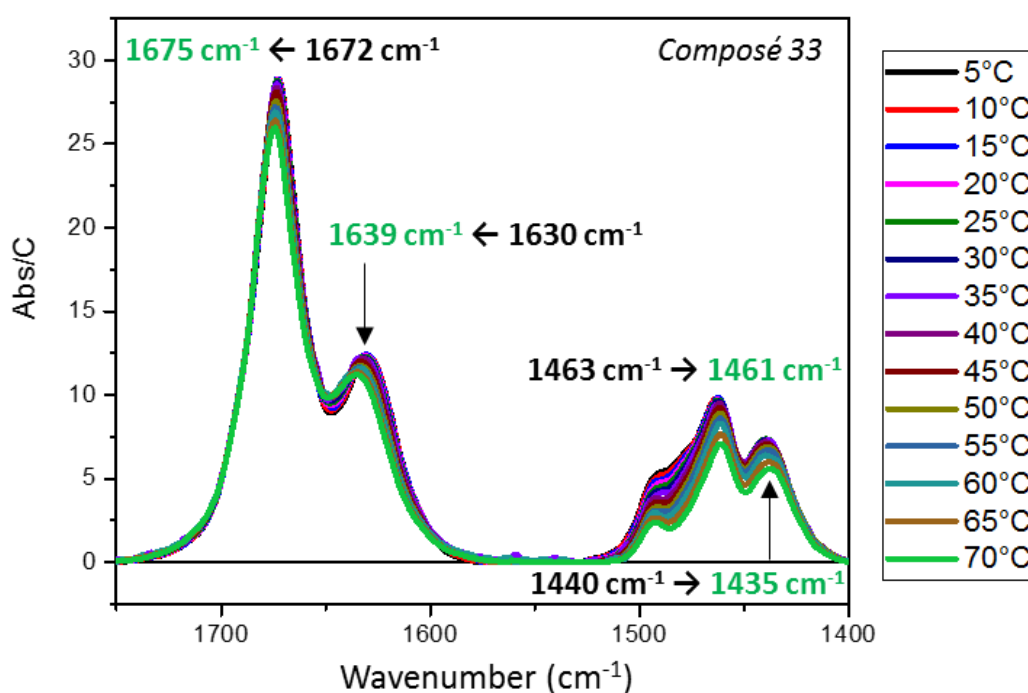


Figure 100 : Spectre IR-TF du composé **33** de 5 à 70°C dans le D₂O dans la zone des amides I et II'.

Pour évaluer l'impact de la présence de liaisons hydrogène aussi bien sur les C=O lactames que sur les C=O acycliques, nous avons comparé le spectre du composé **33** avec celui d'un analogue alternant des résidus Agl et α-AA (série Agl-αPhe) du composé **33**. Le composé **45** Ac-(Agl-αPhe-Agl-αAla)₂-NH₂, à l'inverse du composé **33**, le composé **45** possède des C=O lactames libres et des C=O acycliques engagés dans des liaisons hydrogène.¹¹⁵ La comparaison des résultats théoriques effectuées sur des molécules isolées indique un déplacement vers les hautes fréquences des C=O lactames (entre +7 et +16 cm⁻¹) attendu avec la disparition des liaisons hydrogène (Figure 101A). De manière concomitante un déplacement logique des composantes les plus intenses des C=O acycliques est observée avec la mise en place des liaisons hydrogène (entre -9 et -11 cm⁻¹). Ce comportement n'est pas observé pour les composés expérimentaux (Figure 101B). Les C=O lactames ne sont pas sensibles à la disparition des liaisons hydrogène et les C=O acycliques se déplacent vers les hautes fréquences alors qu'on s'attendrait à un résultat inverse. Ce résultat suggère un rôle déterminant des interactions de solvation qui ne sont pas prises en compte par le calcul théorique. L'absence de décalage des amides intracycliques quand les liaisons hydrogène sont supprimées (composé **45**) suggère que des interactions de solvation importantes stabilisent les deux systèmes. La position des bandes de vibration des C=O lactames et acycliques semble ainsi déterminée en premier lieu par l'effet de solvation plutôt que la présence de liaisons hydrogène intramoléculaires. On notera néanmoins que la variation du moment dynamique induit par la formation de la liaison hydrogène influence en revanche l'intensité de leur signal. En effet, l'intensité de la première bande Amide I du composé **45** est moins intense que celle du composé **33**. Concernant maintenant les vibrations des C=O acycliques, le décalage important de -26 cm⁻¹ pour le composé **33** par rapport au composé **45** pourrait être le signe d'une interaction privilégiée forte avec le solvant qui serait la clé de la solubilité de ce composé dans l'eau. En effet, lors de ces différentes expériences, la série de composés comportant des résidus βAla et βPhe (composés **32** à **34**) a montré une capacité à se solubiliser dans les milieux aqueux surprenante alors qu'elle ne présente que des résidus hydrophobes (Chapitre IV : XI.5.).

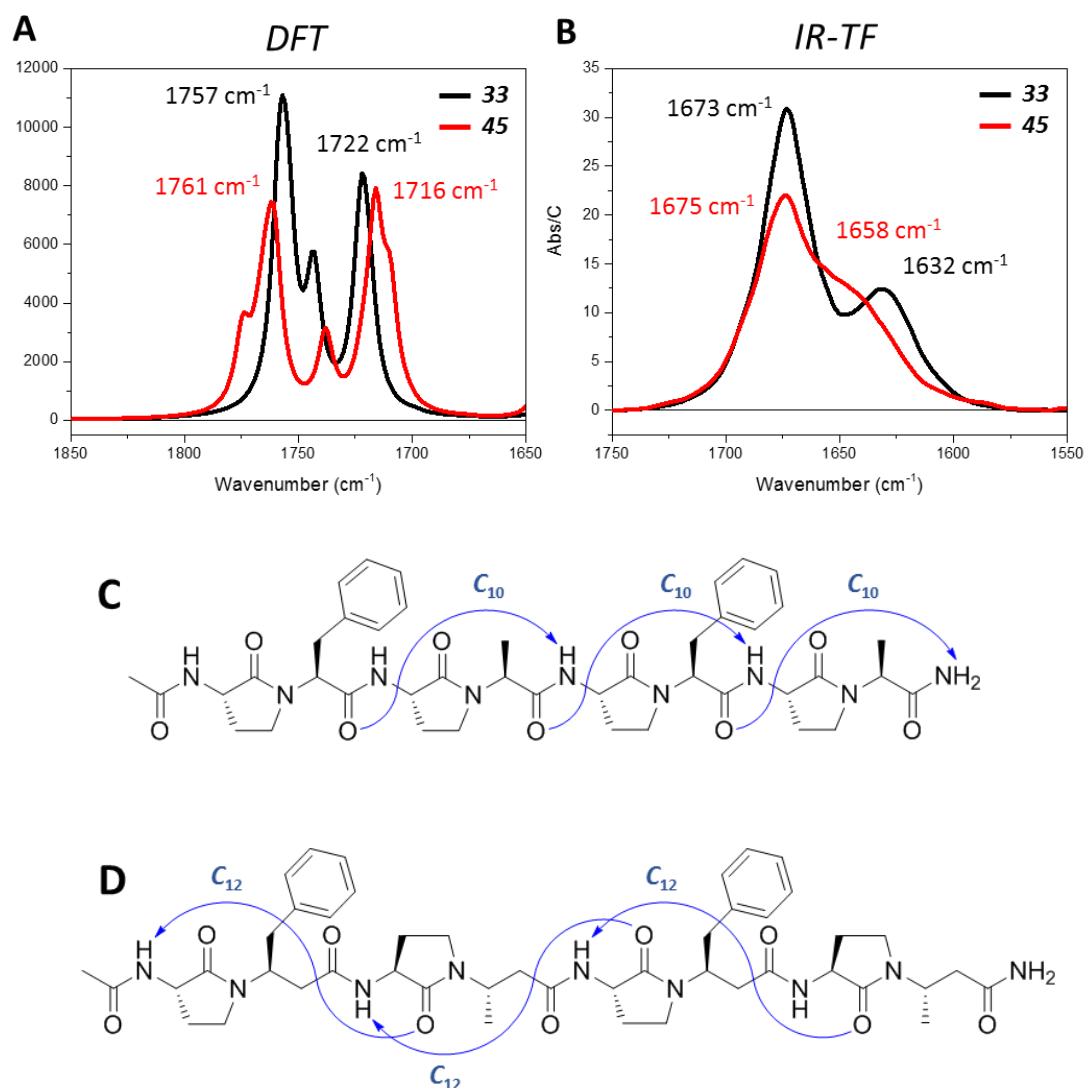


Figure 101 : Spectres théorique par DFT (A) et expérimentaux par IR-TF dans le D_2O (B) des composés **33** et **45**. Illustration du réseau de liaisons hydrogène des composés (C) **45** et (D) **33**.

Hormis la bande $\text{C}=\text{O}$ acyclique, les bandes expérimentales du composé **45** dans le D_2O sont quasiment identiques à celles du composé **33** (Figure 102). Les groupements ND des composés **45**, comme pour le composé **33**, sont impliqués dans des liaisons hydrogène. Leurs bandes de vibration sont retrouvées dans la zone amide II' à 1493, 1463 et 1442 cm^{-1} . On retrouve aussi une bande à 1303 cm^{-1} .

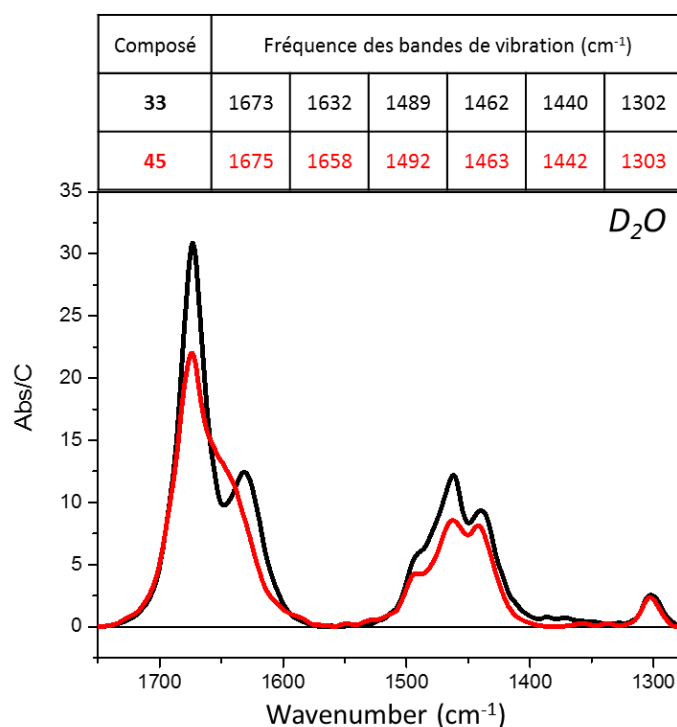


Figure 102 : Comparaison des spectres IR-TF du composé Agl(βPhe/βAla) **33** (noir) avec son homologue alpha le composé Agl(Phe/Ala) **45** (rouge) dans le D₂O.

La bonne concordance des positions et intensités relatives des bandes IR observées entre le spectre expérimental et le spectre calculé par DFT du composé **45** dans l'eau a permis d'attribuer les différentes bandes vibrationnelles observées dans les zones Amide I et II de ce composé (Figure 103 et Table 23). La première bande amide I à 1675 cm⁻¹ correspond aux vibrations $\nu(\text{C=O})$ des C=O intra-cycliques des résidus Agl. La seconde bande amide I observée à 1658 cm⁻¹ correspond aux vibrations $\nu(\text{C=O})$ des C=O amidiques des résidus β-aminoacides. La première bande amide II' observée à 1493 cm⁻¹ est dominée par la vibration $\delta(\text{N-D})$ du NH₂ terminal. La seconde bande amide II' observée à 1463 cm⁻¹ est dominée par la vibration $\delta(\text{N-D})$ des résidus Agl-3 et Agl-7. La troisième bande amide II' observée à 1442 cm⁻¹ comprend la vibration $\delta(\text{N-D})$ du reste des résidus Agl (Agl-1 et Agl-5). La bande à 1303 cm⁻¹ est plus complexe, elle est la résultante de nombreuses vibrations mais semble dominée par les vibrations de balancement $\delta_{\text{hp,s}}(\text{C-H})$ des CH₂ Agl. Les bandes de vibration de plus basse fréquence n'ont pas pu être observées l'absorbance du solvant dans ce domaine de fréquences, et les bandes de vibration $\nu(\text{C-C})$ des cycles aromatiques sont trop faibles pour être observées. Ces résultats montrent que la fréquence de vibration $\nu(\text{C=O})$ des C=O intra-cycliques est comparable dans la limite de la résolution en fréquences de nos expériences qu'ils soient engagés dans des liaisons hydrogène (composé **33**) ou non (composé **45**).

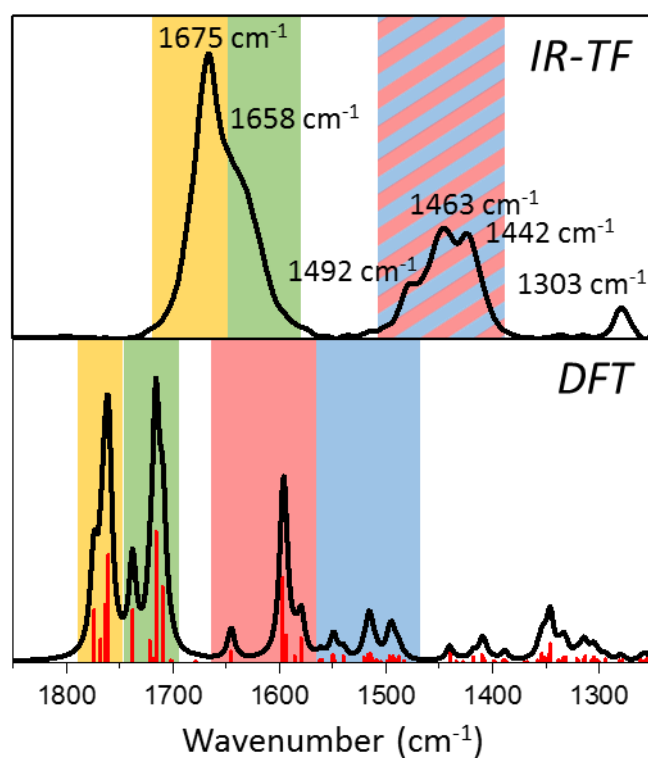
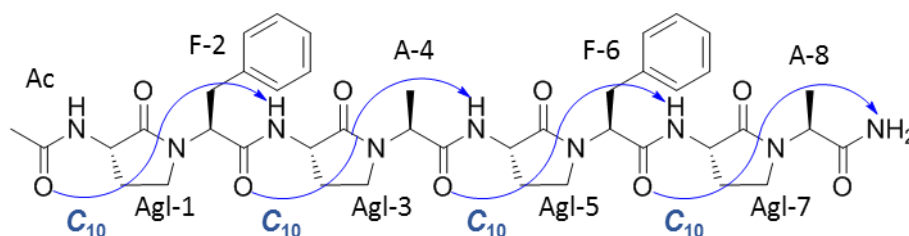


Figure 103 : Spectres IR-TF expérimental (en haut) et théorique (en bas) du composé **45** dans le D₂O

Table 23 : Attribution des signaux IR-TF du composé **45** dans le D₂O basé sur la DFT



Expérimental (cm ⁻¹)	Calculé (cm ⁻¹)	Intensité calculée	Résidu	Vibration	Commentaire
1675	1774.49	719	Agl-1	v(C=O)	Bande Amide I des C=O lactames
	1767.87	314	Agl-7		
	1764.28	795	Agl-5		
	1760.64	1500	Agl-3		
1658	1738.07	733	A-8	v(C=O)	Bande Amide I des C=O acycliques
	1721.64	301	F-6		
	1719.30	51	F-2		

	1716.11	1813	A-4		
	1709.64	1046	Ac		
N.O.	1702.14	20	F-2	$\nu(\text{C-C})$ $\delta(\text{C-H})$	Bande d'élongation C-C et de déformation C-H des aryls
	1701.40	16	F-6		
	1678.93	3	F-6		
	1677.77	3	F-2		
N.O.	1645.51	248	NH ₂	$\delta(\text{N-H})$	Bande Amide II
	1596.75	1167	Agl-7		
	1594.47	376	Agl-3		
	1585.66	87	Agl-5		
	1579.73	327	Agl-1		
N.O.	1562.24	28	F-2	$\nu(\text{C-C})$ $\delta(\text{C-H})$	Bande d'élongation C-C et de déformation C-H des aryls
	1560.33	29	F-6		
1493	-	-	ND ₂	$\delta(\text{N-D})$	Bandes dominées par les déformations N-D couplées aux élongations C-N et C-C
	1549.56	92	Agl-1	$\delta(\text{C-H})$ des γCH_2	
	1549.36	90	Agl-7		
	1549.23	14	Agl-3		
	1540.46	85	Agl-5		
1463	-	-	Agl-3,7	$\delta(\text{N-D})$	
	1521-1515	23-127	-	$\delta(\text{C-H})$	
1442	-	-	Agl-1,5	$\delta(\text{N-D})$	
	1504-1492	8-101	-	$\delta(\text{C-H})$	
1303	~1343	152	-	$\delta(\text{C-H})$	Bande complexe

N.O. : Non observé.

Pour conclure, les études de DRX et RMN nous ont permis de déterminer la structure à l'état solide et liquide des composés Ac-(Agl-β³Phe-Agl-β³Ala)_n-NH₂. A partir du tétramère, ces oligomères adoptent une structure en hélice C₁₂ stabilisée par des liaisons hydrogène entre les fonctions carbonyle des Agl des résidus i avec les NH des amides des résidus i+2. Les études de CD ont permis de montrer l'existence d'un phénomène coopératif qui conduit à une augmentation de la stabilité de la structure avec la longueur de l'oligomère. D'autre part, les études IR-TF appuyées par la DFT ont permis de mieux comprendre la solubilité singulière de ces composés en milieu aqueux malgré l'absence de chaînes latérales hydrophiles.

XI. 5. Diversification des séquences et solubilité en milieu aqueux

Afin d'évaluer la solubilité remarquable des composés poly-(Agl- β AA) dans des milieux aqueux malgré la présence exclusive des chaînes latérales hautement hydrophobes, nous avons synthétisé et étudié des composés comportant des chaînes latérales parmi les plus hydrophobes comme la β Ile (composés **36** à **41**) et la β Trp (composés **42** à **44**).²²⁸ Le résidu Ile est très hydrophobe et non aromatique comparé au résidu Phe déjà étudié. Le résidu Trp est un peu moins hydrophobe mais sa capacité à interagir avec les membranes plasmiques en fait un résidu potentiellement intéressant pour de futures applications de cette famille d'oligomères. Nous avons tout d'abord mesuré la solubilité des différents Agl- β AA dans le PBS à pH physiologique (pH 7,4) ainsi que les LogP. Nous avons ensuite essayé de rationaliser ces résultats par IR-TF et des calculs DFT. Nous avons ensuite étudié l'impact des variations de la nature des chaînes latérales sur structure et la stabilité des oligomères Agl- β AA par CD et RMN

Table 24 : Composés oligomères d'Agl- β AA pour les études de solubilité

Composé	Séquence
32	Ac-Agl- β Phe-Agl- β Ala-NH ₂
33	Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala) ₂ -NH ₂
34	Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala) ₃ -NH ₂
35	Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala) ₄ -NH ₂
36	Ac-Agl- β Ile-Agl- β Ala-NH ₂
37	Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ala) ₂ -NH ₂
38	Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ala) ₃ -NH ₂
39	Ac-Agl- β Ile-Agl- β Ile-NH ₂
40	Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ile) ₂ -NH ₂
41	Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ile) ₃ -NH ₂
42	Ac-Agl- β Trp-Agl- β Ala-NH ₂
43	Ac-(Agl- β Trp-Agl- β Ala) ₂ -NH ₂
44	Ac-(Agl- β Trp-Agl- β Ala) ₃ -NH ₂

Etude de la solubilité et du LogP des oligomères d'Agl- β AA

La solubilité et le LogP sont des paramètres physico-chimiques importants en pharmacologie, puisqu'ils caractérisent le comportement des composés dans le milieu biologique. Le logP permet d'évaluer leur capacité à diffuser à travers les différentes barrières biologiques (Barrière intestinale, barrière hématoencéphalique...).²²⁹ Comme nous l'avons souligné précédemment, les oligomères d'Agl- β AA ont une solubilité très inattendue en milieu aqueux. C'est la raison pour laquelle, la solubilité mais aussi le LogP des oligomères d'Agl- β AA **32-44** ont été déterminés de façon plus fine.

Nous avons tout d'abord évalué la solubilité des composés à 200 μ M dans du tampon PBS après 24 heures d'agitation à pH physiologique (pH 7.4). Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous (Table 25). De façon globale, des différences de solubilité ont été observées en fonction de la longueur et de la série (chaîne latérales) des composés. On peut noter que les composés les plus longs dans une même série sont les moins solubles. Pour la série AgI-(β Phe/ β Ala), une perte de solubilité totale dans le PBS lors du passage de n=3 à n=4 est observée. Ce résultat suggère que l'oligomère Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala)₄-NH₂ a un niveau d'organisation différent de celui des oligomères de plus petite taille. Des phénomènes d'agrégation ou une déstructuration complète de l'oligomère peuvent par exemple être envisagées. Cependant, afin d'appréhender les éléments qui ont conduit à ce seuil de solubilité, il est nécessaire à présent de réaliser une étude structurale approfondie de ce composé. Pour la série AgI-(β Ile/ β Ile), même si les composés conservent une solubilité assez importante en milieu aqueux, nous notons une diminution lors du passage de n=1 à n=2 alors que la solubilité entre n=2 et n=3 reste similaire. Comme attendu, la nature des chaînes latérales influent sur la solubilité des composés, les composés AgI-(β Ile/ β Ile) et AgI-(β Trp/ β Ala) étant les moins solubles.

Table 25 : Solubilités dans le PBS à pH 7.4 exprimées en μM des composés **32-44**.

Composé	s (μM)	Séquence
32	>200	Ac-Agl- βPhe -Agl- βAla -NH ₂
33	>200	Ac-(Agl- βPhe -Agl- βAla) ₂ -NH ₂
34	>200	Ac-(Agl- βPhe -Agl- βAla) ₃ -NH ₂
35	0	Ac-(Agl- βPhe -Agl- βAla) ₄ -NH ₂
36	>200	Ac-Agl- βIle -Agl- βAla -NH ₂
37	>200	Ac-(Agl- βIle -Agl- βAla) ₂ -NH ₂
38	>200	Ac-(Agl- βIle -Agl- βAla) ₃ -NH ₂
39	>200	Ac-Agl- βIle -Agl- βIle -NH ₂
40	173 $\pm$ 5	Ac-(Agl- βIle -Agl- βIle) ₂ -NH ₂
41	172 $\pm$ 2	Ac-(Agl- βIle -Agl- βIle) ₃ -NH ₂
42	>200	Ac-Agl- βTrp -Agl- βAla -NH ₂
43	>200	Ac-(Agl- βTrp -Agl- βAla) ₂ -NH ₂
44	167 $\pm$ 5	Ac-(Agl- βTrp -Agl- βAla) ₃ -NH ₂

Nous avons ensuite effectué des mesures de LogP. Il s'agit d'une mesure de la solubilité différentielle d'un composé dans deux solvants afin de mesurer l'hydrophobie d'un composé. Nous avons choisi l'octanol et le tampon PBS comme solvants pour appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe des différents composés. L'octanol, avec une tête polaire et une queue flexible non polaire, possède une capacité à former des liaisons hydrogène et une caractéristique amphiphile semblable aux phospholipides retrouvés dans la membrane. La solution PBS à pH 7.4 reflète quant à elle le milieu physiologique. Le LogP est égal au logarithme du rapport des concentrations du composé dans les solvants ($\text{LogP} = \text{Log}(C_{\text{oct}}/C_{\text{PBS}})$). Lorsque le composé est plus soluble dans l'octanol que dans le PBS, le logP est positif reflétant un caractère lipophile. Dans le cas inverse, le logP est négatif, le composé présente alors un caractère hydrophile.

Les LogP des différents composés mesurés après 24 h d'agitation dans un mélange Octanol/PBS (1:1) sont reportés dans la table ci-dessous (Table 26). Les résultats sont cohérents avec les mesures de solubilité dans le PBS à pH 7,4. En effet, nous observons une augmentation systématique des logP avec la longueur des oligomères, qui souligne l'augmentation du caractère lipophile. La série $\beta\text{Ile}/\beta\text{Ile}$ est la plus hydrophobe, vient ensuite la série $\beta\text{Trp}/\beta\text{Ala}$, puis $\beta\text{Ile}/\beta\text{Ala}$ et enfin $\beta\text{Phe}/\beta\text{Ala}$. On remarque que les composés des séries $\beta\text{Phe}/\beta\text{Ala}$, $\beta\text{Ile}/\beta\text{Ala}$ et les composés **42**, **43** (oligomères $\beta\text{Trp}/\beta\text{Ala}$) sont hydrophiles malgré l'absence de chaînes latérales polaires ou chargés. Il est également intéressant de noter que les logP pour tous les composés restent inférieur à 4, valeur pour laquelle les composés sont considérés très lipophiles.²³⁰

Table 26 : Coefficient de partage Octanol/PBS pH 7.4

Composé	LogP	Séquence
32	-0.94	Ac-Agl- β Phe-Agl- β Ala-NH ₂
33	-0.60	Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala) ₂ -NH ₂
34	-0.42	Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala) ₃ -NH ₂
36	-1.01	Ac-Agl- β Ile-Agl- β Ala-NH ₂
37	-0.82	Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ala) ₂ -NH ₂
38	-0.45	Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ala) ₃ -NH ₂
39	0.15	Ac-Agl- β Ile-Agl- β Ile-NH ₂
40	1.00	Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ile) ₂ -NH ₂
41	2.13	Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ile) ₃ -NH ₂
42	-0.72	Ac-Agl- β Trp-Agl- β Ala-NH ₂
43	-0.15	Ac-(Agl- β Trp-Agl- β Ala) ₂ -NH ₂
44	0.43	Ac-(Agl- β Trp-Agl- β Ala) ₃ -NH ₂

Les analogues Ac-(Met-X-Met-Y)_n-NH₂ avant cyclisation ne sont pas solubles en milieu aqueux, c'est la conversion en oligomère d'Agl qui leur confère une solubilité dans ces milieux. Nous avons ensuite comparé le composé **34** à son analogue constitué d'unités Agl et d' α -AA, le composé **46** : Ac-(Agl-Phe-Agl-Ala)₃-NH₂. La solubilité exacte du composé **34** (voir partie expérimental pour le calcul) est de $860 \pm 5 \mu\text{M}$, alors que la solubilité du composé **46** est de $117 \pm 5 \mu\text{M}$ dans le PBS 7,4. Le logP du composé **34** est de -0.42 alors que celle de son homologue **46** est de 0.30. Par conséquent, les composés incorporant les résidus β -AA sont plus solubles en milieu aqueux que ceux incorporant les résidus α -AA. Ces résultats montrent qu'un gain de solubilité en milieux aqueux est apporté par les unités lactames, dû à un premier niveau de structuration (ruban ou hélice), et que le repliement en hélice 12 des oligomères β semble plus favorable à cette solubilisation. En effet, les études structurales ont montré que les C=O des amides acycliques pointent vers l'extérieur de l'hélice, ce qui favoriserait la solvation des oligomères via des interactions préférentielles avec le solvant.

FTIR des oligomères AgI- β AA

Les différentes séries de composés ont ensuite été étudiées par IR-TF. Tous les composés des séries β Trp/ β Ala et β Ile/ β Ile n'étant pas solubles dans le D_2O aux concentrations nécessaires pour l'acquisition de données IR-TF en solution, seule la série complète β^3 Ile/ β^3 Ala a pu être obtenue dans ce solvant (**36-38**) (Figure 104). Cette série présente la même signature que la série β^3 Phe/ β^3 Ala (**32-34**) avec 2 pics dans la zone des Amide I à 1672 et 1631 cm^{-1} qui correspond aux vibrations d'élongation $\nu(C=O)$, 3 pics dans la zone des Amides II' à 1488, 1463 et 1437 cm^{-1} qui correspondent aux vibrations amides $\delta(N-D)$ et un pic à 1302 cm^{-1} qui correspond aux vibrations dans le plan $\delta(C-H)$ des γCH_2 des résidus AgI. Comme précédemment, les fréquences de vibration des carbonyles intracycliques, amide I et amide II sont conservées pour les différentes tailles d'oligomère à 1 cm^{-1} près, peu sensibles à la structuration du foldamère. De même, l'intensité des signaux augmente avec la longueur de l'oligomère, due au nombre de groupements qui participe au signal.

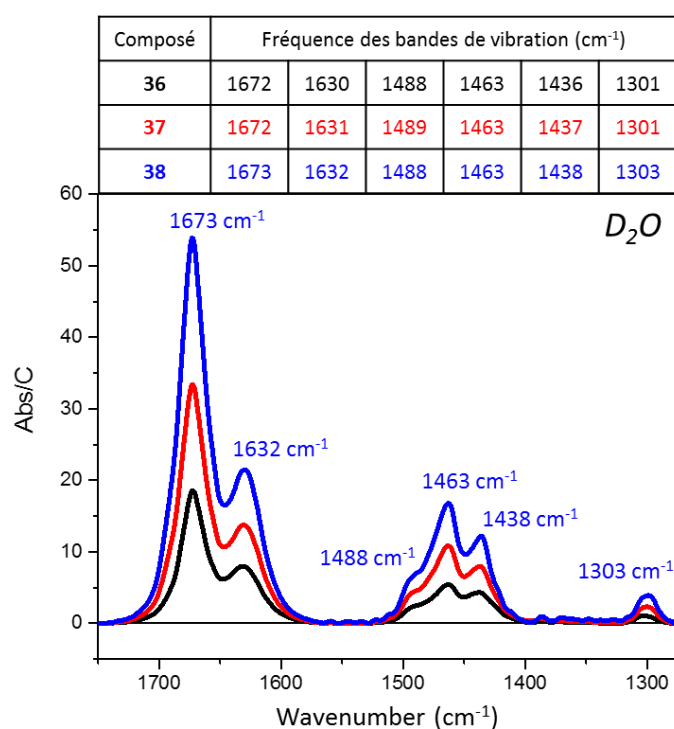
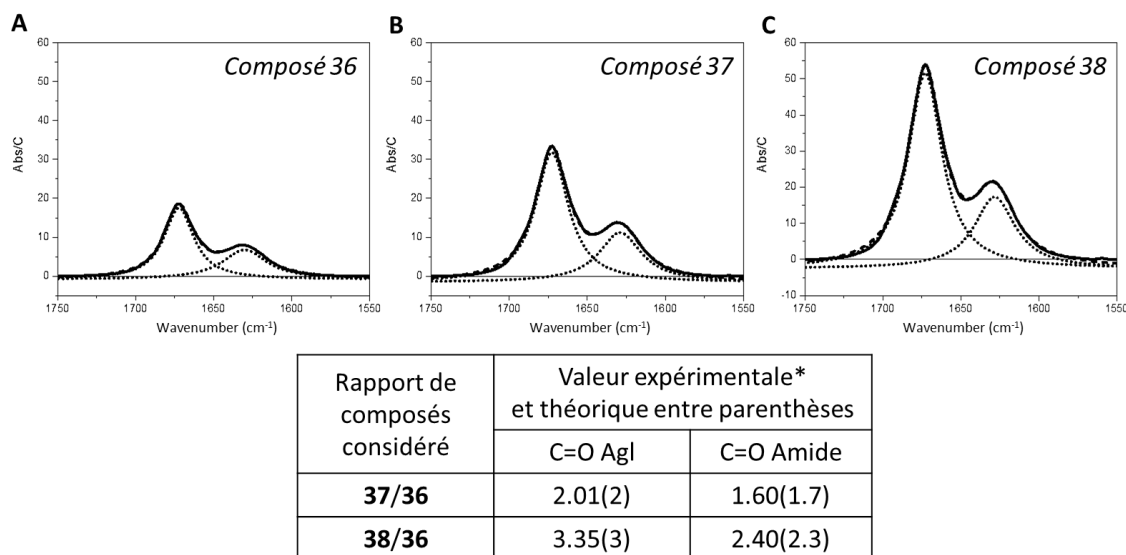


Figure 104 : Spectres IR-TF des composés **36** (en noir) , **37** (en rouge) et **38** (en bleu) dans le D_2O à 20°C et la table des valeurs de fréquence des bandes de vibration observées.

Les résultats de déconvolution de cette série sont identiques à la série βPhe/βAla (**1-3**) (Figure 105). Elle confirme une fois de plus l'attribution des fréquences de vibrations des C=O par le ratio des bandes à 1672 cm⁻¹ et 1631 cm⁻¹.



*rapport des aires de déconvolution des bandes à 1672 et 1631 cm⁻¹

Figure 105 : Déconvolution des bandes amides I des composés **36** (A), **37** (B), **38** (C) et la comparaisons des ratios des différentes population de groupement C=O théorique et expérimental

En comparant les différentes séries entre elles on peut observer qu'elles présentent les mêmes fréquences de vibrations, et cela avec relativement la même intensité pour des oligomères de même longueur, quel que soit les chaînes latérales (Figure 106). Les chaînes latérales ne semblent donc pas influencer les interactions de solvation et de type liaison hydrogène dans le D₂O.

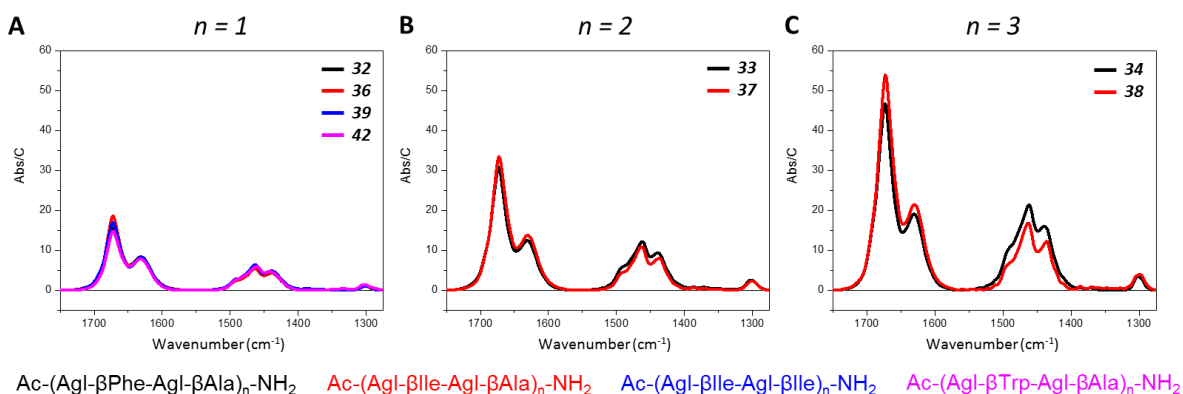


Figure 106 : Comparaison par longueur des spectres IR-TF dans le D₂O des dimères (A), tétramères (B) et hexamères (C) d'Agl-βAA.

L'ensemble des composés n'ayant pas été obtenus dans le D_2O , les différentes séries ont été étudiées dans le méthanol- d_4 . Les mesures ont d'abord été effectuées sur les composés de différentes longueurs de la série β Phe/ β Ala (**32-35**) où elles nous ont permis d'observer des échanges NH en ND (Figure 107). Bien qu'une partie des échanges NH en ND dans le méthanol- d_4 soit déjà effectué lors de la première mesure (t_0 ou '0 min') lié à la préparation de l'échantillon, ces échanges sont suffisamment lents pour avoir été observés dans ce solvant, contrairement au D_2O . La bande de vibration $\delta(N-H)$ est observée à 1561 cm^{-1} . Sa disparition au cours du temps avec l'augmentation des bandes à 1493 , 1459 et 1432 cm^{-1} confirme que ces signaux sont bien les bandes de vibration $\delta(N-D)$. D'autre part, on remarque que les échanges NH en ND induisent un déplacement de la bande $\nu(C=O)$ amidique vers les basses fréquences de 2 à 7 cm^{-1} avec la longueur de l'oligomère. Les amides 1 étant engagés exclusivement dans des interactions de solvation, ce comportement pourrait être due à la prise en masse de NH en ND : La vibration des $C=O$ amidiques seraient donc influencés par la prise en masse des N-H adjacents.

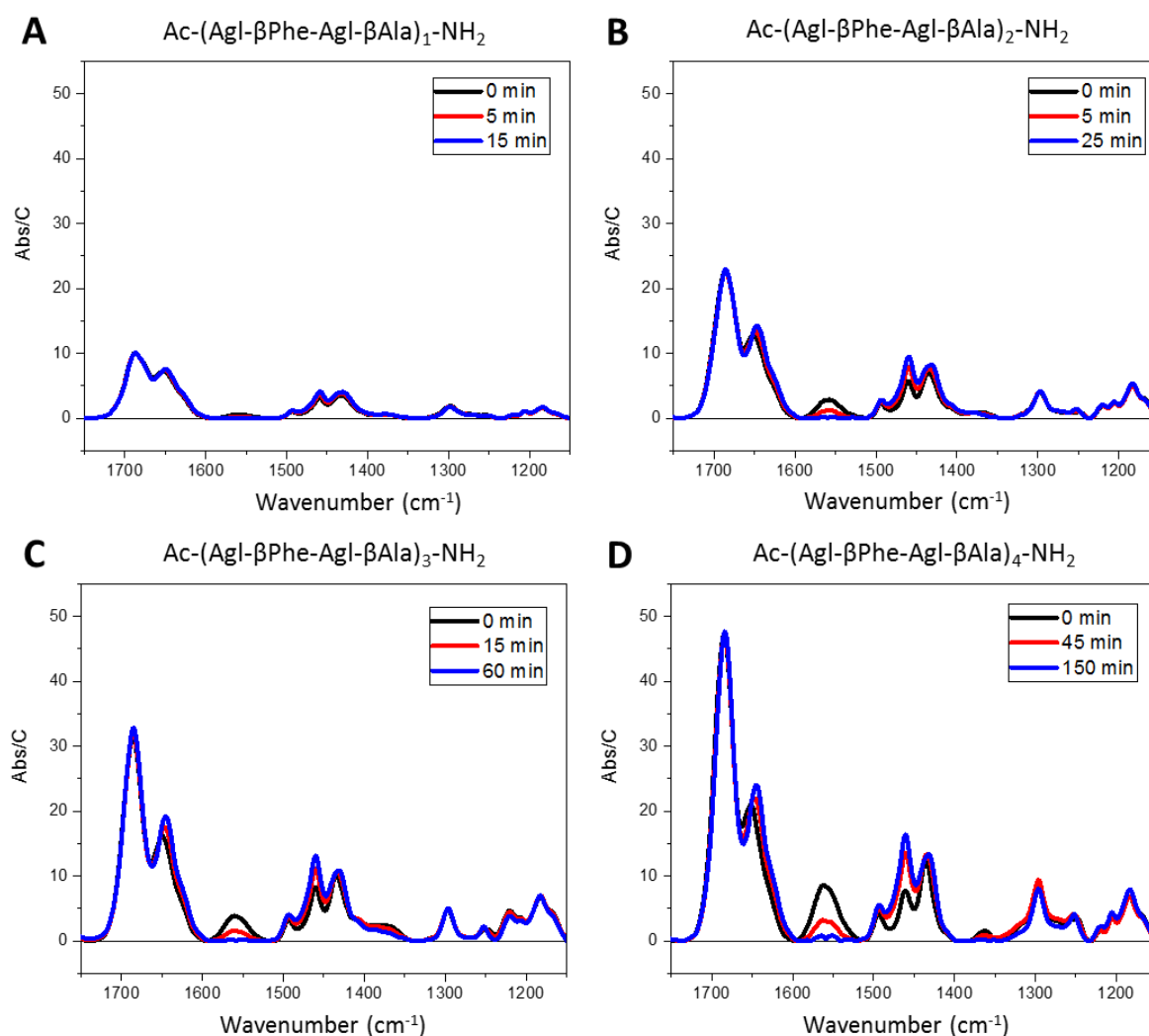


Figure 107 : Spectre IR-TF en fonction du temps dans le méthanol- d_4 des composés (A) **32**, (B) **33**, (A) **34** et (D) **35**.

Les calculs de DFT du composé **33** dans le méthanol ont été effectués pour confirmer l'attribution des bandes Amide ainsi que les bandes entre 1150 et 1250 qui n'étaient pas observable dans le D₂O (Figure 108). Le signal issu des calculs de DFT prévoit un profil similaire à celui obtenu dans l'eau et la concordance avec le spectre expérimental a permis d'attribuer les différentes bandes de vibration dans les zones Amide I et II' (Table 27). Les bandes Amides I observées à 1686 cm⁻¹ et 1647 cm⁻¹ correspondent aux vibrations ν (C=O) intra-cycliques et amidiques respectivement. Les bandes observées à 1494, 1459 et 1432 cm⁻¹ sont attribuées aux vibrations δ (N-D). De plus, les fonctions NH₂ et NH du résidu AgI-7 s'échangent plus rapidement en Deuterium du fait qu'elles ne soient pas engagées dans des liaisons hydrogène et permettent ainsi de confirmer l'attribution plus fine des bandes δ (N-D). En effet, la bande à 1489 cm⁻¹ qui serait dominée par la vibration δ (N-D) de la fonction NH₂ montre peu de variation d'intensité, la majorité des échanges ayant été effectués avant la mesure, alors qu'une variation d'intensité plus importante est observée pour les bandes à 1459 et 1432 cm⁻¹. Les bandes entre 1300 et 1150 cm⁻¹ sont des bandes complexes dominées par des vibrations de déformation δ (C-H). A nouveau, les bandes de vibration liées aux cycles aromatiques sont trop faibles pour avoir été observées.

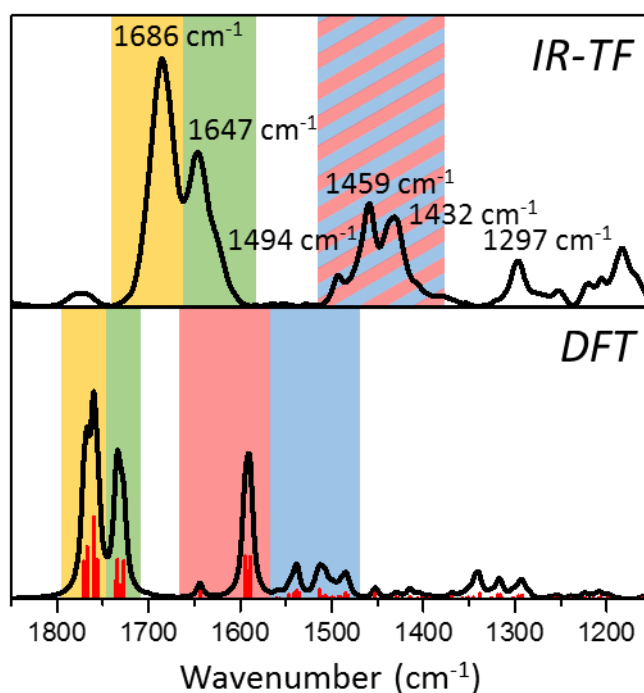
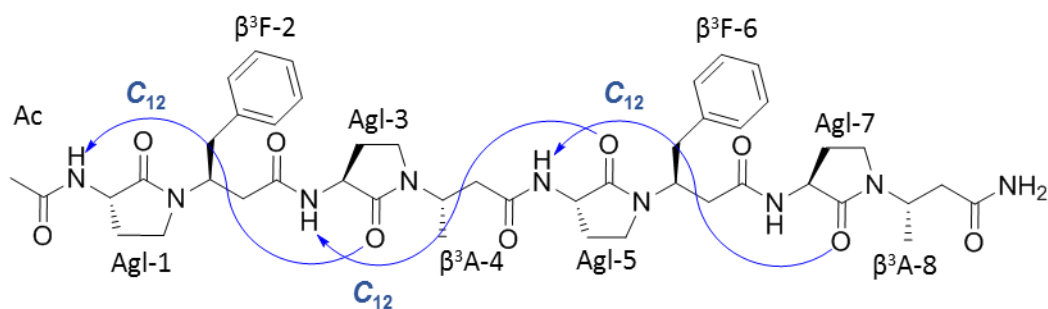


Figure 108 : Spectres IR-TF expérimental (en haut) et théorique (en bas) du composé **33** dans le méthanol-*d*₄

Table 27 Attribution des signaux IR-TF du composé **33** dans le méthanol-*d*₄ basé sur la DFT.

Expérimental (cm ⁻¹)	Calculé (cm ⁻¹)	Intensité calculée	Résidu	Vibration	
1686	1770.82	851	Agl-1	v(C=O)	Bande Amide I des C=O intracycliques
	1767.19	1168	Agl-3		
	1760.26	1835	Agl-5		
	1755.82	876	Agl-7		
1647	1736.09	422	Ac	v(C=O)	Bande Amide I des C=O amidiques
	1734.22	884	β ³ F-2		
	1732.81	233	β ³ A-4		
	1730.28	327	β ³ F-6		
	1727.21	846	β ³ A-8		
N.O.	1701.91	9	β ³ F-2	v(C-C) δ(C-H)	Bande d'élongation C-C et de déformation C-H des aryls
	1700.18	8	β ³ F-6		
	1678.31	1	β ³ F-6		
	1676.02	1	β ³ F-2		
1561*	1644.18	184	NH ₂	δ(N-H)	Bande Amide II
	1594.82	957	Agl-5		
	1593.48	21	Agl-3		
	1591.07	624	Agl-7		
	1588.84	946	Agl-1		
N.O.	1560.10	31	β ³ F-2	v(C-C) δ(C-H)	Bande d'élongation C-C et de déformation C-H des aryls
	1556.86	25	β ³ F-6		

	-	-	ND ₂	δ(N-D)	
1494	1546.80	108	Agl-3	δ(C-H) des γCH ₂ AgI	Bandes dominées par les déformations N-D couplées aux élongations C-N et C-C
	1541.02	139	Agl-7		
	1538.12	202	Agl-1		
	1537.62	105	Agl-5		
1459	-	-	Agl-3,5	δ(N-D)	
	1517- 1507	7-217	-	δ(C-H)	
1432	-	-	Agl-1,7	δ(N-D)	
	1493- 1482	28-147	-	δ(C-H)	
1300-1250	1350- 1285	-	-	δ(C-H)	Bandes complexes
1250-1150	1263- 1191	-	-	δ(C-H)	Bandes complexes

N.O. : Non observé ; *observé avant échange NH en ND

Comparés aux spectres obtenus dans le D₂O, les spectres de la série βPhe/βAla (**32-34**) dans le méthanol-*d*₄ présentent un déplacement des bandes amides I vers les hautes fréquences et un déplacement des bandes amides II' vers les basses fréquences. En effet, l'eau a un moment dipolaire plus élevé que le méthanol qui favorise la formation de liaisons hydrogène avec le solvant. Les bandes de vibration amide I à des fréquences plus basses dans l'eau est le signe d'une meilleure interaction avec ce solvant, ce qui pourrait favoriser sa solubilisation.

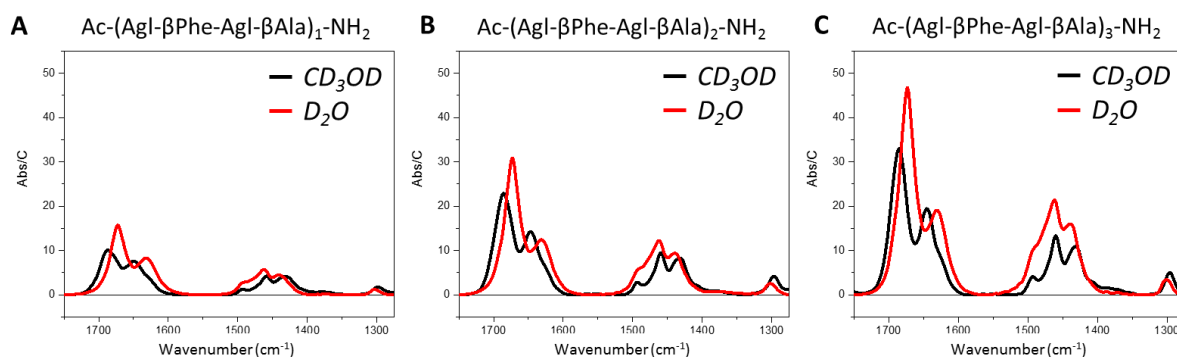


Figure 109 : Spectres IR-TF dans le méthanol-*d*₄ (noir) et le D₂O (rouge) des composés **32** (A), **33** (B) et **34** (C).

Pour les composés de différentes longueurs et de différentes séries, les comparaisons ont été effectuées après échange complet des NH en ND. On observe, comme dans le D₂O, que la signature IR-TF est identique au sein d'une même série et que l'intensité des bandes augmente avec la longueur de l'oligomère (Figure 110). En revanche, on peut observer que les bandes amide I lactames et acycliques se déplacent faiblement vers les basses fréquences (Table 28 : $\Delta\nu = -3$ et -6 cm⁻¹ par exemple pour la série présentée sur la Figure 110A). Ce résultat suggère un effet coopératif de la structuration de l'oligomère lorsque que l'on augmente la longueur de chaîne, comme l'avait indiqué les mesures de CD. Le renforcement du réseau de liaisons hydrogène induit alors un déplacement des bandes amides I vers les basses fréquences.

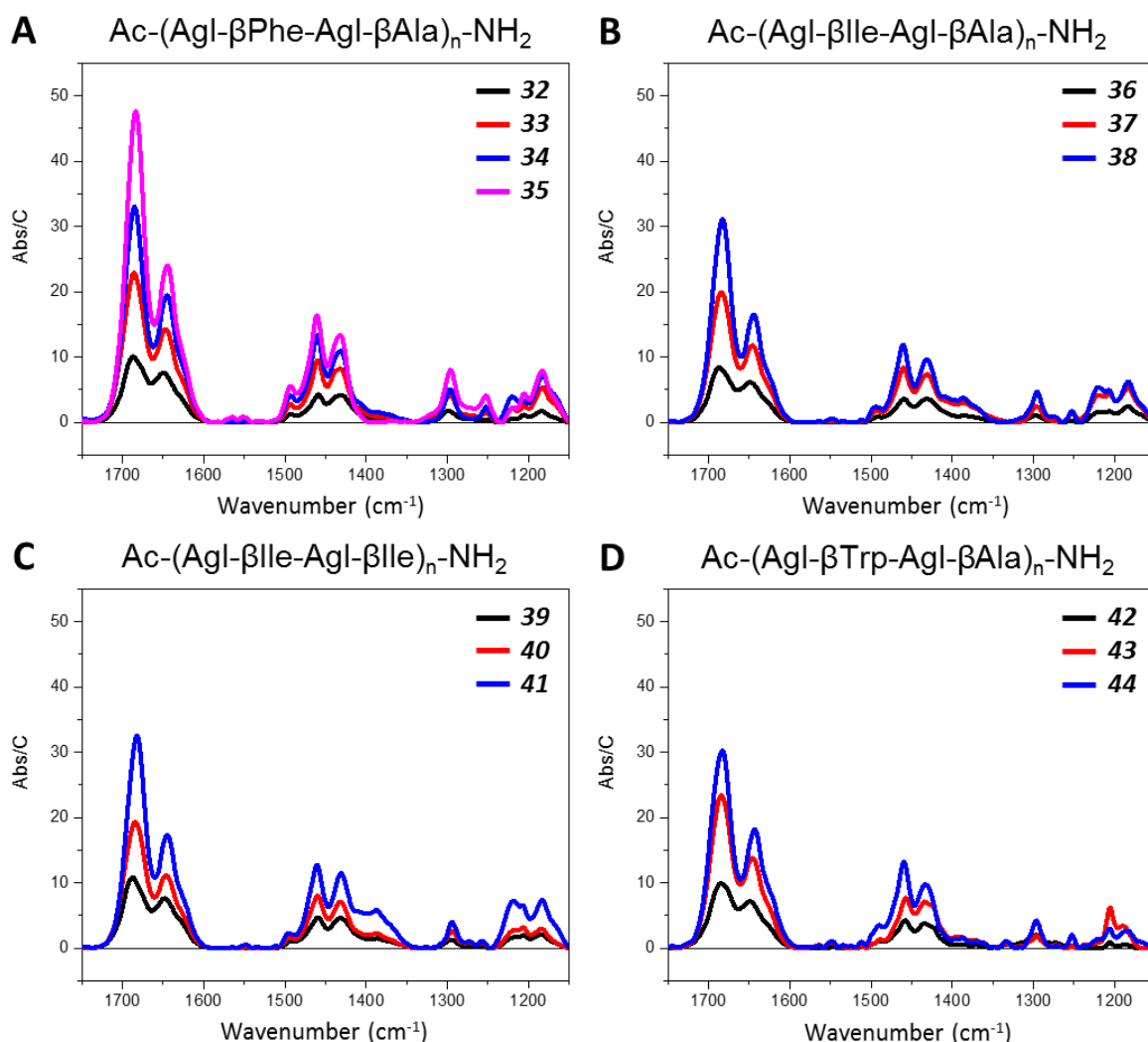
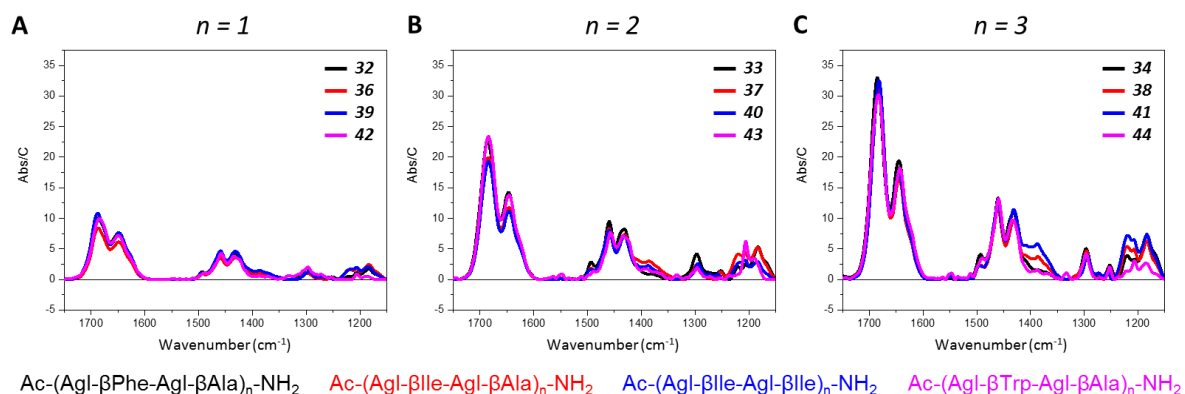


Figure 110 : Spectres IR-TF dans le méthanol-*d*₄ des oligomères d'Agl-(βPhe/βAla) (A), Agl-(βIle/βAla) (B), Agl-(βIle/βIle) (C) et Agl-(βTrp/βAla) (D).

Table 28 : Fréquences des bandes IR-TF des composés **32-44** dans le méthanol-*d*₄

Composé	Fréquence des bandes de vibration (cm ⁻¹)					
32	1687	1650	1493	1458	1431	1298
33	1686	1647	1494	1459	1431	1296
34	1685	1645	1493	1460	1431	1296
35	1684	1644	1493	1460	1432	1296
36	1687	1649	1492	1459	1431	1297
37	1685	1646	1494	1460	1431	1296
38	1683	1644	1494	1460	1431	1296
39	1688	1648	1492	1459	1432	1295
40	1684	1646	1494	1460	1432	1294
41	1682	1645	1495	1460	1431	1294
42	1685	1649	1489	1458	1434	1296
43	1685	1646	1489	1457	1434	1296
44	1683	1643	1490	1459	1433	1296

Si on s'attache maintenant à comparer les oligomères de même taille entre eux pour observer l'influence des différentes chaînes latérales, on s'aperçoit que les spectres IR-TF sont superposables, en particulier pour les vibrations amide I, amide II et la bande de vibration $\delta(\text{C-H})$ des γCH_2 des AgI (Figure 111). Les différentes chaînes latérales ne semblent donc pas influencer les interactions de solvation des C=O amidiques des β -aminoacides ainsi que les interactions de type liaison hydrogène des C=O intracycliques des AgI.

Figure 111 : Spectres IR-TF dans le méthanol-*d*₄ des dimères (A), tétramères (B) et hexamères (C) de dipeptide AgI-βAA

Pour essayer de mieux appréhender l'influence de la solvation nous avons effectué des expériences IR-TF dans un solvant moins susceptible de créer des liaisons hydrogène : le chloroforme. Seule la série β Ile/ β Ile (**39-41**) est soluble dans ce solvant et a permis d'obtenir les spectres IR-TF dans le chloroforme (Figure 112). Ce solvant non deutéré permet d'observer séparément les bandes Amides II entre 1532 et 1553 cm^{-1} et les bandes de déformation des C-H entre 1400 et 1500 cm^{-1} . On remarque aussi un décalage croissant avec la longueur de l'oligomères de la bande amide II vers les hautes fréquences. Ce déplacement indique un effet coopératif de la force des liaisons hydrogène avec la longueur des oligomères.

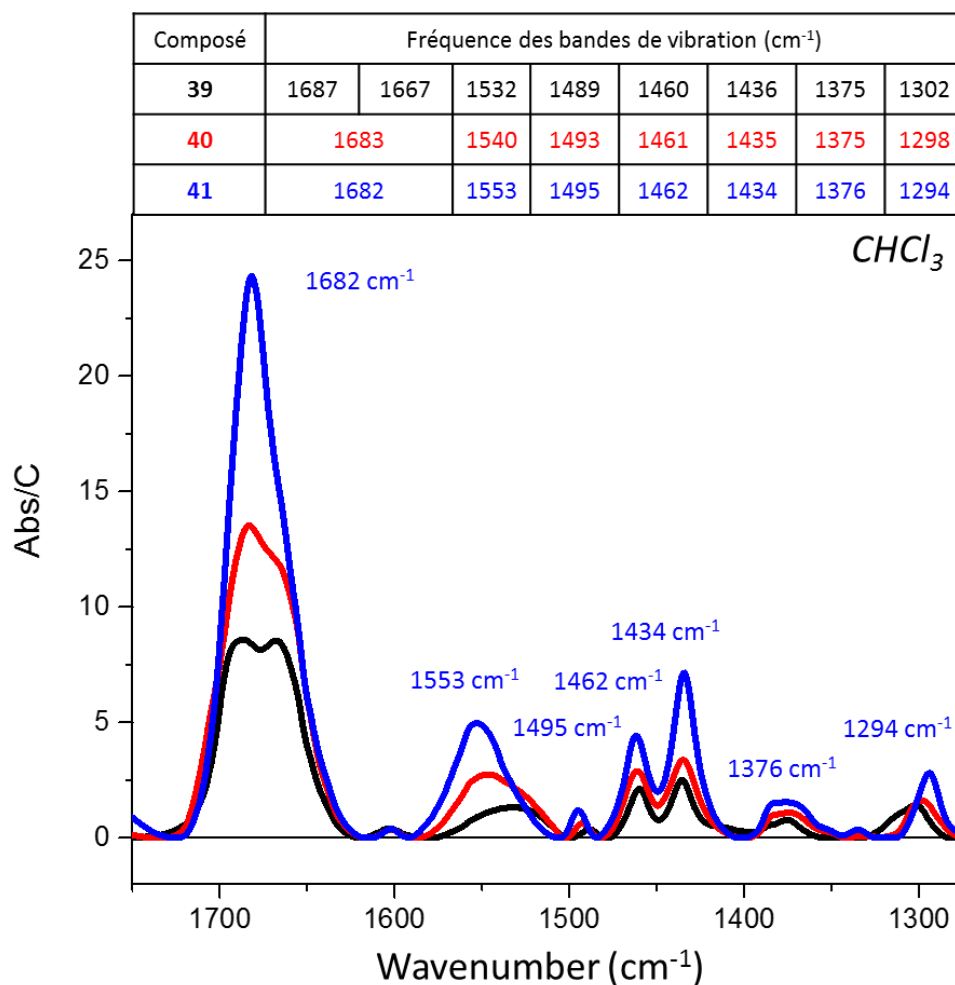


Figure 112 : Spectres IR-TF des composés **39** (en noir) , **40** (en rouge) et **41** (en bleu) dans le Chloroforme à 20°C et la table des valeurs de fréquence des bandes de vibration observées

Dans le méthanol- d_4 ou le chloroforme, on observe un spectre quasiment identique pour les composés **39-41**. Seul la bande $\nu(\text{C}=\text{O})$ des C=O acycliques est affectée par le changement de solvant avec une différence de $+21\text{ cm}^{-1}$ pour les composés les plus courts jusqu'à environ $+35\text{ cm}^{-1}$ pour les composés les plus long. Lorsque dans le chloroforme, les oligomères ne sont pas solvatés, on observe bien un déplacement des C=O acycliques vers les hautes fréquences.

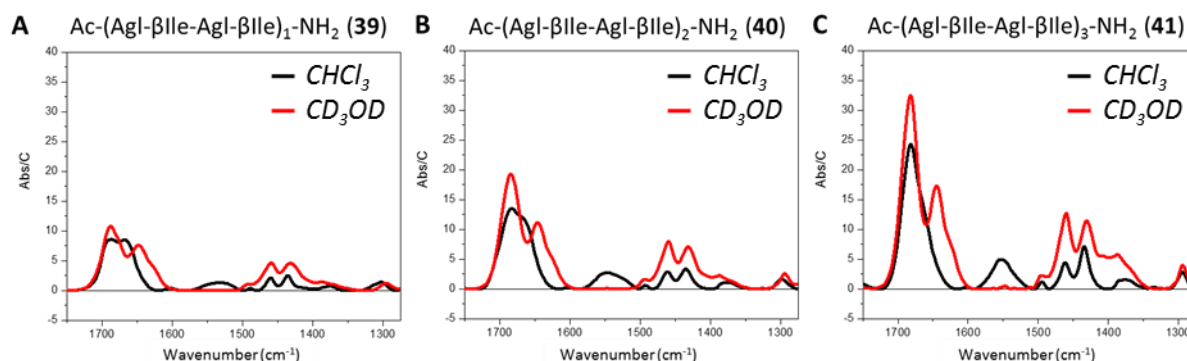


Figure 113 : Spectres IR-TF des composés **39-41** dans le chloroforme (noir) et le méthanol- d_4 (rouge)

Analyse des profils de dichroïsme circulaire des oligomères d'Agl- β AA.

Les spectres CD des oligomères AgI-(β Ile/ β Ala) (**36-38**), AgI- β Ile (**39-41**) et AgI(β Trp/ β Ala) (**42-44**) ont été enregistrés afin de vérifier s'ils adoptent une structure similaire à celle des composés de référence AgI-(β Phe/ β Ala). Comme précédemment, les mesures ont été effectuées à température variable dans le méthanol et le tampon phosphate à pH 7,4 (Figure 114). Le spectre du composé **41** n'a pas pu être enregistré dans le tampon phosphate car il n'est pas assez soluble dans ce solvant. Des spectres ont été enregistrés à 20°C , puis à 55°C et 90°C dans le méthanol et le tampon phosphate respectivement, avant d'être de nouveau enregistrés à 20°C (Annexes : Figure S20 à Figure S22). Globalement, nous avons observé le même comportement pour les différentes séries de composé que la série modèle AgI-(β Phe/ β Ala). L'augmentation de la température induit une diminution réversible du signal sans changement global de profil.

Les spectres CD des oligomères AgI(β Ile/ β Ala) et AgI- β Ile ont des signatures identiques à celle des oligomères modèles de même taille dans les deux solvants (Figure 115) tandis que le spectre de la série AgI-(β Trp/ β Ala) est sensiblement différent avec une contribution additionnelle à 226 nm dans les deux solvants à partir du composé **43**. Ce maximum négatif peut s'expliquer par une transition $\pi-\pi^*$ B_b des noyaux indoles des résidus

Trp.²³¹ On note également un comportement relativement différent de ces oligomères dans le tampon phosphate. En effet, nous n'observons pas de minimum à 202 nm pour le composé **43** qui possède un spectre comparable au composé **42**. Cela semble indiquer que le composé **43** ne possède pas de structure bien définie contrairement aux oligomères de même taille des autres séries dans le tampon phosphate.

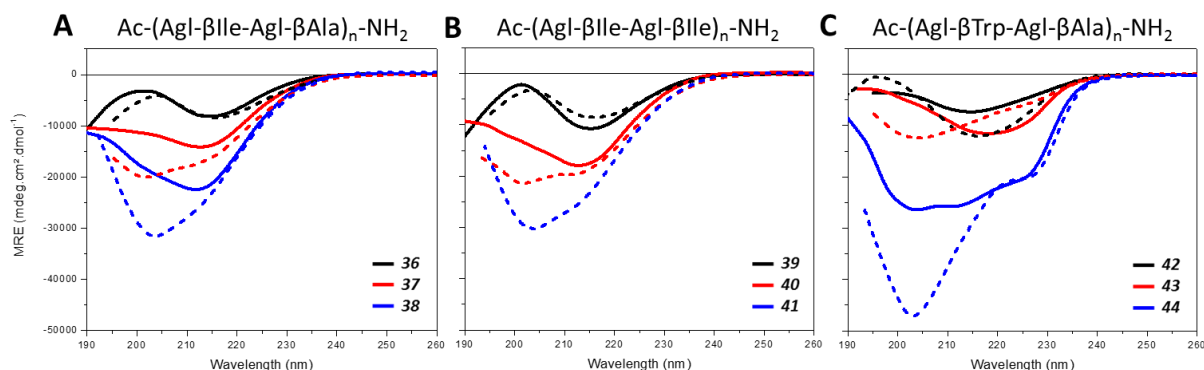


Figure 114 : Spectres CD dans le NaP (trait plein) et méthanol (pointillés) des oligomères AgI(βIle/βAla) (A), AgI(βIle/βIle) (B) et AgI(βTrp/βAla) (C).

On note globalement des signatures comparables pour les différentes séries d'AgI-βAA étudiées. Par conséquent, à l'exception des dimères de dipeptides qui ne sont pas repliés, l'hélice 12 semble conservée malgré les variations de chaînes latérales. L'intensité des maxima négatifs est plus importante dans le méthanol que dans le tampon phosphate : comme pour les oligomères d'AgI-(βPhe/Ala), l'hélice 12 est plus stable dans le méthanol que dans le tampon phosphate pour les AgI-(βIle/βAla), AgI-βIle et AgI-(βTrp/βAla). Cependant, les différentes séries d'oligomères ne partagent pas la même stabilité. Ainsi dans le méthanol, on remarque que les composés AgI-(βIle/βAla) (**36-38**) et AgI-βIle (**39-41**) ont des stabilités comparables et sont plus stables que les oligomères modèles d'AgI-(βPhe/Ala) (**32-34**). Les composés AgI-(βTrp/βAla) (**42-44**) apparaissent comme les oligomères les plus stables. Dans le tampon phosphate, on observe des propriétés similaires pour les tétramères de dipeptides, à l'exception de l'AgI-(βTrp/Ala) **43** qui ne semble pas adopter de structure bien définie. Pour les oligomères les plus longs, on retrouve un ordre de stabilité identique à celui des composés dans le méthanol. Les structures des composés des séries AgI-(βIle/βAla), AgI-βIle et AgI(βTrp/βAla) sont en cours d'études par RMN.

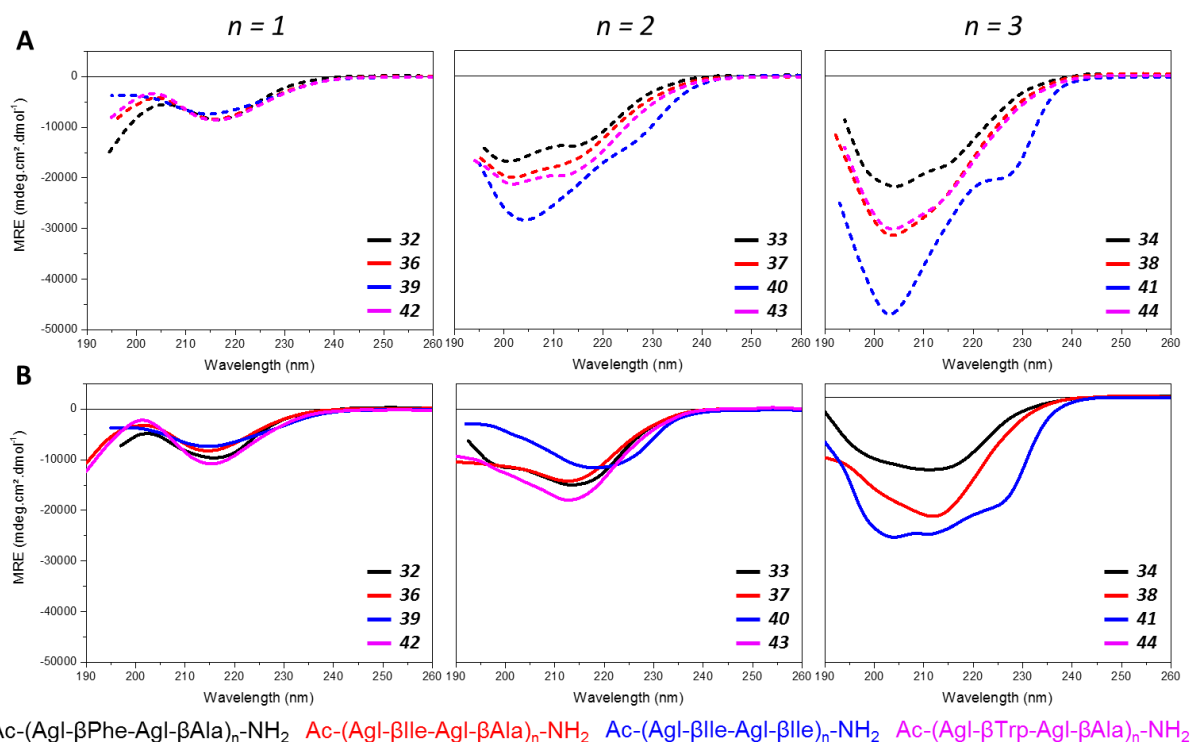


Figure 115 : Comparaison des spectres CD dans le méthanol (A) et le NaP (B) des oligomères d'Agl-(βPhe/βAla) (noir), Agl-(βIle/βAla) (rouge), Agl-(βIle/βIle) (bleu) et Agl-(βTrp/βAla) (rose).

Pour conclure, la synthèse de composés poly-(Agl-βAA) comportant des chaînes latérales hydrophobes variés, aliphatiques et aromatiques, ont permis d'évaluer la capacité surprenante de ces composés à se solubiliser dans des milieux aqueux malgré l'absence de chaînes latérales hydrophiles. L'évaluation de cette propriété singulière a été effectuée par mesure du LogP des différents composés et leur rapport particulier avec les solvants aqueux a pu être évalué par les études IR-TF. D'autre part, les études RMN, CD et IR-TF ont permis de montrer que la structure de ces oligomères est conservée indépendamment des chaînes latérales pour constituer une nouvelle famille de foldamère.

XI. 6. Substitution des AgI par des résidus Ala

Nous avons vu précédemment que les composés AgI- β AA sont repliés en hélice C_{12} dont les chaînes latérales des acides β -aminés sont projetées alternativement sur deux faces opposées de l'hélice. Dans la suite de notre étude, nous avons ensuite évalué la capacité de l'hélice 12 formée par les oligomères d'AgI- β AA à tolérer des substitutions ponctuelles du motif contraint AgI par des acides α -aminés. Nous pourrions ainsi décorer l'hélice avec des groupements fonctionnels non plus sur deux faces seulement mais sur ses quatre faces. Nous avons donc substitué un ou plusieurs motifs AgI au sein du composé **34** par des alanines (Ala) répartis le long de la séquence AgI-(β Phe/ β Ala) (Table 29).

Table 29 : Séquences analogues du composé **34** incorporant 1 ou 3 substitutions d'AgI par un résidu Alanine.

Composé	Séquence
34	Ac-AgI- β hPhe-AgI- β hAla-AgI- β hPhe-AgI- β hAla-AgI- β hPhe-AgI- β hAla-NH ₂
47	Ac-Ala- β hPhe-AgI- β hAla-AgI- β hPhe-AgI- β hAla-AgI- β hPhe-AgI- β hAla-NH ₂
48	Ac-AgI- β hPhe-AgI- β hAla-Ala- β hPhe-AgI- β hAla-AgI- β hPhe-AgI- β hAla-NH ₂
49	Ac-AgI- β hPhe-AgI- β hAla-AgI- β hPhe-AgI- β hAla-Ala- β hPhe-AgI- β hAla-NH ₂
50	Ac-Ala- β hPhe-AgI- β hAla-Ala- β hPhe-AgI- β hAla-Ala- β hPhe-AgI- β hAla-NH ₂

La construction de la structure de l'oligomère **50** à partir de l'hélice 12 formée par le composé **3** suivi d'une optimisation rapide par une méthode semi-empirique (AM1) montre la conservation de l'hélice et l'établissement de liaisons hydrogène additionnelles stabilisant davantage l'édifice moléculaire (Figure 116A). Nous observons la présence de liaisons hydrogène bidentates $C_{12/16}$ de par la disponibilité des HN supplémentaires des résidus Ala introduits dans les séquences (Figure 116B et D). La substitution d'un résidu Agl sur deux par un α-aminoacide permettrait ainsi de générer une face supplémentaire comportant les chaînes latérales de ces acides aminés (Figure 116B et C).

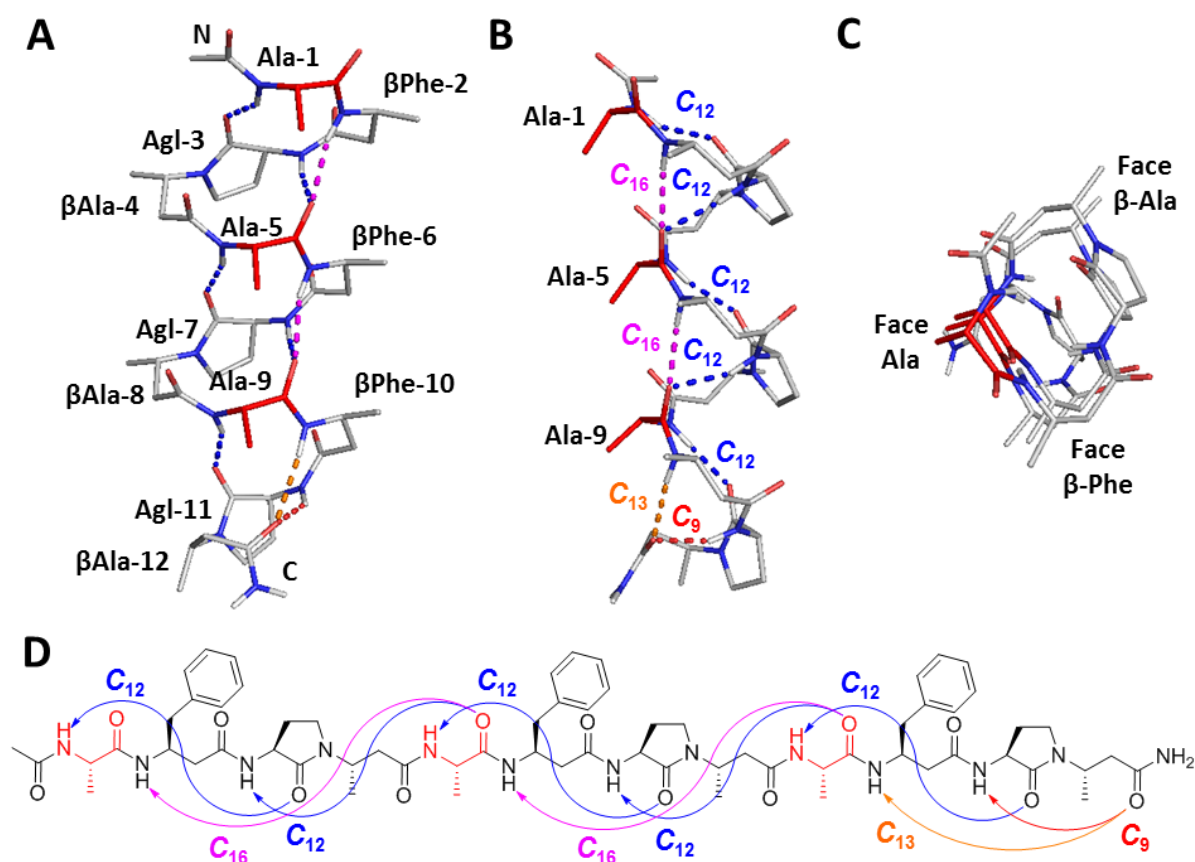


Figure 116 : Structure (A) et réseau de liaisons hydrogène (B) du composé **50** obtenu par méthode semi-empirique (AM1) et mise en évidence des différentes face en vue axiale (C) (Les chaînes latérales des βPhe ont été remplacées par des CH₃ pour plus de clarté). (D) Représentation schématique du réseau de liaisons hydrogène du composé **50** obtenu par méthode semi-empirique (AM1).

Etude CD et RMN

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons analysé les composés **47-50** par dichroïsme circulaire et RMN. Nous avons enregistré les spectres CD dans le méthanol, le tampon phosphate pH 7.4 sans et avec 50% TFE. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour le composé **34**. On retrouve les signatures caractéristiques des oligomères d'Agl-(β Phe/Ala) précédemment décrites dans le manuscrit. Cependant, on observe globalement que l'intensité du signal CD diminue d'autant plus que les substitutions Ala>Agl se situe au centre de la séquence dans les différents solvants. Ainsi, le composé **48** avec une mutation centrale et le composé **50** avec des triples mutations présentent des signatures similaires à celle de l'oligomère **1** qui ne possède pas de structure bien définie. L'introduction de résidus Ala à la place des Agl déstabilise donc partiellement ou totalement l'hélice 12.

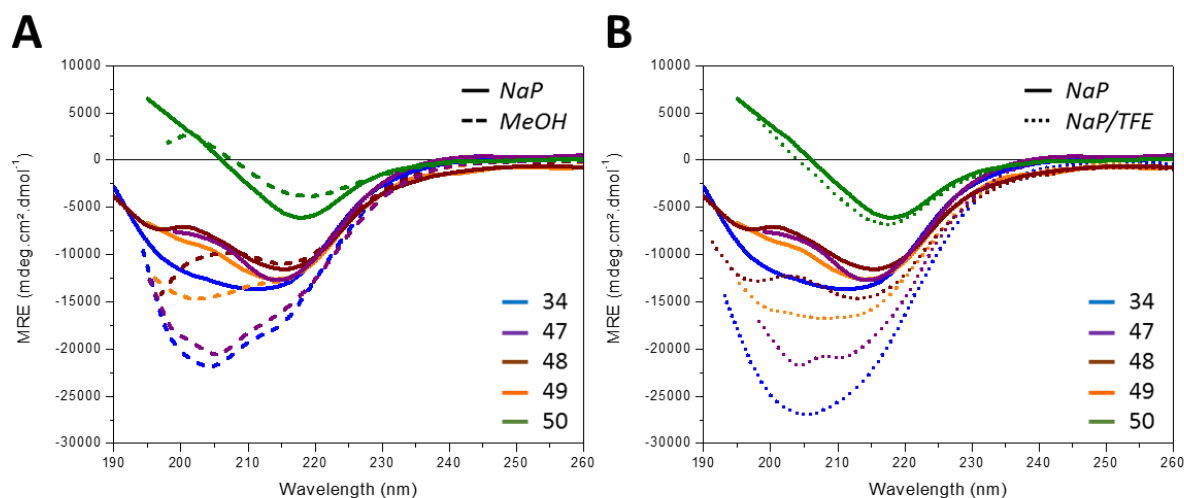


Figure 117 : (A) Spectres de dichroïsme circulaire dans le tampon phosphate (trait plein) et le méthanol (tirets) des composés **47-50**. (B) Spectres de dichroïsme circulaire dans le NaP (trait plein) comparé au NaP/TFE (pointillés) des composés **47-50**.

Si on analyse finement les spectres, l'ordre des mutations qui impactent de manière croissante la stabilité de l'hélice 12 est le suivant : Ala>Agl 1, Ala>Agl 9, Ala>Agl 5, Ala>Agl 1, 5, 9. Alors que les signaux dans le NaP ne sont pas très éclatés pour les composés substitués, leur signature dichroïque peut-être facilement comparés aux composés Agl-(β Phe/Ala) de différentes longueurs dans le méthanol (Figure 118). La signature du composé **47** (Ala>Agl 1) se rapprochent de celui du composé modèle **34** et celle du composé **48** (Ala>Agl 9) est similaire à celle du composé **32**. Lorsque les substitutions sont localisées vers les extrémités N ou C-terminales des oligomères, la perte de structure est confinée dans ces régions. Ce comportement est confirmé par RMN, on observe une perte locale de NOE pour ces

composés. De même, on remarque une perte substantielle de corrélations sur l'ensemble de la séquence lorsque la substitution est centrale ou multiple. Même si nous n'avons évidemment pas essayé d'introduire l'ensemble des acides aminés protéinogéniques, il est probable que l'introduction d' α AA, quel qu'il soit, à la place d'Agl ne soit pas favorable à la conservation de l'hélice 12. Ainsi, l'alternance stricte Agl- β AA est nécessaire afin d'obtenir une hélice 12 stable.

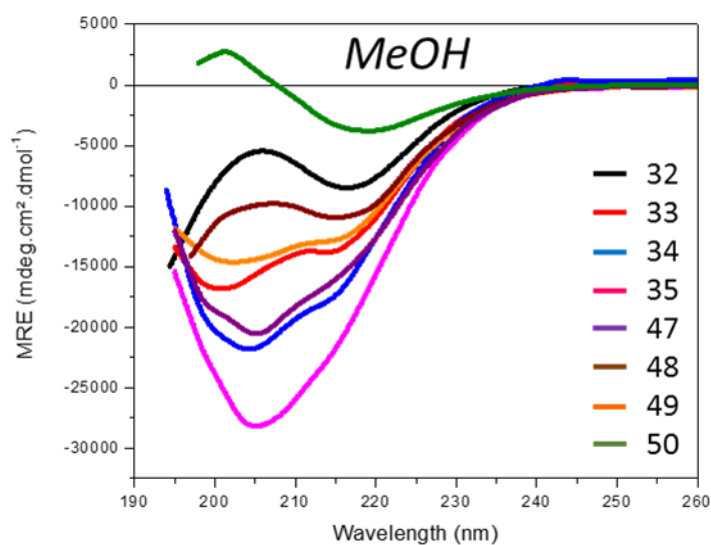


Figure 118 : Comparaison des spectres dichroïques dans le méthanol des composés substitués **47-50** avec les composés de différentes longueurs **32-35**.

XI. 7. Conclusion

Après avoir montré que des poly-(Agl- α AA) sont capables de se structurer en ruban par répétition de coude β II', nous avons exploré la capacité du motif contraint Agl à générer d'autres structures secondaires bien définies et stables. En substituant les α -aminoacides par des β^3 -aminoacides, nous avons identifié une nouvelle famille de foldamères, capables de se structurer en hélice 12. Cette hélice est stabilisée par des liaisons hydrogène entre les fonctions carbonyle des Agl des résidus i et les NH des amides des résidus $i-2$. Cette structure a pu être élucidée grâce à des études RX et RMN. Les études CD ont mis en évidence une signature caractéristique de cette famille de foldamères ainsi qu'un effet coopératif de la structuration avec la longueur des oligomères. D'autre part, les oligomères étudiés montrent une capacité surprenante à se solubiliser dans les milieux aqueux alors qu'ils ne contiennent dans leurs séquences que des résidus hydrophobes. Cette propriété unique a été évaluée par l'étude de leur solubilité et la mesure du LogP. Les études IR-TF ont permis de mettre en évidence le rapport particulier de ces composés avec les solvants aqueux. D'autre part nous avons démontré par ces différentes études que la structure est conservée indépendamment du choix des chaînes latérales. Enfin, nous avons démontré que l'alternance stricte de motifs Agl avec les β AA est indispensable à la structure, et que c'est la structure qui permet une solubilité particulière de ces composés.

Les motifs Agl ont permis d'obtenir différents types de structures : des rubans lorsqu'ils sont en alternance avec des α AA et des hélices 12 lorsqu'ils sont en alternance avec des β^3 AA. Par ailleurs, des oligomères avec différentes alternances d'Agl avec des α AA et/ou β^3 AA ainsi qu'avec des γ AA ont été synthétisés et testés par CD et RMN (Agl- β AA- α AA, Agl- α AA- β AA, Agl- β AA-Agl- α AA, Agl- γ AA). Aucune n'a permis à ce jour d'obtenir de oligomères structurés.

Conclusion générale

Des études antérieures à ma thèse ont permis de développer une stratégie de synthèse originale pour obtenir des oligomères d' α -amino γ -lactames (oligomères Agl- α AA) sur support solide à partir de simples séquences peptidiques. Ces oligomères se structurent en ruban par la répétition de coudes β II' stabilisés par une liaison hydrogène formant un pseudocycle à 10 atomes (C_{10}). Ils donnent accès à une nouvelle famille de foldamères dont les propriétés physico-chimiques sont facilement modulables. Un choix judicieux d' α -AA a permis d'obtenir une première famille de foldamères stables et non toxiques ayant une forte capacité à pénétrer dans les cellules.

Dans une première partie de ma thèse, je me suis attaché à optimiser les différentes étapes réactionnelles pour l'obtention d'oligomères d'Agl- α AA sur support solide. En effet, la stratégie initialement décrite s'est avérée inefficace pour la synthèse de certains oligomères d'Agl-AA. Divers paramètres ont été explorés. Les séquences peptidiques ont été préparées par SPPS assisté par vortex (FPPS), le solvant des deux étapes clés (méthylation et multicyclisation) a été modifié et certaines réactions ont été effectuées sous irradiation micro-ondes. Ces différentes optimisations ont permis de considérablement diminuer les temps de réaction des étapes clés de la synthèse de ces oligomères ainsi que de faciliter la synthèse de séquences difficiles à obtenir suivant les anciennes conditions réactionnelles.

Dans une deuxième partie de ma thèse, j'ai participé au développement des oligomères d'Agl- α AA comme vecteurs de pénétration intracellulaire. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'oligomère d'Agl-AA alternant des résidus arginine et tryptophane, le composé **14** [(Agl-Trp-Agl-Arg)₃] qui s'est avéré plus efficace pour pénétrer dans les cellules, que les CPP de référence la pénétratine et le peptide R₆W₃. Les études par microscopie confocale ont montré que cet oligomère Agl(Trp/Arg) est localisé dans le cytosol (Figure 119A), un compartiment difficile à atteindre pour certaines classes de molécules à visée thérapeutique. Afin d'étudier la capacité de cet oligomère pénétrant à véhiculer un cargo dans le cytosol, nous l'avons conjugué à un peptide proapoptotique, le peptide (D)-KLA, responsable de la mort cellulaire par interaction avec la membrane des mitochondries dans le cytosol. Incapable de traverser seul la membrane plasmique, ce composé ne présente aucune cytotoxicité, en revanche conjugué à la séquence Agl(Trp/Arg), il induit la mort cellulaire avec une IC₅₀ de 7.5 μ M (Figure 119B). et inhibe 90% de la croissance cellulaire à 20 μ M. Cette expérience nous a permis de valider la capacité de cet oligomère à vectoriser des cargos biologiquement actifs au sein de la cellule. Enfin, des tests ont été conduits en présence de trypsine, chymotrypsine et dans le sérum humain afin d'évaluer la capacité des oligomères

Agl(Trp/Arg) à résister à la protéolyse. Contrairement au CPP R₆W₃ qui présente un temps de demi-vie d'environ 2 h, l'oligomère d'Agl-αAA possède une résistance importante à la dégradation enzymatique qui lui permet de rester intact après 24 h (Figure 119C). Dans un second temps, nous avons effectué une étude de relation structure-activité, en particulier la position et le nombre de résidus Trp ont été modulés de part et d'autre du ruban. La capacité de pénétration intracellulaire de ces nouveaux oligomères a été évaluée sur différentes lignées cellulaires. Les résultats ont montré que la capacité des différents composés à pénétrer dans les cellules n'est pas dépendante du type de lignées ni du caractère amphipatique des molécules, qu'il soit structural ou séquentiel. En revanche le nombre de résidus Trp impacte fortement l'efficacité de pénétration, trois résidus Trp sont nécessaires pour obtenir des oligomères d'Agl-AA possédant une forte capacité à pénétrer dans les cellules.

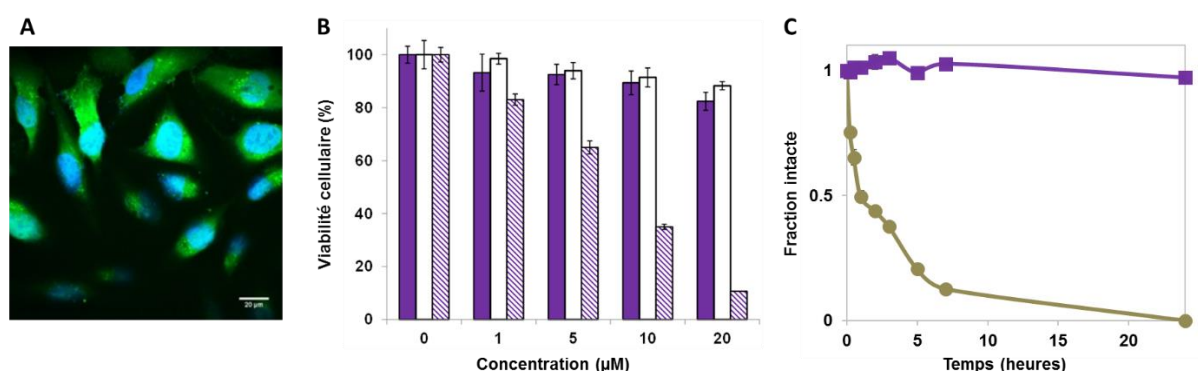


Figure 119 : (A) Microscopie confocale de l'oligomère fluorescent FI-Ahx-(Agl-Trp-Agl-Arg)₃-NH₂ (**14**) sur cellules MDA-MB-231 après 3h d'incubation à 10μM ; (B) Test de cytotoxicité de la séquence (Agl-Trp-Agl-Arg)₃ conjuguée au peptide (D)-KLA (hachuré) comparé au vecteur (**14**) (violet) et (D)-KLA (blanc) seuls ; (C) Test de protéolyse dans le sérum humain du composé **14** (violet) comparé au CPP R₆W₃ (marron).

Dans un autre volet de ma thèse, je me suis intéressé au développement d'une nouvelle famille de foldamères en remplaçant dans les oligomères d'Agl-αAA, les α-aminoacides par des β³-aminoacides afin de perturber la formation du coude β. Ces oligomères d'Agl-βAA ont été étudiés par différentes techniques physico-chimiques (RMN, CD, IR, RX). Ces études ont permis d'identifier un nouveau type de foldamères, qui adoptent une structure stable en hélice 12 (Figure 120A). La structure obtenue par DRX est une hélice gauche à section ovale légèrement courbée avec un pas moyen de 6 Å (Figure 120B et C). Le repliement en hélice 12 a été confirmé en solution par des études RMN (Figure 120C). En revanche, la courbure de l'hélice n'est pas observée en solution, elle pourrait être le fruit d'une contrainte d'empilement cristallin. D'autre part, La structure en hélice 12 est dépendante de l'alternance stricte des βAA avec le motif Agl. Les études de RMN et de CD ont montré que la

substitution d'un seul motif AgI provoque un dépliement local de l'hélice. Au cours de ces expériences, les oligomères d'AgI- β AA ont montré une capacité étonnante à se solubiliser en milieu aqueux malgré l'absence de chaînes latérales hydrophiles. Cette propriété a pu être évaluée par des tests de solubilité et de mesure de LogP. Les études IRTF ont permis de mettre en évidence un effet de solvation qui peut expliquer cette solubilité inattendue en milieu aqueux. Cette dernière semble intimement liée au repliement en hélice 12 de ces oligomères qui permet une présentation des groupements CO des β AA vers l'extérieur de l'hélice. Ce positionnement pourrait favoriser la solvation de l'oligomère. Les études RMN et DRX se poursuivent sur des oligomères qui possèdent des chaînes latérales différentes afin d'explorer les propriétés physico-chimiques de cette famille de molécules.

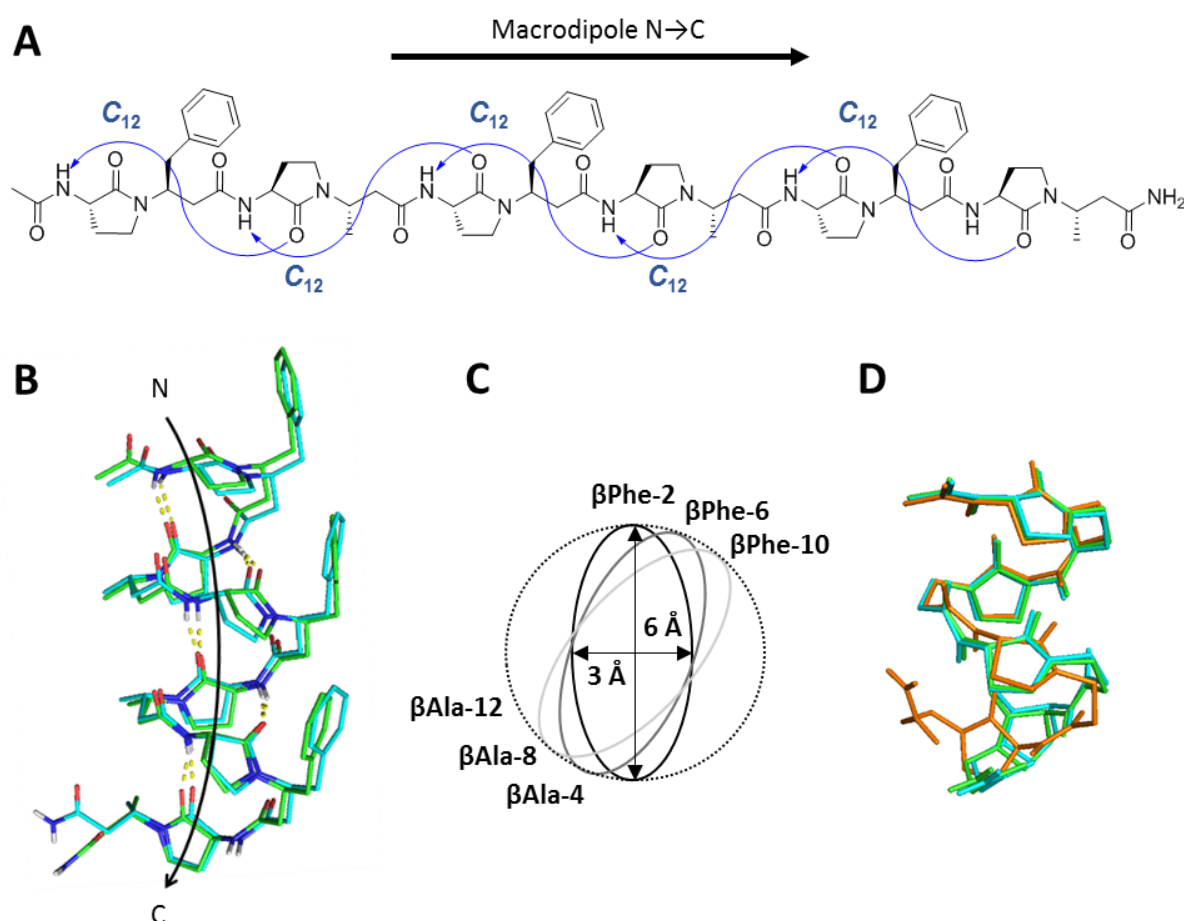


Figure 120 : (A) Représentation du réseau de liaisons hydrogène de l'hélice 12 des oligomères d'AgI- β AA ; (B) Superposition des structures obtenues par DRX du composé **34** ; (C) Représentation schématique de la coupe axiale de l'hélice d'AgI- β AA ; (D) Superposition des structures optimisées par DFT dans le DMSO- d_6 (orange), le méthanol- d_3 (vert) et le tampon phosphate pH 6.4 (cyan).

Le lactame de Freidinger est un dipeptide contraint utilisé en chimie médicinale pour augmenter la sélectivité, la stabilité et la pénétration cellulaire de peptides biologiquement actifs. Les travaux menés au sein de notre laboratoire sur l'alternance d'Agl avec des α - et β -AA montrent la capacité de ce type de motif à générer des molécules capables d'adopter des structures stables. Les oligomères d'Agl/ α AA se structurent en ruban, et la modulabilité des chaînes latérales nous a permis de développer des vecteurs de pénétration intracellulaire efficaces. Les oligomères d'Agl/ β AA donnent des hélices 12 aux propriétés physico-chimiques surprenantes et liées à leur structure. Ces motifs sont d'un intérêt particulier pour l'exploration de nouvelles structures aux propriétés singulière.

Partie expérimentale

General remarks

All of the Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) protected natural amino acids and (1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium-3-oxid hexafluorophosphate) (HATU) were provided by Iris Biotech GmbH. Piperidine, N,N-Diisopropylethylamine (DIEA), 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), 7-Methyl-1,5,7-triazabicyclodec-5-ene (TBD), Trifluoroacetic acid (TFA), Triisopropylsilane (TIS), dichloromethane (DCM) N,N-Dimethylformamide (DMF) and N-methylpyrrolidinone (NMP) were provided by Sigma Aldrich. Iodomethane (MeI) was provided by Thermo Fisher Scientific and Fmoc-Rink amide AmphiSpheres 40 RAM 0.37 mmol/g 75-150 μm resin was purchased from Agilent Technologies. 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 superior to 98%.

X-ray diffraction

Crystal evaluation and data collection were performed on the XRD1 beamline of the Elettra synchrotron (Trieste, Italy) on a Huber 4-circles kappa goniometer and a Pilatus 2M detector. The incident wavelength was set at 0.7000 Å. The *XDS*-program²³² was used for frame integration using default parameters, for the empirical absorption correction using spherical harmonics employing symmetry-equivalent and redundant data, and for the correction for Lorentz and polarization effects. The crystal structure was solved using the *ab-initio* iterative charge flipping method with parameters described by Van der Lee²³³ using the *Superflip* program²³⁴ and it was refined using full-matrix least-squares procedures as implemented in *CRYSTALS*²³⁵ on all reflections with $I > 2\sigma(I)$.

The H atoms were partially located in a difference map and partially positioned geometrically, and all were repositioned geometrically. They were initially refined with soft restraints on the bond lengths and angles to regularize their geometry (C---H in the range 0.93-0.98 Å) and $U_{\text{iso}}(\text{H})$ (in the range 1.2-1.5 times U_{eq} of the parent atom), after which the positions were refined with riding constraints²³⁶. The absolute configuration was assigned arbitrarily, because

of the absence of strong anomalous scatterers for this energy. Some disordered water molecules were found with arbitrarily assigned site occupancy factors at 0.5.

Compound	34
formula	$\text{C}_{136}\text{H}_{188}\text{N}_{26}\text{O}_{31}$
moiety	$2(\text{C}_{68}\text{H}_{89}\text{N}_{13}\text{O}_{13}), 5(\text{H}_2\text{O})$
<i>T</i> (K)	100
spacegroup	$P1_21_1$
crystal system	monoclinic
<i>a</i> (Å)	10.615(2)
<i>b</i> (Å)	29.038(6)
<i>c</i> (Å)	22.900(5)
α (°)	90
β (°)	100.30(3)
γ (°)	90
<i>V</i> (Å³)	6945.0(14)
<i>Z</i>	2
ρ (gcm⁻³)	1.283
<i>M_r</i> (gmol⁻¹)	2683.14
μ (mm⁻¹)	0.088
<i>R</i>_{int}	0.055
Θ_{max} (°)	27.779
resolution (Å)	?
<i>N</i>_{tot} (measured)	107107
<i>N</i>_{ref} (unique)	17451
<i>N</i>_{ref} ($I > 2\sigma(I)$)	13698
<i>N</i>_{ref} (least-squares)	13698
<i>N</i>_{par}	1756
$\langle \sigma(I)/I \rangle$	0.0490
<i>R</i>₁ ($I > 2\sigma(I)$)	0.0640
<i>wR</i>₂ ($I > 2\sigma(I)$)	0.0720
<i>R</i>₁ (all)	0.0815
<i>wR</i>₂ (all)	0.1005
GOF	0.9954
$\Delta\rho$ (eÅ⁻³)	-0.43/1.00

Nuclear magnetic resonance

The NMR samples typically contained 2-4 mM of compound dissolved in CD₃OH, phosphate buffer or/and DMSO. All spectra were recorded on a Bruker Avance 600 AVANCE III spectrometer equipped with a 5 mm quadruple-resonance probe (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ³¹P). 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 (t₁) × 2048 (t₂) complex data points; 8-64 scans per t₁ 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 300 ms for the ROESY experiments. In addition, 2D heteronuclear spectra ¹⁵N, ¹³C-HSQC were acquired (8-32 scans, 256-512 real (t₁) × 2048 (t₂) complex data points). Spectra were processed with Topspin (Bruker Biospin) and visualized with Topspin or NMRview on a Linux station. The matrices were zero-filled to 1024 (t₁) × 2048 (t₂) points after apodization by shifted sine-square multiplication and linear prediction in the F1 domain. Chemical shifts were referenced to the tetramethylsilane (TMS) or trimethylsilylpropanoic acid (TMSP).

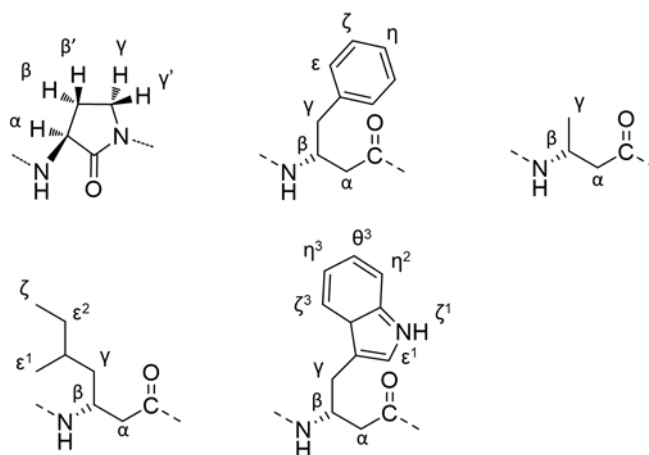


Figure S1 : Nomenclature used for the various atoms of each residues

Structure calculation

^1H , ^{15}N and ^{13}C chemical shifts were assigned according to classical procedures. The nonequivalent diastereotopic methylene groups of the γ -lactam rings were stereospecifically assigned as previously described.¹¹⁵ NOE cross-peaks were integrated and assigned within the NMRView software²³⁷. 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 previously²³⁸. Structure calculations were performed with AMBER 10²³⁹ in two stages: cooking, simulated annealing in vacuum. The cooking stage was performed at 1000 K to generate 100 initial random structures. SA calculations were carried during 20 ps (20000 steps, 1 fs long) as described elsewhere. First, the temperature was risen quickly and was maintained at 1000 K for the first 5000 steps, then the system was cooled gradually from 1000 K to 100 K from step 5001 to 18000 and finally the temperature was brought to 0 K during the 2000 remaining steps. For the 3000 first steps, the force constant of the distance restraints was increased gradually from 2.0 kcal.mol⁻¹.Å to 20 kcal.mol⁻¹.Å. For the rest of the simulation (step 3001 to 20000), the force constant is kept at 20 kcal.mol⁻¹.Å. The 20 lowest energy structures with no violations > 0.3 Å were considered as representative of the compound structure. The representation and quantitative analysis were carried out using MOLMOL²⁴⁰ and PyMOL (Delano Scientific).

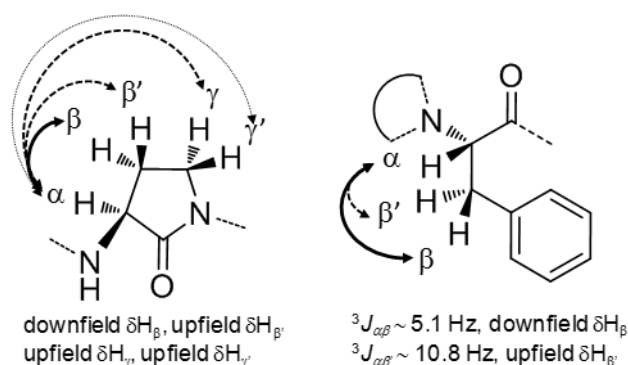


Figure S2 : Stereospecific assignment strategy of the nonequivalent diastereotopic methylene groups of the γ -lactam rings and of the phenylalanine side chains. Characteristic 'strong', 'medium' and 'small' NOEs are shown in plain, dashed and dotted arrows, respectively

Fourier transformation infra-red spectroscopy

FTIR analyses were performed on a Tensor 27 (Brucker) spectrometer. Samples were dissolved in methanol- d_4 , D_2O and chloroform and transferred in liquid cell with NaCl windows of 3 mm thickness with a 100 μm Teflon brace. Spectra were recorded with 128 scans at a 4 cm^{-1} resolution and baseline was corrected by subtracting the solvent spectrum. Temperature measurements were performed with a peltier. Baseline fit was performed with a polynomial function and all spectra were normalized by their concentration.

Figure S3 : Concentration of compounds for IR-TF measurements (mM)

Compound	D_2O	H_2O	CD_3OD	$CHCl_3$
32	17.7		8.5	
33	6.0		3.8	
34	2.8	3.1	3.0	
35			1.8	
36	11.8		9.2	
37	6.1		4.7	
38	4.0		1.4	
39	4.2		8.3	7.0
40			4.4	4.1
41			1.5	1.3
42	10.1		5.0	
43			1.5	
44			1.2	
45	2.2		4.4	

Circular dichroism

Circular dichroism spectra were obtained on a JASCO J815 spectropolarimeter. Continuous scanning mode was used, with a response of 1.0 s with 0.2 nm steps and a bandwidth of 2 nm. The spectra were obtained using a 1 mm path length CD cuvette over a wavelength range of 190-260 nm. Samples were dissolved at 50-200 μ M in phosphate buffer pH 7.4 and methanol, and spectra were recorded at 20°C and 90°C or 20°C and 55°C respectively. The signal to noise ratio was improved by acquiring each spectrum over an average of three scans. Baseline was corrected by subtracting the background from the sample spectrum.

SPPS procedure

Peptide synthesis was performed using a standard SPPS protocol²⁰³. Each synthesis was performed on a 0.2 mmol scale, using Fmoc-Rink amide AmphiSpheres 40 resin (0.38 mmol/g) in plastic syringes equipped with frits. Double coupling of α -amino acids was performed with Fmoc protected α -amino acids (5 eq), HATU (5 eq) and DIEA (10 eq) added to the syringe reactor stirred in a 650 rpm vortex for 5 min at room temperature. Double coupling of β -amino acids was performed with Fmoc protected β -amino acids (1.2 eq), DCC (1.2 eq) and Oxymapure® (1.2 eq) added to the syringe reactor stirred at 70°C using microwave (CEM Microwave Synthesis Discover). After each double coupling reaction, the peptide-resin was submitted to two 2 min deprotection cycles with DMF/piperidine 80/20 v/v solution in a 650 rpm vortex.

Multimethylation and multicyclisation

Rink amide resin bearing peptides were swelled in DMF for 10 minutes. Then a 2M solution of MeI in NMP was added to the resin and the syringe reactor was stirred for 2 h at room temperature. Then, the resin was washed three times with DCM, NMP. The cyclisation was carried out with a solution of 4% TBD in NMP for 15 min at 60°C using microwave. The reaction was monitored by LC/MS analysis of the peptide cleaved from a small amount of the resin. In the case of longer oligomers, an incomplete cyclisation was observed and the cycle of methylation and cyclization was repeated 2-3 more times in the same experimental conditions.

Cleavage

Oligomers were cleaved from the resin by treatment with 50 ml TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) solution for 2h. After removal of the resin by filtration, it was washed three times with DCM. The DCM and TFA filtrates were assembled and concentrated under reduced pressure. Compounds were precipitated by addition of 50 ml of diethyl ether and centrifuged. Finally, they were dissolved in an acetonitrile/water 50/50 solution containing 0.1% TFA and freeze dried.

Compounds purification

All crude compounds were purified by preparative HPLC (Waters 4000 apparatus) on a C18 reversed-phase column (C18 Deltapak column, 100 mm x 40 mm, 15 μ m, 100 Å) at a flow rate of 50 mL/min of a H₂O + 0.1% TFA and CH₃CN + 0.1% TFA mixture in gradient mode with UV detection at 214 nm. Fractions containing the pure product were collected and freeze dried.

HPLC analysis

Reactions were monitored by HPLC (Agilent Technologies 1220 Infinity LC) on a C18 reversed-phase column (Chromolith®HighResolution RP-18e 50 x 4.6 mm column) at a flow rate of 4 mL/min and a gradient of (0–100)% B over 5 min. Eluent A: water/0.1% formic acid; eluent B: acetonitrile/0.1% formic acid. The detection was performed at 214 nm.

LC/MS analysis

Samples were prepared in an acetonitrile/water (50/50 v/v) mixture containing 0.1% TFA. The LC/MS system consisted of a Waters Alliance 2690 HPLC coupled to a Micromass (Manchester, UK) ZQ spectrometer (electrospray ionization mode, ESI+). All analyses were carried out using a C18 Chromolith Flash 25 x 4.6 mm column. A flow rate of 3 mL/min and a gradient of 0–100% B over 2.5 min of a H₂O + 0.1% HCOOH and CH₃CN + 0.1% HCOOH mixture in gradient mode with UV detection at 214 nm. Positive-ion electrospray mass spectra

were acquired at a solvent flow rate of 100–200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Nitrogen was used for both the nebulizing and drying gas. The data were obtained in a scan mode ranging from 200 to 1700 m/z in 0.1 s intervals; ten scans were summed up to obtain the final spectrum. Retention times are given in minutes. Solvents used for HPLC and LC/MS were of HPLC grade.

Solubility measurement

Ten microliters of a 10 mM solution in DMSO of the compound was diluted either in 490 μL of PBS pH 7.4 or in organic solvent MeOH in a 700 μL -microtube (in triplicate). The tubes were gently shaken 24 h at room temperature, then centrifuged for 5 min at 4000 rpm. The mixtures were filtered over 0.45 μm filters (Millex-LH Millipore). Ten microliters of sample was diluted in 490 μL of MeOH. The solubility is determined by the ratio of HPLC-UV signal area PBS/organic solvent.

$$\text{Solubility } (\mu\text{M}) = \frac{AUC_{\text{PBS filtered}}}{AUC_{\text{MeOH not filtered}}} \times 200$$

Test is considered valid when response between filtered and not filtered samples is lower than 10%

$$\left| \frac{AUC_{\text{MeOH not filtered}} - AUC_{\text{MeOH filtered}}}{AUC_{\text{MeOH not filtered}}} \right| \leq 10\%$$

LogP Measurement

40 μL of a 10 mM solution in DMSO of the compound was diluted in 1.960 mL of a 1/1 octanol/PBS mixture at pH 7.4. The mixture was gently shaken for 2 h at room temperature. Ten microliters of each phase was diluted in 490 μL of MeOH and analyzed by HPLC-UV. Each compound was tested in triplicate. LogP was determined as the logarithm of the ratio of concentration of product in octanol and PBS, determined by HPLC-UV signals.

$$\text{LogP} = \frac{AUC_{\text{Octanol}}}{AUC_{\text{PBS}_{7.4}}}$$

Confocal laser scanning microscopy

The MDA-MB-231 cells were seeded into a 12-well tissue culture chambers (Sarstedt, Germany) containing rounded 18 mm-coverslips at a density of 200 000 cells/well in 1 mL of medium. After one day of culture, the different fluorescein-labeled compounds (10 μ M) were added for 3 h at 37 °C in the growth medium. Afterwards, the cells were washed with PBS (3 $\times$ 1 mL). These cells were then fixed with 500 μ L of cold 4% PFA in PBS for 30 min and washed twice with PBS. The nuclei were stained using a DAPI solution (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France). Images were recorded on a confocal microscope (Leica SP5, Leica Microsystems GmbH, Germany) and analysed using ImageJ software.

Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of Ac-(klaklak)₂-NH₂ and of the compounds **31** and **14** was determined by the MTT assay. In brief, MDA-MB-231 cells were seeded at 20.000 cells/well in clear, flat-bottomed 96-well plates (Costar), 24 h before treatment. After being washed, 200 μ L of culture medium that contained the compounds at different concentrations (0, 1, 2, 5, 10 and 20 μ M in DMEM) was added to the wells and incubated at 37 °C for 48 h. The cytotoxicity assay was performed by the addition of 20 μ L of MTT solution (5 mg/ml in PBS) into each well and cells were incubated at 37 °C for another 3 h. The medium was removed and 150 μ L of DMSO/Ethanol was added into each well. The plate was gently rotated on an orbital shaker for 10 min to completely dissolve the precipitate. The absorbance was detected at 570 nm with a Microplate Reader (Multiskan FC, ThermoFisher Scientific, France). The results obtained from triplicate wells were averaged and normalized to the value obtained from the non-treated cells.

Peptide stability in serum

Human serum reaction sample contained 250 μ L of heat inactivated Human Serum (Sigma Aldrich) and 750 μ L of RPMI Medium 1640 (Sigma Aldrich). The reactions were initiated by addition of 50 μ L peptide (5 mM stock solution in DMSO). Assays were performed in a shaking water bath at 37 °C. 100 μ L samples were collected at known time intervals and added to 200 μ L of acetonitrile 1% TFA to precipitate serum proteins. Cloudy sample was cooled to 4 °C for

15 min and then submitted to centrifugation for 10 min at 12,000 rpm to pellet the precipitated serum proteins. 150 μ L of the clear supernatants were collected and peptides were finally analysed by RP-HPLC and LC-MS.

Protease resistance

Chymotrypsin (Sigma Aldrich) reaction samples contained 15 μ L of peptide in DMSO (5 mM stock solution) and 585 μ L of buffer consisting of 50 mM phosphate buffer pH 7.4 with 2 mM CaCl_2 . Final chymotrypsin concentration was 5 μ g/mL. Pepsin (Roche) reaction samples contained 15 μ L of peptide in DMSO (5 mM stock solution) and 585 μ L of 10 mM HCl pH 2 buffer. Final pepsin concentration was 50 μ g/mL. Peptide fragments were analysed at known time intervals with RP-HPLC.

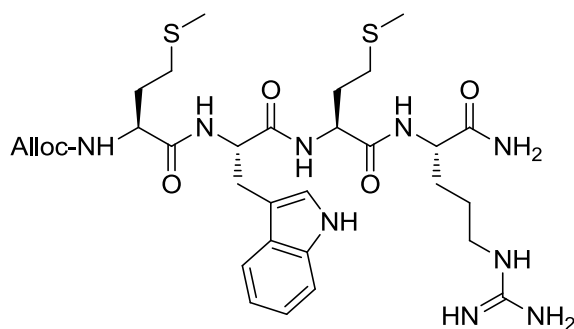
Cell Penetration Assays

Stock solutions of fluorescein-labeled compounds were prepared in DMSO at a concentration of 4 mM. Final concentration of DMSO added to the cells did not exceed 1% (v/v). Cell lines were grown in complete growth medium (DMEM, 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin) were harvested, counted using a haemocytometer, and seeded in a black, clear bottom 96-well plate (Corning) with 20,000 cells per well. The plate was incubated overnight at 37°C in 5% CO_2 atmosphere to allow attachment of the cells to the bottom of the well. The next morning, cells were washed with PBS once and then incubated with the indicated concentrations of fluorescein-labeled compounds in triplicate, in fresh complete growth medium for 1 hour at 37°C. After the desired incubation time, the total fluorescence was quantified by the CLARIOstar® High Performance Monochromator Multimode Microplate Reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Cells were then washed with PBS three times, incubated with fresh complete medium and the remaining fluorescence was measured in the same conditions as before. The percentage of the intracellular uptake of the fluorescein-labeled compounds was calculated by measuring the ratio between the remaining fluorescence (RF) and the total fluorescence (TF) for each compound ($\text{RF/TF} \times 100$). Cells that had been incubated with fluorescein alone were used as a negative control.

Synthesis of compound 1-13 for reactions optimization

Peptide sequences were obtained through SPPS general procedure. After removal of the last Fmoc protection, last Methionine were capped either with Acetyl or Alloc group. Acetyl group was added through 10 min treatment of Ac₂O/DCM (1:1) solution with a 650 rpm vortex stirring at room temperature while Alloc group was added through two 5 min treatments with 4 eq. of allyl chloroformate and 8 eq. DIEA dissolved in 10 ml of DMF with a 650 rpm vortex stirring at room temperature. Different conditions of methylation and cyclisation were tested as described in chapter II. Although compounds were not purified, retention times and m/z are detailed below.

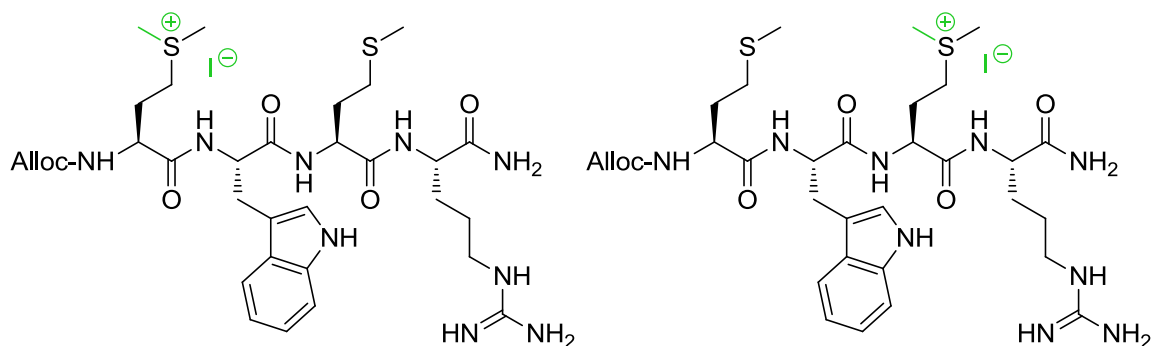
Alloc-MetTrpMetArg-NH₂ (1)



HPLC Retention time : 1.30 min

MS(ESI): m/z [M+H]⁺ = 706.3

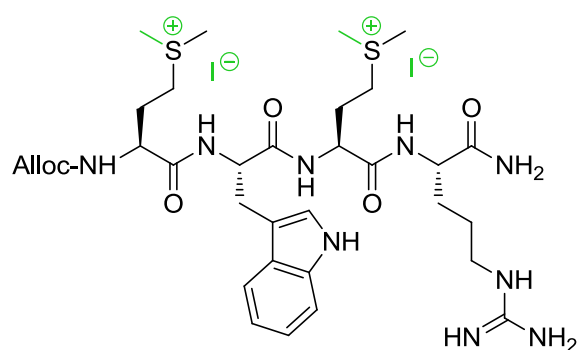
Alloc-Met(S-Me)⁺TrpMetArg-NH₂ & Alloc-MetTrpMet(S-Me)⁺Arg-NH₂ (2-3)



HPLC Retention time : 1.01 & 1.03 min

MS(ESI): m/z [M+H]⁺ = 720.3

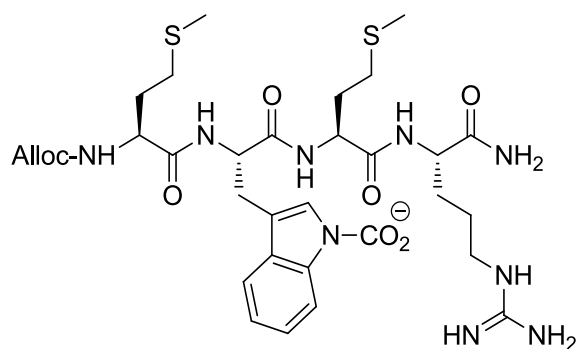
Alloc-Met(S-Me)⁺TrpMet(S-Me)⁺Arg-NH₂ (4)



HPLC Retention time : 0.90 min

MS(ESI): m/z $[M+H]^+ = 736.5$

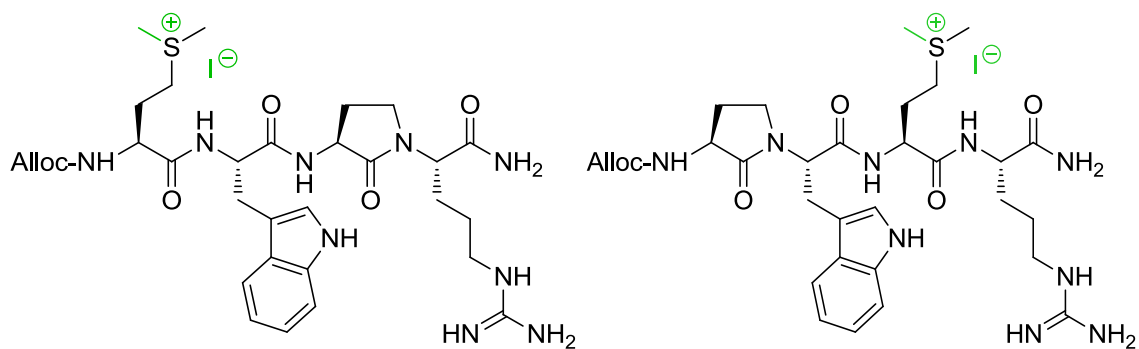
Alloc-MetTrp(N-CO₂)⁻MetArg-NH₂ (5)



HPLC Retention time : 1.60 min

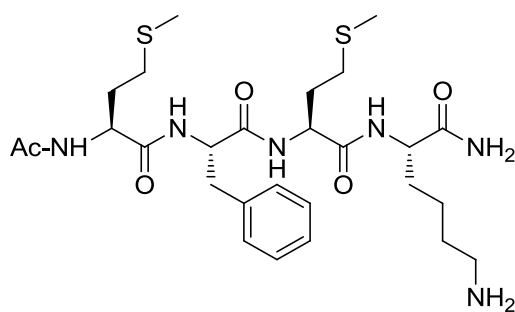
MS(ESI): m/z $[M+H]^+ = 750.3$

Alloc-Met(S-Me)⁺TrpArg-NH₂ or Alloc-ArgTrpMet(S-Me)⁺Arg-NH₂ (6)

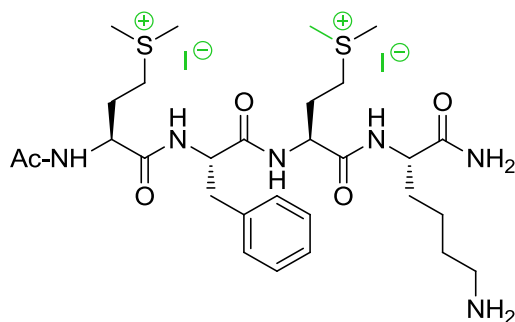


HPLC Retention time : 0.91 min

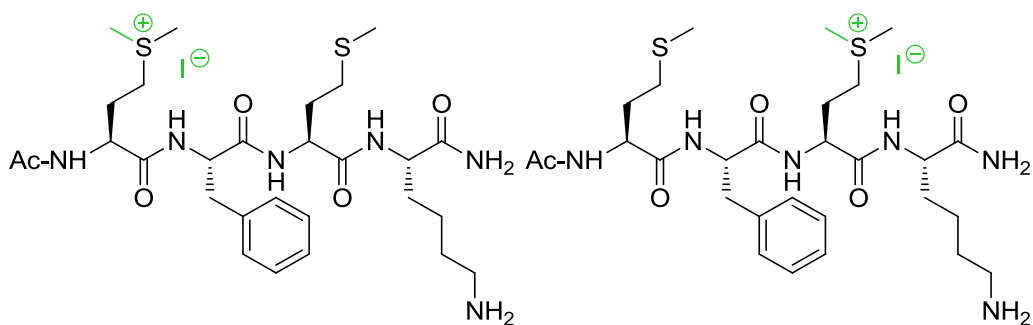
MS(ESI): m/z $[M+H]^+ = 672.3$

Ac-MetPheMetLys-NH₂ (7)

HPLC Retention time : 1.07 min

MS(ESI): m/z $[M+H]^+ = 597.0$ Ac-Met(S-Me)⁺PheMet(S-Me)⁺Lys-NH₂ (8)

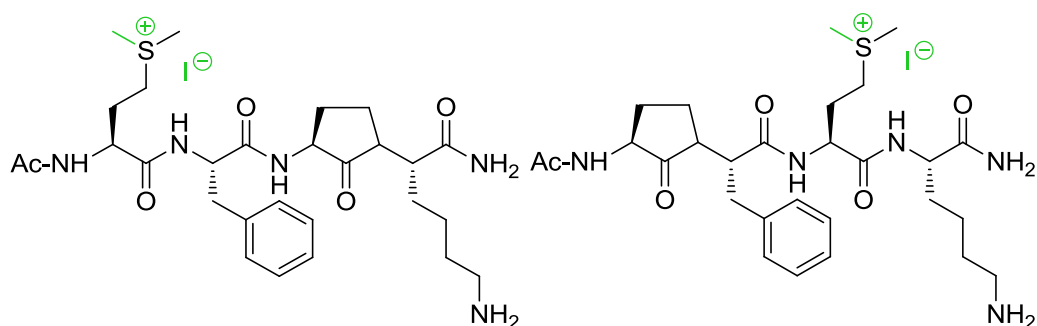
HPLC Retention time : 0.24 min

MS(ESI): m/z $[M+2H]^{2+} = 313.6$ Ac-Met(S-Me)⁺PheMetLys-NH₂ & Ac-MetPheMet(S-Me)⁺Lys-NH₂ (9-10)

HPLC Retention time : 0.76 & 0.78 min

MS(ESI): m/z $[M+H]^+ = 611.3$

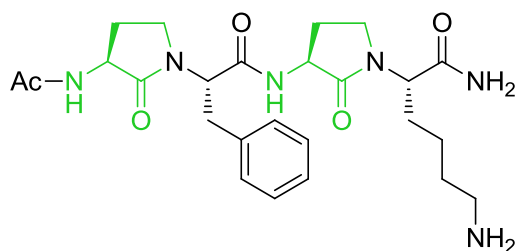
Ac-Met(S-Me)⁺PheAgILys-NH₂ or Ac-MetPheMet(S-Me)⁺Lys-NH₂ (11)



HPLC Retention time : 0.71 min

MS(ESI): m/z $[M+H]^+$ = 563.4

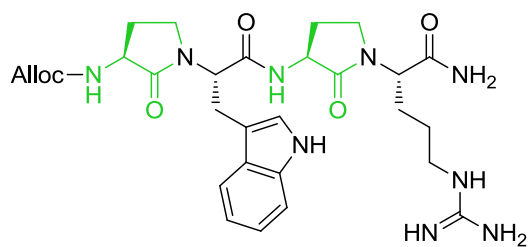
Ac-AgIPheAgILys-NH₂ (12)



HPLC Retention time : 0.87 min

MS(ESI): m/z $[M+H]^+$ = 501.1

Alloc-AgIPheAgILys-NH₂ (13)



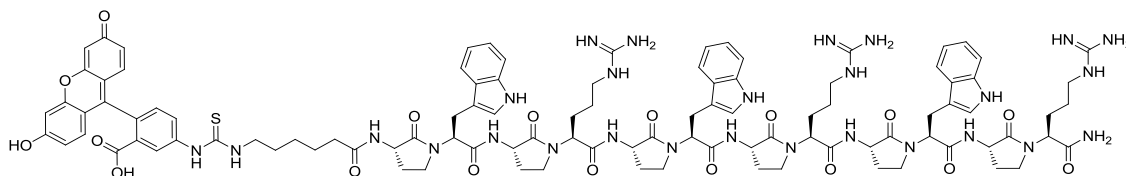
HPLC Retention time : 1.16 min

MS(ESI): m/z $[M+H]^+$ = 610.4

Synthesis of fluorescently labelled oligomers 14-24

Alternating Met/AA peptides were obtained through SPPS procedure as described previously. After removal of the Fmoc group of the last methionine residue, the peptide sequences were re-protected by an Alloc group after two 5 min treatments with 4 eq. of allyl chloroformate and 8 eq. DIEA dissolved in 10 ml of DMF in a 650 rpm vortex at room temperature. Multimethylation and multicyclisation were then performed to obtain the oligomer on solid support. Once the conversion was complete, Alloc protection was removed in 10 mL of DCM with 20 eq of PhSiH_3 followed by 0.1 eq of $\text{Pd}_0(\text{PPh}_3)_4$ stirred in 650 rpm vortex for 5 min. After two removal procedure, the resin was washed three times with DCM and DMF, and stirred for 5 min with 10 ml 0.5 % solution of sodium diethyldithiocarbamate trihydrate in DMF, to remove any residual palladium related impurity. The resin was then washed 3 times with DMF and 3 times with DCM. The Fmoc-Ahx-OH spacer moiety was then coupled to the deprotected polylactam sequences via the SPPS procedure reported earlier. After deprotection of the Fmoc group, 1.5 eq FITC, 3 eq DIEA dissolved in 10 ml of NMP were added to the resin and stirred overnight. Fluorescently labelled oligomers were finally cleaved from the resin and purified by preparative HPLC according to the procedures described previously.

FI-Ahx-(Agl-Trp-Agl-Arg)₃-NH₂ (14)

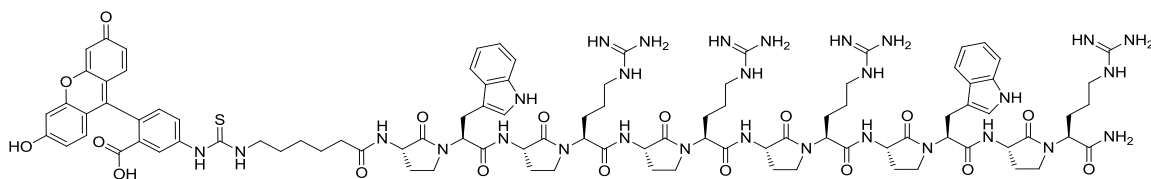


HPLC Retention time 1.25 min

MS(ESI): m/z $[(M+4H)^{4+}] = 511.99$

Yield: 15%

FI-Ahx-Agl-Trp-Agl-Arg-Agl-Arg-Agl-Arg-Agl-Trp-Agl-Arg-NH₂ (15)

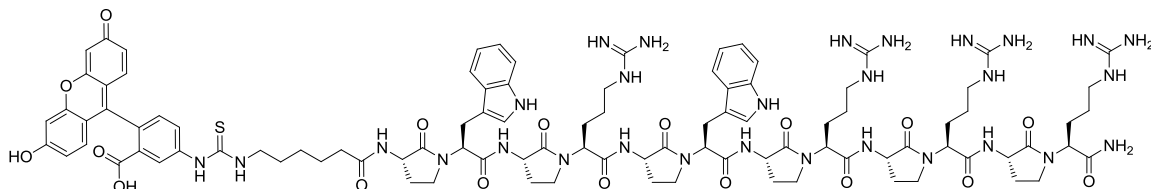


HPLC Retention time 0.83 min

MS(ESI): m/z $[(M+3H)^{3+}] = 673.9$; $[(M+4H)^{4+}] = 505.4$; $[(M+5H)^{5+}] = 404.8$; $[(M+6H)^{6+}] = 337.3$

Yield: 3%

FI-Ahx-Agl-Trp-Agl-Arg-Agl-Trp-Agl-Arg-Agl-Arg-Agl-Arg-NH₂ (16)

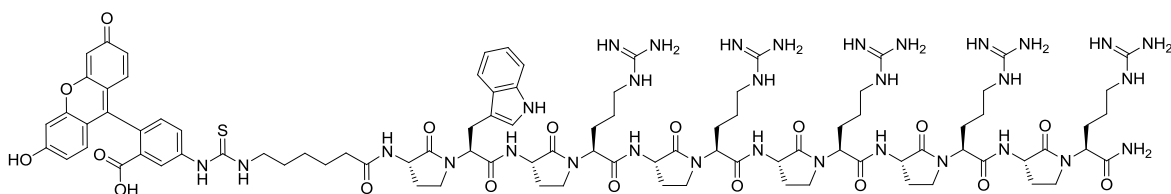


HPLC Retention time 0.90 min

MS(ESI): m/z $[(M+3H)^{3+}] = 673.0$; $[(M+4H)^{4+}] = 504.8$; $[(M+5H)^{5+}] = 404.3$

Yield: 5%

FI-Ahx-Agl-Trp-Agl-Arg-Agl-Arg-Agl-Arg-Agl-Arg-Agl-Arg-NH₂ (17)

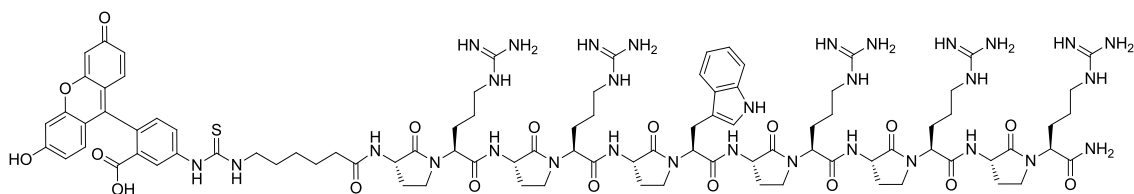


HPLC Retention time 0.78 min

MS(ESI): m/z $[(M+3H)^{3+}] = 663.3$; $[(M+4H)^{4+}] = 497.1$; $[(M+5H)^{5+}] = 398.3$; $[(M+6H)^{6+}] = 331.7$

Yield: 8%

FI-Ahx-Agl-Arg-Agl-Arg-Agl-Trp-Agl-Arg-Agl-Arg-NH₂ (18)

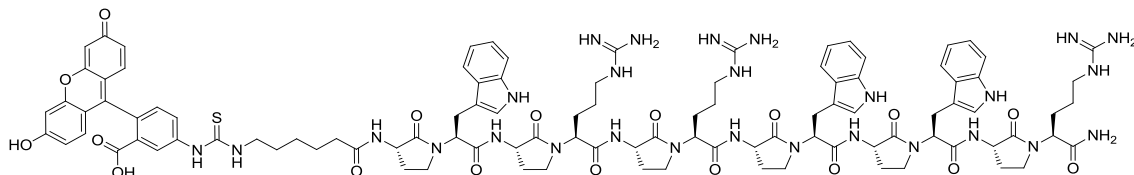


HPLC Retention time 0.85 min

MS(ESI): m/z $[(M+3H)^{3+}] = 663.0$; $[(M+4H)^{4+}] = 497.2$; $[(M+5H)^{5+}] = 397.7$

Yield: 6%

FI-Ahx-Trp-Agl-Arg-Agl-Arg-Agl-Trp-Agl-Trp-Agl-Arg-NH₂ (19)

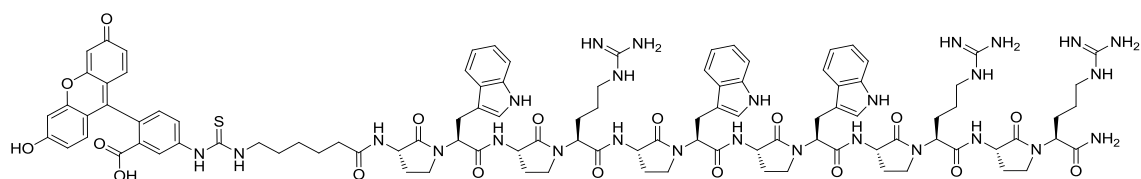


HPLC Retention time 1.29 min

MS(ESI): m/z $[(M+3H)^{3+}] = 682.4$; $[(M+4H)^{4+}] = 512.1$

Yield: 6%

FI-Ahx-Agl-Trp-Agl-Arg-Agl-Trp-Agl-Trp-Agl-Arg-Agl-Arg-NH₂ (20)

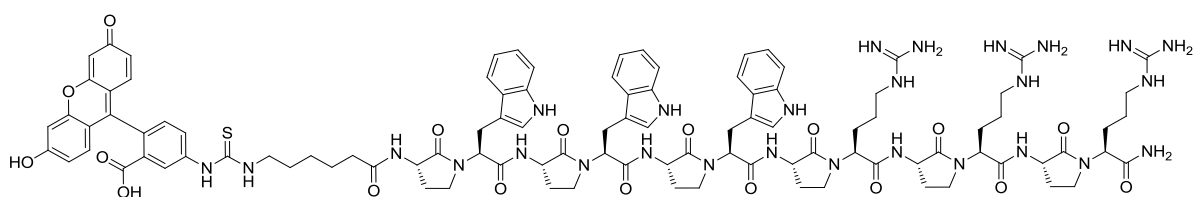


HPLC Retention time 1.30 min

MS(ESI): m/z $[(M+3H)^{3+}] = 682.7$; $[(M+4H)^{4+}] = 512.3$

Yield: 8%

FI-Ahx-Agl-Trp-Agl-Trp-Agl-Trp-Agl-Arg-Agl-Arg-Agl-Arg-NH₂ (21)

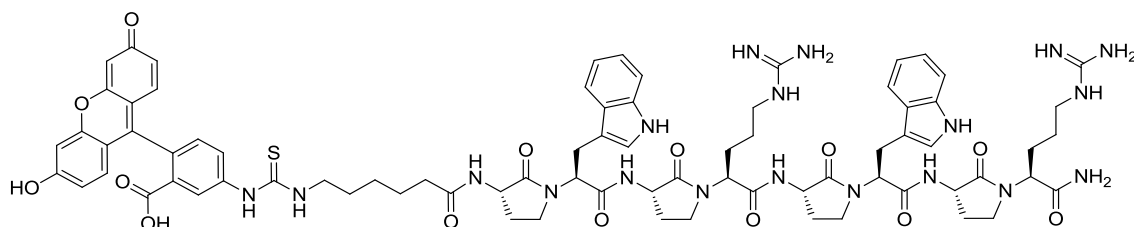


HPLC Retention time 1.46 min

MS(ESI): m/z $[(M+2H)^{2+}] = 1023.6$; $[(M+3H)^{3+}] = 682.6$; $[(M+4H)^{4+}] = 512.2$

Yield: 11%

FI-Ahx-Agl--Trp-Agl-Arg-Agl-Trp-Agl-Arg-NH₂ (22)

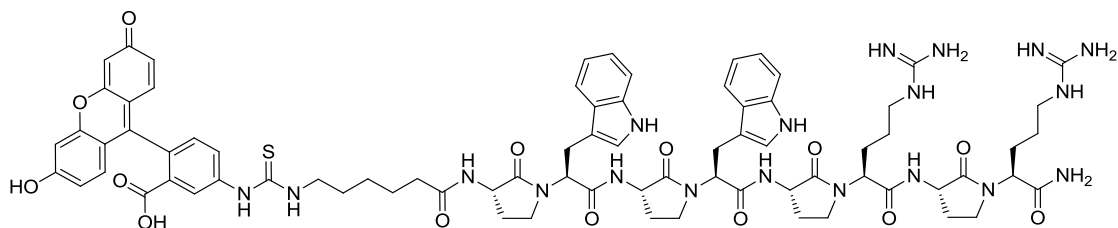


HPLC Retention time 1.23 min

MS(ESI): m/z $[(M+2H)^{2+}] = 768.8$ $[(M+3H)^{3+}] = 512.9$

Yield: 17%

FI-Ahx-Agl-Trp-Agl-Trp-Agl-Arg-Agl-Arg-NH₂ (23)

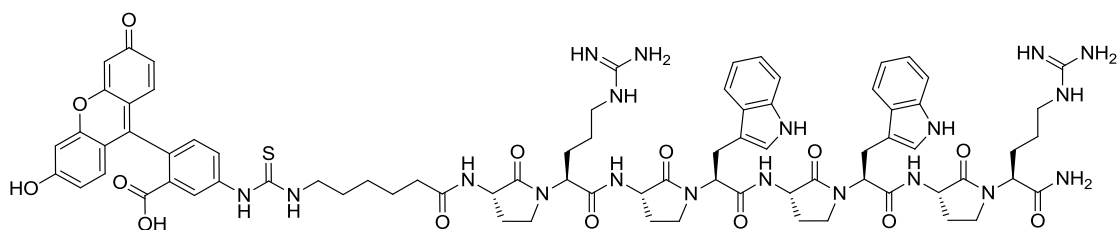


HPLC Retention time 1.39 min

MS(ESI): m/z $[(M+2H)^{2+}] = 769.5$; $[(M+3H)^{3+}] = 513.1$

Yield: 5%

FI-Ahx-Agl-Arg-Agl-Trp-Agl-Trp-Agl-Arg-NH₂ (24)



HPLC Retention time 1.41 min

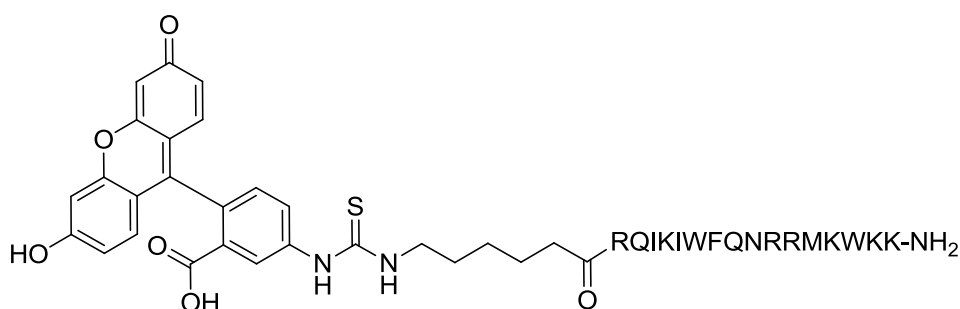
MS(ESI): m/z $[(M+2H)^{2+}] = 769.0$; $[(M+3H)^{3+}] = 513.1$

Yield: 4%

Synthesis of fluorescently labelled peptides 25-27

Fmoc-Ahx-peptide-NH-resin were obtained through SPPS procedure as described previously. After removal of the Fmoc group, 1.5 eq FITC, 3 eq DIEA dissolved in 10 ml of NMP were added to the resin and stirred overnight. Fluorescently labelled peptides were finally cleaved from the resin and purified by preparative HPLC according to the procedures described previously.

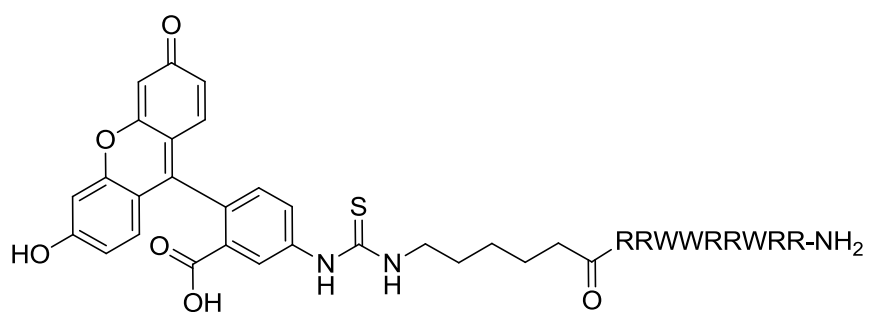
FI-Ahx-Penetratin-NH₂ (25)



HPLC Retention time 0.92 min

MS(ESI): m/z $[(M+3H)^{3+}] = 916.8$; $[(M+4H)^{4+}] = 687.8$; $[(M+5H)^{5+}] = 550.5$; $[(M+6H)^{6+}] = 458.8$; $[(M+7H)^{7+}] = 393.5$; $[(M+8H)^{8+}] = 344.6$

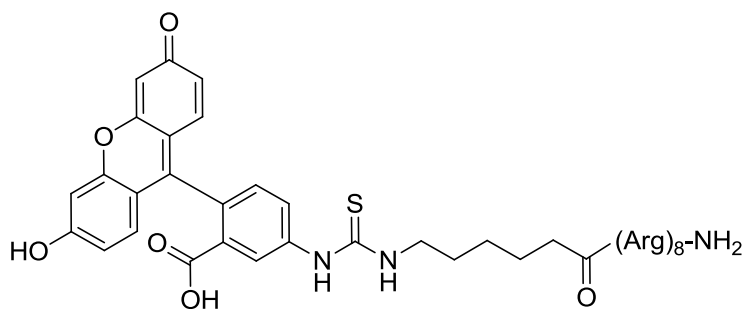
Yield: 12%



HPLC Retention time 1.08 min

MS(ESI): m/z $[(M+5H)^{5+}] = 404$

Yield: 30%

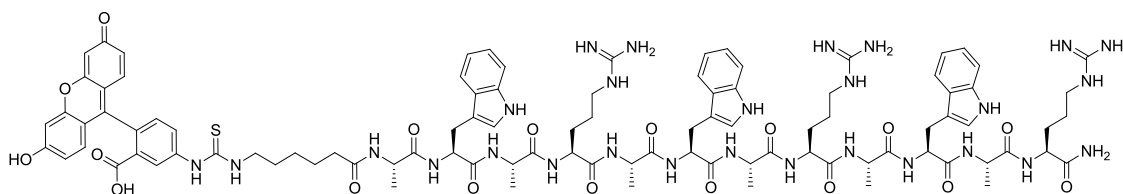


HPLC Retention time 0.80 min

MS(ESI): m/z $[(M+3H)^{3+}] = 590.7$; $[(M+4H)^{4+}] = 443.3$; $[(M+5H)^{5+}] = 354.8$; $[(M+6H)^{6+}] = 295.9$

Yield: 7%

FI-Ahx-(Met-Trp-Met-Arg)₃-NH₂ (28)



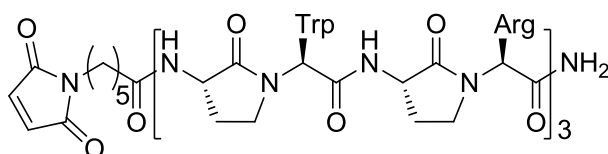
HPLC Retention time 1.39 min

MS(ESI): m/z $[(M+2H)^{2+}] = 987.0$

Yield: 25%

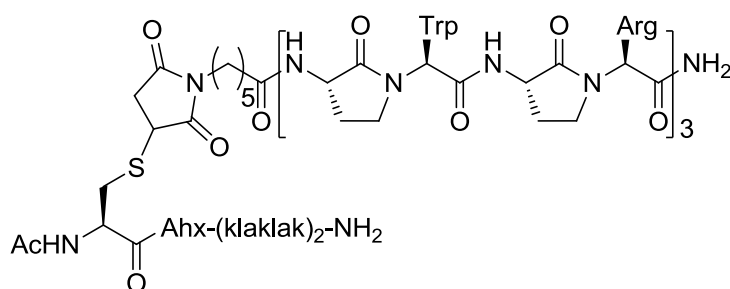
Synthesis of conjugate 31

500 mg of resin containing the intermediate H-(AgI₂TrpAgI₂Arg)₃-NH-Resin (loading = 0.185 mmol/gr) was suspended and gently stirred in DCM for 10 min. Then 6-Maleimidocaproic acid (3 eq), HATU (3 eq) and NMM (4 eq) dissolved in 10 ml of NMP were added to the resin, and gently stirred for 1 h. After standard washings and cleavage from the resin according to the general procedure, compound **29** was purified by preparative HPLC to afford 25 mg of a white powder. HPLC Retention time = 1.06 min, Yield = 13%, MS(ESI) m/z $[(M+3H)^{3+}] = 579.2$.



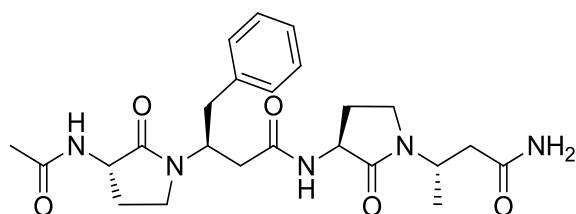
Ac-Cys-Ahx-(klaklak)₂-NH₂, compound **30**, was obtained through standard SPPS procedure reported earlier, on Rink amide resin, and purified by preparative HPLC after TFA cleavage from the solid support. HPLC Retention time = 1.05, Yield = 15.4%, MS(ESI) m/z $[(M+3H)^{3+}] = 594.6$; $[(M+4H)^{4+}] = 446.2$.

8 mg of compound (**29**) were dissolved in a 1/1 mixture CH₃CN /PBS (7.4 pH) (2ml). 10.44 mg of Ac-Cys-Ahx-(klaklak)₂-NH₂ (**30**) were then added, and the reaction mixture was stirred for 1 hour at room temperature. The crude reaction mixture was directly purified by preparative HPLC to afford **31** as a white powder (10 mg, 54% yield). HPLC Retention time = 1.15, Yield = 7%, MS(ESI) m/z [(M+7H)⁷⁺] = 503.5 ; [(M+6H)⁶⁺] = 587.3 ; [(M+5H)⁵⁺] = 704.5.



Synthesis of oligomers for structural studies 32-50

Alternating Met/AA peptides were obtained through SPPS procedure as described previously although βAA were added through double coupling of Fmoc protected βAA (1.2 eq), DCC (1.2 eq), Oxymapure® (1.2 eq) and DiEA (3 eq) at 70°C using microwave irradiation for 30 min. After removal of the Fmoc group of the last methionine residue, the peptide sequences were capped with an acetyl group through Ac₂O/DCM (1:1) solution treatment stirred in a 650 rpm vortex for 10 min at room temperature. Multimethylation and multicyclisation were then performed to obtain the oligomer on solid support as described previously. Once the conversion was complete, oligomers were finally cleaved from the resin and purified by preparative HPLC according to the procedures described previously.

Ac-Agl- β Phe-Agl- β Ala-NH₂ (32)

HPLC Retention time 1.02 min

MS(ESI): m/z $[(M+H)^+] = 472.2$

Yield: 53%

¹H, ¹⁵N and ¹³C NMR chemical shifts in CD₃OH at 273 K

	<i>HN</i>	<i>αCH</i>	<i>β/β'CH</i>	<i>γ/γ'CH</i>	<i>Others</i>
Agl.1	8.44	4.44	2.27, 1.82	3.28, 3.37	CH ₃ 1.96
hβ^3Phe.2	-	2.60, 2.43	4.70	2.90	δ CH 7.25; ϵ CH 7.29; ζ CH 7.19
Agl.3	8.46	4.55	2.38, 1.79	3.32, 3.42	
hβ^3Ala.4	-	2.43	4.49	1.20	NH ₂ 7.02, 7.79

	<i>N</i>	<i>αC</i>	<i>βC</i>	<i>γC</i>	<i>Others</i>
Agl.1	124.1	52.5	27.3	41.9	CH ₃ 22.9
hβ^3Phe.2	-	39.1	53.6	39.3	δ C 130.0; ϵ C 129.4; ζ C 127.7
Agl.3	124.1	52.9	27.3	41.0	
hβ^3Ala.4	-	40.6	47.3	18.1	NH ₂ 108.4

^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts in DMSO- d_6 at 293 K

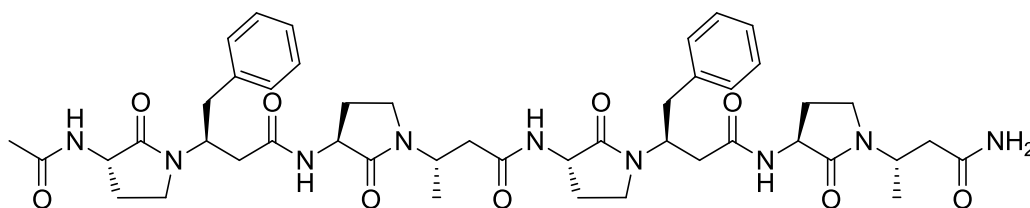
	<i>HN</i>	αCH	$\beta/\beta'\text{CH}$	$\gamma/\gamma'\text{CH}$	<i>Others</i>
Agl.1	8.06	4.17	2.15, 1.62	3.14, 3.26	CH_3
$\text{h}\beta^3\text{Phe.2}$	-	2.46, 2.35	4.48	2.79	δCH 7.19; ϵCH 7.28; ζCH 7.19
Agl.3	8.25	4.36	2.25, 1.63	3.20, 3.28	
$\text{h}\beta^3\text{Ala.4}$	-	2.28	4.30		NH_2 ?

	<i>N</i>	αC	βC	γC	<i>Others</i>
Agl.1	122.2	50.4	26.7	40.2	CH_3 22.9
$\text{h}\beta^3\text{Phe.2}$	-	38.1	51.5	37.8	δC 129.2; ϵC 128.4; ζC 126.5
Agl.3	122.7	50.9	26.5	39.4	
$\text{h}\beta^3\text{Ala.4}$	-	39.5	45.3	17.8	NH_2 110.4

 ^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts in phosphate buffer, pH 6.4 at 298 K

	<i>HN</i>	αCH	$\beta/\beta'\text{CH}$	$\gamma/\gamma'\text{CH}$	<i>Others</i>
Agl.1	8.18	4.37	2.38, 1.81	3.39, 3.46	CH_3 2.00
$\text{h}\beta^3\text{Phe.2}$	-	2.69	4.65	2.98, 2.92	ϵCH 7.31; ζCH 7.34; ηCH 7.31
Agl.3	8.43	4.58	2.45, 1.82	3.42, 3.45	
$\text{h}\beta^3\text{Ala.4}$	-	2.55	4.43	1.22	NH_2 6.93, 7.69

	<i>N</i>	αC	βC	γC	<i>Others</i>
Agl.1	126.1	51.3	25.4	39.9	CH_3 21.9
$\text{h}\beta^3\text{Phe.2}$	-	38.1	51.8	37.4	ϵC 128.8; ζC 128.7; ηC 126.8
Agl.3	127.2	51.8	25.4	39.9	
$\text{h}\beta^3\text{Ala.4}$	-	39.2	46.1	17.0	NH_2 113.6

Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala)₂-NH₂ (33)

HPLC Retention time 1.29 min

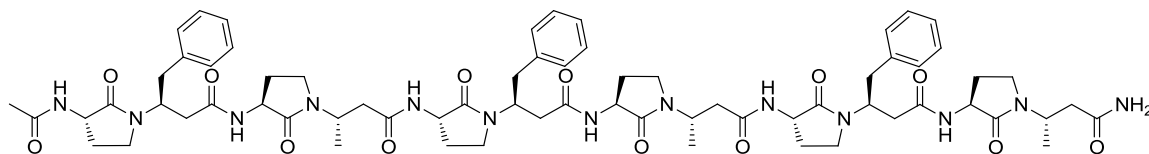
MS(ESI): m/z $[(M+H)^+] = 884.4$; $[(M+2H)^{2+}] = 442.8$

Yield: 46%

^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts in CD_3OH at 273 K

	<i>HN</i>	αCH	$\beta/\beta'\text{CH}$	$\gamma/\gamma'\text{CH}$	<i>Others</i>
Agl.1	8.45	4.38	1.98, 1.69	2.88, 3.00	CH ₃ 1.98
hβ^3Phe.2	-	2.57, 2.37	4.82	2.90	ϵCH 7.26; ζCH 7.34; ηCH 7.20
Agl.3	8.39	4.64	2.26, 1.79	3.18, 3.28	
hβ^3Ala.4	-	2.54, 2.26	4.59	1.18	
Agl.5	8.44	4.52	2.35, 1.87	3.44, 3.56	
hβ^3Phe.6	-	2.57, 2.48	4.82	2.91	ϵCH 7.21; ζCH 7.29; ηCH 7.25
Agl.7	8.48	4.65	2.40, 1.78	3.34, 3.43	
hβ^3Ala.8	-	2.45	4.57	1.19	NH ₂ 7.04, 7.81

	<i>N</i>	αC	βC	γC	<i>Others</i>
Agl.1	126.9	52.2	27.0	41.0	CH ₃ 23.0
hβ^3Phe.2	-	39.6	53.2	39.3	ϵC 128.3; ζC 128.3; ηC 126.3
Agl.3	125.0	52.2	27.0	39.6	
hβ^3Ala.4	-	46.9	41.9	18.6	
Agl.5	127.5	51.9	27.3	40.9	
hβ^3Phe.6	-	39.9	53.2	39.3	ϵC 128.3; ζC 128.3; ηC 126.3
Agl.7	124.8	52.2	27.3	40.6	
hβ^3Ala.8	-	40.3	51.9	18.6	NH ₂ 108.4

Ac-(Agl-βPhe-Agl-βAla)₃-NH₂ (34)

HPLC Retention time 1.45 min

MS(ESI): m/z $[(M+H)^+] = 1296.7$; $[(M+2H)^{2+}] = 648.9$

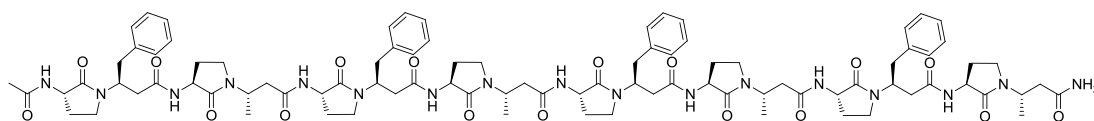
Yield: 35%

¹H, ¹⁵N and ¹³C NMR chemical shifts in CD₃OH at 273 K

	<i>HN</i>	<i>^αCH</i>	<i>β/β'CH</i>	<i>γ/γ'CH</i>	<i>Others</i>
Agl.1	8.47	4.38	1.91, 1.68	2.80, 2.94	CH ₃ 1.97
hβ³Phe.2	-	2.34, 2.56	4.82	2.86	
Agl.3	8.40	4.61	2.18, 1.74	3.12, 3.24	
hβ³Ala.4	-	2.24, 2.56	4.63	1.17	
Agl.5	8.43	4.46	2.04, 1.72	3.00, 3.07	
hβ³Phe.6	-	2.45, 2.59	4.78	2.85	
Agl.7	8.39	4.64	2.25, 1.78	3.19, 3.28	
hβ³Ala.8	-	2.28, 2.56	4.59	1.19	
Agl.9	8.46	4.57	2.38, 1.90	3.49, 3.60	
hβ³Phe.10	-	2.51, 2.58	4.84	2.90	
Agl.11	8.50	4.68	2.41, 1.78	3.36, 3.44	
hβ³Ala.12	-	2.46	4.59	1.20	NH ₂ 7.05, 7.82

	<i>N</i>	α <i>C</i>	β <i>C</i>	γ <i>C</i>	<i>Others</i>
Agl.1	125.8	50.5	25.6	38.9	CH ₃ 21.6
hβ^3Phe.2	-	38.2	51.1	38.2	δ C ?; ϵ C ?; ζ C ?
Agl.3	128.8	50.2	25.3	37.9	
hβ^3Ala.4	-	40.6	45.7	17.3	
Agl.5	128.5	50.2	25.4	38.7	
hβ^3Phe.6	-	38.9	51.8	38.2	δ C ?; ϵ C ?; ζ C ?
Agl.7	128.7	50.5	25.5	37.9	
hβ^3Ala.8	-	40.3	45.5	17.3	
Agl.9	128.0	50.2	25.9	38.9	
hβ^3Phe.10	-	38.8	52.1	37.7	δ C ?; ϵ C ?; ζ C ?
Agl.11	125.9	50.8	25.9	38.7	
hβ^3Ala.12	-	38.9	45.5	17.3	NH ₂ 109.3

Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala)₄-NH₂ (35)

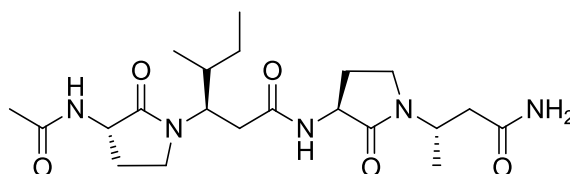


HPLC Retention time 1.53 min

MS(ESI): m/z [(M+2H)²⁺] = 854.8

Yield: 22%

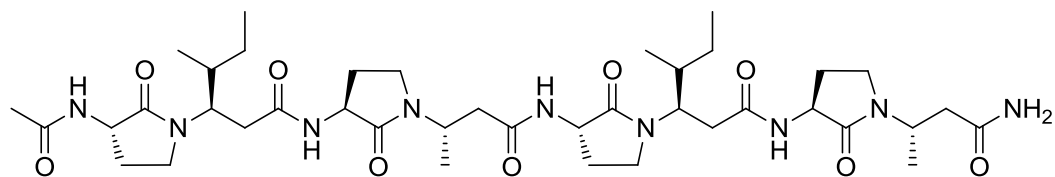
Ac-Agl- β Ile-Agl- β Ala-NH₂ (36)



HPLC Retention time 0.75 min

MS(ESI): m/z [(M+H)⁺] = 438.1

Yield: 72%

Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ala)₂-NH₂ (37)

HPLC Retention time 1.03 min

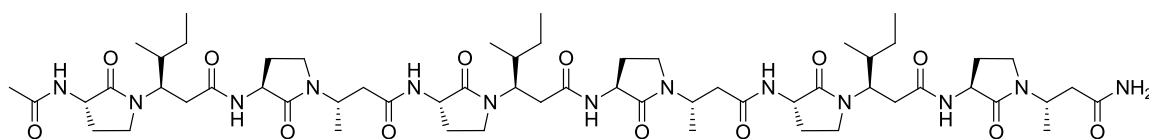
MS(ESI): m/z $[(M+H)^+] = 816.6$; $[(M+2H)^{2+}] = 408.8$

Yield: 42%

¹H, ¹⁵N and ¹³C NMR chemical shifts in phosphate buffer, pH 6.4 at 278 K

	<i>HN</i>	<i>αCH</i>	<i>β/β'CH</i>	<i>γ/γ'CH</i>	<i>Others</i>
Agl.1	8.35	4.78	2.42, 1.88	3.31, 3.40	CH ₃ 2.08
hβ^3Ile.2	-	2.72, 2.52	4.09	1.59	δ^1 CH 0.96; δ^2 CH 1.37, 1.00; ϵ CH 0.88
Agl.3	8.54	4.70	2.44, 1.87	3.40	
hβ^3Ala.4	-	2.59, 2.48	4.55	1.24	
Agl.5	8.52	4.70	2.46, 1.86	3.33, 3.49	
hβ^3Ile.6	-	2.71, 2.51	4.09	1.65	δ^1 CH 0.96; δ^2 CH 1.37, 1.00; ϵ CH 0.88
Agl.7	8.50	4.63	2.46, 1.84	3.42, 3.45	
hβ^3Ala.8	-	2.54	4.49	1.24	NH ₂ 7.01, 7.81

	<i>N</i>	<i>αC</i>	<i>βC</i>	<i>γC</i>	<i>Others</i>
Agl.1	127.2	51.1	25.3	39.5	CH ₃ 21.8
hβ^3Ile.2	-	36.3	55.2	35.6	δ^1 C 14.5; δ^2 C 24.9; ϵ C 9.7
Agl.3	129.7	51.1	25.3	38.9	
hβ^3Ala.4	-	39.8	45.8	16.9	
Agl.5	129.1	51.1	25.6	39.5	
hβ^3Ile.6	-	36.1	55.2	35.4	δ^1 C 14.5; δ^2 C 24.9; ϵ C 9.7
Agl.7	127.8	51.3	25.5	39.3	
hβ^3Ala.8	-	38.9	45.8	16.9	NH ₂ 113.7

Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ala)₃-NH₂ (38)

HPLC Retention time 1.18 min

MS(ESI): m/z [(M+H)⁺] = 1194.6 ; [(M+2H)²⁺] = 597.9

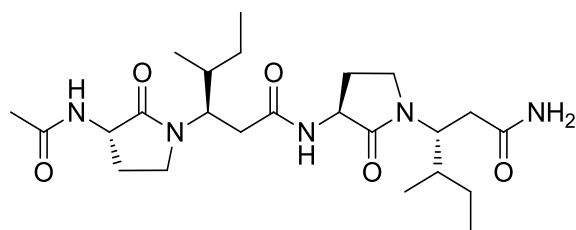
Yield: 12%

¹H, ¹⁵N and ¹³C NMR chemical shifts in phosphate buffer, pH 6.4 at 313 K

	<i>HN</i>	<i>αCH</i>	<i>β/β'CH</i>	<i>γ/γ'CH</i>	<i>Others</i>
Agl.1	8.20	4.74	1.89, 2.43	3.42, 3.29	CH ₃ 2.07
hβ^3Ile.2	-	2.71, 2.53	4.14	1.58	δ^1 CH 0.97; δ^2 CH 1.36; ϵ CH 0.89
Agl.3	8.40	4.68	1.85, 2.44	3.41	
hβ^3Ala.4	-	2.58, 2.48	4.55	1.24	
Agl.5	8.39	4.69	2.44, 1.86	3.27, 3.41	
hβ^3Ile.6	-	2.71, 2.53	4.14	1.58	δ^1 CH 0.97; δ^2 CH 1.36; ϵ CH 0.89
Agl.7	8.40	4.68	2.44, 1.80	3.41	
hβ^3Ala.8	-	2.57, 2.48	4.55	1.24	
Agl.9	8.35	4.58	2.46, 1.83	3.32, 3.49	
hβ^3Ile.10	-	2.69, 2.52	4.10	1.65	δ^1 CH 0.95; δ^2 CH 1.36; ϵ CH 0.88
Agl.11	8.29	4.59	2.46, 1.83	3.41, 3.45	
hβ^3Ala.12	-	2.55	4.46	1.24	NH ₂ 6.84, 7.60

	<i>N</i>	α <i>C</i>	β <i>C</i>	γ <i>C</i>	<i>Others</i>
Agl.1	127.2	51.3	25.6	40.3	CH ₃ 22.4
hβ^3Ile.2	-	36.8	55.3	36.2	δ^1 C 15.1; δ^2 C 25.4; ϵ C 10.4
Agl.3	129.7	51.3	25.6	39.9	
hβ^3Ala.4	-	36.8	46.2	17.3	
Agl.5	129.4	51.3	25.6	40.2	
hβ^3Ile.6	-	36.8	55.3	36.2	δ^1 C 15.1; δ^2 C 25.4; ϵ C 10.4
Agl.7	129.7	51.3	25.6	39.9	
hβ^3Ala.8	-	36.9	46.2	17.3	
Agl.9	128.9	51.8	25.6	40.3	
hβ^3Ile.10	-	36.5	55.3	36.1	δ^1 C 15.1; δ^2 C 25.4; ϵ C 10.4
Agl.11	127.3	51.6	25.6	40.1	
hβ^3Ala.12	-	36.7	46.3	17.3	NH ₂ 113.7

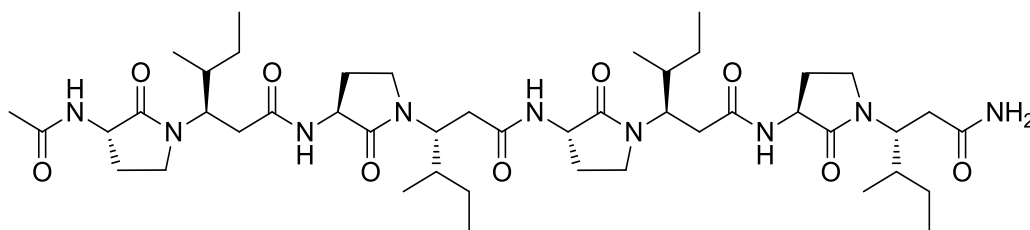
Ac-Agl- β Ile-Agl- β Ile-NH₂ (39)



HPLC Retention time 0.91 min

MS(ESI): m/z [(M+H)⁺] = 480.4

Yield: 50%

Ac-(Agl-βIle-Agl-βIle)₂-NH₂ (40)

HPLC Retention time 1.18 min

MS(ESI): m/z $[(M+H)^+] = 900.8$; $[(M+2H)^{2+}] = 451.1$

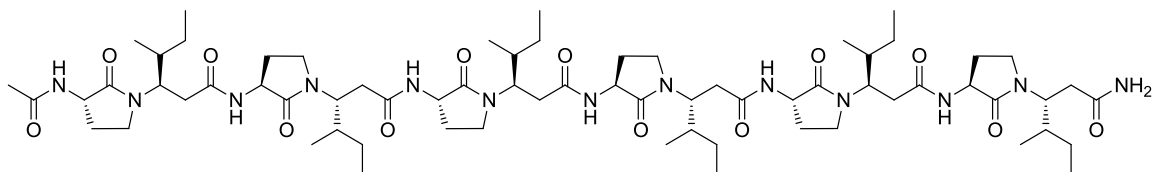
Yield: 12%

¹H, ¹⁵N and ¹³C NMR chemical shifts in phosphate buffer, pH 6.4 at 278 K

	<i>HN</i>	<i>^αCH</i>	<i>β/β'CH</i>	<i>γ/γ'CH</i>	<i>Others</i>
Agl.1	8.32	4.79	2.40, 1.88	3.27, 3.37	CH ₃ 2.08
hβ³Ile.2	-	2.73, 2.52	4.14	1.56	^{δ1} CH 0.96; ^{δ2} CH 1.36, 1.01; ^ε CH 0.89
Agl.3	8.55	4.76	2.42, 1.90	3.28, 3.36	
hβ³Ile.4	-	2.73, 2.46	4.14	1.57	^{δ1} CH 0.96; ^{δ2} CH 1.36, 1.01; ^ε CH 0.89
Agl.5	8.51	4.76	2.46, 1.88	3.32, 3.50	
hβ³Ile.6	-	2.67, 2.49	4.14	1.64	^{δ1} CH 0.96; ^{δ2} CH 1.37, 1.01; ^ε CH 0.89
Agl.7	8.47	4.69	2.48, 1.79	3.33, 3.47	
hβ³Ile.8	-	2.76, 2.51	4.10	1.64	^{δ1} CH 0.96; ^{δ2} CH 1.36, 1.01; ^ε CH 0.89; NH ₂ 6.96, 7.81

	<i>N</i>	<i>^αC</i>	<i>βC</i>	<i>γC</i>	<i>Others</i>
Agl.1	127.8	50.8	24.9	39.5	CH ₃ 22.1
hβ³Ile.2	-	36.5	55.0	35.5	^{δ1} C 15.0; ^{δ2} C 24.9; ^ε C 9.8
Agl.3	130.5	50.8	24.9	39.5	
hβ³Ile.4	-	36.4	55.0	35.7	^{δ1} C 15.0; ^{δ2} C 24.9; ^ε C 9.8
Agl.5	130.3	50.8	25.8	39.3	
hβ³Ile.6	-	35.6	55.0	35.7	^{δ1} C 15.0; ^{δ2} C 24.9, ^ε C 9.8
Agl.7	128.8	50.8	25.8	39.3	
hβ³Ile.8	-	35.6	55.0	35.7	^{δ1} C 15.0; ^{δ2} C 24.9; ^ε C 9.8; NH ₂ 113.6

Ac-(Agi-βIle-Agi-βIle)₃-NH₂ (41)

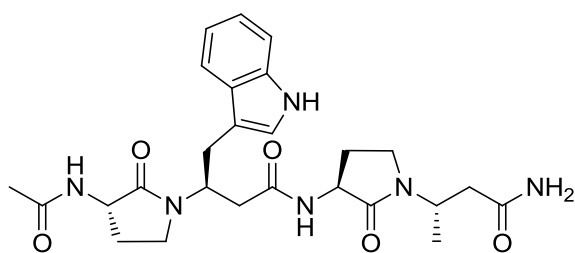


HPLC Retention time 1.59 min

MS(ESI): m/z $[(M+2H)^{2+}] = 661.0$

Yield: 9%

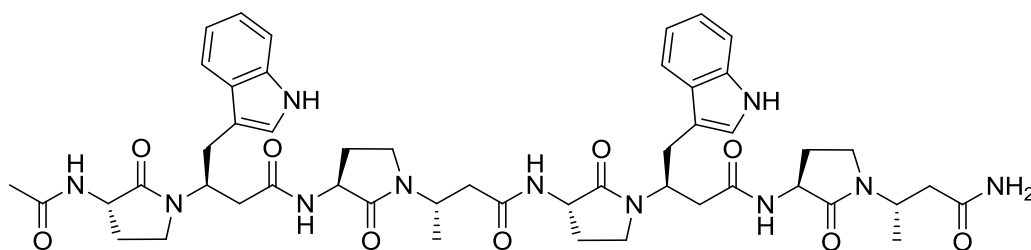
Ac-Agi-βTrp-Agi-βAla-NH₂ (42)



HPLC Retention time 0.87 min

MS(ESI): m/z $[(M+H)^+] = 511.2$

Yield: 18%

Ac-(Agl-βTrp-Agl-βAla)₂-NH₂ (43)

HPLC Retention time 1.27 min

MS(ESI): m/z $[(M+H)^+] = 962.5$; $[(M+2H)^{2+}] = 481.6$

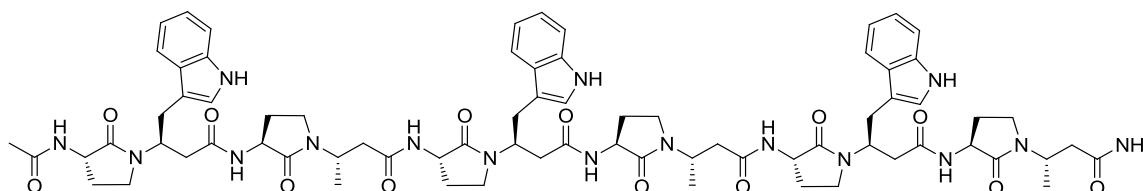
Yield: 4%

^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts in phosphate buffer, pH 6.4 at 278 K

	<i>HN</i>	αCH	$\beta/\beta'\text{CH}$	$\gamma/\gamma'\text{CH}$	<i>Others</i>
Agl.1	8.22	4.39	2.07, 1.57	2.90, 2.74	CH ₃ 2.11
hβ³Trp.2	-	2.46	4.60	2.68, 2.61	$\epsilon^1\text{CH}$ 7.23, $\zeta^1\text{CH}$ 10.22, $\zeta^3\text{CH}$ 7.76, $\eta^2\text{CH}$ 7.49, $\eta^3\text{CH}$ 7.19, $\theta^3\text{CH}$ 7.19
Agl.3	8.41	4.61	2.36, 1.74	3.34	
hβ³Ala.4	-	2.54, 2.41	4.51	1.22	
Agl.5	8.42	4.52	2.45, 1.87	3.53	
hβ³Trp.6	-	2.69	4.72	3.07	$\epsilon^1\text{CH}$ 7.02, $\zeta^1\text{CH}$ 10.13, $\zeta^3\text{CH}$ 7.52, $\eta^2\text{CH}$ 7.47, $\eta^3\text{CH}$ 7.13, $\theta^3\text{CH}$ 7.23
Agl.7	8.34	4.52	2.32, 1.69	3.35	
hβ³Ala.8	-	2.50	4.46	1.20	NH ₂ 6.99, 7.78

	<i>N</i>	<i>αC</i>	<i>βC</i>	<i>γC</i>	<i>Others</i>
Agl.1	127.2	51.0	25.2	38.9	CH ₃ 21.8 ϵ^1 C 123.4, ζ^1 C 128.8, ζ^3 C
hβ^3Trp.2	-	37.8	51.1	26.9	118.1, η^2 C 111.6, η^3 C 121.9, θ^3 C 119.2
Agl.3	129.4	51.0	25.3	38.9	
hβ^3Ala.4	-	39.9	51.2	16.9	
Agl.5	128.8	51.0	25.4	39.2	ϵ^1 C 123.5, ζ^1 C 128.5, ζ^3 C
hβ^3Trp.6	-	38.2	50.9	26.9	118.1, η^2 C 111.6, η^3 C 121.8, θ^3 C 118.8
Agl.7	127.2	45.8	25.2	38.9	
hβ^3Ala.8	-	38.8	45.8	16.9	NH ₂ 113.8

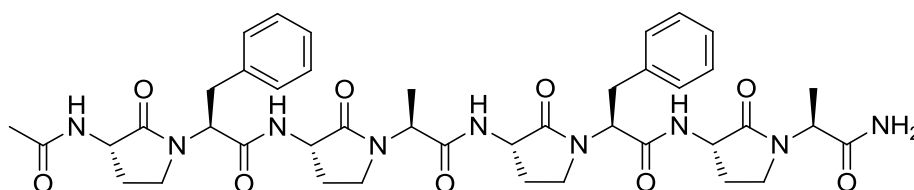
Ac-(Agl β -Trp-Agl- β Ala)₃-NH₂ (44)



HPLC Retention time 1.43 min

MS(ESI): m/z [(M+H)⁺] = 962.5 ; [(M+2H)²⁺] = 481.6

Yield: 8%

Ac-(Agl-Phe-Agl-Ala)₂-NH₂ (45)

HPLC Retention time 1.23 min

MS(ESI): m/z $[(M+H)^+] = 828.3$; $[(M+2H)^{2+}] = 414.8$

Yield: 25%

¹H, ¹⁵N and ¹³C NMR chemical shifts in phosphate buffer, pH 6.4 at 278 K

	<i>HN</i>	<i>αCH</i>	<i>β/β'CH</i>	<i>γ/γ'CH</i>	<i>Others</i>
Agl.1	8.44	4.26			CH ₃ 2.01
Phe.2	-	4.94	3.03, 3.30	-	ϵ CH 7.29; ζ CH 7.37; η CH 7.32
Agl.3	8.63	4.39	2.46, 2.05	3.48, 3.53	
Ala.4	-	4.68	1.40	-	
Agl.5	8.33	4.30	2.41, 2.06	3.52, 3.63	
Phe.6	-	5.00	3.08, 3.33	-	ϵ CH 7.31; ζ CH 7.37; η CH 7.32
Agl.7	8.61	4.35	2.34, 1.98	3.46	
Ala.8	-	4.59	1.39	-	NH ₂ 7.26, 7.59

	<i>N</i>	<i>αC</i>	<i>βC</i>	<i>γC</i>	<i>Others</i>
Agl.1	124.7	51.1	24.6	41.5	CH ₃ 21.7
Phe.2	-	56.4	33.2	-	ϵ C 128.7; ζ C 128.5; η C 126.8
Agl.3	121.5	51.8	23.9	41.5	
Ala.4	-	51.1	16.4	-	
Agl.5	118.4	51.1	24.6	41.5	
Phe.6	-	56.4	33.4	-	ϵ C 128.5; ζ C 128.5; η C 126.8
Agl.7	121.3	51.8	24.0	41.5	
Ala.8	-	51.1	16.4	-	NH ₂ 107.0

^1H , ^{15}N and ^{13}C NMR chemical shifts in DMSO- d_6 at 293 K

	<i>HN</i>	αCH	$\beta/\beta'\text{CH}$	$\gamma/\gamma'\text{CH}$	<i>Others</i>
Agl.1	8.06	4.16	2.06, 1.58	3.14, 3.03	CH ₃ 1.81
hβ^3Phe.2	-	2.42, 2.34	4.50	2.77	δCH 7.17; ϵCH ?; ζCH ?
Agl.3	8.13	4.42	2.19, 1.66	3.23, 3.14	
hβ^3Ala.4	-	2.29	4.38	1.06	
Agl.5	8.12	4.26	2.20, 1.66	3.36, 3.22	
hβ^3Phe.6	-	2.46, 2.35	4.53	2.79	δCH 7.20; ϵCH ?; ζCH ?
Agl.7	8.28	4.42	2.26, 1.63	3.27, 3.22	
hβ^3Ala.8	-	2.29	4.34	1.06	
Agl.9	8.11	4.26	2.12, 1.65	3.23, 3.08	
hβ^3Phe.10	-	2.44, 2.34	4.55	2.78	δCH ?; ϵCH ?; ζCH ?
Agl.11	8.16	4.45	2.21, 1.66	3.25, 3.15	
hβ^3Ala.12	-	2.30	4.34	1.07	NH ₂ 7.40, 6.85

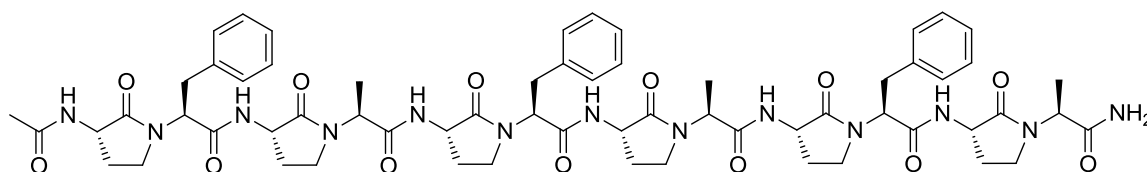
	<i>N</i>	αC	βC	γC	<i>Others</i>
Agl.1	122.7	50.2	26.7	39.9	CH ₃ 22.9
hβ^3Phe.2	-	38.3	51.2	37.9	δC ?; ϵC ?; ζC ?
Agl.3	123.9	50.6	26.3	39.3	
hβ^3Ala.4	-	39.9	45.3	17.7	
Agl.5	123.9	50.2	26.3	39.9	
hβ^3Phe.6	-	39.8	52.7	37.9	δC ?; ϵC ?; ζC ?
Agl.7	123.0	50.6	26.3	39.2	
hβ^3Ala.8	-	39.9	45.2	17.7	
Agl.9	123.9	50.2	26.3	39.7	
hβ^3Phe.10	-	39.8	26.3	50.2	δC ?; ϵC ?; ζC ?
Agl.11	123.9	50.6	26.3	39.0	
hβ^3Ala.12	-	39.9	45.3	17.7	NH ₂ 110.4

¹H, ¹⁵N and ¹³C NMR chemical shifts in phosphate buffer, pH 6.4 at 273 K

	<i>HN</i>	<i>^αCH</i>	<i>^{β/β'}CH</i>	<i>^{γ/γ'}CH</i>	<i>Others</i>
Agl.1	8.23	4.36	2.17, 1.66	3.12	CH ₃ 2.01
hβ³Phe.2	-	2.59	4.69	2.84	^δ CH 7.30; ^ε CH ?; ^ζ CH ?
Agl.3	8.46	4.63	2.39, 1.84	3.33	
hβ³Ala.4	-	2.54	4.49	1.20	
Agl.5	8.44	4.40	2.26, 1.74	3.24	
hβ³Phe.6	-	2.65	4.69	2.89	^δ CH 7.31; ^ε CH ?; ^ζ CH ?
Agl.7	8.50	4.62	2.40, 1.77	3.35	
hβ³Ala.8	-	2.54	4.49	1.21	
Agl.9	8.46	4.43	2.40, 1.85	3.49	
hβ³Phe.10	-	2.70	4.69	2.94	^δ CH 7.32; ^ε CH ?; ^ζ CH ?
Agl.11	8.52	4.59	2.42, 1.80	3.42	
hβ³Ala.12	-	2.52	4.48	1.21	NH ₂ 7.80, 7.01

	<i>N</i>	<i>^αC</i>	<i>^βC</i>	<i>^γC</i>	<i>Others</i>
Agl.1	126.9	51.0	25.2	39.5	CH ₃ 21.8
hβ³Phe.2	-	37.9	51.5	37.6	^δ C ?; ^ε C ?; ^ζ C ?
Agl.3	129.3	51.1	25.3	38.8	
hβ³Ala.4	-	39.7	45.8	17.0	
Agl.5	129.0	50.8	25.2	39.4	
hβ³Phe.6	-	38.2	51.5	37.6	^δ C ?; ^ε C ?; ^ζ C ?
Agl.7	129.1	51.1	25.3	38.8	
hβ³Ala.8	-	39.7	45.8	17.0	
Agl.9	128.5	50.8	25.3	39.8	
hβ³Phe.10	-	38.2	51.5	37.2	^δ C ?; ^ε C ?; ^ζ C ?
Agl.11	127.6	51.1	25.3	39.3	
hβ³Ala.12	-	39.8	45.8	17.0	NH ₂ 113.7

Ac-(Agl-Phe-Agl-Ala)₃-NH₂ (46)

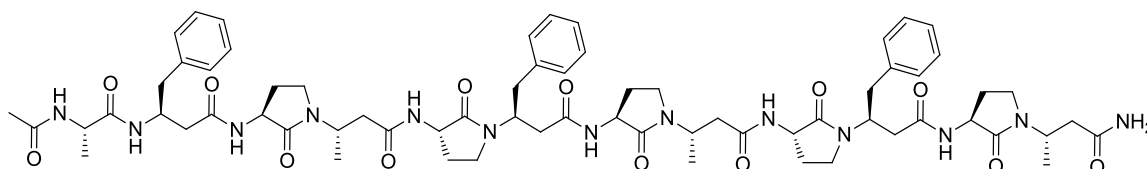


HPLC Retention time 1.47 min

MS(ESI): m/z $[(M+H)^+]$ = 1212.4 ; $[(M+2H)^{2+}]$ = 606.7

Yield: 22%

Ac-Ala- β Phe-Agl- β Ala-Agl- β Phe-Agl- β Ala-Agl- β Phe-Agl- β Ala-NH₂ (47)

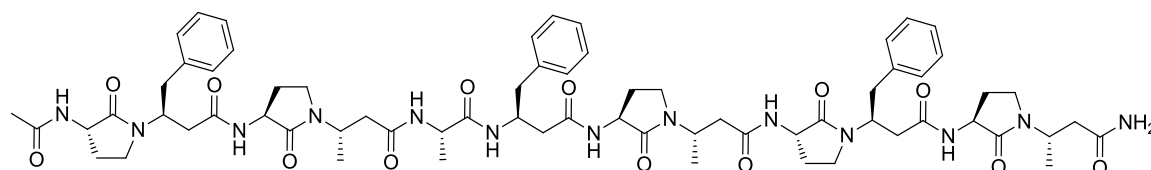


HPLC Retention time 1.38 min

MS(ESI): m/z $[(M+H)^+]$ = 1284.7 ; $[(M+2H)^{2+}]$ = 642.6

Yield: 14%

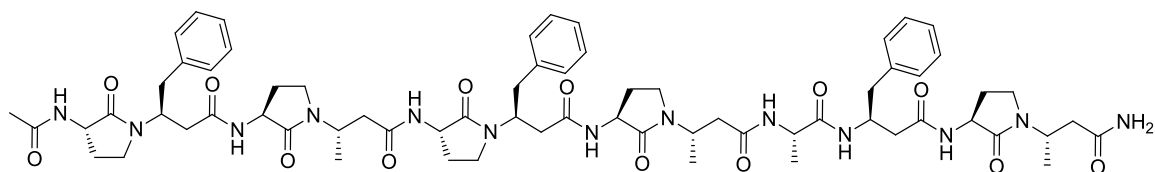
Ac-Agl- β Phe-Agl- β Ala-Ala- β Phe-Agl- β Ala-Agl- β Phe-Agl- β Ala-NH₂ (48)



HPLC Retention time 1.36 min

MS(ESI): m/z $[(M+H)^+]$ = 1284.5 ; $[(M+2H)^{2+}]$ = 642.6

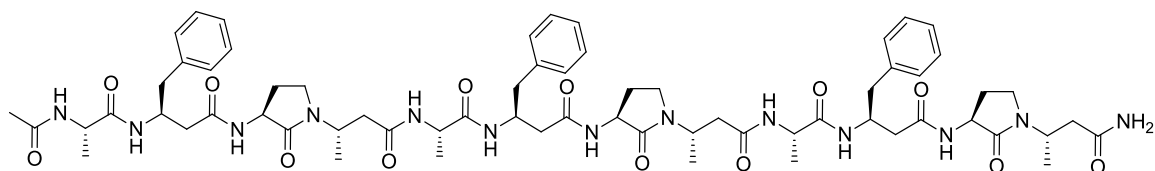
Yield: 30%

Ac-Agl-βPhe-Agl-βAla-Agl-βPhe-Agl-βAla-Ala-βPhe-Agl-βAla-NH₂ (49)

HPLC Retention time 1.37 min

MS(ESI): m/z $[(M+H)^+] = 1284.8$; $[(M+2H)^{2+}] = 642.9$

Yield: 49%

Ac-Ala-βPhe-Agl-βAla-Ala-βPhe-Agl-βAla-Ala-βPhe-Agl-βAla-NH₂ (50)

HPLC Retention time 1.29 min

MS(ESI): m/z $[(M+H)^+] = 1260.9$; $[(M+2H)^{2+}] = 631.0$

Yield: 14%

Annexes

X-ray diffraction

Figure S4 : Backbone dihedrals angles (°) of **34** DRX structures.

<i>Residue</i>	<i>Angles</i>	<i>Molecule A</i>	<i>Molecule B</i>
Agl.1	ϕ	-136.4	-158.0
	ψ	-134.5	-141.4
hβ^3Phe.2	ϕ	-113.5	-112.9
	θ	60.6	60.8
	ψ	-121.1	-112.9
Agl.3	ϕ	-97.7	-101.9
	ψ	-135.6	-138.7
hβ^3Ala.4	ϕ	-105.2	-104.9
	θ	56.5	56.0
	ψ	-113.2	-109.3
Agl.5	ϕ	-131.3	-119.9
	ψ	-107.5	-111.0
hβ^3Phe.6	ϕ	-125.9	-127.5
	θ	62.3	62.8
	ψ	-124.3	-123.9
Agl.7	ϕ	-99.5	-96.3
	ψ	-142.8	-140.9
hβ^3Ala.8	ϕ	-103.8	-100.1
	θ	59	58.6
	ψ	-100.9	-103.6
Agl.9	ϕ	-143.5	-141.3
	ψ	-102.8	-112.6
hβ^3Phe.10	ϕ	-128.7	-128.7
	θ	58.7	60.7
	ψ	-124.6	-123.7
Agl.11	ϕ	-97.7	-91.5
	ψ	-146.4	-141.9
hβ^3Ala.12	ϕ	-144.1	-122.1
	θ	70.1	-169.3
	ψ	-174.6	117.5

Nuclear magnetic resonance

Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala)_n-NH₂ (32-34)

Figure S5 : Coupling Constants $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ of the Agl residues in **32**, **33** and **34** in CD₃OH.

	32	33	34
Agl.1	8.5	9.2	9.2
Agl.3	8.9	9.2	9.4
Agl.5	-	9.3	9.5
Agl.7	-	8.9	9.6
Agl.9	-	-	9.3
Agl.11	-	-	9.1

Figure S6 : Coupling Constants $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ of the Agl residues in **32**, **33** and **34** in DMSO-*d*₆.

	32	33	34
Agl.1	8.3	8.5	8.7
Agl.3	8.4	8.7	8.8
Agl.5	-	8.7	8.8
Agl.7	-	8.5	8.5
Agl.9	-	-	8.8
Agl.11	-	-	8.9

Figure S7 : Coupling Constants $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ of the Agl residues in **32**, **33** and **34** in phosphate buffer, pH 6.4.

	32	33	34
Agl.1	8.8	9.3	9.4
Agl.3	8.4	9.2	9.0
Agl.5	-	9.2	9.9
Agl.7	-	8.8	9.2
Agl.9	-	-	8.6
Agl.11	-	-	8.7

Figure S8 : Temperature coefficients (in ppb/K) of the amide protons of **32**, **33** and **34** in DMSO- d_6 .

	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 3
Agl.1	5.2	4.8	4.6
Agl.3	5.6	4.2	4.0
Agl.5	-	4.6	4.4
Agl.7	-	5.4	5.3
Agl.9	-	-	3.9
Agl.11	-	-	4

Figure S9 : Temperature coefficients (in ppb/K) of the amide protons of **32**, **33** and **34** in phosphate buffer, pH 6.4.

	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 3
Agl.1	7.1	5.2	
Agl.3	6.0	5.1	
Agl.5	-	6.0	
Agl.7	-	6.0	
Agl.9	-	-	
Agl.11	-	-	

Other Oligomers of Agl- β AA (**37**, **40**, **43**)

Figure S10 : Coupling Constants $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ of the Agl residues of **37**, **40** and **43** in phosphate buffer, pH 6.4.

	37	40	43
Agl.1	9.1	9.3	9.3
Agl.3	9.1	9.3	8.8
Agl.5	8.9	9.4	8.8
Agl.7	9.0	8.9	8.9

Figure S11 : Temperature coefficients (in ppb/K) of the amide protons of **37**, **40** and **43** in phosphate buffer, pH 6.4.

	37	40	43
Agl.1	5.4	4.1	5.8
Agl.3	5.2	4.0	4.6
Agl.5	6.1	4.8	6.5
Agl.7	7.3	7.4	6.6

Structure calculation

Ac-(Agl-βPhe-Agl-βAla)₂-NH₂ (**33**)

Figure S12 : Backbone dihedrals angles (°) of **33** NMR structures in methanol-*d*₃, DMSO-*d*₆ and phosphate buffer, pH 6.4. Values are averaged on the 20 lowest energy NMR structures.

Residue	Angles	MeOH	DMSO	NaP
Agl.1	φ	-153.3	-155.4	-156.0
	ψ	-138.6	-137.4	-140.9
hβ³Phe.2	φ	-98.5	-107.3	-103.5
	θ	71.6	77.4	74.0
	ψ	-97.4	-88.1	-95.6
Agl.3	φ	-150.1	-158.5	-141.9
	ψ	-140.2	-138.0	-139.6
hβ³Ala.4	φ	-92.3	-99.7	-97.4
	θ	71.9	77.4	68.5
	ψ	-96.7	-85.3	-92.7
Agl.5	φ	-144.9	-156.6	-147.3
	ψ	-142.9	-142.7	-143.1
hβ³Phe.6	φ	-97.0	-102.5	-98.2
	θ	68.5	65.9	63.5
	ψ	-95.8	-80.9	-94.6
Agl.7	φ	-152.1	-155.1	-147.9
	ψ	-115.7	-137.9	-126.6
hβ³Ala.8	φ	-95.7	-89.8	-91.8
	θ	<i>d</i>	59.3	<i>d</i>
	ψ	<i>d</i>	84.2	<i>d</i>

d = disordered

Figure S13 : Hydrogen bonding pattern statistical analysis on NMR structures of **33** in methanol- d_3 , DMSO- d_6 and phosphate buffer, pH 6.4. (cutoff at $d_{O-N} < 3.5$ Å and N-H-O angle $< 120^\circ$)

Solvent	H-Bond	i	Pseudocycle	Occurrence	Distance (Å)	Angle(°)
CD ₃ OH	CO(i)···HN(i-2)	3	C ₁₂	20/20	2.724 ± 0.01	7.27 ± 4.46
	CO(i)···HN(i-2)	5	C ₁₂	20/20	2.740 ± 0.01	10.64 ± 2.99
	CO(i)···HN(i-2)	7	C ₁₂	20/20	2.736 ± 0.01	13.81 ± 3.45
	CO(i)···HN(i-1)	8	C ₉	12/20	2.825 ± 0.08	21.90 ± 2.51
	CO(i)···HN(i+2)	7	C ₈	4/20	2.794 ± 0.01	16.12 ± 1.67
DMSO- d_6	CO(i)···HN(i-2)	3	C ₁₂	20/20	2.709 ± 0.00	11.72 ± 1.96
	CO(i)···HN(i-2)	5	C ₁₂	20/20	2.790 ± 0.01	20.25 ± 1.98
	CO(i)···HN(i-2)	7	C ₁₂	20/20	2.707 ± 0.01	27.51 ± 1.14
NaP	CO(i)···HN(i-2)	3	C ₁₂	20/20	2.707 ± 0.01	18.88 ± 1.90
	CO(i)···HN(i-2)	5	C ₁₂	20/20	2.763 ± 0.01	11.11 ± 3.48
	CO(i)···HN(i-2)	7	C ₁₂	20/20	2.732 ± 0.01	20.31 ± 2.27
	CO(i)···HN(i-1)	8	C ₉	8/20	2.926 ± 0.01	22.41 ± 6.76
	CO(i)···HN(i+2)	7	C ₈	2/20	2.796 ± 0.01	15.83 ± 1.81

Figure S14 : Root Mean Square Deviations (RMSD, Å) of the lowest energy NMR structure of **33** in methanol- d_3 , DMSO- d_6 and phosphate buffer, pH 6.4.

Coumpound	33
all atoms	0.714
all atoms ^a	0.742
all heavy atoms	0.517
all heavy atoms ^a	0.516
backbone heavy atoms	0.269
backbone heavy atoms ^a	0.090

^aWhen the first and last residues were omitted

Figure S15 : Backbone dihedrals angles (°) of **33** DFT structures in methanol- d_3 , DMSO- d_6 and phosphate buffer, pH 6.4.

Residue	Angles	MeOH	DMSO	NaP
Agl.1	ϕ	-157.0	-149.5	-165.6
	ψ	-143.4	-142.3	-141.5
hβ^3Phe.2	ϕ	-116.9	-129.3	-113.6
	θ	58.1	63.3	58.9
	ψ	-119.6	-102.6	-123.1
Agl.3	ϕ	-80.9	-96.0	-79.7
	ψ	-147.4	-142.4	-145.4
hβ^3Ala.4	ϕ	-113.3	-111.7	-112.9
	θ	56.3	-57.7	56.8
	ψ	-11.2	-94.3	-121.0
Agl.5	ϕ	-98.5	-139.7	-84.3
	ψ	-145.8	-140.8	-149.8
hβ^3Phe.6	ϕ	-104.0	-120.7	-102.6
	θ	55.9	59.7	56.8
	ψ	-120.8	-109.6	-121.6
Agl.7	ϕ	-112.4	-90.4	-109.3
	ψ	-104.1	-146.5	-106.8
hβ^3Ala.8	ϕ	-105.3	-101.7	-102.9
	θ	58.1	52.0	58.2
	ψ	118.0	101.9	118.3

Ac-(Agl-βPhe-Agl-βAla)₃-NH₂ (34)

Figure S16 : Backbone dihedrals angles (°) of **34** DFT structures in methanol-*d*₃ and DMSO-*d*₆.

Residue	Angles	MeOH	DMSO
Agl.1	φ	-148.5	-149.7
	ψ	-140.7	-142.9
hβ³Phe.2	φ	-95.5	-105.5
	θ	71.1	69.6
	ψ	-97.6	-92.5
Agl.3	φ	-154.8	-148.7
	ψ	-137.2	-139.0
hβ³Ala.4	φ	-90.6	-93.6
	θ	73.5	69.8
	ψ	-98.3	-99.0
Agl.5	φ	-148.0	-143.9
	ψ	-141.2	-145.7
hβ³Phe.6	φ	-93.8	-98.6
	θ	73.0	66.0
	ψ	-98.9	-96.1
Agl.7	φ	-148.4	-147.2
	ψ	-141.0	-141.1
hβ³Ala.8	φ	-91.3	-91.4
	θ	68.9	70.5
	ψ	-96.0	-98.9
Agl.9	φ	-146.8	-142.9
	ψ	-143.0	-145.7
hβ³Phe.10	φ	-95.6	-100.0
	θ	67.6	64.2
	ψ	-103.3	-91.8
Agl.11	φ	-148.5	-150.0
	ψ	-95.7	-140.1
hβ³Ala.12	φ	-88.3	-89.9
	θ	<i>d</i>	<i>d</i>
	ψ	<i>d</i>	<i>d</i>

d = disordered

Figure S17 : Hydrogen bonding pattern statistical analysis on NMR structures of **34** in methanol- d_3 and DMSO- d_6 . (cutoff at $d_{O-N} < 3.5$ Å and N-H-O angle $< 120^\circ$)

Solvent	H-Bond	<i>i</i>	Pseudocycle	Occurrence	Distance (Å)	Angle(°)
CD ₃ OH	CO(i)···HN(i-2)	3	C ₁₂	20/20	2.779 ± 0.01	18.26 ± 3.20
	CO(i)···HN(i-2)	5	C ₁₂	20/20	2.749 ± 0.01	8.13 ± 2.56
	CO(i)···HN(i-2)	7	C ₁₂	20/20	2.761 ± 0.01	5.86 ± 3.24
	CO(i)···HN(i-2)	9	C ₁₂	20/20	2.740 ± 0.01	8.77 ± 1.26
	CO(i)···HN(i-2)	11	C ₁₂	20/20	2.726 ± 0.01	9.28 ± 2.21
	CO(i)···HN(i-1)	8	C ₉	19/20	2.808 ± 0.01	12.95 ± 5.04
	CO(i)···HN(i+2)	7	C ₈	1/20	2.869 ± 0.00	14.07 ± 0.00
DMSO- d_6	CO(i)···HN(i-2)	3	C ₁₂	20/20	2.760 ± 0.02	21.53 ± 1.71
	CO(i)···HN(i-2)	5	C ₁₂	20/20	2.787 ± 0.01	10.21 ± 1.90
	CO(i)···HN(i-2)	7	C ₁₂	20/20	2.750 ± 0.01	16.29 ± 0.91
	CO(i)···HN(i-2)	9	C ₁₂	20/20	2.774 ± 0.01	13.37 ± 2.58
	CO(i)···HN(i-2)	11	C ₁₂	20/20	2.721 ± 0.01	17.54 ± 1.37
	CO(i)···HN(i-1)	8	C ₉	7/20	2.797 ± 0.01	14.30 ± 0.86
	CO(i)···HN(i+2)	7	C ₈	2/20	2.872 ± 0.00	19.54 ± 0.94

Fourier transformation infra-red spectroscopy

Figure S18 : Spectre IR-TF du composé **32** de 5 à 70°C dans le D₂O dans la zone des amides I et II'.

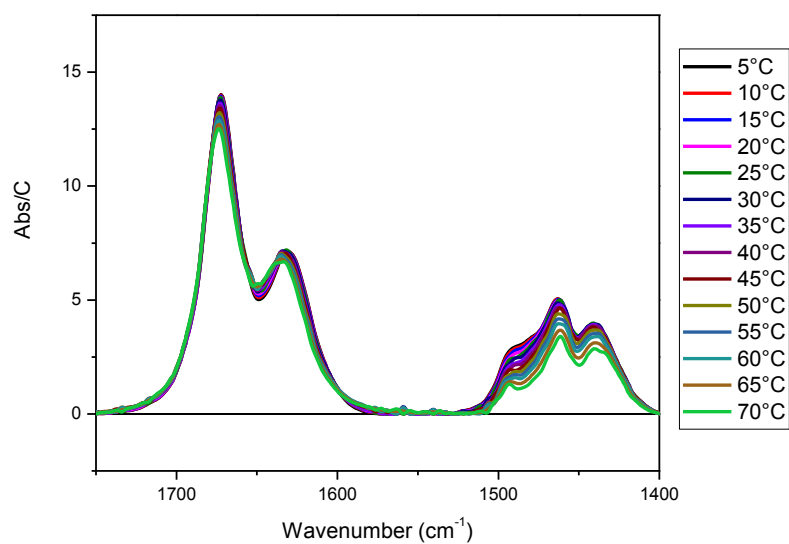
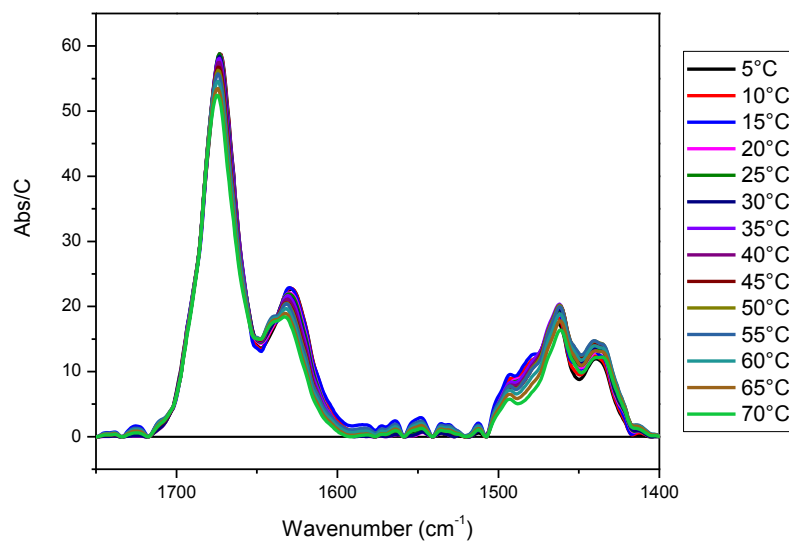


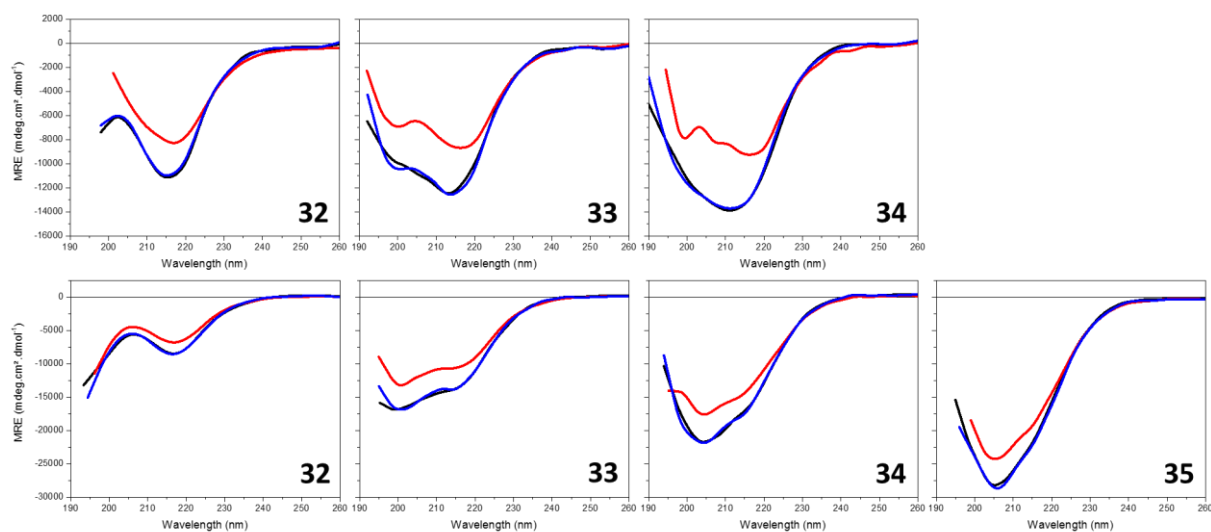
Figure S19 : Spectre IR-TF du composé **34** de 5 à 70°C dans le D₂O dans la zone des amides I et II'.



Circular dichroism

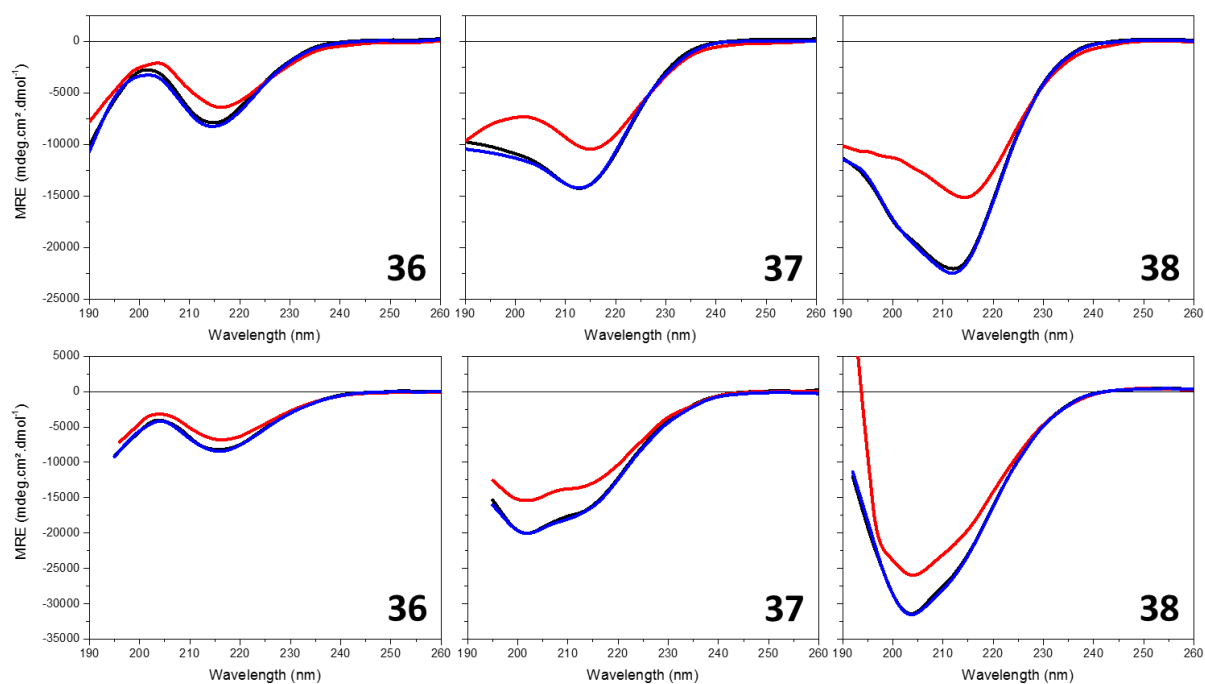
Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala)_n-NH₂ (32-35)

Figure S20 : CD spectra of Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala)_n-NH₂ oligomers (**32-35**) in phosphate buffer, pH 7.4 (top) and in methanol (bottom) at 20°C (black), at 55°C or 90°C in methanol and phosphate buffer respectively (red), and back to 20°C (bleu). The compound Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala)₄-NH₂ (**35**) was not soluble in phosphate buffer.



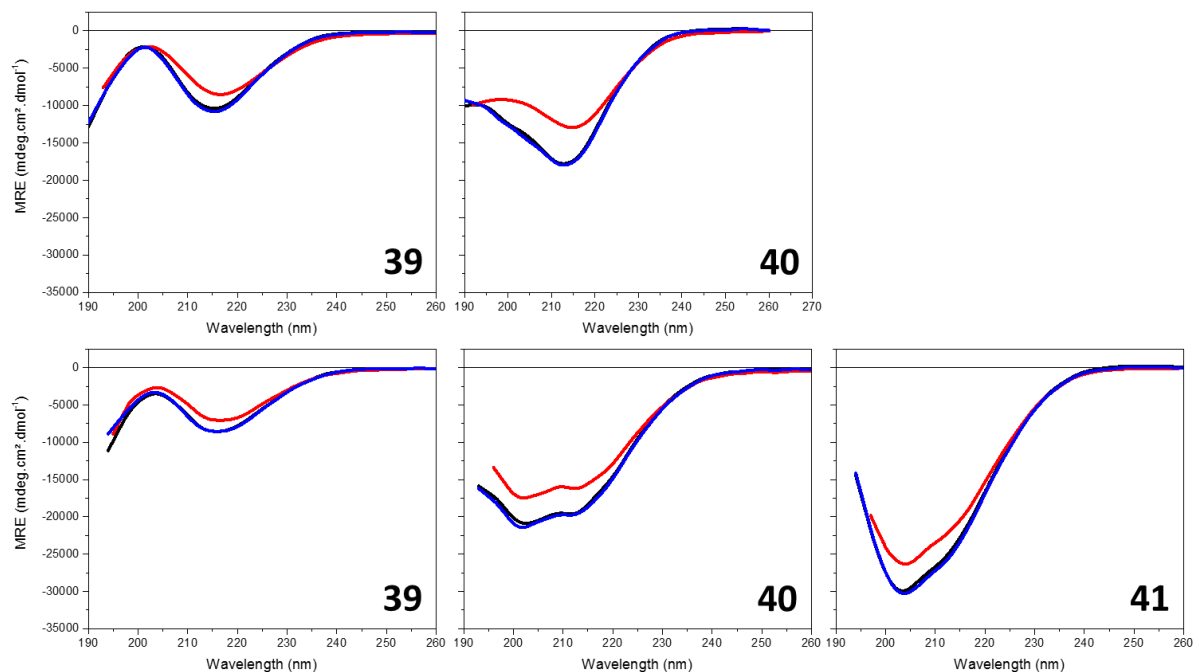
Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ala) $_n$ -NH $_2$ (36-38)

Figure S21 : CD spectra of Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ala) $_n$ -NH $_2$ oligomers (**36-38**) in phosphate buffer, pH 7.4 (top) and in methanol (bottom) at 20°C (black), at 55°C or 90°C in methanol and phosphate buffer respectively (red), and back to 20°C (bleu).



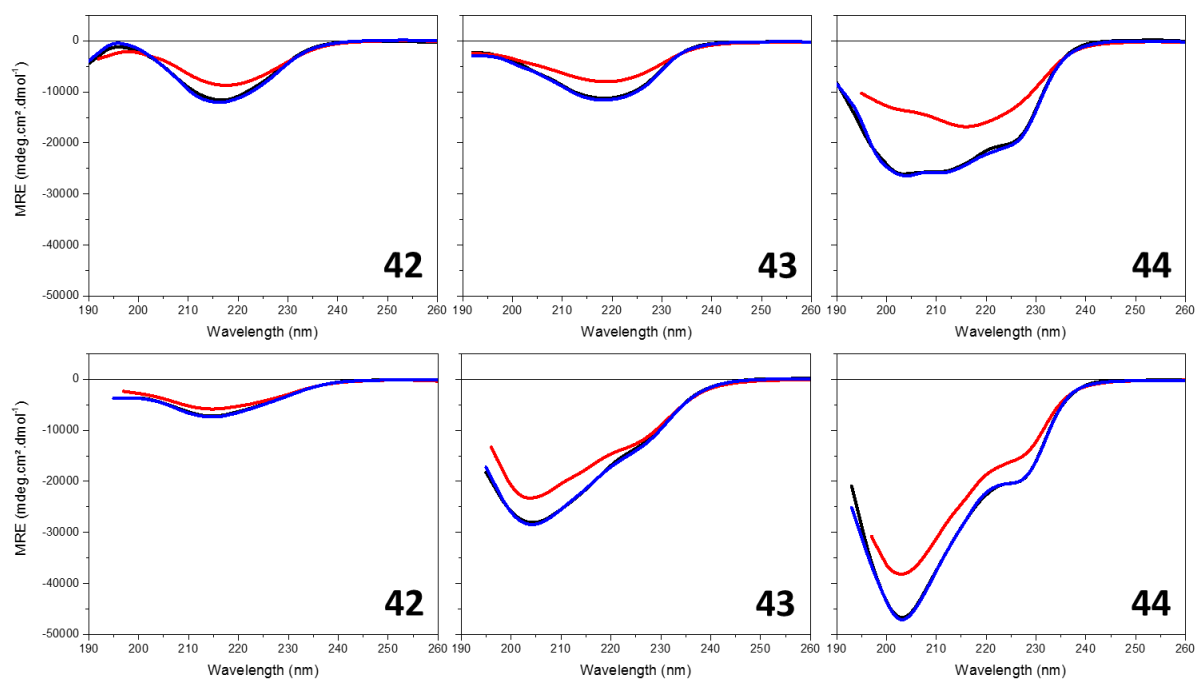
Ac-(Agl-βIle-Agl-βIle)_n-NH₂ (39-41)

Figure S22 : CD spectra of Ac-(Agl-βIle-Agl-βIle)_n-NH₂ oligomers (**39-41**) in phosphate buffer, pH 7.4 (top) and in methanol (bottom) at 20°C (black), at 55°C or 90°C in methanol and phosphate buffer respectively (red), and back to 20°C (bleu). The compound Ac-(Agl-βIle-Agl-βIle)₃-NH₂ (**41**) was not soluble in phosphate buffer.



Ac-(Agl- β Trp-Agl- β Ala)_n-NH₂ (42-44)

Figure S23 : CD spectra of Ac-(Agl- β Trp-Agl- β Ala)_n-NH₂ oligomers (**42-44**) in phosphate buffer, pH 7.4 (top) and in methanol (bottom) at 20°C (black), at 55°C or 90°C in methanol and phosphate buffer respectively (red), and back to 20°C (bleu).



L-Ala substituted AgI(β Phe/ β Ala) oligomers (47-50)

Figure S24 : CD spectra of Ac-(AgI- β Trp-AgI- β Ala) $_n$ -NH $_2$ oligomers (**47-50**) in phosphate buffer, pH 7.4 (top) and in methanol (bottom) at 20°C (black), at 55°C or 90°C in methanol and phosphate buffer respectively (red), and back to 20°C (bleu).

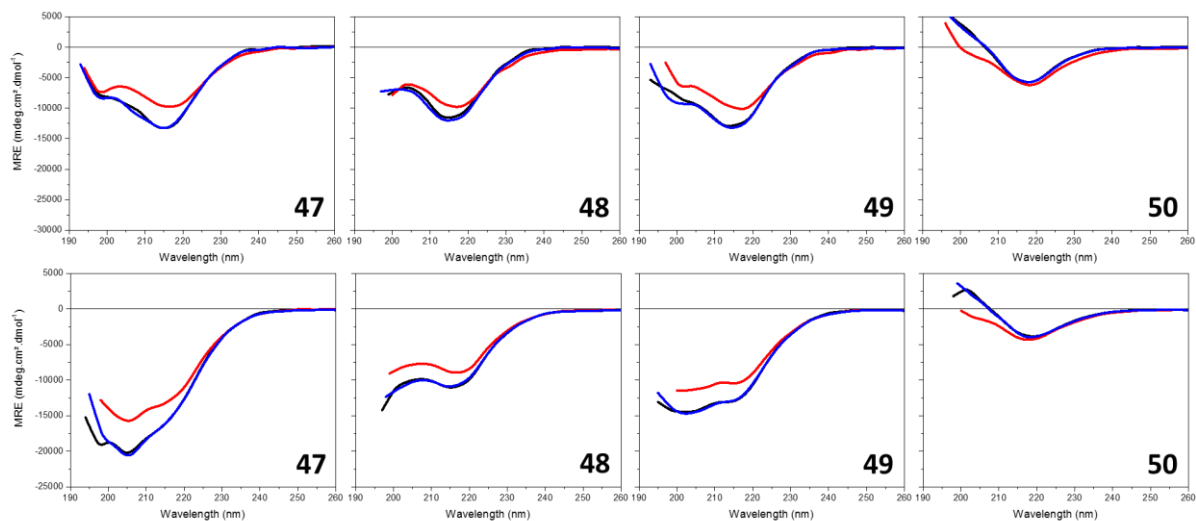


Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Représentation générale d'un acide α -aminé	18
Figure 2 : Les acides aminés protéinogènes	19
Figure 3 : Représentation générale d'un tripeptide avec les liaisons peptidiques entourées en vert	20
Figure 4 : (A) Séquence peptidique, (B) structure secondaire en hélice α et feuillet β , (C) structure tertiaire de la myoglobine (PDB : 1MBN), (D) Structure quaternaire de l'hémoglobine (PDB : 1A3N)	21
Figure 5 : Angles et longueurs des liaisons dans un peptide	22
Figure 6 : Angles dièdres du squelette peptidique	22
Figure 7 : Diagramme de Rammachandran ²⁰	23
Figure 8 : (A) Représentation schématique d'une hélice et (B) des liaisons hydrogène en fonction du type d'hélice.	26
Figure 9 : Représentation de la conformation canonique de l'hélice α ²⁷	27
Figure 10 : Représentation de la conformation canonique de l'hélice 3_{10} ²⁷	27
Figure 11 : Représentation de l'hélice π (en orange) dans la protéine Symerythrin oxydée de <i>Cyanophora paradoxa</i> (PDBe : 3qhb) ³¹	28
Figure 12 : Représentation schématique des deux types de feuillet β	29
Figure 13 : Réseau de liaison hydrogène des feuillets β parallèle (A) et antiparallèle (B) ³⁴ ...	29
Figure 14 : Représentation schématique des coudes α , β et γ	30
Figure 15 : Première application des lactames de Freidinger ⁵³	34
Figure 16 : Superposition du γ -lactame avec le coude β -II' formé par le tetrapeptide Tyr-Gly-Leu-Arg de la séquence LH-RH ⁵³	35
Figure 17 : Différents monomères utilisés dans la conception de foldamères.	37
Figure 18 : Nomenclature associée aux β -aminoacides.....	38
Figure 19 : Représentation des différents types d'hélices adoptées par les β -oligoamides ...	38
Figure 20 : Exemple de L- β^3 -peptides : H-(β^3 -HVal- β^3 -HAla- β^3 -HLeu) ₂ -OH ⁶¹ et son réseau de liaisons hydrogène.	39
Figure 21 : Hélice 8 de Boc-($\beta^{2,2}$ -HAc3c) ₆ -OMe ⁶⁷	39
Figure 22 : Hélice 10/12 de β^2/β^3 -peptide ⁶⁸	40
Figure 23 : $\beta^{2,3}$ -Hexapeptide de résidus acides (2R,3S)-3-Amino-2-Hydroxy carboxyliques ⁹⁹	40

Figure 24 : Monomères $\beta^{2,3}$ -aminoacides cycliques utilisés dans la conception de foldamères.	41
Figure 25 : Hélice 14 de <i>trans</i> -ACHC (en haut) et hélice 12 gauche <i>trans</i> -ACPC (en bas).	42
Figure 26 : Hélice 12 de <i>trans</i> -ACBC (en haut) et hélice 10 d'acides oxétane β -aminés (en bas).	43
Figure 27 : Hélice 12 de <i>trans</i> -ABHC (en haut) et hélice 8 d'un β -peptide composée de dérivés oxanorbornène (en bas).	44
Figure 28 : Structure en hélice 13 de H-Ala-(<i>cis</i> - β -ACC-Ala) ₃ -OH ⁸⁰	46
Figure 29 : Hélices 11 (en haut) et hélice 14/16 (en bas) adoptées par les oligomères hybrides de <i>trans</i> -ACPC en alternance avec des acides α -aminés	46
Figure 30 : Hélices 11/9 (en haut) et hélice 18/16 (en bas) adoptées par les oligomères hybrides d'ABOC en alternance avec des acides α -aminés	47
Figure 31 : Structure en hélice 11/9 de tBu-(phe- β^3 hVal) ₃ -phe-OMe	48
Figure 32 : Représentation schématique des résidus dans les α -peptides, α -peptoïdes et β -peptoïdes	49
Figure 33 : Structure PPII de l'hexamère de <i>N</i> -(phenyl)glycine ⁹⁶	49
Figure 34 : Exemple de substituants favorisant une conformation <i>cis</i> :	50
Figure 35 : Structure en ruban d'un peptoïde alternant des liens amides <i>cis</i> et <i>trans</i> ¹⁰⁰	50
Figure 36 : Structure de l'hexamère de <i>N</i> -(1-naphthylethyl) β -alanine ¹⁰¹	50
Figure 37 : (A) Motif α -AA- <i>D</i> -Oxd et structure en ruban d'oligomères d'oxazolidinone (Boc-(L-Ala- <i>D</i> -Oxd) ₆ -OBn) ¹⁰⁸ ; (B) Motif L-pGlu et oligomère de L-pGlu.	51
Figure 38 : (A) Structure des α -amino γ -lactames α -aminoacides et leurs oligomères ; (B) Structure des oligomères α -amino γ -lactames α -aminoacides	52
Figure 39 : Exemple de foldamères antimicrobiens : (A) Peptide naturel magainin-2 (PDB : 2MAG) et (B) peptoïde H-(NLys- <i>Nspe</i> - <i>Nspe</i>) ₄ -NH ₂ ¹²⁶	53
Figure 40 : Structure RX de Bcl-x _L (magenta) en interaction avec l'hélice α de BH3 (bleu) et un foldamère α/β - α peptide (vert) ¹³⁰	55
Figure 41 : Représentation schématique des voies d'endocytose ¹⁴⁰	57
Figure 42 : Représentation schématique de CPP amphipatique primaire (en haut) et secondaire en hélice (en bas)	60
Figure 43 : Exemples de peptoïdes pénétrants : polyArg ¹⁷³ , lipitoïdes ¹⁷⁸ et hétéro-oligomères d' α -peptide/ β -peptoïde ¹⁸⁰	62
Figure 44 : (A) Vecteur basé sur les PPII en vue (B) axiale et (C) latérale, comparé à l'héparine (D)	64
Figure 45 : Racémisation du C α par formation d'oxazolone	69
Figure 46 : Protection de type uréthane encadrée en bleu	69
Figure 47 : Stratégie générale de la synthèse pas à pas.	71

Figure 48 : Linker rink amide	73
Figure 49 : Représentation schématique du motif Agl- α AA, de la liaison hydrogène en pseudocycle C_{10} inductrice de coude $\beta II'$, et de la structure en ruban de l'oligomère poly(Agl- α AA)	75
Figure 50 : Synthèse en solution des monomères Boc-Agl- α AA-OH et Fmoc-Agl- α AA. ⁵¹	77
Figure 51 : Cyclisation intramolécule conduisant au γ -lactame. P = protection N terminale, capping ou fluorophore.	77
Figure 52 : Synthèse pas à pas des oligomères d'Agl- α AA suivant une stratégie Fmoc/tBu.	78
Figure 53 : Conversion d'un α -peptide en poly-(Agl- α AA) sur support solide. P une protection N terminale	78
Figure 54 : Schéma général de la synthèse de poly-(Agl- α AA) sur support solide	79
Figure 55 : Plateforme FPPS	82
Figure 56 : HPLC du composé 1 à 214 nm	83
Figure 57 : Procédé général d'optimisation de la réaction de méthylation	84
Figure 58 : Représentation schématique des composés 1 , 2 , 3 et 4	85
Figure 59 : Représentation schématique du composé 5	85
Figure 60 : HPLC après réaction du composé 1 avec 30éq de MeI sur support solide pendant 48h dans le DMF/DCM, le DCM, le DMF et la NMP.	86
Figure 61 : Structures possibles du composé 6	87
Figure 62 : HPLC après réaction du composé 1 avec une concentration de MeI de 0.5, 1 et 2 M sur support solide pendant 1, 2 et 4h dans la NMP	88
Figure 63 : HPLC des composés 7 et 8 à 214 nm	90
Figure 64 : Représentation schématique des composés 7 , 8 , 9 et 10	90
Figure 65 : Structures possibles du composé 11	91
Figure 66 : Procédé général d'optimisation de la réaction de cyclisation en lactames	91
Figure 67 : HPLC après réaction du composé 8 pendant 48 h dans une solution à 5% de DBU dans du DMF/DCM ou de la NMP.	92
Figure 68 : HPLC après réaction du composé 8 avec une solution de DBU 5% dans le DMF assisté par micro-ondes	93
Figure 69 : HPLC des composés 12 et 13	94
Figure 70 : Internalisation de la fluorescence dans des cellules MDA-MB-231 après 3 h à 10 μ M	99
Figure 71 : Représentation schématique du composé FI-Ahx-(Agl-Trp-Agl-Arg) ₃ -NH ₂ (14)	99
Figure 72 : Stratégie générale de synthèse des oligomères Agl- α AA fluorescents	101
Figure 73 : Images obtenues par microscopie confocale sur des lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 incubées pendant 3h avec les composés 14 , 25 et 28 à 10 μ M (Noyaux colorés en bleu par le DAPI) ¹⁹⁰	103

Figure 74 : Stratégie de synthèse du conjugué 8	105
Figure 75 : Viabilité cellulaire moyenne après 48h d'incubation avec le vecteur 14 (violet), la séquence proapoptotique Ac-(klaklak) ₂ -NH ₂ (blanc) ou le conjugué 31 (hachuré) ¹⁹⁰	106
Figure 76 : Stabilité à la protéolyse des composé 14 (violet) et 26 (marron) ¹⁹⁰	107
Figure 77 : protocole pour la mesure de fluorescence totale pour l'évaluation de la pénétration cellulaire de composés fluorescents	110
Figure 78 : Mesures de fluorescence totale des composés sur différentes lignés cellulaires	112
Figure 79 : Dipeptides AgI- α AA (A) et AgI- β AA avec ses angles dièdres associés	115
Figure 80 : Schéma de synthèse des poly-(AgI- β AA)	117
Figure 81 : (A) Superposition des deux structures cristallines du composé 34 dans la maille cristalline. Les atomes d'hydrogène non polaires ne sont pas affichés par souci de clarté. L'axe de l'hélice est représenté par une flèche noire et différentes distances illustrées en pointillé. (B) Vue latérale après rotation de 90°C. Les chaînes latérales des β AA ont été omises pour plus de clarté. (C) Représentation axiale de l'hélice. (D) Représentation axiale de la forme ovale de l'hélice.....	125
Figure 82 : Réseau de liaisons hydrogène stabilisant l'hélice C ₁₂	125
Figure 83 : Spectres RMN dans le méthanol-d ₃ des composés 32 (en haut), 33 (au milieu) et 34 (en bas) à 273 K.....	127
Figure 84 : Spectres RMN dans le DMSO-d ₆ des composés 32 (en haut), 33 (au milieu) et 34 (en bas) à 293 K.....	128
Figure 85 : Spectres RMN dans le tampon phosphate pH 6.4 des composés 32 (en haut), 33 (au milieu) et 34 (en bas) à 298 K.....	128
Figure 86 : Corrélations NOE non séquentielles caractéristiques dans les différents solvants à pH 6.4 des oligomères d'AgI- β (Phe/Ala).....	129
Figure 87 : Conformère C ₁₂ (A) et C ₁₆ (B) observés pour le composé 32 en solution.....	131
Figure 88 : Superposition des 20 structures RMN de l'oligomère 33 dans le méthanol-d ₃ (A), le DMSO-d ₆ (B) et le tampon phosphate pH 6.4 (C) ainsi que le composé 34 dans le méthanol-d ₃ (D) et le DMSO-d ₆ (E).....	132
Figure 89 : Superposition des structures optimisées par DFT du composé 33 dans le DMSO-d ₆ (orange), le méthanol-d ₃ (vert) et le tampon phosphate pH 6.4 (cyan) en vue latérale (à gauche) et axiale (à droite).	133
Figure 90 : Réseau de liaison hydrogène du composé 33 en solution dans le méthanol-d ₃ (A), le DMSO-d ₆ (B) et le NaP (C) d'après optimisation des structures RMN par DFT	135
Figure 91 : Superposition des structures du composé 33 prévues par DFT dans le DMSO-d ₆ (orange), le méthanol-d ₃ (vert) et le NaP (bleu) sur la partie N-terminale de la structure cristalline du composé 34	136

Figure 92 : Structure des oligomères 32-35 (A) et spectre de dichroïsme circulaire des oligomères 32-35 (magenta) dans le tampon phosphate (trait plein) et le méthanol (tirets) (B).	138
Figure 93 : spectre de dichroïsme circulaire des oligomères 32 (A), 33 (B), 34 (C) et 35 (D) dans le tampon phosphate avec un pourcentage croissant de TFE.....	139
Figure 94 : Représentation schématique des bandes de vibration caractéristiques des amides.	140
Figure 95 : Spectres IR-TF des composés 32 (en noir) , 33 (en rouge) et 34 (en bleu) dans le D ₂ O à 20°C et la table des valeurs de fréquences des bandes de vibration observées	142
Figure 96 : Spectres IR-TF du composé 34 dans D ₂ O (trait plein) et H ₂ O (tirets).....	142
Figure 97 : Spectres IR-TF expérimental (en haut) et théorique (en bas) du composé 32 dans le D ₂ O.....	143
Figure 98 : Spectres IR-TF expérimental (en haut) et théorique (en bas) du composé 33 dans le D ₂ O.....	146
Figure 99 : Déconvolution des bandes amides I des composés 32 (A), 33 (B), 34 (C) dans le D ₂ O et la comparaisons des ratios des différentes population de groupement C=O théorique et expérimental.....	148
Figure 100 : Spectre IR-TF du composé 33 de 5 à 70°C dans le D ₂ O dans la zone des amides I et II'.	149
Figure 101 : Spectres théorique par DFT (A) et expérimentaux par IR-TF dans le D ₂ O (B) des composés 33 et 45 . Illustration du réseau de liaisons hydrogène des composés (C) 45 et (D) 33	151
Figure 102 : Comparaison des spectres IR-TF du composé Agl(βPhe/βAla) 33 (noir) avec son homologue alpha le composé Agl(Phe/Ala) 45 (rouge) dans le D ₂ O.....	152
Figure 103 : Spectres IR-TF expérimental (en haut) et théorique (en bas) du composé 45 dans le D ₂ O.....	153
Figure 104 : Spectres IR-TF des composés 36 (en noir) , 37 (en rouge) et 38 (en bleu) dans le D ₂ O à 20°C et la table des valeurs de fréquence des bandes de vibration observées.	159
Figure 105 : Déconvolution des bandes amides I des composés 36 (A), 37 (B), 38 (C) et la comparaisons des ratios des différentes population de groupement C=O théorique et expérimental.....	160
Figure 106 : Comparaison par longueur des spectres IR-TF dans le D ₂ O des dimères (A), tétramères (B) et hexamères (C) d'Agl-βAA.	160
Figure 107 : Spectre IR-TF en fonction du temps dans le méthanol- <i>d</i> ₄ des composés (A) 32 , (B) 33 , (A) 34 et (D) 35	161
Figure 108 : Spectres IR-TF expérimental (en haut) et théorique (en bas) du composé 33 dans le méthanol- <i>d</i> ₄	162

Figure 109 : Spectres IR-TF dans le méthanol- d_4 (noir) et le D_2O (rouge) des composés 32 (A), 33 (B) et 34 (C).....	164
Figure 110 : Spectres IR-TF dans le méthanol- d_4 des oligomères d'Agl-(β Phe/ β Ala) (A), Agl-(β Ile/ β Ala) (B), Agl-(β Ile/ β Ile) (C) et Agl-(β Trp/ β Ala) (D).	165
Figure 111 : Spectres IR-TF dans le méthanol- d_4 des dimères (A), tétramères (B) et hexamères (C) de dipeptide Agl- β AA.....	166
Figure 112 : Spectres IR-TF des composés 39 (en noir) , 40 (en rouge) et 41 (en bleu) dans le Chloroforme à 20°C et la table des valeurs de fréquence des bandes de vibration observées	167
Figure 113 : Spectres IR-TF des composés 39-41 dans le chloroforme (noir) et le méthanol- d_4 (rouge)	168
Figure 114 : Spectres CD dans le NaP (trait plein) et méthanol (pointillés) des oligomères Agl(β Ile/ β Ala) (A), Agl(β Ile/ β Ile) (B) et Agl(β Trp/ β Ala) (C).....	169
Figure 115 : Comparaison des spectres CD dans le méthanol (A) et le NaP (B) des oligomères d'Agl-(β Phe/ β Ala) (noir), Agl-(β Ile/ β Ala) (rouge), Agl-(β Ile/ β Ile) (bleu) et Agl-(β Trp/ β Ala) (rose).	170
Figure 116 : Structure (A) et réseau de liaisons hydrogène (B) du composé 50 obtenu par méthode semi-empirique (AM1) et mise en évidence des différentes face en vue axiale (C) (Les chaînes latérales des β Phe ont été remplacées par des CH_3 pour plus de clarté). (D) Représentation schématique du réseau de liaisons hydrogène du composé 50 obtenu par méthode semi-empirique (AM1).	172
Figure 117 : (A) Spectres de dichroïsme circulaire dans le tampon phosphate (trait plein) et le méthanol (tirets) des composés 47-50 . (B) Spectres de dichroïsme circulaire dans le NaP (trait plein) comparé au NaP/TFE (pointillés) des composés 47-50	173
Figure 118 : Comparaison des spectres dichroïques dans le méthanol des composés substitués 47-50 avec les composés de différentes longueurs 32-35	174
Figure 119 : (A) Microscopie confocale de l'oligomère fluorescent FI-Ahx-(Agl-Trp-Agl-Arg) $_3$ -NH $_2$ (14) sur cellules MDA-MB-231 après 3h d'incubation à 10 μ M ; (B) Test de cytotoxicité de la séquence (Agl-Trp-Agl-Arg) $_3$ conjuguée au peptide (D)-KLA (hachuré) comparé au vecteur (14) (violet) et (D)-KLA (blanc) seuls ; (C) Test de protéolyse dans le sérum humain du composé 14 (violet) comparé au CPP R $_6$ W $_3$ (marron).	178
Figure 120 : (A) Représentation du réseau de liaisons hydrogène de l'hélice 12 des oligomère d'Agl- β AA ; (B) Superposition des structures obtenues par DRX du composé 34 ; (C) Représentation schématique de la coupe axiale de l'hélice d'Agl- β AA ; (D) Superposition des structures optimisés par DFT dans le DMSO- d_6 (orange), le méthanol- d_3 (vert) et le tampon phosphate pH 6.4 (cyan).	179

Tables

Table 1 : Atomes impliqués dans les différents angles dièdres.....	23
Table 2 : Abondance relative des résidus par structure (Abondant si $P > 1$, rare si $P < 1$) ²³	24
Table 3 : Paramètres principaux des hélices présentes dans les protéines à l'état naturel ...	26
Table 4 : Angles dièdres des différents coudes β^{40}	31
Table 5 : Résidus les plus représentés dans la composition de coudes β^{40}	31
Table 6 : Angles dièdres des différents coudes β^{40}	32
Table 7 : Résidus les plus représentés dans la composition de coudes γ^{40}	32
Table 8 : Tableau récapitulatif des CPP énoncés avec, en rouge les résidus/domaines cationiques, en bleu les résidus/domaines hydrophobes et en vert les résidus anioniques. .	61
Table 9 : Pourcentage HPLC des différents composés présent après réaction du composé 1 avec 30éq de MeI sur support solide pendant 48h dans le DMF/DCM, le DCM, le DMF et la NMP	87
Table 10 : Pourcentage HPLC du composé 4 après réaction du composé 1 avec une concentration de MeI de 0.5, 1 et 2 M sur support solide pendant 1, 2 et 4h dans la NMP. ...	88
Table 11 : Séquences des composés pour l'étude structure activité	102
Table 12 : Représentation schématique des différents oligomères fluorescents	109
Table 13 : Composés poly-(Agl- β AA) synthétisés	118
Table 14 : Angles dièdres moyens et déviations (entre parenthèses) des 2 structures cristalline du composé 34	126
Table 15 : Constantes de couplage $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ des résidus AgI des composés 32 , 33 et 34 dans le méthanol- d_3	130
Table 16 : Constantes de couplage $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ des résidus AgI des composés 32 , 33 et 34 dans le DMSO- d_6	130
Table 17 : Constantes de couplage $^3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ des résidus AgI des composés 32 , 33 et 34 dans le tampon phosphate pH 6.4.	130
Table 18 : RMSD des 20 structures RMN de plus basses énergies du composé 33 dans le méthanol- d_3 , le DMSO- d_6 et le NaP, ainsi que le composé 34 dans le méthanol- d_3 et le DMSO- d_6	133
Table 19 : RMSD des structures du composé 33 après optimisation par DFT dans chaque solvant (DMSO- d_6 , méthanol- d_3 et NaP).	134
Table 20 : Angles dièdres moyens (et déviations) des structures du composé 33 par DFT dans le DMSO, le méthanol et l'eau.	135
Table 21 : Attribution des signaux IR-TF dans le D_2O basé sur la DFT du composé 32	145

Table 22 : Attribution des signaux IR-TF dans le D ₂ O basé sur la DFT du composé 33	146
Table 23 : Attribution des signaux IR-TF du composé 45 dans le D ₂ O basé sur la DFT.....	153
Table 24 : Composés oligomères d'Agl-βAA pour les études de solubilité.....	155
Table 25 : Solubilités dans le PBS à pH 7.4 exprimées en μM des composés 32-44	157
Table 26 : Coefficient de partage Octanol/PBS pH 7.4	158
Table 27 Attribution des signaux IR-TF du composé 33 dans le méthanol- <i>d</i> ₄ basé sur la DFT.	163
Table 28 : Fréquences des bandes IR-TF des composés 32-44 dans le méthanol- <i>d</i> ₄	166
Table 29 : Séquences analogues du composé 34 incorporant 1 ou 3 substitutions d'Agl par un résidu Alanine.....	171

Figures annexes

Figure S1 : Nomenclature used for the various atoms of each residues	183
Figure S2 : Stereospecific assignment strategy of the nonequivalent diastereotopic methylene groups of the γ-lactam rings and of the phenylalanine side chains. Characteristic 'strong', 'medium' and 'small' NOEs are shown in plain, dashed and dotted arrows, respectively	184
Figure S3 : Concentration of compounds for IR-TF measurements	185
Figure S4 : Backbone dihedrals angles (°) of 34 DRX structures.....	220
Figure S5 : Coupling Constants ³ J(HN,Hα) of the Agl residues in 32 , 33 and 34 in CD ₃ OH.	221
Figure S6 : Coupling Constants ³ J(HN,Hα) of the Agl residues in 32 , 33 and 34 in DMSO- <i>d</i> ₆	221
Figure S7 : Coupling Constants ³ J(HN,Hα) of the Agl residues in 32 , 33 and 34 in phosphate buffer, pH 6.4.	221
Figure S8 : Temperature coefficients (in ppb/K) of the amide protons of 32 , 33 and 34 in DMSO- <i>d</i> ₆	222
Figure S9 : Temperature coefficients (in ppb/K) of the amide protons of 32 , 33 and 34 in phosphate buffer, pH 6.4.	222
Figure S10 : Coupling Constants ³ J(HN,Hα) of the Agl residues of 37 , 40 and 43 in phosphate buffer, pH 6.4.	222
Figure S11 : Temperature coefficients (in ppb/K) of the amide protons of 37 , 40 and 43 in phosphate buffer, pH 6.4.	222
Figure S12 : Backbone dihedrals angles (°) of 33 NMR structures in methanol- <i>d</i> ₃ , DMSO- <i>d</i> ₆ and phosphate buffer, pH 6.4. Values are averaged on the 20 lowest energy NMR structures.	223

Figure S13 : Hydrogen bonding pattern statistical analysis on NMR structures of 33 in methanol- d_3 , DMSO- d_6 and phosphate buffer, pH 6.4. (cutoff at $d_{O-N} < 3.5 \text{ \AA}$ and N-H-O angle $< 120^\circ$)	224
Figure S14 : Root Mean Square Deviations (RMSD, $\text{\AA}$) of the lowest energy NMR structure of 33 in methanol- d_3 , DMSO- d_6 and phosphate buffer, pH 6.4.....	224
Figure S15 : Backbone dihedrals angles ($^\circ$) of 33 DFT structures in methanol- d_3 , DMSO- d_6 and phosphate buffer, pH 6.4.	225
Figure S16 : Backbone dihedrals angles ($^\circ$) of 34 DFT structures in methanol- d_3 and DMSO- d_6	226
Figure S17 : Hydrogen bonding pattern statistical analysis on NMR structures of 34 in methanol- d_3 and DMSO- d_6 . (cutoff at $d_{O-N} < 3.5 \text{ \AA}$ and N-H-O angle $< 120^\circ$)	227
Figure S18 : Spectre IR-TF du compose 32 de 5 à 70°C dans le D_2O dans la zone des amides I et II'.	228
Figure S19 : Spectre IR-TF du compose 34 de 5 à 70°C dans le D_2O dans la zone des amides I et II'.	228
Figure S20 : CD spectra of Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala) $_n$ -NH $_2$ oligomers (32-35) in phosphate buffer, pH 7.4 (top) and in methanol (bottom) at 20°C (black), at 55°C or 90°C in methanol and phosphate buffer respectively (red), and back to 20°C (bleu). The compound Ac-(Agl- β Phe-Agl- β Ala) $_4$ -NH $_2$ (35) was not soluble in phosphate buffer.	229
Figure S21 : CD spectra of Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ala) $_n$ -NH $_2$ oligomers (36-38) in phosphate buffer, pH 7.4 (top) and in methanol (bottom) at 20°C (black), at 55°C or 90°C in methanol and phosphate buffer respectively (red), and back to 20°C (bleu).	230
Figure S22 : CD spectra of Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ile) $_n$ -NH $_2$ oligomers (39-41) in phosphate buffer, pH 7.4 (top) and in methanol (bottom) at 20°C (black), at 55°C or 90°C in methanol and phosphate buffer respectively (red), and back to 20°C (bleu). The compound Ac-(Agl- β Ile-Agl- β Ile) $_3$ -NH $_2$ (41) was not soluble in phosphate buffer.	231
Figure S23 : CD spectra of Ac-(Agl- β Trp-Agl- β Ala) $_n$ -NH $_2$ oligomers (42-44) in phosphate buffer, pH 7.4 (top) and in methanol (bottom) at 20°C (black), at 55°C or 90°C in methanol and phosphate buffer respectively (red), and back to 20°C (bleu).	232
Figure S24 : CD spectra of Ac-(Agl- β Trp-Agl- β Ala) $_n$ -NH $_2$ oligomers (47-50) in phosphate buffer, pH 7.4 (top) and in methanol (bottom) at 20°C (black), at 55°C or 90°C in methanol and phosphate buffer respectively (red), and back to 20°C (bleu).	233

Bibliographie

1. Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R. & Fletcher, A. A. Pancreatic Extracts in The Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J* **12**, 141–146 (1922).
2. du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, J. M., Roberts, C. W. & Katsoyannis, P. G. The Synthesis of Oxytocin. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 3115–3121 (1954).
3. Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J. & Khrestchatisky, M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov. Today* **15**, 40–56 (2010).
4. Lau, J. L. & Dunn, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg. Med. Chem.* **26**, 2700–2707 (2018).
5. Henninot, A., Collins, J. C. & Nuss, J. M. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? *J. Med. Chem.* **61**, 1382–1414 (2018).
6. Fosgerau, K. & Hoffman, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov. Today* **20**, 122–128 (2015).
7. Guichard, G. *et al.* Efficient binding of reduced peptide bond pseudopeptides to major histocompatibility complex class I molecule. *J. Biol. Chem.* **270**, 26057–26059 (1995).
8. Chorev, M. & Goodman, M. A Dozen Years of Retro-Inverso Peptidomimetics. *Acc. Chem. Res.* 266–273 (1993).
9. Simon, R. J. *et al.* Peptoids: a modular approach to drug discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 9367–9371 (1992).
10. Chatterjee, J., Rechenmacher, F. & Kessler, H. N -Methylation of Peptides and Proteins: An Important Element for Modulating Biological Functions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 254–269 (2013).
11. Roxin, Á. & Zheng, G. Flexible or fixed: a comparative review of linear and cyclic cancer-targeting peptides. *Future Med. Chem.* **4**, 1601–1618 (2012).

12. Wang, Z. A., Ding, X. Z., Tian, C.-L. & Zheng, J.-S. Protein/peptide secondary structural mimics: design, characterization, and modulation of protein–protein interactions. *RSC Adv.* **6**, 61599–61609 (2016).
13. Blackwell, H. E. & Grubbs, R. H. Highly efficient synthesis of covalently cross-linked peptide helices by ring-closing metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 3281–3284 (1998).
14. Gellman, S. H. Foldamers: A Manifesto. *Acc. Chem. Res.* **31**, 173–180 (1998).
15. Freidinger, R. M., Veber, D. F., Perlow, D. S. & Saperstein, R. Bioactive conformation of luteinizing hormone-releasing hormone: evidence from a conformationally constrained analog. *Science* **210**, 656–658 (1980).
16. Perdih, A. & Kikelj, D. The application of Freidinger lactams and their analogs in the design of conformationally constrained peptidomimetics. *Curr. Med. Chem.* **13**, 1525–1556 (2006).
17. Forbes, R. M., Cooper, A. R. & Mitchell, H. H. The composition of the adult human body as determined by chemical analysis. *J Biol Chem* **203**, 359–366 (1953).
18. Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V. Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95–99 (1963).
19. Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. V. CONFORMATION OF POLYPEPTIDES AND PROTEINS. *Adv. Protein Chem.* **23**, 283–437 (1968).
20. Mathews, C. K., van Holde, K. E. & Ahern, K. G. *Biochemistry, 3rd Edition*. (W. H. Freeman, 1999).
21. Chou, P. Y. & Fasman, G. D. Prediction of Protein Conformation. *Biochemistry* **13**, 222–245 (1974).
22. PY, C. Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* **13**, 211222Diss (1974).
23. Williams, R. W., Chang, A., Juretić, D. & Loughran, S. Secondary structure predictions and medium range interactions. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Protein Struct. Mol. Enzymol.* **916**, 200–204 (1987).

-
24. Kabsch, W. & Sander, C. How good are predictions of protein secondary structure? *FEBS Lett.* **155**, 179–182 (1983).
 25. Stickle, D. F., Presta, L. G., Dill, K. A. & Rose, G. D. Hydrogen Bonding in Globular Proteins. *J. Mol. Biol.* **226**, 1143–1159 (1992).
 26. Pauling, L., Corey, R. B. & Branson, H. R. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **37**, 205–211 (1951).
 27. Vieira-Pires, R. S. & Morais-Cabral, J. H. 3₁₀ helices in channels and other membrane proteins. *J. Gen. Physiol.* **136**, 585–592 (2010).
 28. Taylor, H. S. Large molecules through atomic spectacles. *Proc. Am. Philos. Soc.* 1–12 (1941).
 29. Huggins, M. L. The Structure of Fibrous Proteins. *Chem. Rev.* **32**, 195–218 (1943).
 30. Low, B. W. & Baybutt, R. B. THE π HELIX—A HYDROGEN BONDED CONFIGURATION OF THE POLYPEPTIDE CHAIN. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 5806–5807 (1952).
 31. Cooley, R. B., Rhoads, T. W., Arp, D. J. & Karplus, P. A. A Diiron Protein Autogenerates a Valine-Phenylalanine Cross-Link. *Science* **332**, 929–929 (2011).
 32. Adzhubei, A. A., Sternberg, M. J. E. & Makarov, A. A. Polyproline-II Helix in Proteins: Structure and Function. *J. Mol. Biol.* **425**, 2100–2132 (2013).
 33. Shoulders, M. D. & Raines, R. T. Collagen Structure and Stability. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 929–958 (2009).
 34. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Biochemistry, 7th Edition*. (W. H. Freeman, 2012).
 35. Richardson, J. S. beta-sheet topology and the relatedness of proteins. *Nature* **268**, 495–500 (1977).
 36. Kung, V. M., Cornilescu, G. & Gellman, S. H. Impact of Strand Number on Parallel β -Sheet Stability. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 14336–14339 (2015).
 37. Stranger, H. E. *et al.* Length-dependent stability and strand length limits in anti parallel beta-sheet secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 12015–12020
 38. Syud, F. A. *et al.* Influence of Strand Number on Antiparallel β -Sheet Stability in Designed Three- and Four-stranded β -Sheets. *J. Mol. Biol.* **326**, 553–568 (2003).

39. Dasgupta, B., Pal, L., Basu, G. & Chakrabarti, P. Expanded turn conformations: Characterization and sequence-structure correspondence in α -turns with implications in helix folding. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **55**, 305–315 (2004).
40. Guruprasad, K. & Rajkumar, S. β - and γ -turns in proteins revisited: A new set of amino acid turn-type dependent positional preferences and potentials. *J Biosci* **25**, 14 (2000).
41. Némethy, G. & Printz, M. P. The γ Turn, a Possible Folded Conformation of the Polypeptide Chain. Comparison with the beta Turn. *Macromolecules* **5**, 755–758 (1972).
42. Watson, H. C. The Stereochemistry of the Protein Myoglobin. *Prog.Stereochem.* 299 (1969).
43. Karle, I. L., Flippen-Anderson, J., Sukumar, M. & Balamar, P. Conformation of a 16-residue zervamicin IIA analog peptide containing three different structural features: 3_{10} -helix, α -helix, and β -bend ribbon. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 5087–5091 (1987).
44. Di Blasio, B. *et al.* Structural Characterization of the beta-Bend Ribbon Spiral: Crystallographic Analysis of Two Long (L-Pro-Aib) $_n$ Sequential Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, (1992).
45. Peptide and Protein Design, Pseudopeptides, and Peptidomimetics. in *Peptides: Chemistry and Biology* 339–378 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003). doi:10.1002/352760068X.ch7
46. Wang, C. K., Swedberg, J. E., Northfield, S. E. & Craik, D. J. Effects of Cyclization on Peptide Backbone Dynamics. *J. Phys. Chem. B* **119**, 15821–15830 (2015).
47. Ball, J. B. & Alewood, P. F. Conformational constraints: Nonpeptide β -turn mimics. *J. Mol. Recognit.* **3**, 55–64 (1990).
48. Obrecht, D., Altorfer, M. & Robinson, J. A. Novel peptide mimetic building blocks and strategies for efficient lead finding. in *Advances in Medicinal Chemistry* **4**, 1–68 (Elsevier, 1999).
49. Burgess, K. Solid-Phase Syntheses of β -Turn Analogues To Mimic or Disrupt Protein–Protein Interactions. *Acc. Chem. Res.* **34**, 826–835 (2001).

-
50. Pelay-Gimeno, M., Glas, A., Koch, O. & Grossmann, T. N. Structure-Based Design of Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 8896–8927 (2015).
51. Freidinger, R. M., Perlow, D. S. & Veber, D. F. Protected lactam-bridged dipeptides for use as conformational constraints in peptides. *J. Org. Chem.* **47**, 104–109 (1982).
52. Paul, P. K. C., Burney, P. A., Campbell, M. M. & Osguthorpe, D. J. The conformational preferences of 7-lactam and its role in constraining peptide structure. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **4**, 239–253 (1989).
53. Freidinger, R. M. Design and Synthesis of Novel Bioactive Peptides and Peptidomimetics. *J. Med. Chem.* **46**, 5553–5566 (2003).
54. Freidinger, R. M., Veber, D. F., Perlow, D. S., Brooks, J. R. & Saperstein, R. Bioactive Conformation of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone: Evidence from a Conformationally Constrained Analog. *Science* **210**, 656–658 (1980).
55. Freidinger, R. M. *et al.* Conformational modifications of cyclic hexapeptide somatostatin analogs. *Int. J. Pept. Protein Res.* **23**, 142–150 (1984).
56. Wu, H., Mousseau, G., Mediouni, S., Valente, S. T. & Kodadek, T. Cell-Permeable Peptides Containing Cycloalanine Residues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 12637–12642 (2016).
57. Mándity, I. M. & Fülöp, F. An overview of peptide and peptoid foldamers in medicinal chemistry. *Expert Opin. Drug Discov.* **10**, 1163–1177 (2015).
58. Gellman, S. H. Foldamers: A Manifesto. *Acc. Chem. Res.* **31**, 173–180 (1998).
59. Hill, D. J., Mio, M. J., Prince, R. B., Hughes, T. S. & Moore, J. S. A Field Guide to Foldamers. *Chem. Rev.* **101**, 3893–4012 (2001).
60. Appella, D. H., Christianson, L. A., Karle, I. L., Powell, D. R. & Gellman, S. H. β -Peptide Foldamers: Robust Helix Formation in a New Family of β -Amino Acid Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 13071–13072 (1996).
61. Seebach, D. *et al.* Probing the Helical Secondary Structure of Short-Chain β -Peptides. *Helv. Chim. Acta* **79**, 2043–2066 (1996).

62. Hintermann, T., Gademann, K., Jaun, B. & Seebach, D. γ -Peptides Forming More Stable Secondary Structures than α -Peptides: Synthesis and helical NMR-solution structure of the γ -hexapeptide analog of H-(Val-Ala-Leu)₂-OH. *Helv. Chim. Acta* **81**, 983–1002 (1998).
63. Seebach, D. *et al.* CD Spectra in Methanol of β -Oligopeptides Consisting of β -Amino Acids with Functionalized Side Chains, with Alternating Configuration, and with Geminal Backbone Substituents—Fingerprints of New Secondary Structures? *Helv. Chim. Acta* **83**, 2849–2864 (2000).
64. Appella, D. H., Barchi, J. J., Durell, S. R. & Gellman, S. H. Formation of Short, Stable Helices in Aqueous Solution by β -Amino Acid Hexamers. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2309–2310 (1999).
65. Guarracino, D. A. *et al.* Relationship between Salt-Bridge Identity and 14-Helix Stability of β 3-Peptides in Aqueous Buffer. *Org. Lett.* **8**, 807–810 (2006).
66. Hintermann, S. Synthesis of a β -Hexapeptide from (R)-2-Aminomethyl-alkanoic Acids and Structural Investigations. *Synlett* 437–438 (1997).
67. Abele, S., Seiler, P. & Seebach, D. Synthesis, Crystal Structures, and Modelling of β -Oligopeptides Consisting of 1-(Aminomethyl)cyclopropanecarboxylic Acid: Ribbon-Type Arrangement of Eight-Membered H-Bonded Rings. *Helv. Chim. Acta* **82**, 1559–1571 (1999).
68. Seebach, D. *et al.* 'Mixed' β -peptides: A unique helical secondary structure in solution. Preliminary communication. *Helv. Chim. Acta* **80**, 2033–2038 (1997).
69. Mathad, R., Gessier, F., Seebach, D. & Jaun, B. The Effect of Backbone-Heteroatom Substitution on the Folding of Peptides - A Single Fluorine Substituent Prevents a β -Heptapeptide from Folding into a 3_{14} -Helix (NMR Analysis). *Helv. Chim. Acta* **88**, 266–280 (2005).
70. Seebach, D., Abele, S., Gademann, K. & Jaun, B. Pleated Sheets and Turns of β -Peptides with Proteinogenic Side Chains. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1595–1597 (1999).

-
71. Gademann, K., Häne, A., Rueping, M., Jaun, B. & Seebach, D. The Fourth Helical Secondary Structure of β -Peptides: The (P)-28-Helix of a β -Hexapeptide Consisting of (2R,3S)-3-Amino-2-hydroxy Acid Residues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 1534–1537 (2003).
72. Appella, D. H. *et al.* Synthesis and Structural Characterization of Helix-Forming β -Peptides: trans-2-Aminocyclopentanecarboxylic Acid Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7574–7581 (1999).
73. Vaz, E., Pomerantz, W. C., Geyer, M., Gellman, S. H. & Brunsveld, L. Comparison of Design Strategies for Promotion of β -Peptide 14-Helix Stability in Water. *ChemBioChem* **9**, 2254–2259 (2008).
74. Wang, X., Espinosa, J. F. & Gellman, S. H. 12-Helix Formation in Aqueous Solution with Short β -Peptides Containing Pyrrolidine-Based Residues. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4821–4822 (2000).
75. Woll, M. G., Fisk, J. D., LePlae, P. R. & Gellman, S. H. Stereoselective Synthesis of 3-Substituted 2-Aminocyclopentanecarboxylic Acid Derivatives and Their Incorporation into Short 12-Helical β -Peptides That Fold in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12447–12452 (2002).
76. Fernandes, C. *et al.* 12-Helix Folding of Cyclobutane β -Amino Acid Oligomers. *Org. Lett.* **12**, 3606–3609 (2010).
77. Claridge, T. D. W. *et al.* 10-Helical conformations in oxetane β -amino acid hexamers. *Tetrahedron Lett.* **5** (2001).
78. Hetényi, A. *et al.* Sculpting the β -peptide foldamer H12 helix via a designed side-chain shape. *Chem Commun* 177–179 (2009). doi:10.1039/B812114A
79. Doerksen, R. J., Chen, B., Yuan, J., Winkler, J. D. & Klein, M. L. Novel conformationally-constrained β -peptides characterized by ^1H NMR chemical shifts. *Chem Commun* 2534–2535 (2003). doi:10.1039/B309584C
80. De Pol, S., Zorn, C., Klein, C. D., Zerbe, O. & Reiser, O. Surprisingly Stable Helical Conformations in α/β -Peptides by Incorporation of cis- β -Aminocyclopropane Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 511–514 (2004).

81. Schmitt, M. A., Weisblum, B. & Gellman, S. H. Unexpected Relationships between Structure and Function in α,β -Peptides: Antimicrobial Foldamers with Heterogeneous Backbones. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6848–6849 (2004).
82. Koglin, N. *et al.* Analogues of Neuropeptide Y Containing β -Aminocyclopropane Carboxylic Acids are the Shortest Linear Peptides That Are Selective for the Y1 Receptor. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 202–205 (2003).
83. Hayen, A., Schmitt, M. A., Ngassa, F. N., Thomasson, K. A. & Gellman, S. H. Two Helical Conformations from a Single Foldamer Backbone: “Split Personality” in Short α/β -Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 505–510 (2004).
84. Choi, S. H., Guzei, I. A., Spencer, L. C. & Gellman, S. H. Crystallographic Characterization of Helical Secondary Structures in α/β -Peptides with 1:1 Residue Alternation. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6544–6550 (2008).
85. Bolin, K. A. & Millhauser, G. L. α and 3_{10} : The Split Personality of Polypeptide Helices. *Acc. Chem. Res.* **32**, 1027–1033 (1999).
86. Mathieu, L. *et al.* Helical Oligomers of Thiazole-Based γ -Amino Acids: Synthesis and Structural Studies. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 6006–6010 (2013).
87. Schmitt, M. A., Choi, S. H., Guzei, I. A. & Gellman, S. H. Residue Requirements for Helical Folding in Short α/β -Peptides: Crystallographic Characterization of the 11-Helix in an Optimized Sequence. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 13130–13131 (2005).
88. Toniolo, C., Crisma, M., Formaggio, F. & Peggion, C. Control of peptide conformation by the Thorpe-Ingold effect ($\text{C}\alpha$ -tetrasubstitution). *Biopolymers* **60**, 396–419 (2001).
89. Sharma, G. V. M. *et al.* 9/11 Mixed Helices in α/β Peptides Derived from C-Linked Carbo- β -Amino Acid and L-Ala Repeats. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 5878–5882 (2005).
90. Srinivasulu, G., Kumar, S. K., Sharma, G. V. M. & Kunwar, A. C. 11/9-Mixed Helices in the α / β -Peptides Derived from Alternating α - and β -Amino Acids with Proteinogenic Side Chains*. *J. Org. Chem.* **71**, 8395–8400 (2006).

91. Lee, M., Shim, J., Kang, P., Guzei, I. A. & Choi, S. H. Structural Characterization of α/β -Peptides having Alternating Residues: X-ray Structures of the 11/9-Helix from Crystals of Racemic Mixtures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 12564–12567 (2013).
92. Seebach, D. *et al.* Synthesis, and Helix or Hairpin-Turn Secondary Structures of 'Mixed' α/β -Peptides Consisting of Residues with Proteinogenic Side Chains and of 2-Amino-2-methylpropanoic Acid (Aib). *Helv. Chim. Acta* **89**, 1801–1825 (2006).
93. Schmitt, M. A., Choi, S. H., Guzei, I. A. & Gellman, S. H. New Helical Foldamers: Heterogeneous Backbones with 1:2 and 2:1 α/β -Amino Acid Residue Patterns. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4538–4539 (2006).
94. Kirshenbaum, K. *et al.* Sequence-specific polypeptoids: A diverse family of heteropolymers with stable secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 4303–4308 (1998).
95. Armand, P. *et al.* Chiral N-substituted glycines can form stable helical conformations. *Fold. Des.* **2**, 369–375 (1997).
96. Shah, N. H. *et al.* Oligo(N-aryl glycines): A New Twist on Structured Peptoids. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16622–16632 (2008).
97. Stringer, J. R., Crapster, J. A., Guzei, I. A. & Blackwell, H. E. Extraordinarily Robust Polyproline Type I Peptoid Helices Generated via the Incorporation of α -Chiral Aromatic N-1-Naphthylethyl Side Chains. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 15559–15567 (2011).
98. Caumes, C., Roy, O., Faure, S. & Taillefumier, C. The Click Triazolium Peptoid Side Chain: A Strong *cis* -Amide Inducer Enabling Chemical Diversity. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 9553–9556 (2012).
99. Roy, O. *et al.* Homogeneous and Robust Polyproline Type I Helices from Peptoids with Nonaromatic α -Chiral Side Chains. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 13533–13540 (2017).
100. Crapster, J. A., Guzei, I. A. & Blackwell, H. E. A Peptoid Ribbon Secondary Structure. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 5079–5084 (2013).
101. Laursen, J. S., Harris, P., Fristrup, P. & Olsen, C. A. Triangular prism-shaped β -peptoid helices as unique biomimetic scaffolds. *Nat. Commun.* **6**, (2015).

102. Abele, S., Vögtli, K. & Seebach, D. Oligomers of β 2- and of β 3-Homoproline: What are the Secondary Structures of β -Peptides Lacking H-Bonds? *Helv. Chim. Acta* **82**, 1539–1558 (1999).
103. Venkatachalapathi, Y. V. & Balaram, P. X-Pro peptides: Synthesis and solution conformation of benzyloxycarbonyl-(Aib-Pro)₄methyl ester. Evidence for a novel helical structure. *Biopolymers* **20**, 1137–1145 (1981).
104. Venkataram Prasad, B. V. & Balaram, P. X-Pro peptides. A theoretical study of the hydrogen bonded conformations of (α -amino isobutyryl-L-prolyl)_n sequences. *Int J Biol Macromol* **4**, 99–102 (1982).
105. 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: Rings and Ribbons in Protein Structures. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **82**, 230–239 (2014).
106. Madalengoitia, J. S. A Novel Peptide Fold: A Repeating β II' Turn Secondary Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4986–4987 (2000).
107. Smith, M. D., Claridge, T. D. W., Sansom, M. S. P. & Fleet, G. W. J. Bend ribbon-forming tetrahydrofuran amino acids This is one of a number of contributions from the current members of the Dyson Perrins Laboratory to mark the end of almost 90 years of organic chemistry research in that building, as all its current academic staff move across South Parks Road to a new purpose-built laboratory. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 3647 (2003).
108. Tomasini, C., Luppi, G. & Monari, M. Oxazolidin-2-one-Containing Pseudopeptides That Fold into β -Bend Ribbon Spirals. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2410–2420 (2006).
109. Srinivas, D., Gonnade, R., Ravindranathan, S. & Sanjayan, G. J. Conformationally Constrained Aliphatic–Aromatic Amino-Acid-Conjugated Hybrid Foldamers with Periodic β -Turn Motifs. *J. Org. Chem.* **72**, 7022–7025 (2007).
110. Baruah, P. K. *et al.* Enforcing Periodic Secondary Structures in Hybrid Peptides: A Novel Hybrid Foldamer Containing Periodic γ -Turn Motifs. *J. Org. Chem.* **72**, 636–639 (2007).

111. Tomasini, C., Angelici, G. & Castellucci, N. Foldamers Based on Oxazolidin-2-ones. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3648–3669 (2011).
112. Castellucci, N. & Tomasini, C. Preorganised Dipeptide Mimics as Foldamer Building Blocks: Preorganised Dipeptide Mimics as Foldamer Building Blocks. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 3567–3573 (2013).
113. Angelici, G. *et al.* Nanofibers from Oxazolidin-2-one Containing Hybrid Foldamers: What is the Right Molecular Size? *Chem. - Eur. J.* **15**, 8037–8048 (2009).
114. Bernardi, F. *et al.* Pseudopeptide Foldamers: The Homo-Oligomers of Pyroglutamic Acid. *Chem. - Eur. J.* **8**, 2516 (2002).
115. Martin, V. *et al.* Turning Peptide Sequences into Ribbon Foldamers by a Straightforward Multicyclization Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 13966–13970 (2015).
116. Goodson, B. *et al.* Characterization of Novel Antimicrobial Peptoids. *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER* **43**, 6 (1999).
117. Ghosh, C. *et al.* Small Molecular Antibacterial Peptoid Mimics: The Simpler the Better! *J. Med. Chem.* **57**, 1428–1436 (2014).
118. Olsen, C. A. *et al.* α -Peptide/ β -Peptoid Chimeras. *Org. Lett.* **9**, 1549–1552 (2007).
119. Molchanova, N., Hansen, P. R., Damborg, P., Nielsen, H. M. & Franzyk, H. Lysine-Based α -Peptide/ β -Peptoid Peptidomimetics: Influence of Hydrophobicity, Fluorination, and Distribution of Cationic Charge on Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *ChemMedChem* **12**, 312–318 (2017).
120. Hamuro, Y., Schneider, J. P. & DeGrado, W. F. De Novo Design of Antibacterial β -Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 12200–12201 (1999).
121. Liu, D. & DeGrado, W. F. De Novo Design, Synthesis, and Characterization of Antimicrobial β -Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 7553–7559 (2001).
122. Raguse, T. L., Porter, E. A., Weisblum, B. & Gellman, S. H. Structure–Activity Studies of 14-Helical Antimicrobial β -Peptides: Probing the Relationship between Conformational Stability and Antimicrobial Potency. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12774–12785 (2002).

123. Epand, R. F., Raguse, L., Gellman, S. H. & Epand, R. M. Antimicrobial 14-Helical β -Peptides: Potent Bilayer Disrupting Agents [†]. *Biochemistry* **43**, 9527–9535 (2004).
124. Arvidsson, P. I. *et al.* Antibiotic and Hemolytic Activity of a β 2/ β 3 Peptide Capable of Folding into a 12/10-Helical Secondary Structure. *ChemBioChem* **4**, 1345–1347 (2003).
125. Schmitt, M. A., Weisblum, B. & Gellman, S. H. Interplay among Folding, Sequence, and Lipophilicity in the Antibacterial and Hemolytic Activities of α/β -Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 417–428 (2007).
126. Chongsiriwatana, N. P. *et al.* Peptoids that mimic the structure, function, and mechanism of helical antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 2794–2799 (2008).
127. Imamura, Y. *et al.* Effect of Helical Conformation and Side Chain Structure on γ -Secretase Inhibition by β -Peptide Foldamers: Insight into Substrate Recognition. *J. Med. Chem.* **56**, 1443–1454 (2013).
128. Kritzer, J. A., Lear, J. D., Hodsdon, M. E. & Schepartz, A. Helical β -Peptide Inhibitors of the p53-hDM2 Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9468–9469 (2004).
129. Harker, E. A., Daniels, D. S., Guarracino, D. A. & Schepartz, A. β -Peptides with improved affinity for hDM2 and hDMX. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 2038–2046 (2009).
130. Lee, E. F. *et al.* High-Resolution Structural Characterization of a Helical α/β -Peptide Foldamer Bound to the Anti-Apoptotic Protein Bcl-x_L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 4318–4322 (2009).
131. Trader, D. J., Simanski, S. & Kodadek, T. A Reversible and Highly Selective Inhibitor of the Proteasomal Ubiquitin Receptor Rpn13 Is Toxic to Multiple Myeloma Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 6312–6319 (2015).
132. Udugamasooriya, D. G., Ritchie, C., Brekken, R. A. & Kodadek, T. A peptoid antagonist of VEGF Receptor 2 recognizes a ‘hotspot’ in the extracellular domain distinct from the hormone-binding site. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 6338–6343 (2008).
133. Raveendra, B. L. *et al.* Discovery of Peptoid Ligands for Anti-Aquaporin 4 Antibodies. *Chem. Biol.* **20**, 351–359 (2013).

-
134. Stephens, O. M., Kim, S., Welch, B. D., Hodsdon, M. E. & Schepartz, A. Inhibiting HIV Fusion with a β -Peptide Foldamer. *6* (2010).
135. Horne, W. S. *et al.* Structural and biological mimicry of protein surface recognition by / -peptide foldamers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 14751–14756 (2009).
136. Johnson, L. M. *et al.* A Potent α/β -Peptide Analogue of GLP-1 with Prolonged Action in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 12848–12851 (2014).
137. Curtis, H. & Barnes, S. *Biology, 5th Edition*. (New York : Worth Publishers, 1989).
138. Conner, S. D. & Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37–44 (2003).
139. Doherty, G. J. & McMahon, H. T. Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 857–902 (2009).
140. Mayor, S. & Pagano, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 603–612 (2007).
141. Lönn, P. *et al.* Enhancing Endosomal Escape for Intracellular Delivery of Macromolecular Biologic Therapeutics. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
142. Mudshinge, S. R., Deore, A. B., Patil, S. & Bhalgat, C. M. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharm. J.* **19**, 129–141 (2011).
143. Liu, T.-C., Galanis, E. & Kirn, D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **4**, 101–117 (2007).
144. Torchilin, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 145–160 (2005).
145. Bashyal, S., Noh, G., Keum, T., Choi, Y. W. & Lee, S. Cell penetrating peptides as an innovative approach for drug delivery; then, present and the future. *J. Pharm. Investig.* **46**, 205–220 (2016).
146. Vivès, E., Brodin, P. & Lebleu, B. A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* **272**, 16010–16017 (1997).

147. Frankel, A. D. & Pabo, C. O. Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus. *Cell* **55**, 1189–1193 (1988).
148. Green, M. & Loewenstein, P. M. Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein. 10
149. Derossit, D., Joliott, A. H., Chassaing, G. & Prochiantz, A. The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 10444–10450 (1994).
150. Milletti, F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* **17**, 850–860 (2012).
151. Wender, P. A. *et al.* The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 13003–13008 (2000).
152. Futaki, S. *et al.* Arginine-rich Peptides: AN ABUNDANT SOURCE OF MEMBRANE-PERMEABLE PEPTIDES HAVING POTENTIAL AS CARRIERS FOR INTRACELLULAR PROTEIN DELIVERY. *J. Biol. Chem.* **276**, 5836–5840 (2001).
153. Tünnemann, G. *et al.* Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *J. Pept. Sci.* **14**, 469–476 (2008).
154. Mitchell, D. J., Steinman, L., Kim, D. T., Fathman, C. G. & Rothbard, J. B. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J. Pept. Res.* **56**, 318–325 (2000).
155. Rothbard, J. B., Jessop, T. C., Lewis, R. S., Murray, B. A. & Wender, P. A. Role of Membrane Potential and Hydrogen Bonding in the Mechanism of Translocation of Guanidinium-Rich Peptides into Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9506–9507 (2004).
156. Elmquist, A., Lindgren, M., Bartfai, T. & Langel, Ü. VE-Cadherin-Derived Cell-Penetrating Peptide, pVEC, with Carrier Functions. *Exp. Cell Res.* **269**, 237–244 (2001).
157. Morris, M. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2730–2736 (1997).

158. Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. & Divata, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **19**, 1173–1176 (2001).
159. Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M. & Langel, U. Cell penetration by transportan. *FASEB J.* **12**, 67–77 (1998).
160. Oehlke, J. et al. Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta* **1414** 127–139 (1998).
161. Yau, W.-M., Wimley, W. C., Gawrisch, K. & White, S. H. The Preference of Tryptophan for Membrane Interfaces [†]. *Biochemistry* **37**, 14713–14718 (1998).
162. Derossi, D. & Prochiantz, G. C. A. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends CELL Biol.* **8**, 4 (1998).
163. 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* **51**, 5531–5539 (2012).
164. Oehlke, J., Krause, E., Wiesner, B., Beyermann, M. & Bienert, M. Extensive cellular uptake into endothelial cells of an amphipathic β -sheet forming peptide. *FEBS Lett.* **415**, 196–199 (1997).
165. Sadler, K., Eom, K. D., Yang, J.-L., Dimitrova, Y. & Tam, J. P. Translocating Proline-Rich Peptides from the Antimicrobial Peptide Bactenecin 7 [†]. *Biochemistry* **41**, 14150–14157 (2002).
166. Daniels, D. S. & Schepartz, A. Intrinsically Cell-Permeable Miniature Proteins Based on a Minimal Cationic PPII Motif. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14578–14579 (2007).
167. Fernández-Carneado, J., Kogan, M. J., Pujals, S. & Giralt, E. Amphipathic peptides and drug delivery: Amphipathic Peptides and Drug Delivery. *Biopolymers* **76**, 196–203 (2004).
168. Rhee, M. & Davis, P. Mechanism of Uptake of C105Y, a Novel Cell-penetrating Peptide. *J. Biol. Chem.* **281**, 1233–1240 (2006).

169. Nakayama, F. *et al.* Fibroblast Growth Factor-12 (FGF12) Translocation into Intestinal Epithelial Cells Is Dependent on a Novel Cell-penetrating Peptide Domain: INVOLVEMENT OF INTERNALIZATION IN THE IN VIVO ROLE OF EXOGENOUS FGF12. *J. Biol. Chem.* **286**, 25823–25834 (2011).
170. Marks, J. R., Placone, J., Hristova, K. & Wimley, W. C. Spontaneous Membrane-Translocating Peptides by Orthogonal High-Throughput Screening. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 8995–9004 (2011).
171. Chu, Q. *et al.* Towards understanding cell penetration by stapled peptides. *MedChemComm* **6**, 111–119 (2015).
172. Ochocki, J. D., Mullen, D. G., Wattenberg, E. V. & Distefano, M. D. Evaluation of a cell penetrating prenylated peptide lacking an intrinsic fluorophore via in situ click reaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 4998–5001 (2011).
173. 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.* **46**, 2944–2954 (2013).
174. Tan, N. C., Yu, P., Kwon, Y.-U. & Kodadek, T. High-throughput evaluation of relative cell permeability between peptoids and peptides. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 5853–5861 (2008).
175. Kwon, Y.-U. & Kodadek, T. Quantitative Evaluation of the Relative Cell Permeability of Peptoids and Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 1508–1509 (2007).
176. Unciti-Broceta, A., Diezmann, F., Ou-Yang, C. Y., Fara, M. A. & Bradley, M. Synthesis, penetrability and intracellular targeting of fluorescein-tagged peptoids and peptide–peptoid hybrids. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 959–966 (2009).
177. Lee, J., Udugamasooriya, D. G., Lim, H.-S. & Kodadek, T. Potent and selective photo-inactivation of proteins with peptoid-ruthenium conjugates. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 258–260 (2010).
178. Utku, Y. *et al.* A peptidomimetic siRNA transfection reagent for highly effective gene silencing. *Mol. Biosyst.* **2**, 312 (2006).

179. Lobo, B. A., Vetro, J. A., Suich, D. M., Zuckermann, R. N. & Middaugh, C. R. Structure/Function Analysis of Peptoid/Lipitoid:DNA Complexes. *J. Pharm. Sci.* **92**, 1905–1918 (2003).
180. Foged, C. *et al.* Cellular uptake and membrane-destabilising properties of α -peptide/ β -peptoid chimeras: lessons for the design of new cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 2487–2495 (2008).
181. Rueping, M., Mahajan, Y., Sauer, M. & Seebach, D. Cellular Uptake Studies with β -Peptides. *ChemBioChem* **3**, 257–259 (2002).
182. Potocky, T. B., Menon, A. K. & Gellman, S. H. Cytoplasmic and Nuclear Delivery of a TAT-derived Peptide and a β -Peptide after Endocytic Uptake into HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 50188–50194 (2003).
183. Potocky, T. B., Silviu, J., Menon, A. K. & Gellman, S. H. HeLa Cell Entry by Guanidinium-Rich β -Peptides: Importance of Specific Cation–Cell Surface Interactions. *ChemBioChem* **8**, 917–926 (2007).
184. Eldred, S. E. *et al.* Effects of Side Chain Configuration and Backbone Spacing on the Gene Delivery Properties of Lysine-Derived Cationic Polymers. *Bioconjug. Chem.* **16**, 694–699 (2005).
185. Kamena, F. *et al.* On the Mechanism of Eukaryotic Cell Penetration by α - and β -Oligoarginines - Targeting Infected Erythro-cytes. *Chem. Biodivers.* **8**, 1–12 (2011).
186. Sparr, C. *et al.* Improved Efficacy of Fosmidomycin against Plasmodium and Mycobacterium Species by Combination with the Cell-Penetrating Peptide Octaarginine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4689–4698 (2013).
187. Demizu, Y. *et al.* A preorganized β -amino acid bearing a guanidinium side chain and its use in cell-penetrating peptides. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 5617–5620 (2015).
188. Fillon, Y. A., Anderson, J. P. & Chmielewski, J. Cell Penetrating Agents Based on a Polyproline Helix Scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 11798–11803 (2005).

189. Nagel, Y. A., Raschle, P. S. & Wennemers, H. Effect of Preorganized Charge-Display on the Cell-Penetrating Properties of Cationic Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 122–126 (2017).
190. Vezenkov, L. L. *et al.* Ribbon-like Foldamers for Cellular Uptake and Drug Delivery. *ChemBioChem* **18**, 2110–2114 (2017).
191. Douat, C. *et al.* A Cell-Penetrating Foldamer with a Bio reducible Linkage for Intracellular Delivery of DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 11133–11137 (2015).
192. Iriondo-Alberdi, J., Laxmi-Reddy, K., Bouguerne, B., Staedel, C. & Huc, I. Cellular Internalization of Water-Soluble Helical Aromatic Amide Foldamers. *ChemBioChem* **11**, 1679–1685 (2010).
193. Maynadier, M. *et al.* Dipeptide mimic oligomer transporter mediates intracellular delivery of Cathepsin D inhibitors: A potential target for cancer therapy. *J. Controlled Release* **171**, 251–257 (2013).
194. Heitz, F., Morris, M. C. & Divita, G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics: Peptide-based drug delivery technology. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 195–206 (2009).
195. Richard, J. P. *et al.* Cell-penetrating Peptides: A REEVALUATION OF THE MECHANISM OF CELLULAR UPTAKE. *J. Biol. Chem.* **278**, 585–590 (2003).
196. Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R. & Brock, R. A Comprehensive Model for the Cellular Uptake of Cationic Cell-penetrating Peptides. *Traffic* **8**, 848–866 (2007).
197. Prochiantz, A. Homeodomain-Derived Peptides: In and Out of the Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **886**, 172–179 (1999).
198. Gazit, E., Lee, W.-J., Brey, P. T. & Shai, Y. Mode of Action of the Antibacterial Cecropin B2: A Spectrofluorometric Study. *Biochemistry* **33**, 10681–10692 (1994).
199. Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. & Shai, Y. Interaction of Antimicrobial Dermaseptin and Its Fluorescently Labeled Analogues with Phospholipid Membranes. *Biochemistry* **31**, 12416–12423 (1992).

-
200. Guidotti, G., Brambilla, L. & Rossi, D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 406–424 (2017).
201. Mae, M. & Langel, U. Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**, 509–514 (2006).
202. El-Faham, A. & Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **111**, 6557–6602 (2011).
203. Amblard, M., Fehrentz, J.-A., Martinez, J. & Subra, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.* **33**, 16 (2006).
204. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154 (1963).
205. 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.* **34**, 595–598 (1970).
206. 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.* **71**, 260–264 (1976).
207. Freidinger, R. M. Synthesis of γ -Lactam-Constrained Tryptophyllisine Derivates. *J Org Chem* **50**, 3631–3633 (1985).
208. Chantell, C. A., Onaiyekan, M. A. & Menakuru, M. Fast conventional Fmoc solid-phase peptide synthesis: a comparative study of different activators: FAST CONVENTIONAL FMOC SPPS: COMPARATIVE STUDY OF DIFFERENT ACTIVATORS. *J. Pept. Sci.* **18**, 88–91 (2012).
209. Chan, W. C. & White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. (Oxford University Press, 2000).
210. Prochiantz, A. Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 629–634 (1996).
211. Delaroche, D. et al. Tracking a New Cell-Penetrating (W/R) Nonapeptide, through an Enzyme-Stable Mass Spectrometry Reporter Tag. *Anal. Chem.* **79**, 1932–1938 (2007).

212. 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* **51**, 5531–5539 (2012).
213. Eiríksdóttir, E., Konate, K., Langel, Ü., Divita, G. & Deshayes, S. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1798**, 1119–1128 (2010).
214. Walrant, A. *et al.* Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808**, 382–393 (2011).
215. Nischan, N. *et al.* Covalent Attachment of Cyclic TAT Peptides to GFP Results in Protein Delivery into Live Cells with Immediate Bioavailability. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 1950–1953 (2015).
216. Traboulsi, H. *et al.* Macrocyclic Cell Penetrating Peptides: A Study of Structure-Penetration Properties. *Bioconjug. Chem.* **26**, 405–411 (2015).
217. Law, B., Quinti, L., Choi, Y., Weissleder, R. & Tung, C.-H. A mitochondrial targeted fusion peptide exhibits remarkable cytotoxicity. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1944–1949 (2006).
218. Alves, I. D. *et al.* A proapoptotic peptide conjugated to penetratin selectively inhibits tumor cell growth. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1838**, 2087–2098 (2014).
219. Fominaya, J., Bravo, J. & Rebollo, A. Strategies to stabilize cell penetrating peptides for *in vivo* applications. *Ther. Deliv.* **6**, 1171–1194 (2015).
220. Kristensen, M., Birch, D. & Mørck Nielsen, H. Applications and Challenges for Use of Cell-Penetrating Peptides as Delivery Vectors for Peptide and Protein Cargos. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 185 (2016).
221. Ishikawa, T. *Superbases for organic synthesis: guanidines, amidines and phosphazenes and related organocatalysts.* (Wiley, 2009).
222. Byler, D. M. & Susi, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* **25**, 469–487 (1986).

223. 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.* **103**, 1917–1954 (2003).
224. Cai, S. & Singh, B. R. A Distinct Utility of the Amide III Infrared Band for Secondary Structure Estimation of Aqueous Protein Solutions Using Partial Least Squares Methods. *Biochemistry* **43**, 2541–2549 (2004).
225. Roccatano, D., Colombo, G., Fioroni, M. & Mark, A. E. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12179–12184 (2002).
226. Shanmugam, G., Reddy, S. M. M., Natarajan, V. & Madhan, B. 2,2,2-Trifluoroethanol disrupts the triple helical structure and self-association of type I collagen. *Int. J. Biol. Macromol.* **54**, 155–159 (2013).
227. Dennington, R., Keith, T. A. & Millam, J. M. *GaussianView*. (Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2016).
228. Cornette, J. L. *et al.* Hydrophobicity scales and computational techniques for detecting amphipathic structures in proteins. *J. Mol. Biol.* **195**, 659–685 (1987).
229. Hansch, C. Quantitative approach to biological structure-activity relationships. *Acc. Chem. Res.* **2**, 232–239 (1969).
230. Charmot, D. Non-Systemic Drugs: A Critical Review. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 1434–1445 (2012).
231. Woody, R. Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. *Eur. Biophys. J.* **23**, 253–262 (1994).
232. Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 133–144 (2010).
233. van der Lee, A. Charge flipping for routine structure solution. *J. Appl. Crystallogr.* **46**, 1306–1315 (2013).

234. Palatinus, L. & Chapuis, G. *SUPERFLIP* – a computer program for the solution of crystal structures by charge flipping in arbitrary dimensions. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 786–790 (2007).
235. Betteridge, P. W., Carruthers, J. R., Cooper, R. I., Prout, K. & Watkin, D. J. *CRYSTALS* version 12: software for guided crystal structure analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 1487–1487 (2003).
236. Cooper, R. I., Thompson, A. L. & Watkin, D. J. *CRYSTALS* enhancements: dealing with hydrogen atoms in refinement. *J. Appl. Crystallogr.* **43**, 1100–1107 (2010).
237. Johnson, B. A. & Blevins, R. A. NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR* **4**, 603–614 (1994).
238. Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic acids*. (1986).
239. Case, D. A. *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **26**, 1668–1688 (2005).
240. Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K. MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**, 51–55 (1996).

Utilisation d'unités γ -lactames pour le développement de vecteurs de pénétration intracellulaire et la conception de foldamères.

Résumé

L'utilisation d'oligomères d' α -amino- γ -lactame (Agl- α AA) comme vecteurs de pénétration intracellulaire est décrite dans ce manuscrit. Nous avons montré que ces oligomères structurés en ruban sont capables de traverser la membrane plasmique pour atteindre le cytosol et y délivrer un cargo biologiquement actif. A la différence des séquences peptidiques, ces oligomères ont une très bonne résistance enzymatique. Une nouvelle famille de foldamères d' α -amino- γ -lactame (Agl- β AA) obtenus à partir de séquences α/β peptidiques est également décrite. La structure secondaire de ces composés a été étudiée par RMN, IR-TF, CD et DRX. Nous avons montré que ces oligomères sont capables d'adopter une structure stable en hélice 12. De façon remarquable, ces oligomères sont solubles en milieux aqueux malgré une absence totale de chaînes latérales hydrophiles.

Mots clés : oligomères d' α -amino- γ -lactame, Foldamères, pseudopeptides pénétrants, foldamères hydrosolubles, structure secondaire en ruban, hélice.

Gamma-lactam units for cell penetrating vectors development and foldamer design

Summary

The use of α -amino- γ -lactam oligomers (Agl- α AA) as cell penetrating vectors are described in this work. These ribbon structured oligomers are able to cross the cell membrane to reach the cytosol and deliver a biologically active cargo. Unlike peptide sequences, these oligomers display a strong enzymatic resistance. A new family of α -amino- γ -lactam oligomers (Agl- β AA) obtained from conversion of α/β peptide sequences are also described. Secondary structure of these molecules have been studied by NMR, FTIR, CD and XRD. These oligomers are able to adopt a stable 12-helix structure. Unexpectedly, these oligomers are soluble in aqueous mediums without any hydrophilic side chains

Key-words : α -amino- γ -lactame oligomers, foldamers, cell penetrating pseudopeptides, water-soluble foldamers, ribbon secondary structure, helix