



HAL
open science

Foldamères stabilisateurs d'hélices peptidiques : Applications à l'inhibition d'interactions protéine-protéine.

Laura Mauran

► **To cite this version:**

Laura Mauran. Foldamères stabilisateurs d'hélices peptidiques : Applications à l'inhibition d'interactions protéine-protéine.. Autre. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0908 . tel-02502235

HAL Id: tel-02502235

<https://theses.hal.science/tel-02502235v1>

Submitted on 9 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

SPÉCIALITÉ : Chimie Organique

Par Laura MAURAN

**Foldamères stabilisateurs d'hélices peptidiques :
Applications à l'inhibition d'interactions protéine/protéine**

Sous la direction de : Dr. Gilles GUICHARD

Soutenue le 13/12/2017

Membres du jury :

M. MACKERETH, Cameron
M. KAROYAN Philippe
M. PAPOT Sébastien
M. CHÊNE Patrick
M. GOUDREAU, Sébastien
M. GUICHARD, Gilles

Directeur de recherche INSERM, Université de Bordeaux
Professeur des Universités, Université Pierre-et-Marie-Curie
Professeur des Universités, Université de Poitiers
Directeur exécutif Novartis, Bâles (Suisse)
Directeur de recherche UREka
Directeur de recherche CNRS, Université de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Invité
Directeur

Remerciements

Mon travail de thèse a été réalisé au sein de l'Institut de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN), détaché à l'Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB) et a été financé par l'ANRT (CIFRE). Je souhaiterais tout d'abord remercier le Dr. Sophie Lecomte directrice du laboratoire de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN), le Dr. Jean-Louis Mergny directeur de l'Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB) ainsi que le Dr. Robert Zimmer président directeur général de la société Ureka, grâce auxquels j'ai pu bénéficier de conditions de travail optimales pour réaliser mon travail de doctorat.

Je remercie très chaleureusement mon directeur de thèse, le Dr. Gilles Guichard, avec qui j'ai partagé les bons comme les moins bons résultats de recherche. Son goût pour l'excellence et sa ténacité m'ont conduite à me dépasser tout au long de ces trois années. Je tiens également à remercier le Dr. Sébastien Goudreau qui a encadré mon travail au sein de l'entreprise Ureka. Son enthousiasme pour le projet de recherche a été une grande source de motivation. Ma thèse a été une opportunité unique de participer à un projet de recherche pluridisciplinaire à l'interface entre la chimie et la biologie. Une expérience singulière et extrêmement formatrice.

Je tiens à remercier le Dr. Karoyan et le Dr. Papot qui ont accepté d'évaluer ce travail en qualité de rapporteur. Je remercie également le Dr. Chêne et le Dr. Mackereth d'avoir accepté d'examiner mon travail. Je les remercie pour l'attention qu'ils ont portée à la lecture de mon manuscrit.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont contribué à ce projet. Merci à Brice Kauffmann, Gavin Collie et Jérémie Buratto d'avoir résolu toutes mes structures cristallographiques, à Benoît Odaert d'avoir réalisé les expériences de RMN structurales ainsi qu'à Frédéric Rossu et Valérie Gabelica pour les expériences de spectrométrie de masses natives.

Je tiens à adresser un merci tout particulier à Céline Douat pour sa disponibilité, son aide ainsi que ses précieux conseils tout au long de ma thèse. Merci pour ces petites parenthèses humoristiques qui ont rendu mon quotidien au laboratoire très agréable. Je remercie également Morgane Pasco et Christel Dolain pour leur aide et leurs conseils.

Je tiens à adresser un grand merci à tous ceux que j'ai eu la chance de côtoyer au sein de l'équipe « Guichard » et avec lesquels j'ai pris plaisir à travailler : Gavin, Caterina, Arnaud, Stéphanie, Diane, Vincent, Léonie, Christophe, Maialen, Julen, Arup, Sung-Hyun et Guillaume. Une attention toute particulière pour Johanne, Jérémie, Mégane et Camille avec qui j'ai partagé des moments forts tant dans l'enceinte qu'à l'extérieur du laboratoire. Je remercie Lucile, membre de l'équipe « Ferrand » sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Je souhaite également remercier Juliette et Claire, chargées de recherche pour la société Ureka, pour leur aide et leurs conseils avisés. En espérant que nous puissions partager encore plus à présent. Je remercie très chaleureusement les membres de l'équipe « Innis », et tout particulièrement Caro et Natacha, avec qui j'ai passé des moments inoubliables.

Pour finir je tiens à adresser un énorme merci à mes proches, tout particulièrement à Manon, Cécile et Laetitia (Titi) pour les liens solides que nous entretenons depuis nos années universitaires. Un grand merci à mes parents et à mon petit frère César qui m'ont apporté et m'apportent force, amour et courage au quotidien. Pour finir, je souhaite remercier infiniment Julien qui partage ma vie ainsi que sa famille (Isabelle, Michel, Paul, Mémé et Mamie) pour l'amour et le soutien indéfectible dont ils ont su faire preuve durant cette thèse.

Abréviations

| | |
|-------------------|--|
| δ | déplacement chimique (ppm) |
| % | pourcent |
| ° | degré |
| 2D | deux dimensions |
| Å | angström |
| AcCN | acétonitrile |
| Aib | acide α -aminoisobutyrique |
| Alloc | Allyloxycarbonyl |
| ASU | unité cristalline asymétrique |
| Bn | benzyle |
| Boc | <i>tert</i> -butoxycarbonyle |
| Bu | butyle |
| Bn | benzyle |
| C | celsius |
| Cbz = Z | benzyloxycarbonyle |
| CCM | chromatographie sur couche mince |
| CD | dichroïsme circulaire |
| COSY | correlated Spectroscopy |
| DIAD | diisopropyl azodicarboxylate |
| DIEA | <i>N,N</i> -diisopropyléthylamine |
| DMF | diméthylformamide |
| DMSO | diméthylsulfoxyde |
| DSC | carbonate de disuccinimide |
| equiv. | équivalent |
| ESI-MS | analyse de masse par ionisation par electrospray |
| EtOAc | acétate d'éthyle |
| Et ₃ N | triéthylamine |
| Fmoc | 9 <i>H</i> -fluoren-9-ylméthoxyloxycarbonyle |
| g | gramme |
| h | heure |
| min | minute |
| H ₂ O | eau |
| HOBT | 1-hydroxybenzotriazole |
| Hz | hertz |
| IC ₅₀ | concentration d'inhibition à 50% |
| IBCF | chloroformiate d'isobutyle |
| <i>iBu</i> | isobutyle |
| <i>iPr</i> | isopropyle |
| kcal | kilocalorie |
| K _d | constante de dissociation |
| K _i | constante d'inhibition |
| l | longueur d'onde |
| M | mol.litre ⁻¹ |
| Me | méthyle |
| mg | milligramme |
| MHz | mégahertz |
| min | minute |

| | |
|----------------------|---|
| mL | millilitre |
| mM | millimolaire |
| mmol | millimole |
| mol | mole |
| MeOH | méthanol |
| M_w | masse molaire |
| NHS | <i>N</i> -hydroxysuccinimide |
| nm | nanomètre |
| NMM | <i>N</i> -méthylmorpholine |
| NOE | nuclear overhauser effect |
| PBS | tampon phosphaté salin |
| ppm | partie par million |
| PS | polystyrène |
| quant. | quantitatif |
| RMN | résonance magnétique nucléaire |
| ROESY | rotating-frame nuclear overhauser effect spectroscopy |
| RP-HPLC | chromatographie liquide haute performance à phase inverse |
| s | seconde |
| TA | température ambiante |
| TBDMSCI | <i>tert</i> -butyl diméthyl chlorosilane |
| TFA | acide trifluoroacétique |
| TFE | 2,2,2-trifluoroéthanol |
| THF | tétrahydrofurane |
| TOCSY | total correlation spectroscopy |
| TIS | triisopropylsilane |
| t_R | temps de rétention |
| W | watt |
| Δδ | écart de déplacement chimique (ppm) |
| μ | micro |
| μm | micromètre |

Nomenclature utilisée

Les acides α aminés seront indifféremment désignés sous leur nom complet ou sous leur code à trois lettres. Par exemple, l'alanine sera nommée Ala. Les acides β -aminés seront eux précédés du signe β . (β^3 -homoalanine : β hAla).

Les résidus de type urée seront désignés par le code de trois lettres de l'acide aminé dont ils sont issus suivi en exposant de la lettre « u ». Ainsi le résidu dérivé de l'alanine sera nommé Ala^U (**Figure 1**). Les résidus acides aminés seront eux désignés par leur code de trois lettres.

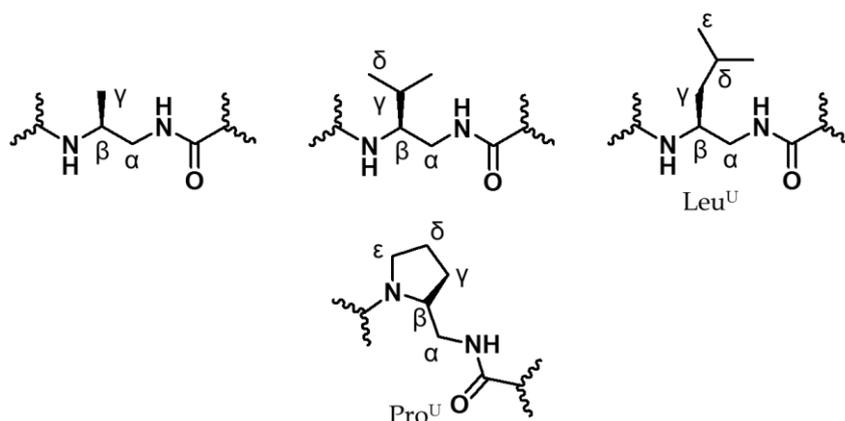


Figure 1 : Exemple de notation des résidus de type urée

De la même manière un oligomère chimère protégé par un groupement *tert*-butoxy carbonyle et comportant treize résidus : 6 résidus urées dérivés de la valine, de l'alanine et de la leucine ainsi que 7 résidus acides aminés alanine et leucine sera notée Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Val^U-Ala^U-Leu^U-Val^U-Ala^U-Leu^U-NH₂. Les résidus seront numérotés en partant de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Ainsi la position 1 correspondra au résidu protégé par le groupement *tert*-butoxy comme présenté sur la **Figure 2**.

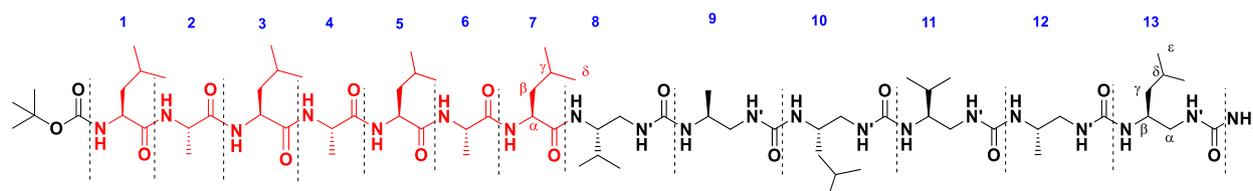


Figure 2 : Numérotation des résidus dans un oligomère chimère

Les angles dièdres (Φ , θ_1 , θ_2) seront définis par $\Phi = \text{CO-NH-}\beta\text{C-}\alpha\text{C}$, $\theta_1 = \text{NH-}\beta\text{C-}\alpha\text{C-N'H}$ et $\theta_2 = \beta\text{C-}\alpha\text{C-N'H-CO}$ comme décrit sur la Figure 3.

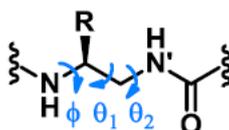


Figure 3: Angles dièdres des résidus dans une oligourée

La plupart des composés rapportés font l'objet d'une numérotation systématique, suivant leur ordre d'apparition dans ce manuscrit, réinitialisée au début de chaque nouveau chapitre. D'autres sont désignés suivant des nomenclatures particulières. Ainsi les monomères seront désignés par la lettre **M** suivie de leur ordre d'apparition dans le manuscrit.

| | |
|---|----|
| Chapitre 1 Stabilisation et mimétisme d'hélices peptidiques en vue de la découverte d'inhibiteurs d'interactions protéine/protéine..... | 14 |
| I. Séquences et motifs pour la nucléation et le mimétisme de l'hélice α | 16 |
| 1. Nucléation d'hélices α | 16 |
| a. Effet de « <i>capping</i> » dans les séquences de protéines..... | 19 |
| i. Motifs de « <i>capping</i> » N-terminaux des protéines..... | 21 |
| ii. Motifs de « <i>capping</i> » C-terminaux des protéines | 22 |
| b. Etude du « <i>capping</i> » des séquences peptidiques | 24 |
| c. Les « <i>Caps</i> » de Synthèse..... | 26 |
| i. Blocs contraints | 26 |
| ii. Substituts de liaisons hydrogène (HBS)..... | 27 |
| iii. Courte Séquence peptidique macrocyclique | 28 |
| 2. Mimes d'hélices α : prothèses moléculaires | 29 |
| a. Substitutions (1 : 1) α/β | 30 |
| b. Substitutions α/β ; motifs $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha\alpha\beta$ | 31 |
| c. Substitution $\alpha/\beta/\gamma$; motif $\alpha\gamma\alpha\alpha\beta\alpha$ | 33 |
| II. Applications à la recherche d'inhibiteurs d'interactions protéine/protéine | 35 |
| 1. BCL-2..... | 38 |
| 2. Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)..... | 42 |
| 3. Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1) | 44 |
| III. Historique et objectifs de la thèse..... | 48 |
| 1. Les Oligourées | 48 |
| a. Rappel historique sur les oligourées..... | 48 |
| b. Comparaison de l'hélice α peptidique et de l'hélice d'oligourée | 51 |
| Bibliographie..... | 53 |
| Chapitre 2 Stabilisation de peptides via l'ajout de segments oligourées | 67 |
| I. Introduction d'un « cap » uréido aux extrémités C- et/ou N-terminales d'un peptide modèle soluble en solvant organique | 71 |
| 1. Synthèse | 71 |
| a. Synthèse de monomères en solution | 72 |
| i. Synthèse des monomères azoture activés..... | 72 |
| ii. Synthèse des monomères N-Boc protégés activés..... | 73 |
| b. Synthèse sur support solide des oligomères | 74 |
| i. Synthèse sur support solide des oligomères II.3 à II.4 | 74 |
| ii. Synthèse sur support solide des oligomères II.5 et II.6..... | 75 |
| iii. Synthèse sur support solide des peptides II.7 et II.8 | 76 |

| | | |
|------|---|-----|
| 2. | Analyse conformationnelle des oligomères chimères..... | 77 |
| a. | En solution : par dichroïsme circulaire..... | 77 |
| b. | En solution : par Résonance Magnétique Nucléaire..... | 78 |
| i. | Caractérisation du composé II.3..... | 78 |
| ii. | Caractérisation du composé II.4..... | 79 |
| iii. | Caractérisation du composé II.5..... | 80 |
| iv. | Caractérisation du composé II.6..... | 81 |
| c. | En phase cristalline..... | 82 |
| II. | Stabilisation de peptides modèles hydrosolubles par l'ajout de « caps » oligourées : développement de la « foldamer capping box »..... | 84 |
| 1. | Synthèse..... | 84 |
| a. | Synthèse de monomères en solution..... | 85 |
| i. | Synthèse des monomères azoture activés..... | 85 |
| b. | Synthèse sur support solide des oligomères..... | 86 |
| i. | Synthèse sur support solide des oligomères II.10, II.11, II.13, II.14, II.16 à II.27..... | 86 |
| ii. | Synthèse sur support solide des peptides II.9, II.12 et II.15..... | 89 |
| 2. | Etude conformationnelle en solution..... | 90 |
| a. | Par dichroïsme circulaire..... | 90 |
| b. | Par résonance magnétique nucléaire..... | 94 |
| i. | Caractérisation du peptide II.15..... | 94 |
| ii. | Caractérisation de l'oligomère chimère II.20..... | 95 |
| iii. | Caractérisation de l'oligomère chimère II.21..... | 96 |
| | Bibliographie..... | 98 |
| | Chapitre 3 Conception de foldamères à base d'urées inhibiteurs de l'interaction p53/MDM2 | 101 |
| I. | Interaction p53/MDM2 et MDMX..... | 102 |
| II. | Inhibiteurs mimes d'hélices α peptidiques..... | 103 |
| III. | Inhibiteur peptidique PMI..... | 105 |
| IV. | Remplacement systématique d'un acide aminé par un monomère de type urée dans la séquence du peptide PMI..... | 107 |
| 1. | Synthèse..... | 108 |
| a. | Synthèse des monomères de type éthylène diamine..... | 109 |
| i. | Synthèse de monomères N-Fmoc protégés activés..... | 109 |
| ii. | Synthèse du monomère N-Teoc protégé dérivé de la proline..... | 111 |
| b. | Synthèse sur support solide des oligomères III.1 à III.13..... | 112 |
| i. | Synthèse sur support solide des oligomères chimères III.2 à III.12..... | 112 |

| | | |
|------|---|-----|
| ii. | Synthèse sur support solide de l'oligomère III.13..... | 114 |
| iii. | Synthèse sur support solide du peptide III.1..... | 115 |
| 2. | Caractérisation de l'inhibition | 116 |
| a. | Estimation de la concentration pour laquelle 50% d'inhibition de l'interaction p53/MDM2 est observée par fluorescence | 116 |
| i. | Résultats et discussion | 117 |
| 3. | Dégradation enzymatique..... | 119 |
| a. | Chymotrypsine | 119 |
| i. | Résultats et discussion | 120 |
| V. | Remplacement de 3 acides aminés consécutifs par un fragment di-urées dans la séquence du peptide PMI..... | 121 |
| 1. | Synthèse | 121 |
| a. | Synthèse en solution des monomères..... | 121 |
| i. | Synthèse des monomères azoture activés..... | 121 |
| b. | Synthèse sur support solide des oligomères chimères..... | 123 |
| i. | Synthèse sur support solide des oligomères III.14 à III.24 | 123 |
| 2. | Caractérisation de l'inhibition | 124 |
| a. | Estimation de la concentration pour laquelle 50% d'inhibition de l'interaction p53/MDM2 est observée par fluorescence | 124 |
| i. | Résultats et discussions | 124 |
| VI. | Modifications à l'extrémité C-terminale du peptide PMI : insertion d'un cap oligourée..... | 126 |
| 1. | Synthèse | 127 |
| a. | Synthèse en solution des monomères..... | 127 |
| i. | Synthèse des monomères azoture activés..... | 128 |
| ii. | Synthèse des monomères azoture inversés activés. | 129 |
| b. | Synthèse sur support solide des oligomères chimères..... | 130 |
| i. | Synthèse sur support solide des oligomères chimères..... | 130 |
| 2. | Caractérisation de l'inhibition | 130 |
| a. | Estimation de la concentration pour laquelle 50% d'inhibition de l'interaction p53/MDM2 est observée par fluorescence | 130 |
| i. | Résultats et discussions | 131 |
| 3. | Dégradation enzymatique..... | 134 |
| a. | Chymotrypsine | 134 |
| i. | Résultats et discussion | 134 |
| VII. | Modifications à l'extrémité N-terminale de l'oligomère chimère III.37 | 135 |
| 1. | Synthèse | 136 |

| | | |
|-------|--|-----|
| a. | Synthèse en solution des monomères..... | 136 |
| i. | Synthèse du monomère O-TBDMS protégé activé dérivé de la dé-amino sérine : (de-N)Ser(TBDMS)-Osu..... | 136 |
| ii. | Synthèse du monomère N-Alloc protégé activé dérivé de la déamino ornitine : (dé-N)Orn(Alloc)-Osu..... | 137 |
| b. | Synthèse sur support solide des oligomères chimères..... | 137 |
| i. | Synthèse sur support solide des oligomères chimères III.45 à III.48..... | 137 |
| ii. | Synthèse sur support solide des oligomères chimères III.49 à III.51..... | 138 |
| iii. | Synthèse sur support solide des peptides III.52 et III.53..... | 140 |
| 2. | Caractérisation de l'inhibition..... | 141 |
| a. | Estimation de la concentration pour laquelle 50% d'inhibition de l'interaction p53/MDM2 est observée par fluorescence..... | 141 |
| i. | Résultats et discussions..... | 141 |
| | Bibliographie..... | 144 |
| | Chapitre 4 Assemblages d'hélices chimères en milieu aqueux..... | 147 |
| VIII. | De novo peptides formant des faisceaux d'hélices..... | 149 |
| 1. | Faisceaux constitués de dimères, trimères et tétramères d'hélices conçus par <i>de novo design</i> | 150 |
| 2. | Justification structurale pour une oligomérisation d'ordre supérieur..... | 151 |
| 3. | Installation d'une triade catalytique dans la séquence de l'oligomère IV.6..... | 152 |
| IX. | Approche descendante (top down) à partir d' α/β -peptides..... | 153 |
| 1. | Faisceaux d'hélices α/β -peptidiques..... | 153 |
| 2. | Assemblages hétérogènes entre foldamère α/β -peptidique et α -peptides..... | 153 |
| X. | Approche ascendante (bottom-up) à partir de β -peptides..... | 154 |
| 1. | Premier design : hétéro-oligomère Acid-1F/Base-1F..... | 154 |
| 2. | Homo-oligomère Zwit-1F..... | 154 |
| 3. | Optimisation du design du faisceau d'hélices..... | 156 |
| 4. | Activité du faisceau d'hélices..... | 157 |
| a. | Reconnaissance spécifique de sucres..... | 157 |
| b. | Chélation de métaux..... | 158 |
| c. | Activité catalytique..... | 159 |
| XI. | Approche ascendante (bottom-up) à partir d'oligourées..... | 160 |
| 1. | Caractérisation structurale de l'assemblage formé par l'oligomère IV.8..... | 161 |
| 2. | Caractérisation structurale de l'assemblage formé par l'oligomère IV.9..... | 162 |
| a. | Encapsulation de molécules hôtes dans la cavité de IV.9..... | 162 |
| b. | « Side Chain Scanning » IV.9..... | 163 |

| | |
|---|-----|
| XII. Premiers designs dans l'objectif de former des architectures inédites à base d'hélices chimères. | 164 |
| 1. Synthèse | 165 |
| a. Synthèse des monomères d'éthylène diamine : azoture activés..... | 166 |
| b. Synthèse sur support solide des molécules chimères | 166 |
| 2. Etudes structurales à l'état solide..... | 167 |
| a. Caractérisation de la structure secondaire..... | 167 |
| i. Unité asymétrique | 167 |
| ii. Interactions intermoléculaires dans l'unité asymétrique..... | 169 |
| a) Détail de l'assemblage supramoléculaire des hélices dans le cristal IV.10 | 170 |
| 3. Caractérisation des espèces multimériques par spectrométrie de masse en conditions natives..... | 172 |
| XIII. Modulation de l'assemblage à 6 hélices parallèles par l'introduction de mutations ponctuelles..... | 173 |
| 1. Synthèse | 173 |
| a. Synthèse sur support solide des molécules chimères | 174 |
| 2. Etudes structurales à l'état solide..... | 174 |
| a. Caractérisation de la structure secondaire..... | 175 |
| i. Unité asymétrique | 175 |
| ii. Interactions intermoléculaires dans l'unité asymétrique..... | 177 |
| b. Détail de l'assemblage supramoléculaire des hélices dans le cristal IV.11 | 177 |
| 2. Caractérisation des espèces multimériques par spectrométrie de masse native..... | 179 |
| XIV. Essai de modification de la stœchiométrie de l'assemblage à 6 hélices parallèles formé par l'oligomère chimère IV.11 | 180 |
| 1. Synthèse | 181 |
| a. Synthèse sur support solide des molécules chimères | 181 |
| 2. Caractérisation des espèces multimériques par spectrométrie de masse..... | 182 |
| Bibliographie..... | 184 |
| Conclusion et perspectives..... | 188 |
| Bibliographie..... | 193 |
| Partie expérimentale | 194 |
| I. General methods..... | 195 |
| 1. General procedure A for solid phase oligomers synthesis under microwave irradiation using azide strategy. | 196 |
| 2. General procedure B for solid phase oligomers synthesis under microwave irradiation using azide strategy. | 197 |
| 3. General procedure C for solid phase oligomers synthesis using N-Fmoc strategy..... | 197 |

| | | |
|------|--|-----|
| II. | Compounds described in Chapter 2..... | 198 |
| 1. | Part I : Oligomers soluble in organic solvents..... | 198 |
| a. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M1, M2, M3..... | 198 |
| b. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M4..... | 198 |
| c. | Synthesis of oligomers..... | 198 |
| d. | Circular Dichroism..... | 205 |
| e. | X-ray crystallography..... | 207 |
| 2. | Part II : Oligomers soluble in water..... | 208 |
| a. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M5, and M6..... | 208 |
| b. | Synthesis of oligomers..... | 208 |
| c. | Circular Dichroism..... | 214 |
| III. | Compounds described in Chapter 3..... | 218 |
| 1. | Screen 1: Substitution of 1 α - 1 ^U | 218 |
| a. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M7, M8, M9, and M10..... | 218 |
| b. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M11, M12, M13, and M14..... | 218 |
| i. | General procedure for N-Fmoc protected amino alcohol formation..... | 218 |
| ii. | General procedure for conversion of alcohol into iodine..... | 219 |
| iii. | General procedure for conversion of iodine into azide..... | 220 |
| iv. | General procedure for conversion of azide into amine..... | 221 |
| v. | General procedure for the preparation of N-Fmoc protected activated carbamates monomers..... | 221 |
| c. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M15..... | 223 |
| i. | General procedure for N-Boc protected amino alcohol formation..... | 223 |
| ii. | General procedure for conversion of alcohol into phtalimide - the Mitsunobu reaction..... | 223 |
| iii. | General procedure for Boc removal..... | 223 |
| iv. | General procedure for Teoc insertion..... | 223 |
| v. | General procedure to generate the amine from the phtalimide - the hydrazinolysis reaction..... | 224 |
| vi. | General procedure for the preparation of N-Teoc protected activated carbamates monomers..... | 224 |
| d. | Synthesis of oligomers..... | 225 |
| e. | Inhibition curves..... | 230 |
| 2. | Screen 2: Substitution of 3 α - 2 ^U | 233 |
| a. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M16..... | 233 |
| b. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M17..... | 233 |
| i. | General procedure for N-Boc protected amino alcohol formation..... | 233 |

| | | |
|------|---|-----|
| ii. | General procedure for conversion of alcohol into phtalimide – the Mitsunobu reaction..... | 233 |
| iii. | General procedure for Boc removal..... | 233 |
| iv. | General procedure for amine to azide conversion | 233 |
| v. | General procedure to generate the amine from the phtalimide - the hydrazinolysis reaction | 234 |
| vi. | General procedure for the preparation of succinimidyl azido-2-substituted-ethyl-carbamates..... | 234 |
| c. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M18..... | 234 |
| i. | General procedure for N-Fmoc protected amino alcohol formation | 234 |
| ii. | General procedure for Fmoc removal | 235 |
| iii. | General procedure for amine to azide conversion | 235 |
| iv. | General procedure for conversion of alcohol into amine – the Mitsunobu reaction..... | 235 |
| v. | General procedure for the preparation of succinimidyl azido-2-substituted-ethyl-carbamates..... | 235 |
| d. | Synthesis of oligomers | 236 |
| e. | Inhibition curves..... | 240 |
| 3. | Screen 3: Insertion of C-terminal caps | 241 |
| a. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M19..... | 241 |
| i. | General procedure for N-Boc protected amino alcohol formation | 241 |
| ii. | General procedure for conversion of alcohol into phtalimide – the Mitsunobu reaction..... | 241 |
| iii. | General procedure for Boc removal..... | 241 |
| iv. | General procedure for amine to azide conversion | 241 |
| v. | General procedure to generate the amine from the phtalimide - the hydrazinolysis reaction | 242 |
| vi. | General procedure for the preparation of succinimidyl azido-2-substituted-ethyl-carbamates..... | 242 |
| b. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M20..... | 242 |
| i. | General procedure for N-Fmoc protected amino alcohol formation | 242 |
| ii. | General procedure for Fmoc removal | 243 |
| iii. | General procedure for amine to azide conversion | 243 |
| iv. | General procedure for conversion of alcohol into amine – the Mitsunobu reaction..... | 243 |
| v. | General procedure for the preparation of succinimidyl azido-2-substituted-ethyl-carbamates..... | 244 |
| c. | Preparation of O-succinimidyl carbamate M21. | 244 |

| | | |
|------|---|-----|
| d. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M22, M23, M24 | 244 |
| i. | General procedure for N-Boc protected amino alcohol formation | 244 |
| ii. | General procedure for conversion of alcohol into azide..... | 245 |
| iii. | General procedure for the preparation of succinimidyl azido-1-substituted-ethyl-carbamates..... | 245 |
| e. | Synthesis of oligomers | 246 |
| f. | Inhibition curves..... | 253 |
| 4. | Screen 4: N-terminal modifications on the oligomers III.37..... | 258 |
| a. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M25..... | 258 |
| i. | Monoprotection of ethylene glycol | 258 |
| ii. | General procedure for conversion of alcohol into amine – the Mitsunobu reaction..... | 258 |
| iii. | General procedure to generate the amine from the phtalimide - the hydrazinolysis reaction | 258 |
| iv. | General procedure for the preparation of activated carbamates monomers..... | 258 |
| b. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M26..... | 259 |
| i. | Monoprotection of 1,3-diaminopropane | 259 |
| ii. | General procedure for the preparation of activated carbamates monomers... .. | 259 |
| c. | Synthesis of oligomers | 260 |
| d. | Inhibition curves..... | 264 |
| IV. | Compounds described in Chapter 4..... | 267 |
| a. | Preparation of O-succinimidyl carbamates M27..... | 267 |
| b. | Oligomers synthesis | 267 |
| c. | X-ray crystallography | 269 |
| d. | Native electrospray ionization mass spectrometry | 270 |
| | Bibliographie..... | 271 |
| | | 272 |

Chapitre 1

Stabilisation et mimétisme d'hélices peptidiques en vue de la découverte d'inhibiteurs d'interactions protéine/protéine

Les protéines sont des macromolécules essentielles à la construction et au fonctionnement des organismes vivants, que ce soit pour les cellules procaryotes ou eucaryotes. Les protéines représentent plus de 50% du poids sec d'une cellule, c'est donc le principal composant des êtres vivants. Elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes biologiques et possèdent des fonctionnalités très variées. En effet, les protéines jouent un rôle clé dans les processus de stockage, de catalyse, de structuration, de transport, de défense et de régulation de l'expression des gènes. Il existe 22 acides aminés protéinogènes parmi lesquels 20 sont utilisés de manière universelle, la sélénocystéine et la pyrrolysine étant réservés à quelques protéines. C'est l'enchaînement des différents acides aminés qui va guider le repliement des protéines donnant ainsi accès à une multitude de conformations spécifiques et compactes, stabilisées par des interactions intramoléculaires. Ce sont les arrangements tridimensionnels des groupes fonctionnels portés entre autres par les chaînes latérales, qui conduisent à la formation des sites actifs et définissent ainsi les propriétés caractéristiques de chaque protéine. Plusieurs degrés d'organisation ont été mis en évidence (**Figure I.4**).

- La structure secondaire ; un arrangement tridimensionnel local des résidus qui conduit à la formation de structures spécifiques comme les hélices α , les feuillets β , les coudes ou encore les boucles.
- La structure tertiaire ; l'association dans l'espace des différents motifs secondaires.
- La structure quaternaire ; un assemblage généralement non covalent de plusieurs chaînes polypeptidiques.

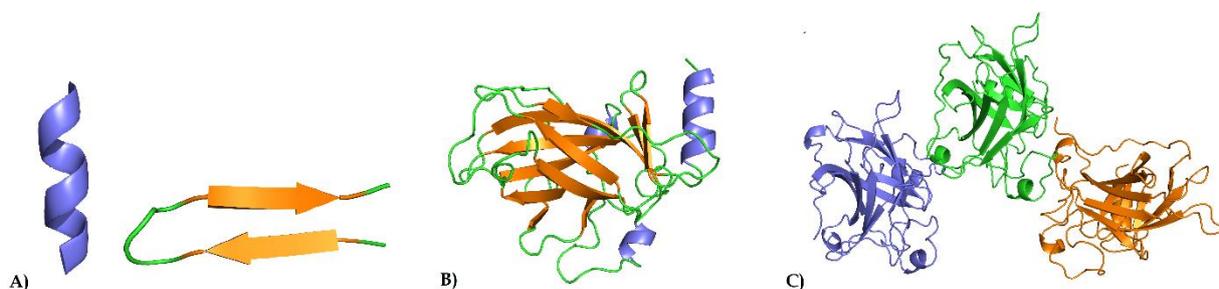


Figure I.4 : (A) Structures secondaires : hélice α en bleu et feuillet β en orange, (B) structure tertiaire, (C) structure quaternaire de 3 sous unités (PDB : 1TSR)[1]

La fonction biologique d'une protéine est généralement liée à sa structure spécifique. En effet, une mutation au sein de la séquence d'une protéine peut empêcher cette dernière d'adopter sa forme active et donc inhiber la formation de complexes avec d'autres biomolécules, engendrant des pathologies graves. L'examen des complexes protéine/biomolécules révèle que les protéines interagissent avec leurs partenaires via des sous domaines structurés ou des éléments de structure secondaire protéique.[2][3][4] L'hélice α est un élément de structure secondaire commun très représenté dans les interfaces d'interactions protéine/protéine.[2][3][4] La **Figure I.5** montre une sélection de complexes dans lesquels un domaine structuré en hélice α interagit avec une biomolécule.

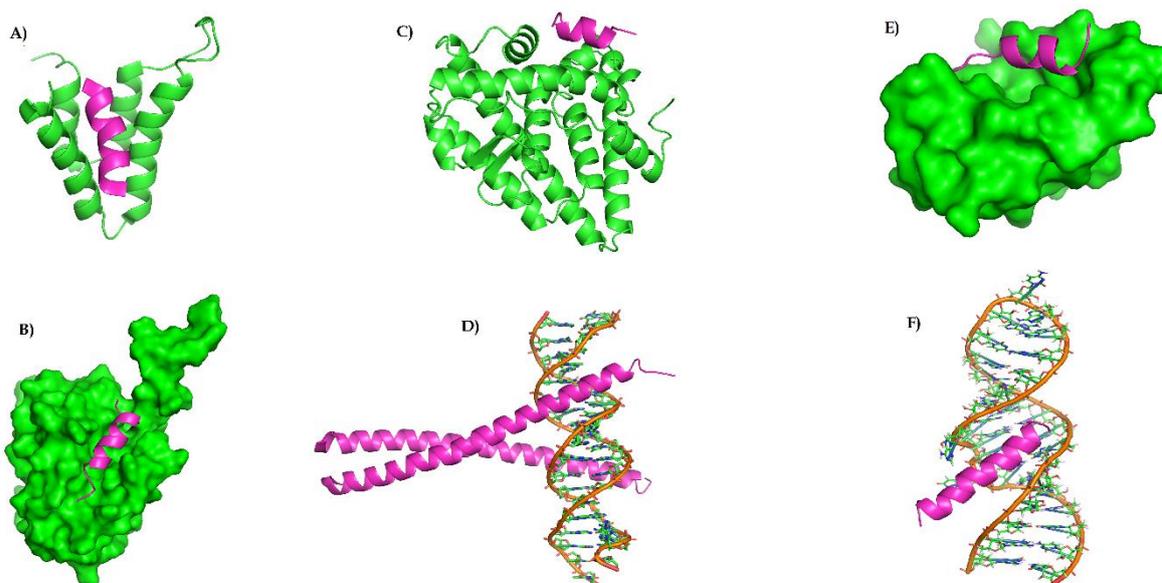


Figure I.5 : Reconnaissance entre biomolécules impliquant des domaines peptidiques en hélice α : (A) corépresseur Sin3B lié au facteur de transcription Mad (PDB : 1E91) [5] ; (B) reconnaissance entre les régulateurs d'apoptose Bcl-xL/Bak (PDB : 1BXL) [6] ; (C) sous-unité du domaine de liaison du ligand α du récepteur aux œstrogènes humains en complexe avec le récepteur protéique aux glucocorticoïdes (PDB : 3ERD) [7] ; (D) le région GCN4 de la protéine leucine zipper liée à l'ADN (PDB : 1YSA) [8] ; (E) l'oncoprotéine MDM2 complexée avec le domaine de suppression par transactivation de tumeur p53 (PDB : 1YCR) [9] ; (F) hélice α /ARN reconnaissance entre un peptide rev HIV-1 par formation d'un complexe avec l'ARN RRE (PDB : 1ETF).[10]

Ces complexes suggèrent qu'il est possible de développer des mimes d'hélices α de relatif faible poids moléculaire ($500 \text{ Da} < M_w < 5000 \text{ Da}$), susceptibles de participer à des interactions sélectives de biomolécules. La relation entre la séquence primaire d'acides α -aminés et la structuration spécifique des hélices α peptidiques a été étudiée afin de comprendre les mécanismes de repliement mis en jeu lors de la formation d'une hélice α .

I. Séquences et motifs pour la nucléation et le mimétisme de l'hélice α

1. Nucléation d'hélices α

La structure de l'hélice α a été proposée par Pauling en 1951.[11]. Cette découverte a très rapidement captivé la communauté scientifique par sa simplicité et son élégance. La structure cristallographique de la myoglobine [12] qui a suivi peu de temps après, a fourni une confirmation expérimentale qui a validé l'exactitude du modèle de Pauling. Les hélices α sont des hélices droites contenant 3.6 résidus par tour d'hélice. Chaque atome d'oxygène de la fonction carbonyle d'un résidu, forme une liaison hydrogène avec le NH amide situé quatre résidus plus loin (motif de liaison hydrogène $i/i+4$). Afin d'adopter ce type de conformation les valeurs d'angles dièdres Φ et Ψ doivent respectivement se situer aux alentours de -60° et -45° . Le réseau de liaisons hydrogène, compact et bien défini, formé par les atomes de la chaîne principale contraste avec la projection des chaînes latérales qui pointent vers l'extérieur du cylindre de l'hélice (**Figure I.6**).

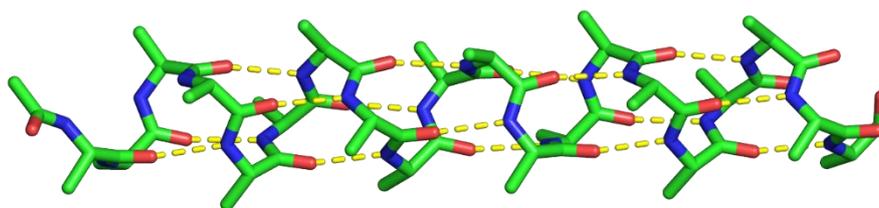


Figure I.6 : Structure cristallographique d'une hélice α peptidique.

La compréhension du lien qui existe entre la structuration d'une protéine dans l'eau et sa séquence primaire d'acides aminés a été un enjeu de recherche majeur. Dans le domaine, le travail expérimental a débuté dans les années 1960 par l'utilisation d'homopolymères d'acide glutamique et de lysine, qui, selon la spectroscopie de dispersion rotative optique (ORD) forment des structures en hélice. Ces arrangements tridimensionnels sont, cependant, très dépendants du pH et de la température ce qui limite la pertinence du modèle. Afin de mieux comprendre la transition énergétique entre une séquence non structurée et un motif de structuration secondaire : l'hélice α (transition hélice/bobine), un formalisme particulier a été développé par Zimm et Bragg en Californie et par Lifson et Roig en Israël.[13][14] Bien que ces deux algorithmes aient des différences significatives dans le traitement de la transition hélice-bobine, ils mettent en lumière des paramètres similaires.[15] Ces paramètres reflètent deux termes énergétiques distincts : l'un décrivant la nucléation de l'hélice et l'autre décrivant la propagation de l'hélice dans la séquence peptidique. Afin d'étudier la transition hélice/pelote statistique, Scheraga et son équipe ont développé l'approche « hôte/invité », qui consiste à utiliser des séquences de copolymères pour déterminer les paramètres de nucléation et de propagation de l'hélice α pour les 20 acides aminés naturels (**Figure I.7**).[16][17][18][19][20][21][22][23][24][25][26]

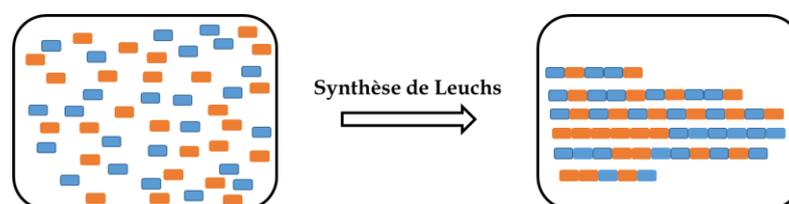


Figure I.7 : Schéma descriptif de l'approche « hôte/invité » utilisant des copolymères aléatoires. Le résidu hôte : l'hydroxybutyl- ou hydroxypropyl-L-glutamine (HBLG ou HPLG) est représenté par les petits carrés bleus. Le résidu invité : l'un des 20 acides aminés est représenté par les petits carrés oranges.

Ces copolymères aléatoires hydrosolubles, constitués de deux acides aminés, ont été réalisés en utilisant la synthèse de Leuchs : le résidu hôte est l'hydroxybutyl- ou hydroxypropyl-L-glutamine (HBLG ou HPLG) [27], et le résidu invité est l'un des 20 acides aminés. En dépit du fait que l'hélice soit formée par des interactions qui impliquent les atomes de la chaîne principale, les α -acides aminés possèdent des paramètres de propagation différents. Ces expériences ont donc mis en évidence le rôle significatif des chaînes latérales des différents acides α -aminés dans la stabilisation des hélices peptidiques, ce qui a été confirmé par l'analyse statistique de quelques structures tridimensionnelles.[28][29][30][31] Ces analyses statistiques ont permis d'établir la probabilité, pour chaque acide α -aminé naturel, d'adopter une structure en hélice α . Cette observation a conduit Gerald Fasman à développer le premier algorithme de prédiction de structure secondaire.[32][33]

Historiquement, les polymères d'acides aminés sont des composés modèles étudiés par de nombreux groupes, qui ont conduit à l'établissement de certaines propriétés générales sur les hélices α et les mécanismes de transition hélice/pelote statistique. Ces polymères sont habituellement de grande taille, jusqu'à plusieurs centaines d'unités. Or, ils contrastent fortement avec la longueur moyenne des segments structurés en hélice α , présents dans la

séquence naturelle des protéines (en moyenne 8 à 12 résidus). L'étude de courts segments peptidiques, 10 résidus ou moins, a pendant longtemps été limitée par la faible propension des séquences peptidiques, issues des domaines protéiques en hélice α , à adopter des structures hélicoïdales stables en milieu aqueux.

La situation a évolué en 1982, quand Baldwin et son équipe [34] suivant l'observation originale de Brown et Klee [35], ont montré que le peptide C constitué de 13 résidus, dérivé du clivage au CNBr de la ribonucléase A, formait une structure monomérique en hélice dans l'eau à basse température (**Figure I.8**). L'hélice est formée sans avoir recours à la création d'interactions tertiaires avec le reste de la Ribonucléase A. La stabilité de l'hélice du peptide C a également été caractérisée comme dépendante du pH. Aux alentours de pH 5, le peptide C atteint son maximum d'hélicité. Deux fonctions, portées par les chaînes latérales de ce peptide, doivent à minima être ionisées pour conduire à la stabilisation de ce composé.[34] En effet, des interactions spécifiques, mettant en jeu les chaînes latérales de certains résidus, stabilisent la structure en hélice α du peptide C.

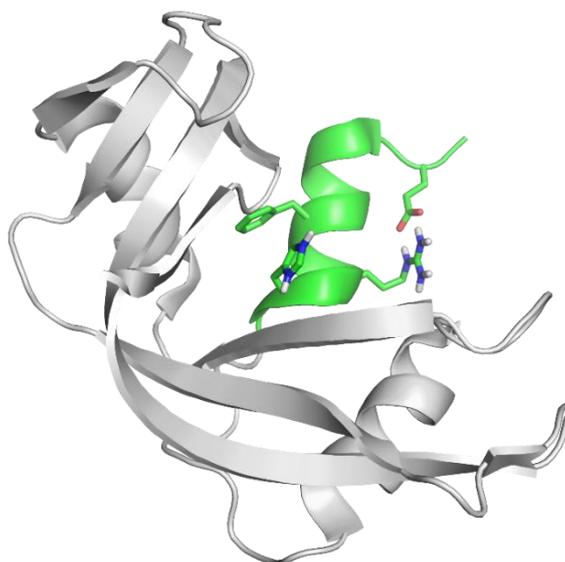


Figure I.8 : Structure cristallographique de la Ribonucléase A (PDB : 7RSA).[36]

Les résidus Glu2⁻ et His12⁺ situés aux extrémités du peptide C stabilisent via des interactions entre les charges portées par les chaînes latérales de ces résidus, et le macrodipôle de l'hélice, la formation de l'hélice α . [37] Des expériences faisant varier la nature des résidus à l'extrémité N-terminale du peptide C, ont permis de caractériser la propension de ce type d'interactions à stabiliser la formation de hélice α . [38] De plus, de nombreux travaux ont mis en évidence l'implication des résidus Glu2⁻ et His12⁺ dans d'autres interactions spécifiques qui stabilisent l'hélice du peptide C. Grâce à des expériences d'inter-échanges et de remplacement de résidus dans la séquence du peptide C, Baldwin et son équipe ont pu mettre en évidence des interactions clés entre les résidus Phe8/His12⁺ et Glu2⁻/Arg10⁺. [36][39][40] Historiquement, cette hélice a fourni le premier exemple de structuration autonome d'un court segment peptidique issu de la séquence d'une protéine naturelle. [41] Les études menées sur la formation d'hélices α dans les peptides dérivés de la ribonucléase A ont permis d'identifier des interactions spécifiques entre les chaînes latérales et des interactions charge/dipôle qui affectent la stabilité de l'hélice α . Ces expériences ont changé le paradigme dans l'étude thermodynamique de la formation d'hélice α pour de courtes séquences peptidiques.

Malgré tout l'intérêt porté au peptide C, ce modèle est loin d'être idéal pour déterminer dans de courtes séquences peptidiques, la propension de chaque acide aminé à adopter une conformation hélicoïdale. De nombreuses séquences peptidiques ont été conçues de novo,

pour former des hélices monomériques en solution, qui possèdent toutes un motif commun. Elles sont stabilisées par des ponts salins et/ou contiennent une teneur élevée en Alanine, résidu qui possède une forte propension à adopter une structure en hélice α . [42][43][44][45][46][47][48][49][50][51][52] Les peptides courts sont devenus les systèmes modèles prédominants et, en 1990, trois groupes ont déterminé indépendamment les échelles expérimentales de propension de chaque acide aminé à former une hélice en se basant sur l'approche « hôte-invité » utilisant ces courts peptides modèles comme séquences hôtes (**Figure I.9**). [43][44][48][53]

| Composé | Séquence |
|---------|---|
| I.1 | Ac-Y-K-A-A-X-A-K-A-A-X-A-K-A-A-X-A-K-NH ₂ |
| I.2 | Ac-Y-E-A-A-A-K-E-A-X-A-K-E-A-A-A-K-A-NH ₂ |
| I.3 | Suc-Y-S-E-E-E-E-K-K-K-K-X-X-X-E-E-E-E-K-K-K-NH ₂ |

Figure I.9 : Séquences de différents peptides hôtes : I.1 [54] , I.2 [55] et I.3.[43]. Les résidus X représentent les acides aminés « invités ».

Ces expériences ont permis d'établir les tendances des différents acides aminés à se structurer en hélice α dans de courtes séquences peptidiques. Malgré la variété des peptides hôtes utilisés, il existe une grande similitude entre les différentes échelles de propension.

Le concept développé par l'utilisation de courts peptides modèles a été étendu à certaines séquences protéiques. En 1992, Matthews [56] et Fersht [57] en utilisant respectivement le lysozome T4 et la barnase, ont établi des échelles de propension des acides aminés à former de l'hélice α pour les protéines. La comparaison des différentes échelles a montré qu'elles sont similaires mais pas identiques. L'interaction entre les chaînes latérales, en raison des différences dans la séquence locale des divers systèmes modèles, a été proposée comme source de variabilité. Pour expérimenter cela, Pace and Scholtz ont déterminé l'échelle de propension à former de l'hélice α pour chaque résidu dans l'hélice α de la ribonucléase T1 ainsi que pour un peptide constitué de 17 résidus.[58][59] Ils ont déterminé que les contributions énergétiques apportées par les différents acides aminés, pour adopter une structuration en hélice, sont équivalentes que les résidus soient situés dans la séquence d'une protéine ou d'un peptide.[58] Ces résultats ont permis à Pace et Scholtz de combiner toutes les échelles connues en une seule échelle commune. Ces résultats ont conduit au développement d'outils de calcul pour déterminer la stabilité des séquences peptidiques en hélices α . Doig, Rohl et Baldwin ont introduit une approche de Lifson-Roig modifiée qui intègre les interactions entre les chaînes latérales ainsi que les interactions qui se produisent à la fin de l'hélice c'est-à-dire les interactions dites de « capping » N et/ou C-terminales.[60][61][50][62][63][64] Ces interactions jouent un rôle crucial dans l'étape d'initiation de la structuration en hélice des séquences peptidiques.

a. Effet de « capping » dans les séquences de protéines

Comme nous l'avons mentionné au début de ce chapitre, l'hélice α peptidique se caractérise par un réseau de liaisons hydrogène à deux centres impliquant les NHs (*i*) ainsi que les carbonyles des fonctions amides du squelette peptidique (en *i+4*) [11]. Ce modèle s'interrompt aux extrémités de l'hélice. En effet, en l'absence de terminaison, aucun tour d'hélice suivant ne va pouvoir fournir des accepteurs ou donneurs de liaisons hydrogène supplémentaires aux extrémités N- et C-terminales. Ces effets de terminaison sont importants dans le cas de petites hélices de 10 à 12 résidus car englobant les deux tiers des résidus de l'hélice [65].

La géométrie de l'hélice peptidique s'articule de la façon suivante : les carbonyles sont orientés vers l'extrémité C-terminale (pôle (-) du macrodipôle) de l'hélice peptidique alors que

les NHs sont orientés vers l'extrémité N-terminale (pôle (+) du macrodipôle). L'hélice peptidique est donc pourvue d'un moment dipolaire. En 1988, Presta et Rose ont décrit la capacité d'un donneur de liaison hydrogène, inséré à l'extrémité C-terminale des peptides, à stabiliser la structure en hélice par interaction avec les carbonyles amides des 4 résidus C-terminaux non impliqués dans le réseau de liaisons hydrogène. Ils ont également rapporté qu'un accepteur de liaison hydrogène, positionné à l'extrémité N-terminale des peptides, avait tendance à stabiliser la structure en hélice α en interagissant avec les NHs amides des 4 résidus N-terminaux non impliqués dans le réseau de liaisons hydrogène.[65] Le terme « *capping* » d'hélice [66] a été utilisé pour décrire de tels modèles alternatifs de liaison hydrogène qui peuvent satisfaire les NH et les C=O amides du squelette peptidique dans les tours initiaux et/ou finaux de l'hélice.[65] Les « *caps* » positionnés aux extrémités des hélices, sont constitués de courtes séquences peptidiques et peuvent mettre en jeu des interactions par liaison hydrogène et/ou effet hydrophobe.

Les « *caps* » peuvent exercer leur effet sur des peptides de tailles différentes. Pour des peptides de petite ou de moyenne taille, ce sont les « *caps* » constitués de 3 ou 4 résidus qui vont être à l'origine de la stabilisation des séquences peptidiques. Alors que pour les longs peptides ils vont être constitués de 7 résidus. Nous nous sommes intéressés aux « *caps* » de 3 ou 4 résidus majoritairement présents dans les hélices peptidiques. Dans la structure naturelle des protéines, la formation de liaisons hydrogène survient préférentiellement entre les donneurs et les accepteurs de liaisons hydrogènes d'une même chaîne peptidique dont les résidus sont agencés dans une proximité spatiale. Cette tendance est particulièrement vraie aux extrémités des hélices peptidiques[67].

Les « *caps* » localisés à l'extrémité N-terminale des hélices peptidiques, possèdent une tendance nette à l'utilisation d'accepteurs de liaisons hydrogène provenant des chaînes latérales impliquée dans l'hélice peptidique. A contrario, les « *caps* » situés à l'extrémité C-terminale des hélices peptidiques utilisent des donneurs de liaisons hydrogène apportés par des résidus de la chaîne principale du peptide impliqués dans un motif adjacent de type tour. Ils sont qualifiés de « *caps* » hydrophobes car dirigés par un effet hydrophobe mettant en jeu deux résidus. Le premier est positionné à l'extrémité C-terminale de l'hélice et le deuxième dans la continuité du tour adjacent.[68][69][70] Cette différence entre les interactions de « *capping* » aux extrémités N- et C-terminale est une conséquence plausible de la chiralité des résidus. Dans une hélice droite composée d'acides aminés-L, chaque vecteur $C\alpha \rightarrow C\beta$ est orienté vers l'extrémité N-terminale de l'hélice (**Figure I.10**). Ainsi, la géométrie de l'hélice prédispose les chaînes latérales vers l'extrémité N-terminale de l'hélice, facilitant la création de liaisons hydrogène entre les groupements accepteurs portés par les chaînes latérales des résidus de l'hélice et les N-H amides non impliqués dans le réseau de liaisons hydrogène. A contrario, les chaînes latérales ne sont donc pas du tout orientées vers les C=O amides non impliqués dans le réseau de liaisons hydrogène de l'hélice ce qui explique pourquoi elles ne sont pas une force motrice dans le repliement des « *caps* » C-terminaux. Il existe 7 motifs de « *caps* » N et C terminaux. Ces motifs rassemblent les exemples de « *caps* » retrouvés dans la séquence des protéines naturelles dont la nomenclature a été décrite dans la **Figure I.10**.

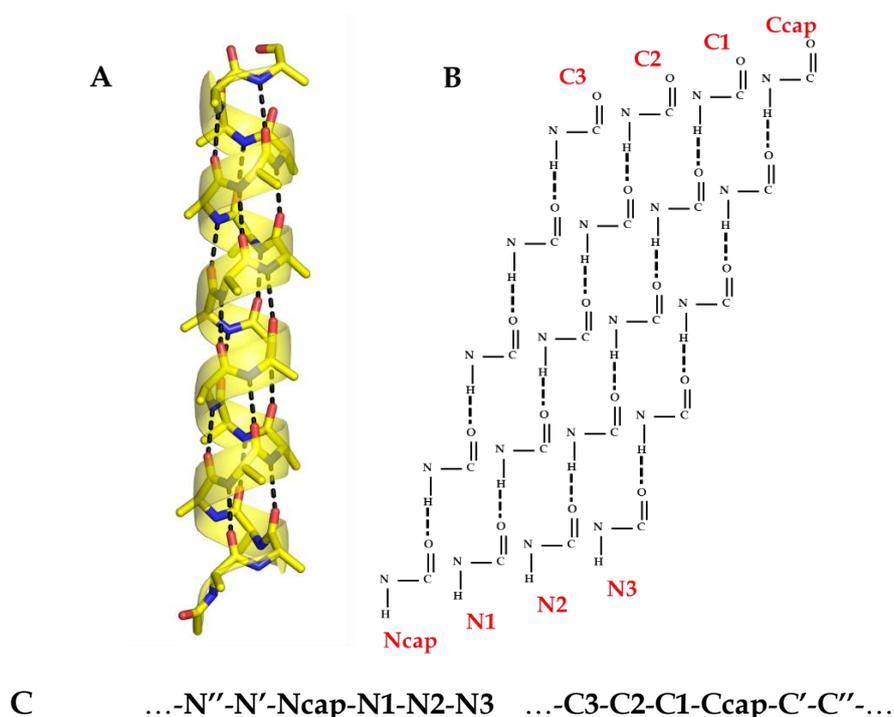


Figure I.10 : Représentations de l'hélice α peptidique : (A) structure cristallographique de l'hélice α peptidique, (B) schéma représentatif du réseau de liaison hydrogène de l'hélice α peptidique et (C) nomenclature des résidus associés

i. Motifs de « capping » N-terminaux des protéines

Le « capping » d'hélice à l'extrémité N-terminale le plus décrit est représenté par la « capping box ».[71][72] Cette « capping box » forme des liaisons hydrogène avec deux des quatre donneurs de liaisons hydrogène présents à l'extrémité N-terminale, non-impliqués dans le réseau de liaisons hydrogène de l'hélice (**Figure I.11**). Plus en détails, la chaîne latérale du résidu **Ncap** forme une liaison hydrogène avec le NH amide de la chaîne principale du résidu **N3** et réciproquement.[67] Le plus souvent on retrouve au niveau du résidu **Ncap** les acides aminés suivants : Thr > Ser > Asn. Au niveau du résidu **N3** se sont des acides aminés de type Glu et Gln qui ont le plus souvent été mis en évidence.

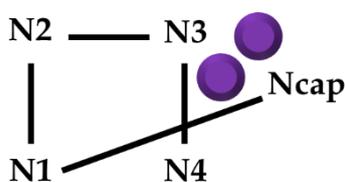


Figure I.11 : Schéma du motif « capping box ». Les boules violettes symbolisent les chaînes latérales impliquées dans les interactions de « capping ». Le plus souvent on trouve N3 = Glu, Gln et Ncap = Thr>Ser>Asn.

Il existe également un modèle appelé la « big box »[69], très proche du modèle de la « capping box » (**Figure I.12**). Ce modèle qui fait intervenir un résidu supplémentaire (N') permet de répartir les cycles de liaisons hydrogène entre la chaîne latérale du résidu **Ncap** et la fonction amide du squelette du résidu **N3** et réciproquement la chaîne latérale du résidu **N3** et la fonction carbonyle du squelette du résidu **N'**(au lieu du résidu **Ncap**).

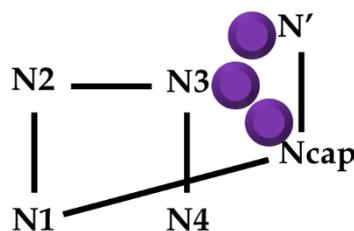


Figure I.12 : Schéma du motif « big box ». Les boules violettes symbolisent les chaînes latérales impliquées dans les interactions de « capping ».

Le motif « β -box », [73] est dirigée par une interaction entre les chaînes latérales hydrophobes des résidus N''' et $N3$ (ou $N4$) ainsi que par une liaison hydrogène stabilisant un coude- β entre les atomes $C=O$ du résidu N''' et NH du résidu $Ncap$ (**Figure I.13**).

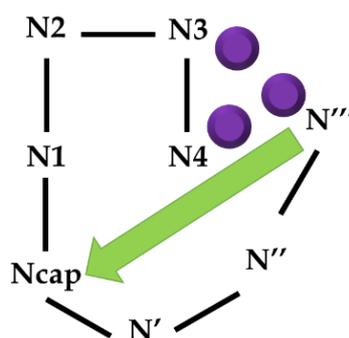


Figure I.13 : Schéma du motif « β -box ». Les boules violettes symbolisent les chaînes latérales impliquées dans les interactions de « capping », les flèches vertes représentent les liaisons hydrogène entre les atomes du squelette peptidique caractéristiques du motif de « capping ».

La fréquence normalisée d'apparition de proline à la position $N1$ est élevée dans tous les motifs de « capping » N-terminaux. La position $N1$ est bien adaptée aux caractéristiques stériques et chimiques de la proline, [74] moins flexible que les autres résidus. Son angle dièdre Φ , est en effet contraint d'adopter des valeurs proches de -70° , [75] semblable à celui d'une hélice idéale. Cependant, lorsque le résidu proline adopte une conformation compatible avec la formation d'une hélice, le cycle pyrrolidine volumineux affecte la conformation du résidu précédent, le forçant à adopter une conformation non hélicoïdale. En conséquence, la proline est compatible avec la position $N1$ car la position précédente, $Ncap$, possède des angles dièdres éloignés des valeurs caractéristiques de l'hélice α . De plus, de par sa nature cyclique l'azote de la chaîne principale de la proline n'est pas disponible pour venir former une liaison hydrogène, ne nécessitant pas le besoin d'un groupement accepteur de liaison hydrogène à proximité.

ii. Motifs de « capping » C-terminaux des protéines

Les deux premiers motifs de « capping » C-terminaux à avoir été décrits sont le motif de Schellman et le motif αL . [68] (**Figure I.14**) Le motif de Schellman est défini par son motif distinctif de double liaison hydrogène de type $i/i+5$ et $i+1/i+3$ impliquant le carbonyle du résidu : la première liaison hydrogène s'effectue entre les groupes $N-H$ du résidu C'' et $C=O$ du résidu $C3$ et la deuxième entre les groupes $N-H$ du résidu C' et $C=O$ du résidu $C2$. L'interaction hydrophobe associée met en jeu les chaînes latérales des résidus $C3$ et C'' . Si C'' est polaire, c'est le motif alternatif αL qui est observé. Le motif αL est défini par une liaison hydrogène entre les groupes NH du résidu C' et $C=O$ du résidu $C3$. L'interaction hydrophobe dans le motif αL est hétérogène, se produisant entre les chaînes latérales des résidus $C3$ et l'un des résidus extérieurs à l'hélice : C''' , C'''' ou C''''' . Les contraintes conformationnelles imposées à la structure par ces différentes interactions ne peuvent être satisfaites que lorsque le résidu C' , typiquement une glycine, adopte des valeurs d'angles Φ positives. Dans le motif

de Schellman, les résidus polaires sont très favorisés en position **C1**. Cette tendance est rationalisée par le fait que les hélices caractéristiques des protéines ont deux faces distinctes : une face hydrophobe enfouie dans le corps de la protéine et une face hydrophile exposée au solvant. L'interaction hydrophobe entre les chaînes latérales des résidus **C''** et **C3**, établie la face hydrophobe de l'hélice. En conséquence, la position **C1**, située à un demi-tour d'hélice, est reléguée sur la face exposée au solvant, où les résidus polaires sont favorisés.

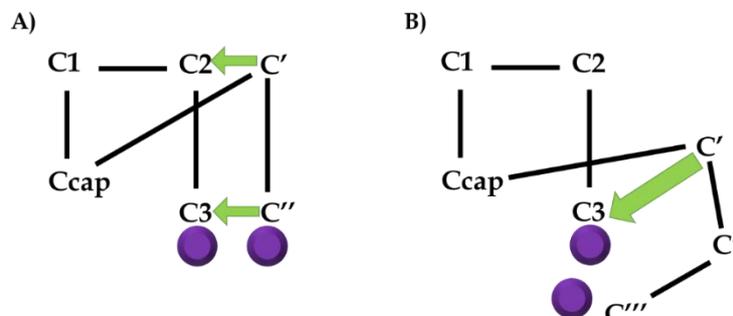


Figure I.14 : Schémas des motifs (A) Schellman et (B) α L. Les boules violettes symbolisent les chaînes latérales impliquées dans les interactions de « capping », les flèches vertes représentent les liaisons hydrogène entre les atomes du squelette peptidique caractéristiques du motif de « capping ».

Le motif Schellman non-Gly ressemble au motif de Schellman (**Figure I.15**).[73] En effet, ce motif met en jeu 2 liaisons hydrogène caractéristiques, la première entre le NH du résidu **C''** et le C=O du résidu **C3** et la deuxième se situe entre le NH du résidu **C'** et le C=O du résidu **C2**. En revanche, dans le cas présent, la position **C'** est un résidu non ramifié différent de Gly et l'interaction hydrophobe se situe entre les chaînes latérales des résidus **C3** et **C'''** ou **C''''**, au lieu de **C''** pour le motif de Schellman.

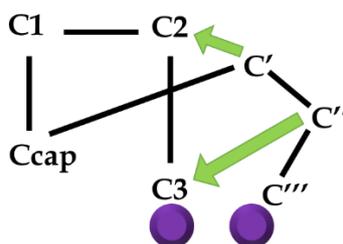


Figure I.15 : Schéma du motif Schellman non-Gly. Les boules violettes symbolisent les chaînes latérales impliquées dans les interactions de « capping », les flèches vertes représentent les liaisons hydrogène entre les atomes du squelette peptidique caractéristiques du motif de « capping ».

Le motif Proline, motif de « capping » localisé à l'extrémité C-terminale, implique des hélices terminées par des résidus prolyle (**Figure I.16**).[73] Les prolines sont connus pour être des briseurs d'hélices.[76] En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, la séquence en hélice ...-Xaa-Pro-... entraîne une collision stérique entre le cycle pyrrolidine et l'acide aminé précédant. Par conséquent, les résidus Pro qui terminent les hélices peptidiques sont localisés au niveau de la position **C'**, position dans laquelle le résidu situé en position $i-1$ (c'est-à-dire, **Ccap**) peut contribuer au réseau de liaisons hydrogène $i/i+4$ de l'hélice, adoptant des valeurs d'angles dièdres caractéristiques de la conformation en hélice α . Le motif Proline est défini par une interaction hydrophobe entre les chaînes latérales des résidus **C''''/C'''''** et **C3** (ou **C2** si **C3** est polaire). Ce motif comprend un tour d'hélice- 3_{10} entre les résidus **C3** et **Ccap** ainsi qu'une liaison hydrogène à trois centres reliant le C=O du résidu **Ccap** aux NHs des résidus **C'''** et **C''''**. Dans cette conformation, les résidus **C'** et **C''** sont exposés au solvant et, en conséquence, ces résidus sont donc pourvus de chaînes latérales polaires.

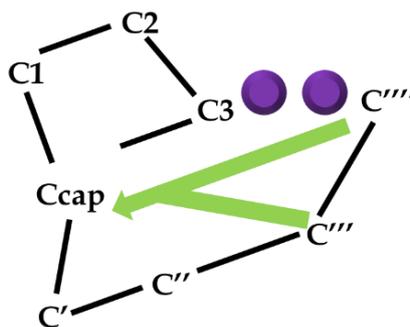


Figure I.16 : Schéma du motif proline. Les boules violettes symbolisent les chaînes latérales impliquées dans les interactions de « *capping* », les flèches vertes représentent les liaisons hydrogène entre les atomes du squelette peptidique caractéristiques du motif de « *capping* ». Le résidu Pro est localisé en C'

Il existe une différence inhérente de spécificité entre les motifs N- et C-terminaux. Au niveau de l'extrémité N-terminale, la géométrie de l'hélice favorise les liaisons hydrogènes des chaînes latérales vers le squelette et sélectionne des résidus polaires compatibles. En revanche, au niveau de l'extrémité C-terminale, les liaisons hydrogène entre les chaînes latérales et le squelette sont défavorisées au profit de liaisons hydrogène entre le squelette et les atomes de la chaîne principale post-hélice. En conséquence, l'extrémité N-terminale favorise la sélectivité dans toutes les positions polaires, en particulier **Ncap** et **N3**, alors que l'extrémité C-terminale ne doit sélectionner que des résidus C' pouvant adopter des valeurs positives de l'angle dièdre Φ au niveau de la chaîne principale. Ces différences de spécificité se traduisent par les préférences de résidus normalisées, répertoriées pour chaque motif de « *capping* ».[73]

Les mécanismes de « *capping* » des extrémités N- et C-terminales des hélices α , dans la séquence des protéines naturelles, ont donc très largement été étudiés et décrits. Afin de déterminer si ces mêmes interactions stabilisantes peuvent prendre place dans de courts peptides de synthèse, plusieurs groupes de recherche ont étudié les mécanismes de « *capping* » caractéristiques de ces séquences.

b. Etude du « *capping* » des séquences peptidiques

Les premières études, visant à étudier le « *capping* » des séquences peptidiques, ont été menées par Baldwin et son équipe.[77] Ils ont testé l'hypothèse selon laquelle la fonction amide, à l'extrémité C-terminale de la séquence peptidique, pourrait agir comme un motif de « *capping* ». Des expériences de dichroïsme circulaire ont permis de déterminer le pourcentage d'hélicité des composés. Cependant, aucune variation notable d'hélicité n'a été observée en remplaçant la fonction amide à l'extrémité C-terminale par l'ester méthylique correspondant, ce qui n'est pas surprenant compte tenu des mécanismes de « *capping* » décrits précédemment dans ce chapitre. Une autre série d'expériences, réalisée par Gierasch et son équipe,[78] souligne l'impact de la variation de la nature du résidu initial (**Ncap**) sur l'hélicité d'un segment peptidique, dérivé de la carboxypeptidase A. Kallenbach et son équipe ont également analysé le « *capping* » dans la séquence du lyutide (**Figure I.17**) [79], un peptide conçu pour mettre en évidence les préférences conformationnelles observées des résidus dans les hélices protéiques.[66]

Ac-YMSEDELKAAEAAFKRHGPT-OH

Figure I.17 : Séquence du peptide lyutide.

Certaines substitutions affectent de façon significative la capacité de ce peptide à adopter une structuration en hélice α . Par exemple, la substitution du résidu Ser par un résidu Ala, en position **Ncap** dans la séquence conduit à une réduction de moitié de l'hélicité du peptide, alors qu'à l'inverse, la substitution du résidu Ala₁₀ par un résidu Ser sur une position

centrale de la séquence, conduit à une diminution de moitié de pourcentage d'hélicité de la séquence peptidique. De plus, Kallenbach a montré, dans le cas du lyutide, que la substitution de groupements accepteurs de liaisons hydrogène à l'extrémité N-terminale du peptide impacte de façon significative l'hélicité de ce dernier,[79][80] alors que la substitution de groupements donneurs de liaisons hydrogène à l'extrémité C-terminale possède des effets moins prononcés.[81]

Les expériences menées par Nambiar et son équipe [82] ont montré que l'hélicité est sensible à l'identité du résidu N-terminal (**Ncap**) pour un peptide constitué de 12 résidus. Yumoto et son équipe, en 1993, ont obtenu des conclusions similaires en utilisant un peptide dérivé du neuropeptide Y. Des études ont également été conduites par Baldwin et son équipe [83] qui ont, de façon systématique, fait varier le résidu N-terminal (**Ncap**) dans une famille de peptides à base d'alanine. La corrélation entre l'hélicité résultante et la tendance pour chaque résidu, positionné en **Ncap**, à adopter une structure en hélice a ainsi été démontrée.[66] En revanche, aucune variation d'hélicité n'a été observée lorsque des substitutions analogues ont été réalisées au niveau du résidu C-terminal (**Ccap**) de ces peptides. La capacité de ces séquences peptidiques, riches en alanines, à adopter une structure en hélice α est également impacté lorsque l'amine libre à l'extrémité N-terminale de la séquence a été masquée par un groupement acétyle, confirmant l'hypothèse selon laquelle les groupements bloquants des extrémités peptidiques peuvent agir comme des substituts de « *capping* ».

Les interactions de « *capping* » décrites pour stabiliser les hélices α peptidiques dans la séquence des protéines ont également été mises en évidence dans de courtes séquences peptidiques, via des expériences de spectroscopie RMN. Le peptide lyutide [79], précédemment mentionné, est pourvu d'une « *capping box* » à son extrémité N-terminale (SEDE). Des corrélations NOEs ont été mises en évidence entre la chaîne latérale du résidu Ser (position **Ncap**) et le NH de la chaîne principale du résidu Glu (position **N3**) mais également entre la chaîne latérale du résidu Glu (position **N3**) et le NH de la chaîne principale du résidu Ser (position **Ncap**).[80][70][61] Viguera et Serrano ont ensuite analysé la séquence d'un peptide synthétique conçu pour adopter une structure en hélice, incluant un motif de « *capping box* » à son extrémité N-terminale et un motif de Schellman à son extrémité C-terminale. La présence de la « *capping box* » a rapidement été confirmée à partir de l'analyse des déplacements chimiques. Cependant les interactions caractéristiques du motif de Schellman n'ont pas été mises en évidence, bien que curieusement, l'extrémité C-terminale du peptide présente un caractère structuré. Une autre étude, dirigée par Serrano,[84] a ensuite permis de détecter la signature attendue du motif de Schellman : l'interaction hydrophobe entre les chaînes latérales des résidus en position **C''** et **C3**, dans la séquence du peptide E issu de la protéine « Che Y » ainsi que dans la séquence du peptide D issu de la protéine p21-Ras. Comme nous avons pu le voir, les interactions de « *capping* » peuvent tout à fait conduire à la stabilisation de séquence peptidique de longueur moyenne (entre 20 et 30 acides aminés). Qu'en est-il pour les courtes séquences constituées de moins de 10 résidus d'acides α -aminés ?

De façon générale, les interactions de « *capping* » stabilisent les hélices en inhibant la déstructuration des extrémités, mais tout résidu impliqué dans un motif de « *capping* » est retiré du contingent de résidus appartenant à l'hélice peptidique proprement dite.[73] L'élimination même de quelques résidus peut avoir un effet proportionnellement élevé sur la propension de l'hélice à maintenir sa structuration dans le temps. Il est donc très complexe de parvenir à stabiliser de courtes séquences peptidiques par la seule utilisation des interactions naturelles de « *capping* ». La stabilisation de courtes séquences peptidiques structurées en hélice α est un challenge de taille. La théorie de la transition hélice-pelote statistique pour les peptides suggère que l'organisation énergétiquement couteuse de trois acides aminés consécutifs dans une conformation hélicoïdale, limite intrinsèquement la stabilité de courtes

hélices α . [13][14][15] En conséquence, les hélices α constitués de 10 acides aminés ou moins sont connues pour être essentiellement non-structurées à cause de leur faible probabilité de nucléation. [85][86] La pré-organisation des résidus d'acides aminés dans un tour d'hélice α devrait conduire à l'augmentation de la capacité intrinsèque de nucléation et initier la formation de l'hélice. Différentes stratégies visant à préformer ce premier tour d'hélice α en utilisant des « caps » de synthèse ont été développées.

c. Les « Caps » de Synthèse

i. Blocs contraints

Une question connexe concerne le degré de stabilisation de l'hélice qui peut être conféré par les groupes de « capping » synthétiques. Historiquement, Kemp et son équipe de recherche ont développé le premier « cap » de synthèse. [87] Ils ont conçu un système de blocs contraints à 3 cycles enchevêtrés : **Ac-Hel**, avec l'idée que les carbonyles des liens amides du composé adoptent la même conformation que les carbonyles des liens amides des 3 premiers résidus d'une hélice α . C'est un modèle conformationnel qui, dans des conditions favorables, communique son information à la chaîne polypeptidique associée. En effet, le modèle inducteur d'hélice **Ac-Hel**, lorsqu'il adopte une conformation *trans*, favorise la structuration en hélice de la chaîne polypeptidique, alors que dans la conformation *cis* cette molécule n'induit aucune structuration du segment peptidique (**Figure I.18**).

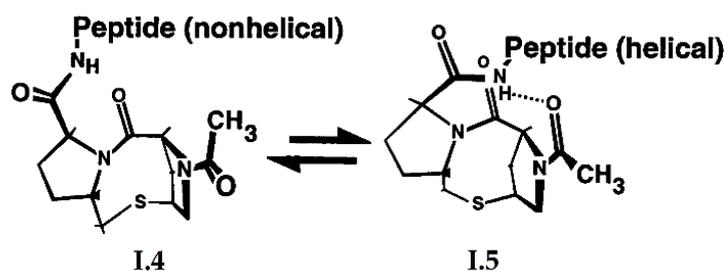


Figure I.18 : Représentation Schématique des 2 conformères *cis* : **I.4** et *trans* : **I.5**, du modèle inducteur, contraint à 3 cycles, d'hélice dans les peptides associés. [88]

Dans le conformère **I.4**, la proline décorée du groupement acétyle adopte la conformation *cis*, projetant le groupement acétyle vers le solvant. A l'inverse, dans la conformère *trans* **I.5**, le moment dipolaire du groupement acétyle est aligné sur le macrodipôle de l'hélice, formant des liaisons hydrogène avec les NHs des liens amides localisés à l'extrémité N-terminale de la séquence peptidique associée, amorçant de ce fait la structuration en hélice du peptide comme indiqué dans la **Figure I.18**. En effet, dans le cas de peptides conjugués au modèle **Ac-Hel** en milieu aqueux, seul le conformère *trans* **I.5** permet d'amorcer la structuration en hélice, de plus une réorientation de l'atome de soufre ($s \rightarrow e$) accompagne l'initiation, ce qui conduit à la formation du conformère *trans* **I.5**. Si le modèle contraint à 3 cycles adopte une conformation *cis*, le peptide associé ne possède pas de structure définie. [89][88] La rotation lente autour de la liaison entre l'azote de la proline et le C=O de l'acétyle conduit à des états de résonance distincts pour les conformères *cis* **I.4** et *trans* **I.5** qui ont été caractérisés par des expériences de spectroscopie RMN. Les variations d'hélicité du peptide lié au modèle **Ac-Hel**, se sont révélées être directement corrélées à la fraction de modèle adoptant la conformation *trans* **I.5** et peut être calculée à partir du rapport entre les intensités intégrées des résonances RMN des conformères *cis* et *trans*. [89][90] Le développement de ce premier modèle de cap contraint a permis de valider l'hypothèse selon laquelle la pré-organisation d'un premier tour d'hélice, à l'extrémité N-terminale, est suffisante pour amorcer la structuration en hélice α d'un peptide. Néanmoins, la présence d'un équilibre, via les 2 conformères du composé **Ac-Hel**, entre les formes : structurée/non-

structurée de la séquence peptidique, limite le développement de ce type de « cap » pour stabiliser des séquences peptidiques bioactives. Le développement d'autres « caps » présentant une structure unique verrouillée, capable d'amorcer la structuration en hélice du peptide associé, a été mis en place.

ii. Substituts de liaisons hydrogène (HBS)

Afin de verrouiller la conformation en hélice α de 3 résidus d'acides aminés consécutifs, [15][13][14] Arora et son équipe ont développé une stratégie impliquant le remplacement d'une des liaisons hydrogène du squelette par un lien covalent.[91] Pour mimer la liaison hydrogène C=O...NH de façon optimale, un lien covalent du type C=X-Y-N a été envisagé, dans lequel X et Y font partie respectivement des résidus i et $i+4$. La tolérance exceptionnelle de groupes fonctionnels, affichée par les catalyseurs de métathèse d'oléfines a suggéré que les atomes X et Y pourraient être deux atomes de carbone liés par une réaction de métathèse cyclisante (RCM).[92][93] Cette approche par remplacement de liaison hydrogène a été inspirée par le travail de Satterhwait, qui a exploré l'utilisation de lien hydrazone pour stabiliser les hélice α .[94] La méthode basée sur la réaction de métathèse offre une liaison stable et irréversible, contrairement à la stratégie hydrazone, et est applicable à un grand nombre de séquences peptidiques. La stratégie de substitution d'une liaison hydrogène de la chaîne principale (HBS) est attractive car elle permet la préservation stricte de la projection des chaînes latérales des résidus de l'hélice et l'introduction d'un lien croisé à l'intérieur du squelette de l'hélice préserve la possibilité d'interagir avec la surface d'autres biomolécules. Dans cette approche, le pseudocycle à 13 chaînons liés par une liaison hydrogène qui caractérise l'hélice α à l'extrémité N-terminale, a été remplacé par un macrocyle à 13 chaînons. L'utilisation de la technologie HBS a été appliquée à un décapeptide modèle hydrosoluble bioactif issu du domaine BH3 de la protéine Bak (**Figure I.19**).[95][96]



Figure I.19 : Séquence du décapeptide modèle hydrosoluble bioactif issu du domaine BH3 de la protéine Bak, **I.6**. [6]

Les capacités du peptide natif **I.6** et de son analogue HBS **I.7** à se structurer en hélice α ont été caractérisées selon différentes techniques expérimentales.[96][95]

Les expériences de dichroïsme circulaire, en milieu aqueux, soulignent l'absence d'élément de structuration secondaire pour la séquence du peptide natif **I.6** qui affiche un spectre caractéristique d'un peptide non-structuré ou très légèrement structuré en hélice α . L'analogue HBS **I.7** présente lui deux minima, le premier à 222 nm et le deuxième à 208 nm ainsi qu'un maximum à 190 nm compatibles avec ceux observés pour les hélices α canoniques. Le pourcentage relatif d'hélicité, calculé à partir de la valeur de l'ellipticité molaire mesurée à 222 nm,[42] se situe aux alentours de 70% d'hélicité pour le composé **I.7** dans une solution de tampon phosphate (PBS) comportant 10% de TFE. Le peptide natif **I.6**, dans ces mêmes conditions expérimentales, n'adopte aucune structure secondaire.

Des expériences de spectroscopie RMN à 2D (TOCSY) (DQF-COSY) (NOESY) réalisées sur le composé **I.7**, corroborent les résultats obtenus par les analyses de CD. En effet, une séquence peptidique qui adopte une conformation en hélice α , fournit des corrélations NOE NN($i/i+1$) sur l'ensemble de la séquence ainsi que des corrélations NOE α N($i/i+4$). Ces pics caractéristiques, attendus pour une séquence peptidique adoptant une conformation stable en hélice α , ont été observés à partir du spectre du composé **I.7**. La détection des corrélations NOE impliquant les derniers résidus du composé **I.7** montre que l'hélice est structurée à l'extrémité C-terminale, alors que le lien covalent substituant la liaison hydrogène a été inséré entre les résidus 1 et 5. La structure en solution du composé **I.7** a

également, été déterminée en utilisant les corrélations NOEs ainsi que les constantes de couplage $^3J_{\text{NH-CH}_\alpha}$ mesurées. La structure finale met en évidence un réseau de liaisons hydrogène le long du squelette dans une configuration $i/i+4$ avec une hélice α bien définie.

La structure cristallographique du composé **I.7** (**Figure I.20**) analogue HBS a été résolue à 1.15Å (déposée à la Cambridge Structural Data Base).[96] Cette structure se superpose parfaitement à celle d'une hélice α idéale. Tous les partenaires de liaisons hydrogène C=O et NH interagissent dans une relation $i/i+4$, et possèdent des valeurs d'angles et de distances caractéristiques de celles d'une courte hélice α avec un réseau de liaisons hydrogène complet. La structure cristallographique fournit un support explicite pour confirmer que le remplacement d'une liaison hydrogène entre les résidus $i/i+4$ à l'extrémité N-terminale d'un court peptide par une liaison covalente carbone/carbone conduit à la formation d'une hélice α stable sur l'ensemble de la séquence du composé. Cette structure met en évidence la capacité du macrocyle basé sur la formation d'un lien alcène à reproduire fidèlement la conformation d'un tour d'hélice α pré-nucléé.

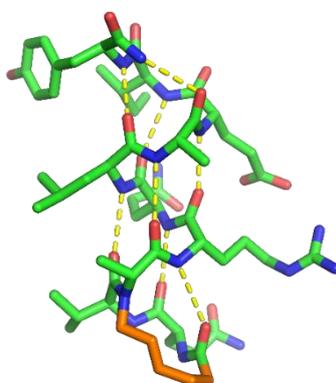


Figure I.20 : structure cristallographique du composé **I.7** analogue HBS (CSD ID : 675526).[96]

Cette étude a conduit au développement de la stratégie HBS sur différents peptides modulateurs d'interactions entre biomolécules.[97][98][99][100][101]

iii. Courte Séquence peptidique macrocyclique

Les hélices α des protéines interagissent avec d'autres protéines, peptides, ARN, ADN, ions métalliques et des composés organiques, habituellement au travers de 1 à 4 tours d'hélice et une seule face de l'hélice.[102] Fairlie et son équipe[103] ont mené une étude détaillée visant à étudier la capacité du cyclopentapeptide **I.8**, plus petit peptide décrit dans la littérature pour adopter une structure en hélice α en milieu aqueux,[104][105][106] à nucléer une séquence peptidique modèle **I.9**, en étant inséré à l'une ou l'autre de ces extrémités (**Figure I.21**).

| Composé | Séquence |
|-------------|--|
| I.8 | Ac-(cyclo-1,5)-[KARAD]-NH ₂ |
| I.9 | Ac-ARAARAARA-NH ₂ |
| I.10 | Ac-(cyclo-1,5)-[KARAD]-ARAARAARA-NH ₂ |
| I.11 | Ac-ARAARAARA-(cyclo-1,5)-[KARAD]-NH ₂ |

Figure I.21 : Séquences des composés **I.8**, **I.9**, **I.10**, et **I.11**. [103]

Des expériences de dichroïsme circulaire ont été menées, en milieu aqueux (10 mM tampon phosphate, pH 7,4, 25 °C) à une concentration excluant le risque de phénomènes d'agrégation pour les composés analysés. L'allure du spectre CD pour le peptide **I.9** est en accord avec une conformation non-structurée possédant un seul minimum à la longueur d'onde de 198 nm. L'allure des spectres CD pour les composés **I.10** et **I.11** est en accord avec

l'obtention d'une structure en hélice α possédant 2 minima, à 222 nm et à 208 nm, ainsi qu'un maximum à 190 nm. Le pourcentage relatif d'hélicité a été calculé à partir de la valeur de l'ellipticité molaire mesurée à 222 nm.[42] Le composé **I.10** adopte une structuration en hélice α à hauteur de 67%. Le composé **I.11** se structure en hélice α à hauteur de 92%. Au vu des résultats obtenus par les expériences de dichroïsme circulaire, le « cap » penta-peptidique cyclique **I.8** impacte de façon significative l'hélicité d'un segment peptidique qu'il soit positionné à l'extrémité N- ou C-terminale, avec une capacité plus prononcée à stabiliser la séquence peptidique lorsqu'il est inséré à l'extrémité C-terminale. Des expériences de spectroscopie RMN ont également montré que le composé **I.11** possède un nombre plus important de résidus générant des constantes de couplages $^3J_{\text{NH-CH}\alpha} < 6.0$ Hz, en comparaison avec les données mesurées pour le composé **I.10**. [103] Des valeurs de constantes de couplage $^3J_{\text{NH-CH}\alpha}$ inférieures à 6Hz coïncident avec un réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires entre les résidus i et $i+4$, [107][108] soulignant la capacité plus importante du composé **I.8** à stabiliser la structuration en hélice dans un segment peptidique lorsque ce dernier est positionné à l'extrémité C-terminale de la séquence peptidique. De plus, la présence d'une structure en hélice α sur l'ensemble de la séquence du composé **I.11** et d'une partie de la séquence du composé **I.10** a été confirmée par les corrélations ROE observées entre les résidus i et $i+3$ mais également entre les résidus i et $i+4$. Ces données sont tout à fait cohérentes avec la présence d'une hélice α peptidique au niveau de la portion correspondante au peptide **I.9** pour les composés **I.10** et **I.11**.

L'induction de la structure en hélice α dans une séquence peptidique via l'insertion du composé **I.8** aux extrémités d'une séquence peptidique est une stratégie de « *capping* » efficace pour de courtes séquences peptidiques. Les expériences de dichroïsme circulaire et de RMN soulignent une tendance plus importante à la stabilisation du segment peptidique **I.9** lorsque le cap **I.8** est inséré à l'extrémité C-terminale. C'est l'un des rares exemples de cap de synthèse, positionné à l'extrémité C-terminale des séquences peptidiques, à être capable d'initier et de stabiliser la structuration en hélice α des peptides en milieu aqueux. Fairlie et son équipe ont également développés une variante avec un cyclotérapeptide. [109] Zigang Li et son équipe ont également développé un peptide cyclique permettant de faciliter la nucléation en hélice des séquences peptidiques, basé sur la formation d'un lien lactame entre les résidus i (acide L-isoaspartique) et $i + 3$ (acide 2,3-diaminopropionique), conduisant à une stabilité protéolytique et une amélioration de la pénétration cellulaire. [110]

La plupart des stratégies de « *capping* » développées pour de courts peptides mettent en jeu des « *caps* » synthétiques insérés à l'extrémité N-terminale des séquences peptidiques. Les différents « *caps* » de synthèse décrits précédemment utilisent des architectures constituées d'acides α -aminés dans lesquelles des contraintes, via des liens covalents, ont été introduites verrouillant la conformation de ces composés pour induire le premier tour d'hélice. Relativement peu d'approches basées sur l'utilisation de squelettes artificiels visant, par des interactions de « *capping* », à amorcer et stabiliser la structuration en hélice de peptides ont été explorées. Parallèlement au développement de « *caps* » de synthèses, une autre approche basée sur l'insertion ponctuelle de résidus non-naturels (i.e. les foldamères) permettant de stabiliser la structuration en hélice des séquences peptidiques a été étudiée.

2. Mimes d'hélices α : prothèses moléculaires

Les foldamères adoptent des structurations bien définies et compactes, mimant le repliement de biopolymères. [111] Contrairement aux peptides, les architectures artificielles des foldamères leurs permettent de ne pas être reconnus et donc dégradés par les protéases plasmatiques. Cependant, la capacité des foldamères à reproduire la distribution des chaînes latérales impliquées dans les interfaces protéine/protéine demeure complexe, limitant le

développement de ces composés comme modulateurs d'interactions protéine/protéine. Si les foldamères constitués d'un seul type de monomères (homo-oligomères) ont été très étudiés, il est également possible d'augmenter considérablement la diversité des structures secondaires obtenues en combinant plusieurs types de monomères au sein d'une même séquence pour générer des foldamères hybrides. En effet, en considérant simplement les acides α - et β -aminés comme monomères, il est possible de générer de nombreuses combinaisons différentes (par exemple : α - β - α - β - α - β -, $\alpha\alpha$ - β - $\alpha\alpha$ - β -, α - $\beta\beta$ - α - $\beta\beta$ -, $\alpha\alpha$ - $\beta\beta$ -, ...) chacune avec de nouvelles propriétés de repliement. Ces différents repliements possèdent tous une capacité différente à projeter les chaînes latérales dans l'espace permettant ainsi de moduler plus finement les interactions avec la surface d'un partenaire protéique. Par conséquent, plus le nombre d'architectures distinctes accessibles est important, meilleures sont les chances d'identifier et d'optimiser un composé replié avec l'activité biologique désirée. [112][113] En particulier, la combinaison de monomères non naturels avec les acides α -aminés naturels s'est révélée extrêmement fructueuse pour créer des architectures non naturelles avec de nouveaux motifs de repliement (hélices en particulier) et des propriétés de reconnaissance moléculaire inédites. L'introduction de résidus non naturels dans la séquence peut apporter un niveau supplémentaire de contrôle conformationnel, tandis que les résidus d'acides α -aminés fournissent une diversité de chaînes latérales à faible coût, limitant ainsi le nombre de monomères non-canoniques à préparer. La stratégie la plus largement développée introduite par Gellman et Horne consiste à réaliser des substitutions discrètes d'acides α -aminés par leurs homologue β , espacées de manière régulière le long de la séquence, (**Figure I.22**).[112]

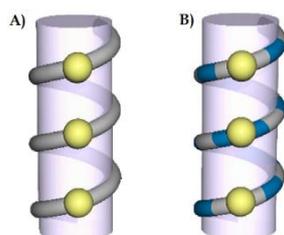


Figure I.22 : Schéma représentatif des hélices formées par : (A) des α -peptides; (B) des α/β -peptides correspondants.[114] La chaîne principale des résidus d'acides α -aminés a été représentée en gris, la chaîne principale des résidus non naturels a été représentée en bleu, et les chaînes latérales pour les différents types de résidus ont été représentées par des boules jaunes.

a. Substitutions (1 : 1) α/β

Les peptides α/β pourvus de résidus α et β mélangés selon différents motifs de répétition, sont parmi les oligomères chimères les plus étudiés. Les premières études ont été menées de manière indépendante par Zerbe et Reiser et par le groupe de Gellman, sur les peptides α/β alternés dans un rapport 1 : 1 (c'est-à-dire un motif répété $\alpha\beta\alpha\beta$).[115][116] Les deux groupes ont montré que ces séquences hybrides peuvent adopter des conformations hélicoïdales et que des unités β pré-organisées (cycliques de type ACPC) sont supérieures à leurs versions acycliques pour stabiliser l'hélice dans les solvants polaires. Gellman a caractérisé, pour le motif α/β , l'existence de 2 conformations d'hélices distinctes : une hélice-11, octamère **I.12** ainsi qu'une hélice-14/15, décimère **I.13** (**Figure I.23**).[117]

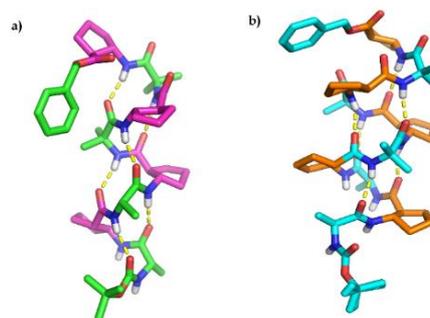


Figure I.23 : Structures cristallographiques : (a) le peptide α/β **I.12** (octamère 1 :1) composé d'une alternance de résidus ACPC (en rose) et Ala ou Aib (en vert) adopte une conformation en hélice-11 (CDS ID : OGATUM),[117] (b) le peptide α/β **I.13** (décamère 1 :1) composé adopte une conformation en hélice-14/15 (1 :1) ; alternance de résidus ACPC (en orange) et Ala ou Aib (en bleu) (CSD ID : OGAVEY).[117]

Afin d'évaluer la pertinence du concept en milieu aqueux, Gellman et son équipe ont choisi d'utiliser comme séquence peptidique modèle le peptide GCN4-pLI,[118] une variante du régulateur de transcription des levures GCN4, conçue pour former des bundles parallèles à 4 hélices dans l'eau (**Figure I.24**).



Figure I.24 : Séquence du peptide GCN4-pLI, composé **I.14**. Les résidus soulignés assurent la formation de l'assemblage du faisceau à 4 hélices

Le motif de substitution (1 : 1) a été introduit sur l'ensemble de la séquence du peptide **I.14**. Des résidus β^3 ont été insérés, dans un premier temps, afin de conserver les chaînes latérales originales. Cependant, le composé **I.15** ne possède quasiment aucune propension à se structurer en hélice. La substitution des résidus β^3 par des résidus β^c (APC) plus contraints, conduit à une augmentation significative des propriétés de structuration du composé **I.16** (**Table I.25**). Les résidus APC sont donc très utiles pour pré-organiser la séquence des peptides α/β mimes de l'hélice α . [119]

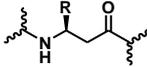
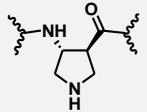
| Motif de substitution | Nature des résidus β | Composé | $[\theta]_{\min}$, deg.cm ² .dmol ⁻¹ .res ⁻¹ * |
|------------------------------|---|-------------|--|
| Séquence originale | -- | I.14 | -30 000 |
| Motif α/β^3 |  | I.15 | -5000 |
| Motif α/β^c (APC) |  | I.16 | -30 000 |

Table I.25 : Table récapitulative de l'ellipticité molaire minimum pour les composés **I.14**, **I.15** et **I.16**.

*Ellipticité molaire minimum observée pour un échantillon à 100 μ M dans un tampon à 10 mM de NaOAc (pH 4.6) à 25 °C.

b. Substitutions α/β ; motifs $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha\beta$

De nombreux autres motifs α/β (par exemple, 2 : 1 et 1 : 2) ont depuis été explorés et ont conduits à des structures hélicoïdales,[112][120][119][121][122] dont certaines assez proches des hélices α peptidiques.[123] Le groupe de Gellman a démontré l'utilité de cette approche pour mimer les hélices α peptidiques, en étendant son application à des séquences naturelles biologiquement actives.[122] Cette approche se base sur la conception de composés à partir de la séquence peptidique native, dans laquelle un sous-ensemble de résidus- α est remplacé par des résidus β^3 homologues. Les substitutions $\alpha \rightarrow \beta$ ont été effectuées sur l'ensemble de la séquence peptidique selon des modèles simples contenant de 25 à 33% de

résidus β^3 dispersés uniformément le long de la chaîne principale. Les analogues peptidiques ainsi générés fournissent des mimes efficaces d'hélice α avec des affinités de liaison pour des surfaces de protéines similaires à celles des ligands peptidiques apparentés, et ce malgré la présence d'atomes supplémentaires dans la chaîne principale des molécules hybrides. Des résidus β^3 ont, tout d'abord, été insérés afin de conserver la chaîne latérale d'origine. Il est cependant nécessaire, dans certains cas, de substituer certains résidus β^3 par des résidus β cycliques pour augmenter la capacité du composé hybride à adopter une structure en hélice. [117][123][124]

Afin d'évaluer la pertinence du concept en milieu aqueux, Gellman et son équipe ont, une nouvelle fois, choisi d'utiliser comme séquence peptidique modèle **I.14**, [118] qui permet d'accéder rapidement à de l'information structurale à haute résolution. La structure cristallographique du composé **I.14** a été comparée avec celles des analogues **I.17**, **I.18** et **I.19** contenant des substitutions α/β^3 possédant respectivement les motifs : $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha\beta$, and $\alpha\alpha\beta$ (**Figure I.26**). [123] La comparaison des structures cristallographiques du peptide **I.14**, structuré en hélice α , avec celles des analogues **I.17**, **I.18**, **I.19** a mis en évidence la proximité conformationnelle des différentes structures observées, malgré la présence d'environ un atome de carbone supplémentaire par tour d'hélice pour les peptides α/β . L'impact de l'insertion de ces atomes supplémentaires semble être réparti en douceur sur l'ensemble du squelette. [123] Le motif $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ est adapté à l'organisation en heptade des résidus de l'hélice α . Dans ce cas, les résidus β^3 sont alignés le long d'un côté de l'hélice. La « face β » ainsi générée est diamétralement opposée à la face de l'hélice qui contient les chaînes latérales hydrophobes responsables de l'auto-assemblage. Ainsi, les résidus β^3 sont localisés exclusivement sur l'extérieur du « bundle » à quatre hélices pour le composé **I.17**. En revanche, les motifs de répétition $\alpha\alpha\beta$ ou $\alpha\alpha\beta$, portés respectivement par les composés **I.18** et **I.19**, provoquent une répartition en spirale des résidus β autour du cylindre de l'hélice. Deux des résidus β^3 sont impliqués dans l'assemblage quaternaire à 4 hélices parallèles, via des interactions entre chaînes latérales hydrophobes. [123]

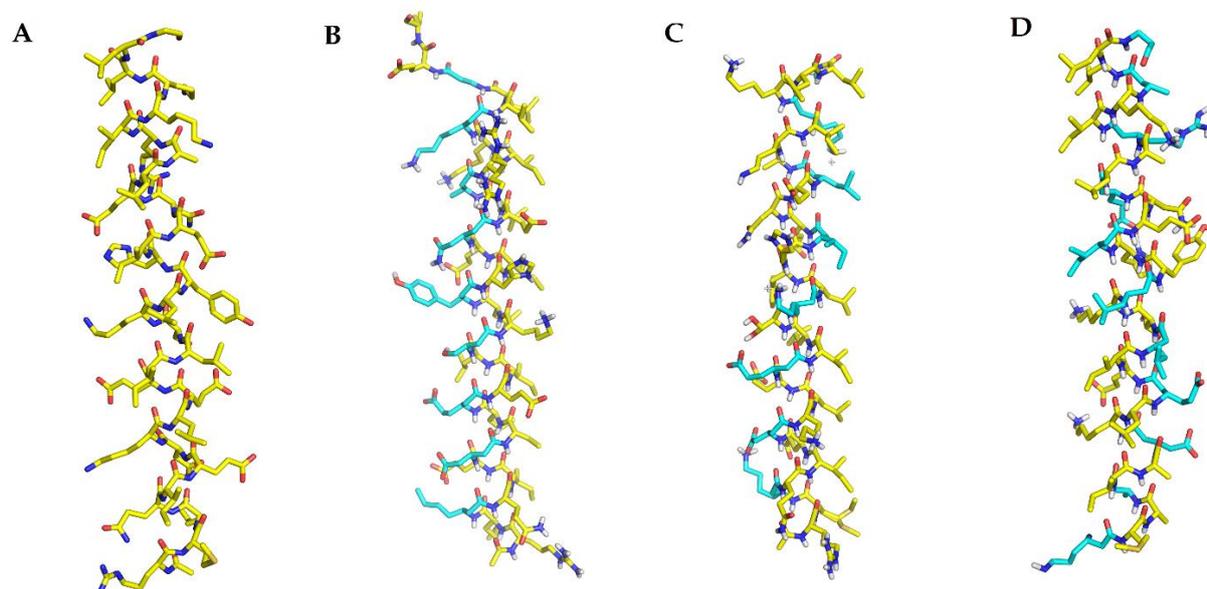


Figure I.26 : Structures cristallographiques : (A) peptide α GCN4-pLI, **I.14**, (PDB ID : 1GCL) [118] ; (B) peptide α/β **I.17**, analogue de GCN4-pLI pourvu d'un motif $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ répété sur l'ensemble de la séquence (PDB ID : 2O XK) [125] ; (C) peptide α/β **I.18**, analogue de GCN4-pLI pourvu d'un motif $\alpha\alpha\beta$ répété sur l'ensemble de la séquence (PDB ID : 3C3G) [123] ; (D) peptide α/β **I.19**, analogue de GCN4-pLI pourvu d'un motif $\alpha\alpha\beta$ répété sur l'ensemble de la séquence (PDB ID : 3C3F). [123]

Les excellents mimes structuraux de l'hélice α du peptide **I.14** représentés par les analogues **I.17**, **I.18** et **I.19**, s'accompagnent néanmoins d'une déstabilisation de la structure quaternaire formée d'un « bundle » à 4 hélices parallèles. Il semblerait que cette diminution de stabilité soit due en partie à un gain d'entropie conformationnelle. Chaque substitution $\alpha \rightarrow \beta^3$ introduit une liaison souple et donc un degré de liberté supplémentaire dans le squelette peptidique. Comme il y a de 8 à 11 remplacements au sein des composés **I.17**, **I.18** et **I.19**, le coût entropique lié à la structuration en hélice est plus important que pour le peptide- α correspondant.[123]

c. Substitution $\alpha/\beta/\gamma$; motif $\alpha\gamma\alpha\beta\alpha$

Comme nous l'avons décrit ci-dessus, les oligomères pourvus du motif répété $\alpha\beta\alpha\alpha\alpha\beta$ en heptade peuvent adopter une structure secondaire en hélice dans laquelle chaque tour contient un atome de carbone supplémentaire au niveau de la chaîne principale par rapport à celle d'une hélice α . Récemment, Gellman et son équipe ont proposé un nouveau type de foldamère hybride contenant des acides α , β et γ -aminés dans un motif de répétition en hexade $\alpha\gamma\alpha\beta\alpha$, destiné à mimer une heptade d'acides α -aminés sans introduire d'atomes supplémentaires au niveau de la chaîne principale.[126] Un résidu β et un résidu γ forment à eux deux une chaîne carbonée comportant autant d'atomes que 3 résidus α consécutifs. Le motif en hexade $\alpha/\beta/\gamma$ ainsi que l'heptade constituée d'acides α -aminés correspondent chacun à deux tours d'hélices.[127] La juxtaposition d'un tour d'hélice (**Figure I.27**) montre que le motif de répétition $\alpha\gamma\alpha\beta\alpha$ permet potentiellement une correspondance directe entre les résidus α de l'hexade et quatre des résidus- α de l'heptade standard d'une hélice α peptidique.

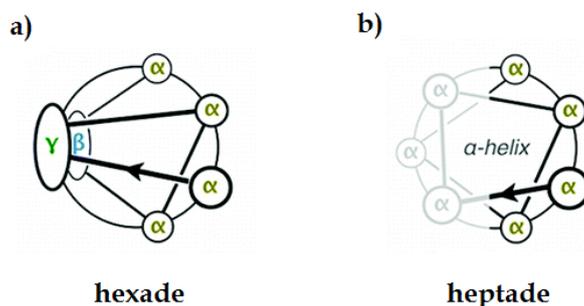


Figure I.27 : Schéma de la répartition des résidus dans les motifs suivants : (a) hexade $\alpha\gamma\alpha\beta\alpha$ et (b) heptade $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$. [126]

Des expériences de RMN 2D ont mis en évidence la capacité du motif en hexade $\alpha\gamma\alpha\beta\alpha$ à mimer de la projection des chaînes latérales sur une face de l'hélice α , malgré la présence de résidus non-naturels.[126] La comparaison directe avec un peptide α révèle que le peptide $\alpha/\beta/\gamma$ possède une capacité à se structurer en hélice beaucoup plus importante. Cette caractéristique devrait faciliter le développement de cette technologie sur des peptides- α biologiquement actifs. Des expériences de dichroïsme circulaire et de spectroscopie RMN ont montré que les résidus γ présentaient une propension hélicoïdale élevée dans le cas des composés **I.20** et **I.21** (**Figure I.28**). Contrairement à l'introduction critique d'une contrainte cyclique pour les résidus β , les résidus γ conservent leur capacité à adopter des structures en hélice que le résidu soit contraint ou non.[126][128]

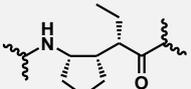
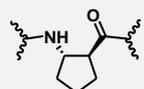
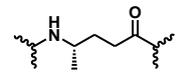
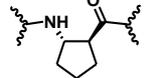
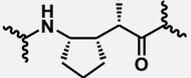
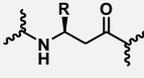
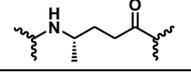
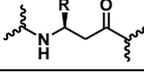
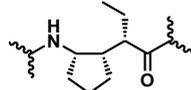
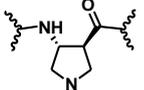
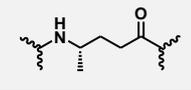
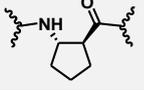
| Composé | Résidu- γ | Résidu- β | Séquence |
|---------|---|---|---|
| I.20 |  |  | Ac-E γ^c AR β^c YA γ^c QA β^c K-NH ₂ |
| I.21 |  |  | Ac-E γ^A AR β^c YA γ^A QA β^c K-NH ₂ |
| I.22 |  |  | Ac-E γ^c AR β^3 QYA γ^c QA β^3 FK-NH ₂ |
| I.23 |  |  | Ac-E γ^A AR β^3 QYA γ^A QA β^3 FK-NH ₂ |

Figure I.28 : Séquences des composés pourvus du motif $\alpha\gamma\alpha\beta\alpha$ et leurs abréviations.

Afin de déterminer si la conception de peptide $\alpha/\beta/\gamma$ peut supporter le mimétisme fonctionnel des hélices α biologiques, le motif en hexade $\alpha\gamma\alpha\beta\alpha$ a été introduit dans la séquence du peptide **I.14** pour obtenir des structures à haute résolution. Comme nous l'avons décrit précédemment, de nombreux peptides α/β dérivés de la séquence du peptide **I.14** cristallisent en formant un assemblage de quatre hélices remarquablement similaires à la structure quaternaire adoptée par le peptide **I.14**. [118][123][124] Une série de peptides $\alpha/\beta/\gamma$, basée sur cette séquence, contenant des nombres variés d'hexades $\alpha\gamma\alpha\beta\alpha$ localisées dans différentes portions du peptide, a été synthétisée. Seuls 2 oligomères ont fourni des cristaux de haute qualité à partir de solutions aqueuses (**Figure I.29**). Les structures résultantes montrent que le motif $\alpha\beta\alpha\gamma\alpha\beta\alpha$ peut effectivement conduire à l'adoption d'une conformation similaire à celle de l'hélice α , que le résidu γ soit pourvu d'une contrainte cyclique, (composé **I.24**) ou non, (composé **I.25**).

| Composé | Résidu- γ | Résidu- β | Séquence |
|---------|---|---|---|
| I.14 | -- | -- | Ac-R <u>M</u> KQ <u>I</u> EDK <u>L</u> EE <u>I</u> LSK <u>L</u> Y <u>H</u> I <u>E</u> N <u>E</u> L <u>A</u> R <u>I</u> K <u>K</u> L <u>L</u> GER-OH |
| I.24 |  |  | Ac-R <u>M</u> KQ <u>I</u> EDK <u>L</u> EE <u>I</u> LSK <u>L</u> Y <u>H</u> I <u>E</u> β^c EL γ^c <u>I</u> K β^c <u>L</u> GER-OH |
| I.25 |  |  | Ac-R <u>M</u> KQ <u>I</u> EDK <u>L</u> EE <u>I</u> β^c KL γ^A <u>I</u> E β^c <u>E</u> L <u>A</u> R <u>I</u> K <u>K</u> L <u>L</u> GER-OH |

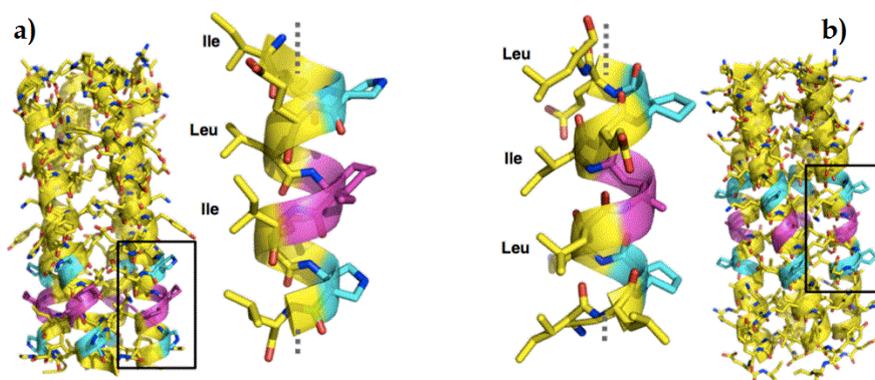


Figure I.29 : (haut) séquences des composés **I.14**, **I.24** et **I.25** ainsi que la structure des résidus β et γ ; (bas) structures cristallographiques : (a) du composé **I.24** (PDB ID : 4HJB) et (b) du composé **I.25** (PDB ID : 4HJD). [128] Les résidus clés dans la formation de l'assemblage quaternaire ont été soulignés.

Les données cristallographiques des composés **I.24** et **I.25**, mettent en évidence le réseau de liaisons hydrogène (i)C=O...H-N(i+3), caractéristique des structures peptidiques en hélice contenant des résidus γ . [129] La valeur de l'angle de torsion $C\beta-C\gamma$ des résidus γ contenus dans les hélices peptidiques, se situe fréquemment aux alentours de 50° , cependant un angle de torsion $C\beta-C\gamma$ encore plus petit de $38,9^\circ$, a été observé dans le squelette du composé **I.25** qui comporte un résidu γ^4 -hAla. Ces résultats soulignent la flexibilité apportée par l'introduction de résidus γ^4 dans le motif $\alpha\beta\alpha\gamma\alpha\beta\alpha$. La contrainte générée par l'introduction d'un résidu γ^c , augmente la rigidité du squelette. Afin d'optimiser le mimétisme des séquences peptidiques structurées en hélice α , dans le motif de répétition en hexade $\alpha\gamma\alpha\beta\alpha$, l'utilisation combinée de résidus β^c et de résidus γ^4 acycliques, a donc largement été favorisé. C'est un modèle récent de foldamère hybride dont les premiers exemples d'applications sur des peptides bioactifs inhibiteurs d'IPP sont très attendus. Néanmoins, Gellman et son équipe ont développé, à l'aide de séquences peptidiques hybrides α/β , différents exemples de composés mimes de peptides bioactifs se structurant en hélices α générant des composés capables de moduler/inhiber certaines IPP.

II. Applications à la recherche d'inhibiteurs d'interactions protéine/protéine

Le décodage du génome humain a facilité la mise en place de vastes études sur la protéomique fonctionnelle et a permis de mettre en évidence les interactomes, réseaux des interactions protéine/protéine dans les processus biologiques. [130] Les interactions protéine/protéine (IPP) sont impliquées dans de nombreux processus biologiques et représentent donc de nouvelles cibles prometteuses pour le développement d'approches thérapeutiques inédites. Une protéine impliquée dans une IPP présente une face exposée et une face exclue du solvant. Les enzymes possèdent un site actif bien défini et souvent localisé à l'intérieur des protéines, avec lequel de petites molécules vont pouvoir interagir. A l'inverse, les zones impliquées dans les IPP sont généralement planes et possèdent de larges surfaces d'interactions : de l'ordre de 1500 à 3000 \AA^2 alors qu'elles sont de 300 à 1000 \AA^2 pour des interactions protéines - petites molécules (**Figure I.30**). [131]

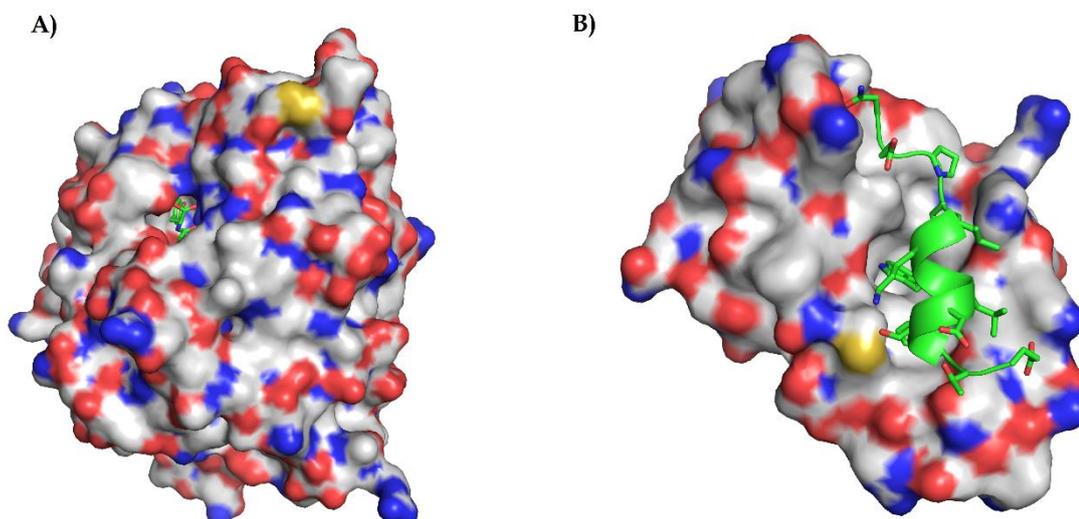


Figure I.30 : Structures cristallographiques : (A) Carboxypeptidase A + substrat (PDB ID : 3CPA) [132] ; (B) MDM2/domaine de P53 responsable de l'IPP (PDB ID : 1YCR). [9]

Pour mesurer la complexité de l'association de protéines, il faut aussi prendre en compte la complémentarité de forme, la distribution de charge, les effets hydrophobes et les interactions électrostatiques de surface. [133] Ces caractéristiques soulignent l'enjeu thérapeutique considérable, ainsi que la complexité à cibler ce type d'interfaces. Afin de mieux appréhender le mode d'interaction des IPP, plusieurs groupes de recherche ont essayé

d'identifier les régions clés dans la reconnaissance et la liaison des partenaires protéiques. C'est ainsi qu'ils ont établi une cartographie définissant les « hot spots ». Ces « hot spots » correspondent à un ensemble de résidus d'acides aminés contribuant fortement à l'association des partenaires protéiques. Wells et son équipe ont réalisé une mutagénèse systématique de chaque résidu en alanine à l'interface d'interaction entre l'hormone de croissance humaine et son récepteur (hGH/hGHbp). Si l'énergie libre de liaison entre la protéine native et le mutant augmente de 2 kcal/mol, alors le résidu fait partie intégrante du « hot spot ».[134] Il a ainsi été établi que la plupart du temps, les vastes surfaces de protéine en jeu ne contribuent pas dans leur intégralité à l'interaction et que les régions déterminantes pour la reconnaissance et l'affinité de liaison entre les partenaires protéiques peuvent être réduites à une surface d'environ 500 Å². [135] Fort de cette découverte, le champ des inhibiteurs/modulateurs d'IPP a fait l'objet de progrès spectaculaires dans les 20 dernières années avec le développement de différentes approches basées sur de petites molécules mais également de protéines recombinantes. Cependant, la conception de molécules de synthèse visant à interférer avec ce type d'interactions demeure extrêmement complexe en partie à cause de la diversité des interfaces protéine/protéine et de la dynamique des surfaces de protéines.[136][137][138][139][140] Une approche prometteuse consiste à utiliser des molécules de tailles intermédiaires (500 - 5000 Da) comme les peptides pour mimer les éléments de structuration secondaire de plus grands interfaces protéine/protéine (aussi appelés épitopes de structure secondaire). Cette stratégie contribue à combler le manque entre les petites molécules de synthèse et les protéines recombinantes (« biologics ») pour le développement d'une nouvelle classe de modulateurs d'IPP. Ce regain d'intérêt pour les peptides qui s'inscrit dans une dynamique actuelle forte : le biomimétisme, provient également de leur contribution croissante au marché pharmaceutique international comme le témoigne le nombre de peptides thérapeutiques en cours d'essais cliniques mais également le nombre sans précédent d'autorisations de mise sur le marché de peptides en 2012.[141] L'utilisation de peptides linéaires comme candidat médicament comporte, néanmoins, certaines limitations ; une structuration dans l'espace peu définie rendant les peptides plus susceptibles d'être dégradés par les protéases plasmatiques ainsi qu'un manque de perméabilité cellulaire qui limite leur utilisation à des cibles extracellulaires. Dans ce contexte, les approches chimiques visant à stabiliser ou à mimer les éléments de structure protéique secondaire pour développer des modulateurs d'IPP ont prospéré. En effet, 62% des complexes protéine/protéine, décrits dans la « protein data bank » (PDB), sont dirigés par des interfaces inter-hélices.[142] Les hélices peptidiques sont donc des éléments clés de reconnaissance entre les protéines,[143][142] qui tolèrent relativement bien les modifications chimiques. Comme nous l'avons décrit précédemment, de nombreux efforts ont été dédiés à l'étude de la stabilisation et du mimétisme des hélices α peptidiques. Les approches les plus populaires développées pour augmenter spécifiquement l'hélicité de courtes séquences peptidiques incluent : l'introduction d'acides aminés contraints α,α -disubstitués,[144] la macrocyclisation de chaînes latérales,[145][146][147] et l'introduction de motifs N-terminaux et de substitués de liaisons hydrogène.[148][149][91][150] Ces méthodes ont toutes été utilisées pour créer des modulateurs d'IPP (**Figure I.31**).[151][152][99][146]

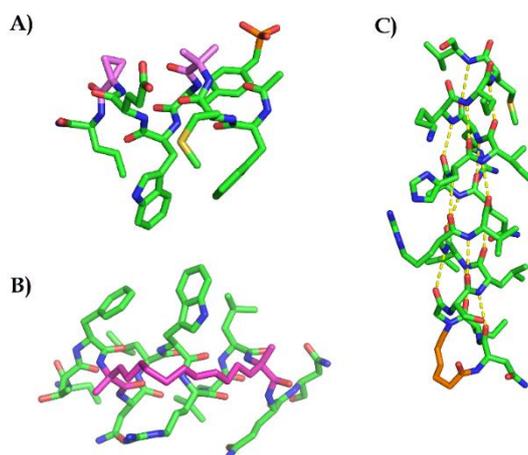


Figure I.31 : Structures cristallographiques : (A) du composé **I.26** analogue de p53 obtenu par l'introduction de résidus α,α -disubstitués (violet) (PDB ID : 3FE7) [153] ; (B) du composé **I.27**, analogue de myoA avec un lien HBS (orange) (PDB ID : 4MZL) [150] ; (C) du composé **I.28**, un « stapled (rose) peptide » analogue de p53 (PDB ID : 3V3B).[154]

Grâce à la modulation des propriétés pharmacologiques telles que la résistance à la protéolyse plasmatique et l'amélioration de la perméabilité cellulaire, certains des analogues peptidiques générés sont en train d'ouvrir la voie au développement d'inhibiteurs d'IPP.[147] Cependant, ces technologies bien que populaires ne permettent pas d'influer de manière prévisible ou systématique sur les propriétés comme la perméabilité cellulaire. Des approches complémentaires visant à mimer l'hélice α peptidique afin de moduler les IPP, basées sur l'utilisation de foldamères ont émergé dans les 10 dernières années. La chimie des foldamères a initié un profond changement dans le mimétisme des biopolymères, en montrant que des éléments de structure secondaires stables et isolés pouvaient être créés à partir d'une grande variété d'oligomères non-naturels. Deux stratégies principales ont été développées pour générer des inhibiteurs d'IPP à base de foldamères (**Figure I.32**). La première présente l'hélicité comme un principe directeur focalisé sur le squelette artificiel avec des paramètres d'hélice prédictibles et un grand degré de similarité avec les peptides. La deuxième, plus minimaliste, se concentre sur la projection des chaînes latérales et sur des squelettes rigides et étendus, ce sont des mimes topographiques,[155] assez éloignés des peptides naturels.

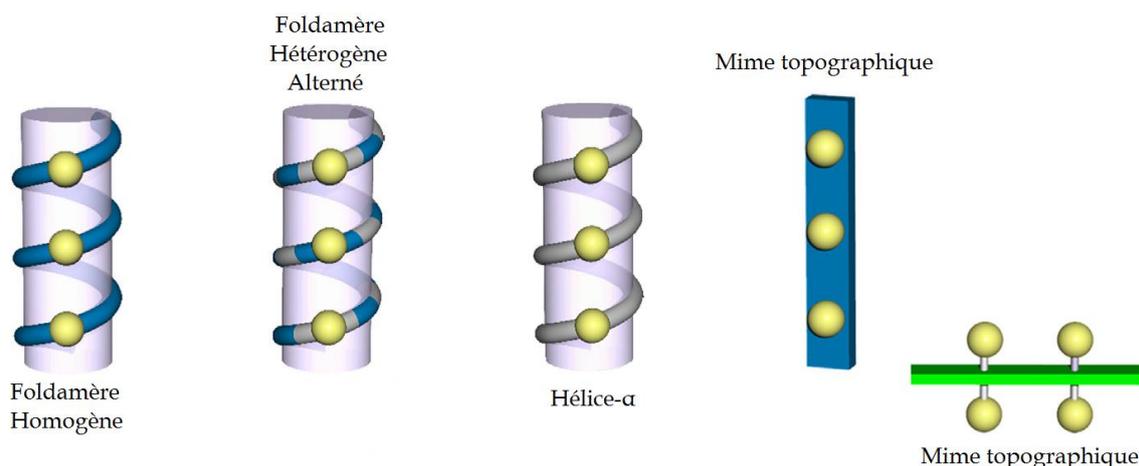


Figure I.32 : Représentation schématique des 2 stratégies permettant de concevoir des inhibiteurs d'interactions protéine/protéine.[114] La chaîne principale des résidus d'acides α -aminés a été représentée en gris, la chaîne principale des résidus non naturels a été représentée en bleu, et les chaînes latérales pour les différents types de résidus ont été représentées par des boules jaunes.

Dans le cadre de ce travail de thèse, qui porte sur la nucléation et la stabilisation d'hélices peptidiques, nous nous sommes focalisés sur la première stratégie. Grâce à la diversité des architectures à base de foldamères hybrides, des progrès remarquables dans le mimétisme des hélices α peptidiques bioactives ont été réalisés. On citera notamment l'inhibition de l'interaction des protéines de la famille BCL-2, l'inhibition du processus de fusion membranaire du virus de l'immunodéficience humaine, et la découverte d'agonistes du récepteur GLP-1.

1. BCL-2

La famille BCL-2 est un ensemble de protéines interagissant mutuellement et structurellement reliées qui régulent le sort de la cellule en activant ou en inhibant l'apoptose.[156] Les membres pro-survie BCL-2, BCL- x_L , MCL-1, BFL-1, et BCL-W inhibent l'apoptose en capturant l'hélice α responsable de la mort cellulaire incluse dans le domaine BH3 des membres pro-apoptotiques de la famille : les protéines BAX et BAK, via un sillon hydrophobe délimité par les domaines BH1 à BH3 des protéines pro-survie (**Figure I.33**). Les protéines BH3-only (BID, BIM, BAD, NOXA, PUMA, BIK) qui contiennent uniquement un domaine BH3 exercent un effet pro-apoptotique soit indirectement en se liant aux protéines pro-survies et inhibant l'interaction avec les protéines BAX et BAK, soit directement en se liant et en inactivant les protéines BAX et BAK pour causer une perméabilisation de la membrane mitochondriale.

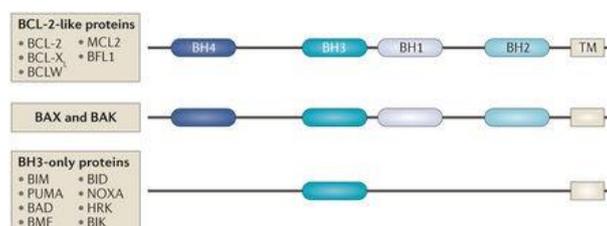


Figure I.33 : Schéma de la structure des protéines de la famille BCL-2.[157]

Parce que les protéines BCL-2 pro-survies sont surexprimées dans différents types de cancers, favorisant ainsi la survie des cellules malignes, leur inhibition sélective représente une approche prometteuse pour l'induction de l'apoptose dans les cellules tumorales. Ainsi différents mimes de BH3 sont en cours d'étude clinique.[157] Les structures à résolution

atomique des protéines BCL-2 pro-survies (BCL-X_L, MCL-1) en complexe avec les peptides, issus du domaine BH3, structurés en hélices α ont révélé de larges zones de contact entre 4 résidus hydrophobes situés sur une même face de l'hélice α peptidique de BH3 et un sillon hydrophobe à la surface du partenaire de liaison la protéine BCL-2 (**Figure I.34**). De plus, des interactions polaires ont été observées entre les chaînes latérales d'un acide aspartique et d'un résidu arginine conservé dans le domaine d'interaction de la protéine BH3.

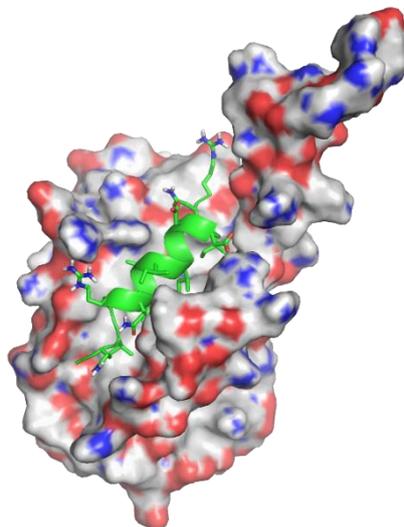
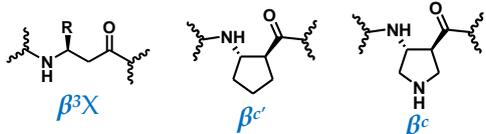


Figure I.34 : Structure cristallographique du complexe entre la protéine BCL-X_L et le peptide BH3 (PDB ID : 1BXL).[6]

Différentes stratégies basées sur l'utilisation de foldamères hybrides pour mimer les hélices α peptidiques issues du domaine BH3 et donc cibler les membres de la famille des protéines BCL-2 pro-survies, ont été reportées. Les principaux défis sont la longueur ainsi que la répartition des résidus hydrophobes clés distribués sur 4 tours de l'hélice peptidique bioactive **I.29** (**Figure I.35**) issue des résidus 73 à 81 du domaine BH3 de la protéine BAK. Cette séquence peptidique présente une bonne affinité pour la surface de la protéine BCL-X_L ($K_i = 2$ nM). De plus, les résidus impliqués dans l'interaction avec la surface des protéines BCL-2 pro-survies sont situés sur 2 faces de l'hélice, les résidus hydrophobes (Val2, Leu6, Ile9, Ile13) répartis sur une face et la chaîne latérale de l'acide aspartique (Asp12) présente sur une autre face, ce qui augmente le niveau de complexité du mimétisme de cette hélice α peptidique. Une première approche développée par le groupe de Gellman consiste à utiliser des hélices peptidiques hybrides 1 : 1 α/β afin de mimer la projection et la répartition des chaînes latérales du peptide **I.29**. Cette démarche a abouti au développement de composés possédant une faible affinité pour la surface de la protéine BCL-X_L. Ces résultats illustrent la difficulté à identifier une architecture appropriée permettant de mimer fidèlement l'hélice α .

Gellman a ensuite décidé de réduire le segment foldamérique à seulement une partie du peptide **I.29** pour générer des peptides chimères ($\alpha\beta+\alpha$). Il a positionné le segment hybride 1 : 1 α/β à l'extrémité N-terminale du peptide, ce qui a conduit à une amélioration significative de l'interaction du composé **I.30** avec la surface de la protéine BCL-X_L ($K_i = 2$ nM).[158] La structure cristallographique du peptide α/β **I.30** en complexe avec la protéine BCL-xL (**Figure I.35**) a montré que le foldamère conserve le mode d'interaction général du peptide **I.29**. De plus, le segment α/β forme une structure en hélice 14/15 dans laquelle certains résidus cycliques d'acides β -aminés : ACPC, créent des contacts avec la surface de la protéine BCL-X_L.

| Composé | Résidus β | Séquence |
|---------|---|---|
| I.29 | -- | Ac-QVGRQLAIIGDDINR-NH ₂ |
| I.30 |  | Ac- β^c V β^c R β^c L β^c K β^3 LGDAFNR-NH ₂ |

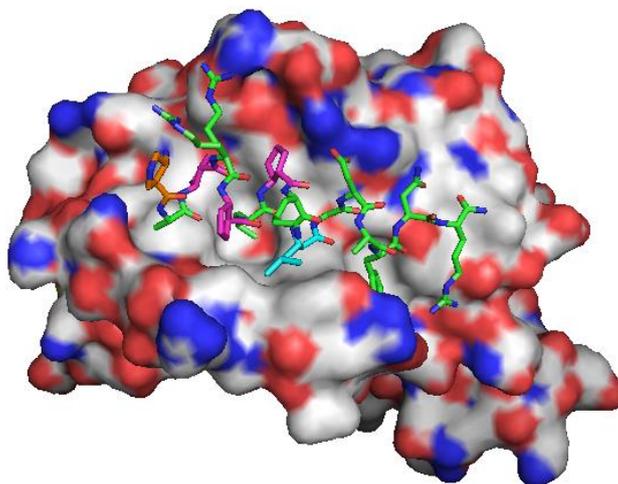
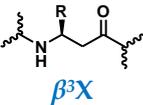
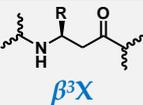


Figure I.35 : (haut) Tableau récapitulatif de la séquence du peptide **I.29** et peptide hybride **I.30** ainsi que les structures des résidus β . (bas) Structure cristallographique du complexe entre la protéine BCL-X_L et le composé **I.30** (PDB ID : 3FDM). Les atomes de carbone des résidus d'acides α -aminés du peptide sont représentés en vert [159]

Dans une approche plus générale, Gellman a de nouveau utilisé les motifs de répétitions $\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha\alpha\beta$, et $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$, décrits précédemment, pour mimer l'hélice α . [122] Plusieurs peptides α/β dérivés d'une portion du domaine BH3 de la protéine BIM comme les composés **I.32** (motif de répétition : $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$) et **I.33** (motif de répétition : $\alpha\alpha\alpha\beta$) se sont révélés être des ligands de la protéine BCL-X_L. [160][161][162] Les structures cristallographiques des peptides α/β **I.32** et **I.33** en complexes avec la protéine BCL-X_L confirment la capacité de ces composés de se lier via le même mode d'interaction que le peptide **I.31** à la surface de BCL-X_L (**Figure I.36**). Néanmoins ces deux peptides α/β ne possèdent pas la même propension à se lier à la surface de BCL-X_L (composé **I.32** : IC₅₀ = 1005 nM et composé **I.33** : IC₅₀ = 21 nM). [163] Cette différence peut s'expliquer par la différence de distribution des résidus β . Les résidus β , présents dans la séquence du composé **I.32**, sont alignés le long d'une même face de l'hélice et dirigés vers le solvant. Les 4 chaînes latérales hydrophobes clés de l'interaction avec la surface de BCL-X_L, apportées par des résidus d'acides α -aminés, sont situées sur une même face. A contrario, le motif $\alpha\alpha\alpha\beta$ utilisé dans le composé **I.33**, provoque la répartition en spirale des résidus β autour de l'axe de l'hélice. Deux résidus β^3 contribuent aux interactions hydrophobes clés avec le site de liaison à la surface de BCL-X_L (e.g., β^3 -Ile et β^3 -Phe14).

| Composé | Résidus β | Motif de répétition | Séquence |
|---------|---|--------------------------------------|--|
| I.31 | -- | | Ac-IWIAQELRRIGDEFNAYY-NH ₂ |
| I.32 |  | $\alpha\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ | Ac-I β^3 WIAQ β^3 ELR β^3 RIGD β^3 EFN β^3 AYY-NH ₂ |
| I.33 |  | $\alpha\alpha\beta$ | Ac-I β^3 WIAQ β^3 ELRR β^3 IGDE β^3 FNAY β^3 Y-NH ₂ |

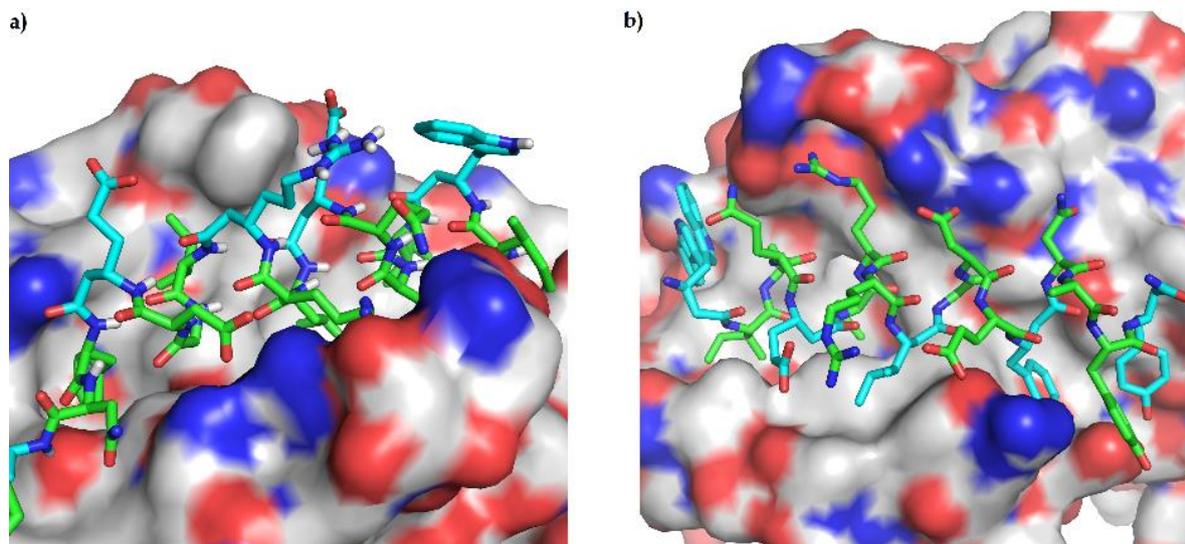


Figure I.36 : (haut) Tableau récapitulatif des séquences du peptide **I.31** et des séquences hybrides **I.32** et **I.33** ainsi que la structure des résidus β . (bas) Structures cristallographiques des complexes : (a) BCL-X_L/composé **I.32** (résidus β^3 : bleus) (PDB ID : 4A1U) [163] ; (b) BCL-X_L/composé **I.33** (résidus β^3 : bleus) (PDB ID : 4A1W).[163]

La substitution de résidus- β^3 par des résidus β cycliques contraints dans la séquence des peptides α/β **I.32** et **I.33** conduit à une amélioration quasiment systématique de l'interaction avec la surface de la protéine BCL-X_L mais également de la protéine MCL-1.[164] De façon intéressante, les ligands extrêmement sélectifs (soit de la protéine BCL-X_L, soit de la protéine MCL-1) ont été obtenus à partir du composé **I.33**, en remplaçant les β^3 par des β cycliques aux positions en contact avec la surface de la protéine BCL-X_L (e.g., β^3 -Phe14 \rightarrow β^c multiplie par 30 l'affinité de liaison pour la surface de la protéine MCL-1).[164] De plus, le remplacement global des résidus β^3 par des résidus β cycliques dans la séquence du peptide α/β **I.32** a conduit à l'obtention d'un ligand très puissant **I.34** (**Figure I.37**) sélectif des protéines BCL-X_L et MCL-1 avec une protection améliorée contre l'activité des protéases (temps de demi-vie 120 fois supérieur à celui du peptide **I.31** en présence de protéase K).[164]

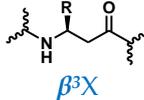
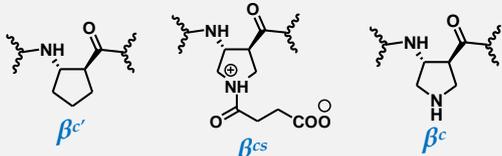
| Composé | Résidus β | Séquence |
|---------|---|---|
| I.31 | -- | Ac-IWIAQELRRIGDEFNAYY-NH ₂ |
| I.32 |  | Ac-I β^3 WIAQ β^3 ELR β^3 RIGD β^3 EFN β^3 AYY-NH ₂ |
| I.34 |  | Ac-I β^c IAQ β^{cs} LR β^c IGD β^{cs} FN β^c YY-NH ₂ |

Figure I.37 : Séquences du peptide I.31, des composés analogues I.32, I.34 ainsi que les structures des résidus β associés.

2. Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

L'infection des cellules cibles par le VIH-1 est médiée par la glycoprotéine de l'enveloppe virale (Env) et les récepteurs de la surface cellulaire (CD4 et un co-récepteur comme CXCR4 ou CCR5) (**Figure I.38**).[165] Le complexe mature Env est un trimère, comportant trois glycoprotéines gp120 associées de manière non covalente avec trois sous-unités gp41 ancrées dans la membrane. La liaison de gp120/gp41 aux récepteurs cellulaires déclenche une série de changements conformationnels dans gp41 qui aboutit à la formation d'une structure en hairpins constituée de trois unités et à la fusion des membranes.[166][167][168] Ces changements conformationnels mènent à l'exposition d'un premier domaine de répétition en heptade (HR1) et l'insertion d'un peptide de fusion dans la membrane cellulaire. Par la suite, dans un autre changement majeur de conformation, un deuxième domaine de répétition en heptade (HR2) se replie sur HR1 pour former une structure stable en faisceau de 6 hélices qui juxtapose le virus et la membrane cellulaire pour la fusion des membranes.

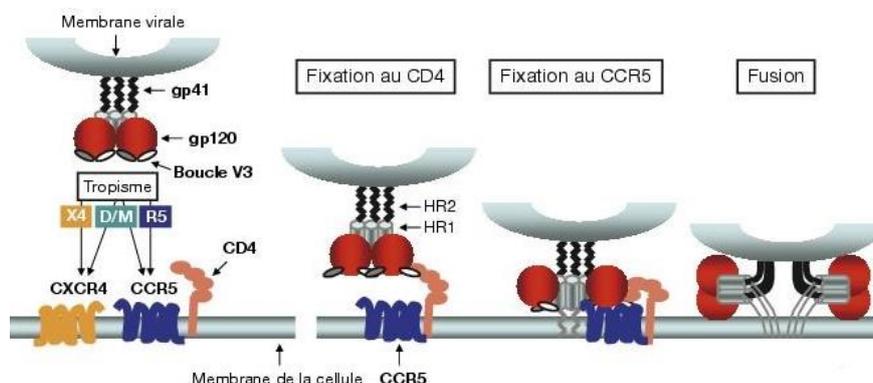


Figure I.38 : Schéma du mécanisme de fusion de la membrane virale du VIH avec les membranes cellulaires.[169]

Le cœur de l'assemblage formé post-fusion par trois motifs de type « hairpins », se structure en faisceau de six hélices : trois peptides N structurés en hélices, forment l'intérieur du faisceau à trois hélices parallèles (HR1), tandis que les trois peptides C structurés en hélices, s'assemblent de manière antiparallèle via des interactions entre chaînes latérales hydrophobes (HR2) (**Figure I.39**).[166][167][168] Le peptide N présente une poche hydrophobe ciblée par les résidus du peptide C : W628, W631 et I635.[170]

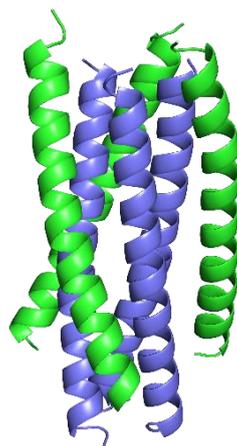


Figure I.39 : structure cristallographique des domaines HR1 (bleu) et HR2 (vert) de la glycoprotéine gp41 (PDB ID : 2SIV).[171]

Le développement réussi de l'enfuvirtide, un peptide constitué de 36 résidus qui cible de manière transitoire le domaine HR1 de la glycoprotéine gp41 pour le traitement de l'infection HIV,[172] a établi l'intérêt thérapeutique des approches à base de peptides visant à inhiber l'assemblage de ce faisceau à 6 hélices. Des désavantages sont associés à l'utilisation des séquences peptidiques naturelles du domaine HR2 comme par exemple une protéolyse rapide *in vivo*, l'apparition de résistances ainsi qu'une réactivité croisée avec les anticorps du patient. Différentes approches chimiques comme la macrocyclisation [106][173] et des modifications au niveau du squelette[98] ont été explorées afin d'augmenter le temps de demi-vie dans l'organisme de l'inhibiteur de fusion peptidique. Cependant les composés générés par ce type d'approches sont actifs à des concentrations de l'ordre du micro-molaire, limitant le développement de ces composés comme candidats médicaments. Afin de pallier ce problème, Gellman et son équipe ont choisi de mimer la séquence du peptide **I.35**, un analogue peptidique optimisé de l'enfuvirtide,[174] pour inhiber la formation post-fusion de l'assemblage du faisceau à 6 hélices, en utilisant un remplacement périodique d'acides α -aminés par des acides β -aminés résistants à la protéolyse. Afin de localiser l'ensemble des résidus- β sur la même face de l'hélice, non impliquée dans l'interaction avec la surface du trimère HR1, le motif de répétition $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$, décrit précédemment, a été inséré sur l'ensemble de la séquence du peptide **I.35**. Différents résidus- β ont été être utilisés : des résidus β^3 substitués mais également des résidus β cycliques. Des expériences de compétition par polarisation de fluorescence ont permis de mesurer la constante de dissociation de l'assemblage. Le composé **I.37** pourvu de résidus β cycliques mais également de résidus β^3 a été identifié comme étant beaucoup plus efficace ($K_i = 9$ nM) que le composé **I.36** qui contient exclusivement des remplacements à base de résidus β^3 ($K_i = 3800$ nM), suggérant la nécessité de pré-structurer l'hélice (**Figure I.40**). Ces résultats vont dans le sens des études menées par Gellman sur la séquence du peptide modèle **I.14**, formant des auto-assemblages en milieu aqueux, précédemment décrits.[123] Remarquablement, le peptide α/β **I.37** s'est avéré être équipotent au peptide **I.35** dérivé de HR2, au niveau des expériences d'inhibition de fusion cellulaires ($IC_{50} = 5$ nM) ainsi que dans l'inhibition de l'infection au HIV (souches virales X4 et R5, $IC_{50} = 28-110$ nM). De plus il affiche une stabilité à la protéolyse 280 fois supérieure à celle du peptide **I.35**. La structure cristalline du composé **I.37** en complexe avec le peptide HR1 (PDB ID : 3F50) a confirmé la formation du faisceau à six hélices espéré ainsi que l'orientation des résidus d'acides β -aminés vers le solvant comme prédit (**Figure I.40**).[175]

| Composé | Séquence |
|-------------|--|
| I.35 | Ac-TTWEAWDRAIAEYAAARIEALIRAAQQEQKNEAALREL-NH ₂ |
| I.36 | Ac- β^3 TTWE β^3 AWD β^3 RAIA β^3 EYA β^3 ARIE β^3 ALI β^3 RAAQ β^3 EQQ β^3 EKNE β^3 AAL β^3 REL-NH ₂ |
| I.37 | Ac- β^3 TTWE β^c WD β^c AIA β^3 EYA β^c RIE β^c LI β^c AAQ β^3 EQQ β^3 EKNE β^c AL β^c EL-NH ₂ |

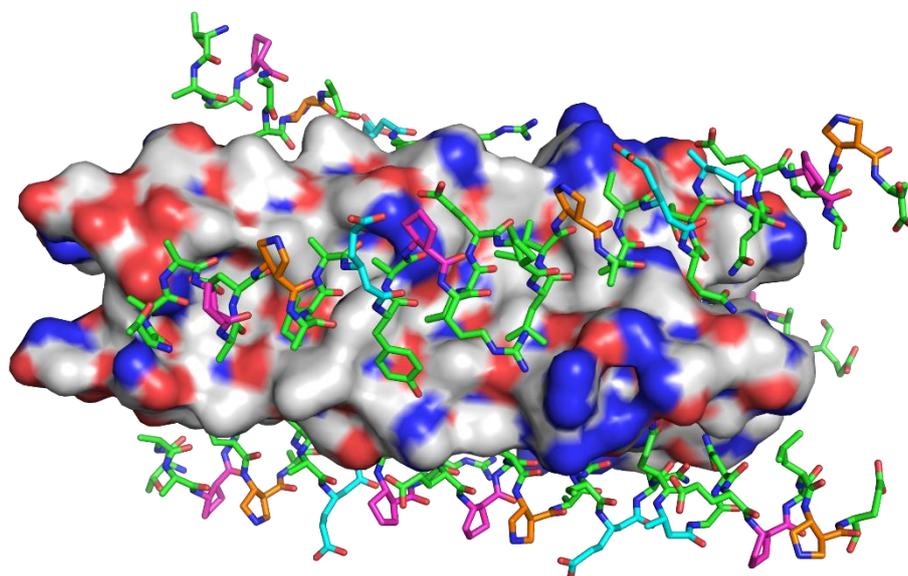


Figure I.40 : (haut) Séquences des composés : **I.35**, **I.36**, **I.37**. (bas) Structure cristallographique du complexe HR1/composé **I.37** (PDB ID : 3F50). [175]

L'introduction de paires de résidus β^3E/β^3R avec un espacement entre les résidus $i, i+4$ dans l'hélice peptidique α/β a par la suite été identifié comme étant tout aussi approprié que les résidus β cycliques pour augmenter la propension du composé **I.39** (**Figure I.41**) à se structurer en hélice, se liant au trimère HR1, et inhibant l'infection par le VIH dans les expériences cellulaires in vitro. Cependant, sa stabilité à la protéolyse n'a pas été notablement améliorée par rapport à celle du peptide **I.38** apparenté (**Figure I.41**). La substitution de 3 résidus β^3 par des résidus β^c APC cycliques à proximité des sites de clivage de la protéase K dans la séquence du peptide α/β **I.39**, conduit au composé **I.40** (**Figure I.41**), et à une amélioration spectaculaire du temps de demi-vie ainsi qu'une liaison accrue au trimère HR1.

| Composé | Séquence |
|-------------|--|
| I.38 | Ac-RTWEEWDRAIAEYARRIEELIRAAQQEQQRKNEEALREL-NH ₂ |
| I.39 | Ac- β^3 RTWE β^3 EWD β^3 RAIA β^3 EYA β^3 RRIE β^3 ELI β^3 RAAQ β^3 EQQ β^3 RKNE β^3 EAL β^3 REL-NH ₂ |
| I.40 | Ac- β^3 RTWE β^3 EWD β^3 RAIA β^3 EYA β^3 RRIE β^3 ELI β^c AAQ β^3 EQQ β^c KNE β^3 EAL β^c EL-NH ₂ |

Figure I.41 : Séquences du peptide **I.38** et des composés analogues **I.39** et **I.40**.

3. Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1)

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) jouent un rôle physiologique essentiel dans la transmission des informations codées par les molécules extracellulaires au cytoplasme. La transduction du signal nécessite l'interaction d'un RCPG activé avec des protéines partenaires intracellulaires, qui peuvent être des protéines G (G_{α_s} , G_{α_i} , G_{α_q} , etc.), la β -arrestin-1, et la β -arrestin-2 (**Figure I.42**). Chacune de ces protéines effectrices stimule une ou plusieurs voies de signalisation. G_{α_s} , par exemple, conduit à la production du second messenger l'AMPc, G_{α_q} conduit à la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire, et les β -arrestins dirigent l'internalisation du récepteur et/ou servent de scaffolds pour la signalisation indépendante de la protéine

G.[176][177][178] La structure des RCPG est dynamique. Chaque protéine effectrice se lie à une conformation unique du récepteur.[179][180] Les ligands des RCPG qui favorisent l'engagement de certaines protéines effectrices par rapport à d'autres, appelés agonistes « conformationnellement sélectifs » ou « polarisés », sont censés favoriser un sous-ensemble parmi les conformations RCPG activées. [181][182][183]

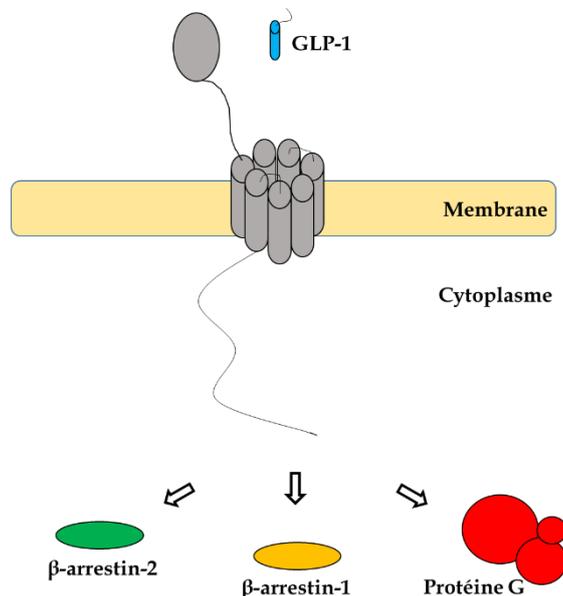


Figure I.42 : Schéma du fonctionnement des récepteurs couplés aux protéines G.

Le récepteur du glucagon-like peptide 1 (GLP-1R) est un membre de la sous-classe B des RCPG, activés par de longues hormones polypeptidiques. Le GLP-1R est principalement exprimé dans les cellules β pancréatiques, qui sécrètent de l'insuline pour réguler la concentration de glucose dans la circulation sanguine. Ce récepteur peut être engagé par de multiples peptides endogènes, comprenant au moins six formes de GLP-1. Les formes complètes, GLP-1(1-36)-NH₂ et GLP-1(1-37), sont considérées comme des agonistes faibles ou des antagonistes du GLP-1R.[184] Les formes matures, GLP-1(7-36)-NH₂ et GLP-1(7-37) sont des agonistes puissants; ces deux formes affichent une activité identique.[184][185] Après la libération dans le flux sanguin, les formes matures de GLP-1 sont rapidement clivées par les protéases systémiques.[184] La liaison de GLP-1 au GLP-1R active la protéine G_s induisant ainsi une augmentation de l'AMPc intracellulaire, ce qui conduit à une sécrétion d'insuline stimulée par le glucose.[186]

Des agonistes peptidiques synthétiques de GLP-1 ont été développés pour traiter le diabète de type II en améliorant la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose à partir de cellules β pancréatiques (**Figure I.43**). L'exendin-4, par exemple, une composante du venin du monstre de Gila (une espèce de lézard), fonctionne comme un puissant agoniste de ce récepteur.[187] Il en est de même pour le liraglutide développé par la société Novo Nordisk, presque identique en séquence au peptide GLP-1(7-37), mais pourvu d'un groupe hexadécanoylé sur la chaîne latérale de la Lys-26.[188] Cet appendice favorise la liaison à l'albumine du sérum, ce qui protège le liraglutide du clivage à la DPP-4 et améliore considérablement sa durée de vie dans le flux sanguin.[189]

| Composé | Séquence |
|-------------|--|
| GLP1(7-37) | H-HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG-OH |
| Liraglutide | H-HAEGTFTSDVSSYLEGQAAK(γ -Glu-Palmitoyl)EFIAWLVRGRG-OH |
| Exendin-4 | H-HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-OH |

Figure I.43 : Séquences des peptides : GLP-1 (7-37), exendin-4 et liraglutide. Les acides aminés surlignés en gris soulignent les différences structurelles entre les séquences de l'exenatide et du liraglutide avec la séquence de GLP-1(7-37).

Afin de développer des analogues de GLP-1 résistants à la protéolyse, Gellman a synthétisé une série de peptides α/β . Les segments C-terminaux des peptides agonistes des RCPG de la famille B adoptent une structure en hélice α lorsqu'ils sont liés à leurs récepteurs.[190] La structure cristallographique de GLP-1(10-35) en complexe avec la partie extracellulaire du GLP-1R (**Figure I.44**), souligne la capacité du peptide GLP-1(10-35) à adopter une structuration en hélice continue du résidu Thr13 au résidu Val33. La face hydrophobe de l'hélice α de GLP-1(10-35) interagit avec le domaine extracellulaire du GLP-1R via les résidus Phe28, Ile29, et Leu32 dont la contribution essentielle a été précédemment démontrée par des expériences d'«Ala-scan».[191] De plus, le résidu Val33, dernier résidu impliqué dans l'hélice α de GLP-1(10-35) interagit avec le domaine extracellulaire du GLP-1R via des interactions hydrophobes mais également par la formation d'une liaison hydrogène entre le carbonyle du lien amide du résidu Val33 et le NH porté par la chaîne latérale de l'Arg121 du GLP-1R.

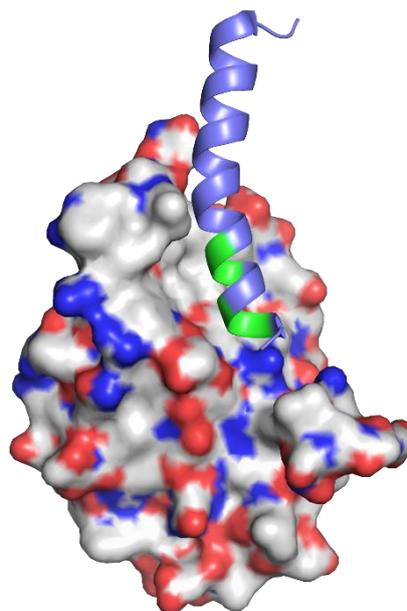


Figure I.44 : Structure cristallographique de GLP-1(10-35) en complexe avec le domaine extracellulaire du GLP-1R (PDB ID : 3IOL).[190] Les résidus du peptide GLP-1(10-35) impliqués dans l'interaction avec le domaine extracellulaire de GLP-1R ont été colorés en vert.

Les peptides α/β possèdent la capacité d'adopter des structures bien définies mimant celle de l'hélice α peptidique tout en étant résistants à la protéolyse plasmatique. Le peptide GLP-1(7-37)-NH₂ puissant agoniste du GLP-1R, possède un EC₅₀ de 1.6 nM.[192][185] Par convention, le résidu N-terminal de GLP-1 natif est désigné par la position 7. L'insertion systématique de ponts lactames entre les chaînes latérales des résidus $i/i+4$ a montré que les résidus Ser18, Gly22, Lys26 et Ala30 ne sont pas impliqués dans des interactions clés avec GLP-1R.[193][194] Gellman et son équipe ont donc choisi d'utiliser le motif $\alpha\alpha\alpha\beta$, décrit précédemment, en substituant les résidus- α Lys26, Ala30 et Lys34 par leurs équivalents β^3 . Afin d'évaluer l'EC₅₀ de chaque composé pour activer le GLP-1R, la production d'AMPC a été

mesurée in cellulo.[194][195] Le peptide GLP-1(7-37)-NH₂, comme nous l'avons décrit précédemment est un agoniste puissant de GLP-1R, contrairement au peptide α/β **I.42** qui possède un EC₅₀ supérieur à 100 nM. Cette tendance est attribuée au degré supplémentaire de flexibilité de torsion dans un résidu β^3 , décrit précédemment dans ce chapitre, et qui augmente le coût entropique de la formation d'hélice.[196] Le remplacement des résidus β^3 par des résidus β cycliques, générant le composé **I.43**, permet de restaurer l'activité agoniste avec un EC₅₀ de 0.7 nM pour GLP-1R (**Figure I.45**). L'extension du motif $\alpha\alpha\beta$ vers l'extrémité N-terminale de la séquence du peptide GLP-1(7-37)-NH₂ a été réalisée via la substitution progressive des acides α -aminés Gly22, Ser18 et Ser14 par des résidus β cycliques. Les peptides α/β contenant 4 ou 5 substitutions $\alpha \rightarrow \beta$ cycliques sont de puissants agonistes du GLP-1R, possédant des EC_{50s} de 2 nM pour le composé **I.44** et de 4 nM pour le composé **I.45** (**Figure I.45**). En revanche, l'introduction de 6 modifications $\alpha \rightarrow \beta$ cycliques diminue de façon drastique l'activité du composé **I.46** (**Figure I.45**). C'est un résultat surprenant compte tenu des expériences d'« Ala-scan » réalisées sur la séquence du peptide GLP-1(7-37)-NH₂ qui ont montré que le remplacement du résidu Ser14 par un résidu Ala n'affectait pas son activité agoniste pour GLP-1R.[191]

Des expériences de dégradation enzymatique ont été réalisées pour déterminer l'impact de l'insertion de résidus- β cycliques sur la stabilité des peptides α/β face aux protéases plasmatiques. La protéolyse de GLP-1 est dirigée principalement par deux enzymes, la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4),[197] qui clive spécifiquement après le résidu Ala8 et la neprilysine (NEP 24.11), qui clive après les résidus Asp15, Ser18, Tyr19, Glu27, Phe28, et Trp31.[198] La cinétique de dégradation de GLP-1 in vivo est extrêmement rapide, de l'ordre de quelques minutes.[197][198] L'insertion des résidus- β cycliques aux positions 34, 30, 26, 22, 18 protège la quasi-totalité des potentiels sites de clivage de la NEP 24.11 à l'exception de celui situé entre les résidus Asp15-Val16. Le remplacement du résidu Ala8 par un Aib bloque l'activité de la DPP-4 sans affecter l'activité agoniste du peptide vis-à-vis du GLP-1R.[199] Le peptide α/β **I.47**, qui contient les 5 substitutions $\alpha \rightarrow \beta$ du composé **I.45** ainsi que le remplacement des résidus Ala8 et Val16 par des résidus Aib, est un agoniste puissant du récepteur GLP-1 (**Figure I.45**). De plus, cet analogue α/β peptidique a montré une grande résistance à la dégradation enzymatique (DPP-4 et NEP 24.11), lors d'expériences réalisées in vitro.

| Composé | Séquence | EC50 |
|-----------------------------|--|----------|
| GLP-1(7-37)-NH ₂ | H-HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG-NH ₂ | 1.6 nM |
| I.42 | H-HAEGTFTSDVSSYLEGQAA β^3 KEFI β^3 AWL β^3 VKGRG-NH ₂ | > 100 nM |
| I.43 | H-HAEGTFTSDVSSYLEGQAA β^c EFI β^c WL β^c KGRG-NH ₂ | 0.7 nM |
| I.44 | H-HAEGTFTSDVSSYLE β^c QAA β^c EFI β^c WL β^c KGRG-NH ₂ | 2.0 nM |
| I.45 | H-HAEGTFTSDV β^c YLE β^c QAA β^c EFI β^c WL β^c KGRG-NH ₂ | 4.0 nM |
| I.46 | H-HAEGTFT β^c DV β^c YLE β^c QAA β^c EFI β^c WL β^c KGRG-NH ₂ | > 100 nM |
| I.47 | H-HAibEGTFTSDAib β^c YLE β^c QAA β^c EFI β^c WL β^c KGRG-NH ₂ | 3.2 nM |

Figure I.45 : Séquences du peptide **I.41** et des composés analogues **I.42**, **I.43**, **I.44**, **I.45**, **I.46**, **I.47**.

Des expériences in vivo de tolérance au glucose, sur des modèles murins, ont mis en évidence l'activité agoniste du composé **I.47**, 5 heures après avoir été injecté dans la souris. Ces résultats reflètent la résistance des peptides α/β à la protéolyse systémique.

L'approche par insertion ponctuelle de résidus d'acides β -aminés, décrite précédemment, met en évidence de véritables points forts pour concevoir des analogues d'hélices α qui conservent la capacité à interagir avec leur partenaire protéique cible tout en améliorant de façon remarquable leur stabilité face à la protéolyse plasmatique. Néanmoins

les substitutions $\alpha \rightarrow \beta$ ne sont pas sans impact sur la structuration des composés analogues résultants. En effet, le nombre, la localisation, l'espacement, et la nature des substitutions réalisées sur la séquence peptidique nécessite un travail d'optimisation très fin pour chaque composé afin de conserver une activité biologique comparable à celle du peptide d'origine. Pour concevoir une approche plus systématique, nécessitant moins de temps d'optimisation, nous nous sommes penchés sur l'utilisation de foldamères insérés aux extrémités N- ou C-terminales des hélices peptidiques. Cette approche de type « *capping* » permettrait d'amorcer et de stabiliser la structuration en hélice du segment peptidique adjacent sans induire de modifications structurales au cœur de la portion peptidique.

III. Historique et objectifs de la thèse

1. Les Oligourées

a. Rappel historique sur les oligourées

Les oligomères aliphatiques, comportant des liens urées entre des unités de type éthylène diamine, ont pour la première fois été décrits en 1995 par Burgess et son équipe. [200][201] Ces foldamères de type oligourées N, N'-liées sont des aza-analogues de γ -peptides dans lesquels le motif amide ($\text{CH}_2\text{-CO-NH}$) a été substitué par une liaison urée (NH-CO-NH). Les liens amide et urée partagent certaines caractéristiques communes : la rigidité, la planéité, la polarité ainsi que la capacité à former des liaisons hydrogène. Cependant, des différences notables entre ces deux motifs de liaison ont également été mises en évidence : le moment dipolaire du motif urée supérieur à celui de l'amide, [202] le caractère de double liaison plus faible du lien urée, et la barrière d'énergie de rotation moins élevée pour l'urée (de 10 à 12 kcal.mol⁻¹ contre 16 à 20 kcal.mol⁻¹ pour les liens amides). Les oligomères à base de liens urées possèdent, pour chaque motif de liaison, un carbonyle accepteur de liaisons hydrogène et deux NHs donneurs de liaisons hydrogène. Ce qui constitue un NH supplémentaire susceptible de former une liaison hydrogène additionnelle par rapport aux motifs de liaison homologues oligoamides. La capacité des foldamères d'oligourées à se replier pour former des structures compactes et bien définies, mimant le repliement des éléments de structure secondaire des protéines a été étudiée de façon approfondie par notre laboratoire. Des études structurales en solution [203][204][205][206] et à l'état solide [207][208] soulignent la propension des oligourées N, N'-liées, générées à partir de monomères dérivés des acides α -aminés de configuration (L), à adopter une structuration en hélice 2.5 droite apparentées à l'hélice-(P)-2.6₁₄ des peptides- γ (**Figure I.46**). L'atome d'azote supplémentaire des liens urées agit comme un élément de rigidification permettant la formation d'un réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires à 3 centres de type $\text{C=O}_i \dots \text{HN}_{i-2}$ et $\text{C=O}_i \dots \text{HN}_{i-3}$ qui ferment des pseudocycles à 12 et 14 atomes.

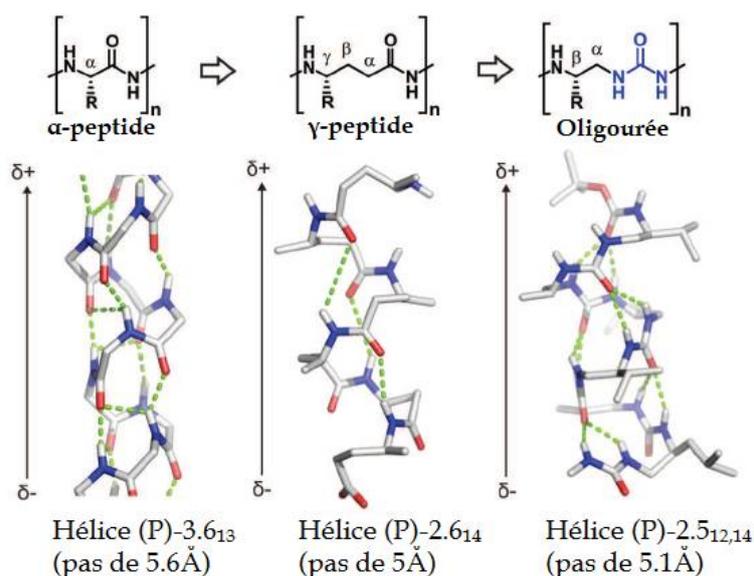


Figure I.46 : Comparaison des structures cristallines d'une hélice de α -peptide, de γ -peptide [209] et d'oligourée.[210]

Afin de caractériser ces structures hélicoïdales en solution différentes méthodes d'analyses structurales ont été utilisées. Les études en solution par spectroscopie RMN, réalisées dans différents solvants de modérément polaires à polaires, ont tout d'abord montré que les signaux correspondants aux NHs des motifs urées étaient fortement dispersés (tout particulièrement dans la pyridine et AcCN) et ce dans une large gamme de température (0-80 °C pour les études dans la pyridine). De plus, l'arrangement anti-périplanaire des protons NH et β CH de la chaîne principale, a été caractérisé grâce à l'obtention de valeurs de constantes de couplage vicinales 3J (NH, β CH) élevées (\approx 9-10 Hz). De la même façon, une différenciation forte des deux constantes de couplage 3J (NH, α CH) reflète une organisation préférentielle autour de la liaison N'- α C (**Figure I.47a**) Enfin, une forte diastéréotopie des protons α CH₂ déterminée par une différence de déplacement chimique, allant jusqu'à 1,5 ppm est observée pour les résidus centraux dans l'hélice (**Figure I.47c**). Les corrélations NOE à moyenne distance (de type $i/i+2$ et $i/i+3$) répétées sur toute la longueur de la séquence oligourée, sont caractéristiques d'une structure en hélice. Ces données ont été utilisées pour établir un modèle tridimensionnel de l'hélice 2.5 d'oligourée (**Figure I.47b**). D'autres caractéristiques conformationnelles, propres aux oligourées, peuvent être mentionnées [211] comme par exemple la capacité de courtes oligourées, 4 à 5 unités, à amorcer leur repliement en hélice dans des solvants à basse polarité. En revanche, si l'oligomère est plus petit alors ce sont les liaisons hydrogène intermoléculaires qui sont favorisées, pouvant conduire à la formation de structures probablement étendues et agrégées. Des études ont également mis en évidence la stabilité accrue de l'hélice 2.5 générée par l'acylation de l'extrémité N-terminale de l'oligourée. En effet, le « capping » de l'extrémité N-terminale, par insertion d'un motif de type alkyle urée, apporte un premier groupement accepteur de liaisons hydrogène, supprimant les interactions électrostatiques répulsives entre la charge à l'extrémité N-terminale et le macrodipôle de l'hélice. La structuration des oligourées, qui a été caractérisée dans différents environnements de solvation : protique et aprotique polaire (pyridine > MeCN > MeOH > DMSO), est maximum lorsque l'oligomère est en solution dans un environnement de basse polarité comme la pyridine. L'analyse des oligomères à base de liens urées par CD, en solution dans le TFE (et le MeOH ou encore le MeCN) a mis en évidence une signature caractéristique de l'hélice 2.5 d'oligourée qui possède un minimum d'ellipticité négative à 188 nm et un maximum d'ellipticité positive à 203 nm dont l'intensité par résidu est fonction de la longueur de la chaîne (**Figure I.47d**).[204] De plus, les résultats obtenus en solution ont pu être confirmés

α par la résolution de différentes structures cristallographiques obtenues par diffraction des rayons X.[207][208]

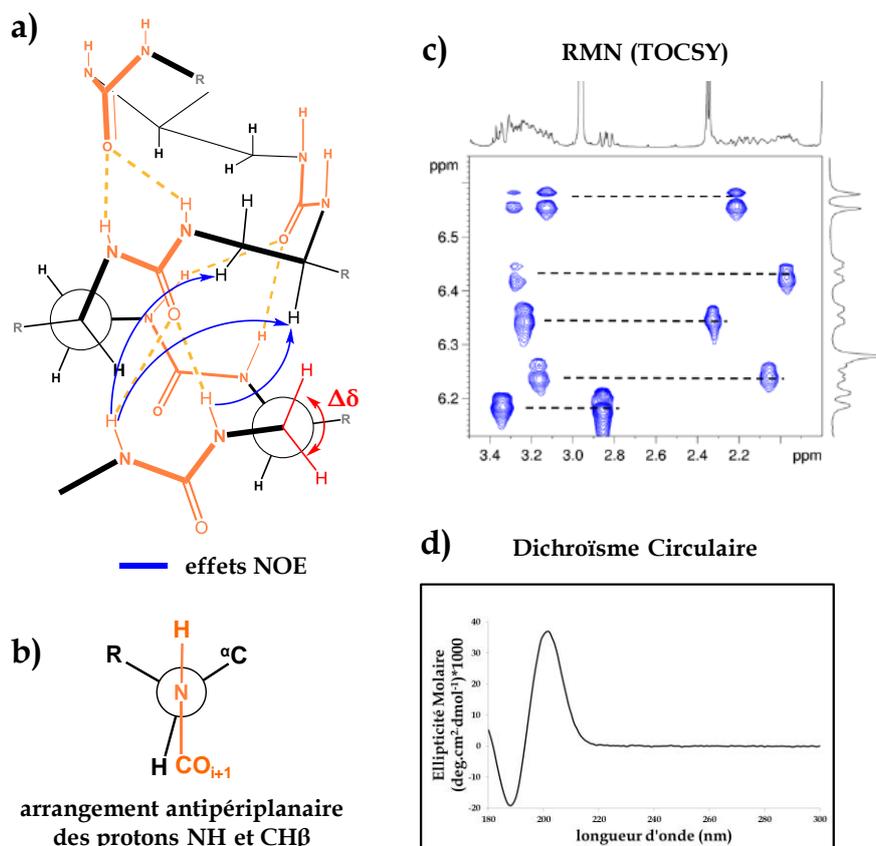


Figure I.47 : (a) Informations structurales obtenues par spectroscopie RMN du proton : connectivités NOE caractéristiques de l'hélice d'oligourée (en orange sur un schéma simplifié de l'hélice d'oligourée) ; (b) arrangement anti-périplanaire observé par RMN des protons NH et βCH ; (c) Ecarts de déplacement chimique entre les protons αCH_2 diastérotopiques d'une séquence oligourée observés sur un spectre TOCSY dans le CD_3OH ; (d) Spectre de CD d'une hélice d'oligourée dans le TFE (séquence modèle Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe à 0,2 mM).

Des études plus récentes ont aussi mis en évidence la compatibilité de résidus acycliques ou cycliques non canoniques (*cis*-diaminocyclohexane, résidus avec la chaîne latérale déplacé sur le βC , résidus achiraux) avec la formation d'une hélice régulière.[212] Cette hélicité s'est également avérée être relativement indépendante de la nature des chaînes latérales utilisées, fonctionnalisées ou non, rendant les foldamères d'oligourée particulièrement robustes et adaptables. De plus, des études de spectroscopie CD sur des oligourées solubles en tampon salin à pH 7,4 soulignent leur capacité à former une hélice stable en solution aqueuse, même si la propension de repliement observée est plus faible.[213] Leur conception a été principalement inspirée par les séquences de peptides bioactifs, et ces foldamères ont montré des activités intéressantes en tant que mimes de peptides antimicrobiens ou de peptides pénétrants les cellules (CPPs).[214][213][215] En raison de sa modularité, de sa stabilité structurale et de sa résistance à la protéolyse, cette nouvelle plateforme hélicoïdale présente un très fort potentiel pour la conception de mimes d'hélices peptidiques particulièrement pertinents dans un contexte thérapeutique. Cependant, dans le cadre de la conception d'inhibiteurs d'IPPs, l'emploi d'un squelette hélicoïdal oligourée caractérisé par la projection d'un nombre plus restreint de chaînes latérales (2.5 résidus par tour versus 3.6 pour l'hélice α) en comparaison d'un peptide en hélice α est une contrainte forte. Pour essayer de remédier à cette difficulté, nous nous sommes interrogés sur la possibilité de générer des

séquences hétérogènes associant les squelettes peptide et oligourée, l'idée étant d'apporter de la modularité au système tout en conservant les propriétés remarquables des foldamères d'oligourée.

b. Comparaison de l'hélice α peptidique et de l'hélice d'oligourée

Les oligomères à base de liens urées adoptent des structures secondaires en hélice-2.5 similaires aux hélices α . Une différence majeure entre les 2 familles d'hélices réside cependant dans le nombre de résidus par tour d'hélice qui est de 3.6 pour les hélices α contre 2.5 pour les hélices d'oligourée (**Table I.48**). La répartition des chaînes latérales dans l'espace est donc sensiblement différente compliquant ainsi la conception de séquences non peptidiques capables de mimer des hélices α .

| | α -helix | Oligourea helix |
|----------------------------|-----------------|-----------------|
| Nombre de résidus par tour | 3.6 | 2.5 |
| Rayon [Å] | 2.3 | 2.6 |
| Élévation par résidu [Å] | 1.5 | 2.0 |
| Pas [Å] | 5.4 | 5.1 |

Table I.48 : Table récapitulative des propriétés : de l'hélice α peptidique et de l'hélice 2.5 d'oligourée.

Des réalisations significatives qui incluent le mimétisme des hélices α pour l'inhibition des interactions protéine/protéine à l'aide d'architectures hétérogènes peptides α/β , ont été décrites précédemment.[122] Cependant, la possibilité pour un squelette foldamérique d'exercer un double effet de nucléation et de stabilisation de la structure en hélice α dans un segment peptidique- α contigu n'a pas été documentée à l'exception des peptides chimériques ($\alpha/\beta+\alpha$) conçus par Gellman pour cibler la surface de liaison des inhibiteurs peptidiques des protéines Bcl-XL.[216] Il a été suggéré dans cette étude que le segment α/β structuré en hélice 14/15 à l'extrémité N-terminale pourrait nucléer une structure α -hélicoïdale dans le segment peptide- α à l'extrémité C-terminale. Nous avons cherché à approfondir la notion de squelette peptidique hybride en développant une approche, peu décrite dans la littérature, d'architecture hybride par insertion de blocs foldamères (**Figure I.49**).

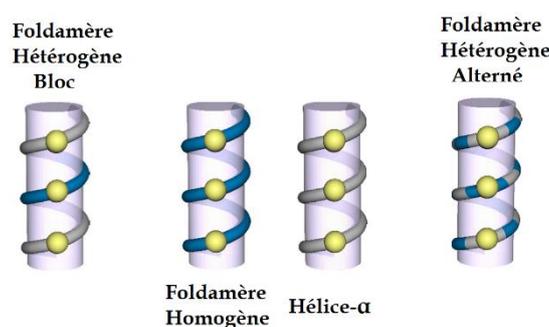


Figure I.49 : Schéma des différentes stratégies de conception d'architectures hétérogènes peptide/foldamère.[114] La chaîne principale des résidus d'acides α -aminés a été représentée en gris, la chaîne principale des résidus non naturels a été représentée en bleu et les chaînes latérales pour les différents types de résidus ont été représentées par des boules jaunes.

Dans ce travail de thèse, j'ai tout d'abord cherché à étudier la capacité de courts fragments uréido aliphatiques fusionnés à des segments peptidiques (de moins de 10 résidus) à stabiliser la structuration en hélice des peptides. L'étude des propriétés conformationnelles de ces composés a été réalisée en solution, en milieu organique et à l'état solide.

J'ai ensuite choisi d'étudier la propension de fragments tri- ou tétra-urées à stabiliser, en milieu aqueux la structuration en hélice α de différents peptides constitués de 17 résidus riches en alanines décrits par Baldwin.[53] Différentes expériences, en solution, m'ont permis

d'évaluer l'apport de courts fragments uréido sur la stabilisation de longues séquences peptidiques en milieu aqueux.

Grâce à ces informations structurales, je me suis ensuite penchée sur la conception d'analogues mimes de l'hélice peptidique de la protéine p53 impliquée dans l'interaction avec la surface de la protéine MDM2 afin de générer des composés modulateurs/inhibiteurs de l'interaction p53/MDM2 impliquée dans de nombreux cas de cancer.

Je me suis finalement intéressée à la conception de « foldamères hybrides » capables de s'assembler de manière discrète sous forme de faisceaux d'hélices en milieu aqueux. Cette démarche a été développée afin de concevoir des composés amphiphiles hydrosolubles pour évaluer rapidement leur capacité à former des structures quaternaires à l'état solide mais également en solution. Nous avons ensuite étudié l'influence de différents paramètres tels que la nature et la position des chaînes latérales sur la stabilité et la stœchiométrie de l'assemblage.

Bibliographie

- [1] Y. Cho, S. Gorina, P. Jeffrey, and N. Pavletich, "Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations," *Science (80-.)*, vol. 265, no. 5170, pp. 346–355, Jul. 1994.
- [2] M. Guharoy and P. Chakrabarti, "Secondary structure based analysis and classification of biological interfaces: identification of binding motifs in protein-protein interactions," *Bioinformatics*, vol. 23, no. 15, pp. 1909–1918, Aug. 2007.
- [3] S. Jones and J. M. Thornton, "Principles of protein-protein interactions.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 93, no. 1, pp. 13–20, Jan. 1996.
- [4] S. Jones and J. M. Thornton, "Protein-protein interactions: A review of protein dimer structures," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 63, no. 1, pp. 31–65, Jan. 1995.
- [5] G. W. Vuister *et al.*, "The Mad1-Sin3B interaction involves a novel helical fold," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 7, no. 12, pp. 1100–1104, Dec. 2000.
- [6] M. Sattler, "Structure of Bcl-xL-Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis," *Science (80-.)*, vol. 275, no. 5302, pp. 983–986, Feb. 1997.
- [7] A. K. Shiau *et al.*, "The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen," *Cell*, vol. 95, no. 7, pp. 927–937, Dec. 1998.
- [8] T. E. Ellenberger, C. J. Brandl, K. Struhl, and S. C. Harrison, "The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α Helices: Crystal structure of the protein-DNA complex," *Cell*, vol. 71, no. 7, pp. 1223–1237, Dec. 1992.
- [9] P. H. Kussie *et al.*, "Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain.," *Science (80-.)*, vol. 274, no. 5289, pp. 948–953, 1996.
- [10] J. L. Battiste *et al.*, "alpha Helix-RNA Major Groove Recognition in an HIV-1 Rev Peptide-RRE RNA Complex," *Science (80-.)*, vol. 273, no. 5281, pp. 1547–1551, Sep. 1996.
- [11] L. Pauling, R. B. Corey, and H. R. Branson, "The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 37, no. 4, pp. 205–211, 1951.
- [12] J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff, and D. C. Philipps, "A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis," *Nature*, vol. 181, no. 4610, pp. 662–666, 1958.
- [13] S. Lifson and A. Roig, "On the Theory of Helix – Coil Transition in Polypeptides," *J. Chem. Phys.*, vol. 34, no. 6, pp. 1963–1974, Jun. 1961.
- [14] B. H. Zimm and J. K. Bragg, "Theory of the Phase Transition between Helix and Random Coil in Polypeptide Chains," *J. Chem. Phys.*, vol. 31, no. 2, pp. 526–535, Aug. 1959.
- [15] H. Qian and J. A. Schellman, "Helix-coil theories: a comparative study for finite length polypeptides," *J. Phys. Chem.*, vol. 96, no. 10, pp. 3987–3994, May 1992.
- [16] K. H. Altmann, J. Wojcik, M. Vasquez, and H. A. Scheraga, "Helix-coil stability constants for the naturally occurring amino acids in water. XXIII. Proline parameters from random poly(hydroxybutylglutamine-CO-L-proline)," *Biopolymers*, vol. 30, no. 1–

- 2, pp. 107–120, 1990.
- [17] M. K. Dygert, G. T. Taylor, F. Cardinaux, and H. A. Scheraga, "Helix-Coil Stability Constants for the Naturally Occurring Amino Acids in Water. 11. Lysine Parameters from Random Poly(hydroxybutylglutamine-co-l-lysine)," *Macromolecules*, vol. 9, no. 5, pp. 794–801, 1976.
- [18] D. J. T. Hill, F. Cardinaux, and H. A. Scheraga, "Helix-coil stability constants for the naturally occurring amino acids in water. XIV. Methionine parameters from random poly(hydroxypropylglutamine,L-Methionine)," *Biopolymers*, vol. 16, no. 11, pp. 2447–2467, Nov. 1977.
- [19] Y. Kobayashi, F. Cardinaux, B. O. Zweifel, and H. A. Scheraga, "Helix-Coil Stability Constants for the Naturally Occurring Amino Acids in Water. 16. Aspartic Acid Parameters from Random Poly(hydroxybutylglutamine-co-L-aspartic acid)," *Macromolecules*, vol. 10, no. 6, pp. 1271–1283, Nov. 1977.
- [20] Y. Konishi, J. W. van Nispen, G. Davenport, and H. A. Scheraga, "Helix-Coil Stability Constants for the Naturally Occurring Amino Acids in Water. 15. Arginine Parameters from Random Poly(hydroxybutylglutamine-co-L-arginine)," *Macromolecules*, vol. 10, no. 6, pp. 1264–1271, Nov. 1977.
- [21] R. R. Matheson, R. A. Nemenoff, F. Cardinaux, and H. A. Scheraga, "Helix-coil stability constants for the naturally occurring amino acids in water. XII. Asparagine parameters from random poly(hydroxybutylglutamine-co-L-asparagine)," *Biopolymers*, vol. 16, no. 7, pp. 1567–1585, Jul. 1977.
- [22] F. R. Maxfield, J. E. Alter, G. T. Taylor, and H. A. Scheraga, "Helix-Coil Stability Constants for the Naturally Occurring Amino Acids in Water. IX. Glutamic Acid Parameters from Random Poly(hydroxybutylglutamine-co-L-glutamic acid)," *Macromolecules*, vol. 8, no. 4, pp. 479–491, Jul. 1975.
- [23] J. W. Van Nispen, D. J. Hill, and H. A. Scheraga, "Helix-coil stability constants for the naturally occurring amino acids in water. XIII. The presence of by-products in amino-acid analysis of copolymers and their effect on the guest parameters; recomputed values of σ and s for L-serine," *Biopolymers*, vol. 16, no. 7, pp. 1587–1592, Jul. 1977.
- [24] R. K. Scheule, F. Cardinaux, G. T. Taylor, and H. A. Scheraga, "Helix-Coil Stability Constants for the Naturally Occurring Amino Acids in Water. X. Tyrosine Parameters from Random Poly(hydroxypropylglutamine-co-L-tyrosine)," *Macromolecules*, vol. 9, no. 1, pp. 23–33, Jan. 1976.
- [25] J. Wójcik, K.-H. Altmann, and H. A. Scheraga, "Helix-coil stability constants for the naturally occurring amino acids in water. XXIV. Half-cystine parameters from random poly(hydroxybutylglutamine- <sc>CO</sc> - S -methylthio- <sc>L</sc> - cysteine)," *Biopolymers*, vol. 30, no. 1–2, pp. 121–134, 1990.
- [26] H. E. Van Wart, G. T. Taylor, and H. A. Scheraga, "Helix-Coil Stability Constants for the Naturally Occurring Amino in Water. VII Phenylalanine Parameters from Random Poly(hydroxypropylglutamine-co-L-L-phenylalanine)," *Macromolecules*, vol. 6, no. 2, pp. 266–273, Mar. 1973.
- [27] N. Lotan, A. Yaron, and A. Berger, "The stabilization of the α -helix in aqueous solution by hydrophobic side-chain interaction," *Biopolymers*, vol. 4, no. 3, pp. 365–368, Mar. 1966.
- [28] D. A. Cook, "The relation between amino acid sequence and protein conformation," *J.*

- Mol. Biol.*, vol. 29, no. 1, pp. 167–171, Oct. 1967.
- [29] A. V Guzzo, "The Influence of Amino Acid Sequence on Protein Structure," *Biophys. J.*, vol. 5, no. 6, pp. 809–822, Nov. 1965.
- [30] J. W. Prothero, "Correlation between the distribution of amino acids and alpha helices," *Biophys. J.*, vol. 6, no. 3, pp. 367–370, May 1966.
- [31] O. B. Ptitsyn, "Statistical analysis of the distribution of amino acid residues among helical and non-helical regions in globular proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 42, no. 3, pp. 501–510, Jun. 1969.
- [32] P. Y. Chou and G. D. Fasman, "Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins," *Biochemistry*, vol. 13, no. 2, pp. 211–222, Jan. 1974.
- [33] P. Y. Chou and G. D. Fasman, "Prediction of protein conformation," *Biochemistry*, vol. 13, no. 2, pp. 222–245, Jan. 1974.
- [34] a Bierzynski, P. S. Kim, and R. L. Baldwin, "A salt bridge stabilizes the helix formed by isolated C-peptide of RNase A.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 79, no. April, pp. 2470–2474, 1982.
- [35] J. E. Brown and W. A. Klee, "Helix-Coil Transition of the Isolated Amino Terminus of Ribonuclease," *Biochemistry*, vol. 10, no. 3, pp. 470–476, 1971.
- [36] A. Wlodawer, L. A. Svensson, L. Sjoelin, and G. L. Gilliland, "Structure of phosphate-free ribonuclease A refined at 1.26 Å," *Biochemistry*, vol. 27, no. 8, pp. 2705–2717, Apr. 1988.
- [37] W. Hol, "The role of the alpha-helix dipole in protein function and structure," *Prog Biophys Mol Biol*, vol. 45, no. 3, pp. 149–95, 1985.
- [38] K. R. Shoemaker, P. S. Kim, E. J. York, J. M. Stewart, and R. L. Baldwin, "Tests of the helix dipole model for stabilization of α -helices," *Nature*, vol. 326, no. 6113, pp. 563–567, Apr. 1987.
- [39] K. R. Shoemaker *et al.*, "Side-chain interactions in the C-peptide helix: Phe 8⁺ His 12⁺," *Biopolymers*, vol. 29, no. 1, pp. 1–11, 1990.
- [40] R. Fairman, K. R. Shoemaker, E. J. York, J. M. Stewart, and R. L. Baldwin, "The Glu 2-... Arg 10⁺ side-chain interaction in the C-peptide helix of ribonuclease A," *Biophys. Chem.*, vol. 37, no. 1–3, pp. 107–119, 1990.
- [41] K. R. Shoemaker, R. Fairman, P. S. Kim, E. J. York, J. M. Stewart, and R. L. Baldwin, "The C-peptide Helix from Ribonuclease A Considered as an Autonomous Folding Unit," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 52, pp. 391–398, Jan. 1987.
- [42] A. CHAKRABARTTY and R. BALDWIN, "Stability of α -Helices," in *Advances in Protein Chemistry Volume 46*, vol. 46, Elsevier, 1995, pp. 141–176.
- [43] P. Lyu, M. Liff, L. Marky, and N. Kallenbach, "Side chain contributions to the stability of alpha-helical structure in peptides," *Science (80-.)*, vol. 250, no. 4981, pp. 669–673, Nov. 1990.
- [44] G. Merutka, W. Lipton, W. Shalongo, S. H. Park, and E. Stellwagen, "Effect of central-residue replacements on the helical stability of a monomeric peptide," *Biochemistry*, vol. 29, no. 32, pp. 7511–7515, Aug. 1990.
- [45] V. Muñoz and L. Serrano, "Elucidating the folding problem of helical peptides using

- empirical parameters," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 1, no. 6, pp. 399–409, Jun. 1994.
- [46] V. Muñoz and L. Serrano, "Elucidating the Folding Problem of Helical Peptides using Empirical Parameters. II†. Helix Macro-dipole Effects and Rational Modification of the Helical Content of Natural Peptides," *J. Mol. Biol.*, vol. 245, no. 3, pp. 275–296, Jan. 1995.
- [47] V. Muñoz and L. Serrano, "Elucidating the Folding Problem of Helical Peptides using Empirical Parameters. III>Temperature and pH Dependence," *J. Mol. Biol.*, vol. 245, no. 3, pp. 297–308, Jan. 1995.
- [48] K. O'Neil and W. DeGrado, "A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids," *Science (80-.)*, vol. 250, no. 4981, pp. 646–651, Nov. 1990.
- [49] C. N. Pace and J. M. Scholtz, "A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins.," *Biophys. J.*, vol. 75, no. 1, pp. 422–427, 1998.
- [50] C. A. Rohl and R. L. Baldwin, "[1] Deciphering rules of helix stability in peptides," in *Methods in Enzymology*, vol. 295, 1998, pp. 1–26.
- [51] C. A. Rohl, W. Fiori, and R. L. Baldwin, "Alanine is helix-stabilizing in both template-nucleated and standard peptide helices," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, no. 7, pp. 3682–3687, Mar. 1999.
- [52] J. M. Scholtz and R. L. Baldwin, "The Mechanism of alpha-Helix Formation by Peptides," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 21, no. 1, pp. 95–118, 1992.
- [53] S. Padmanabhan, S. Marqusee, T. Ridgeway, T. M. Laue, and R. L. Baldwin, "Relative helix-forming tendencies of nonpolar amino acids," *Nature*, vol. 344, no. 6263, pp. 268–270, Mar. 1990.
- [54] S. Marqusee, V. H. Robbins, and R. L. Baldwin, "Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 14, pp. 5286–90, Jul. 1989.
- [55] S. Marqusee and R. L. Baldwin, "Helix stabilization by Glu-...Lys+ salt bridges in short peptides of de novo design.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 24, pp. 8898–8902, 1987.
- [56] M. Blaber, X. Zhang, J. D. Lindstrom, S. D. Pepiot, W. a Baase, and B. W. Matthews, "Determination of α -Helix Propensity within the Context of a Folded Protein," *J. Mol. Biol.*, vol. 235, no. 2, pp. 600–624, Jan. 1994.
- [57] A. Horovitz, J. M. Matthews, and A. R. Fersht, " α -Helix stability in proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 227, no. 2, pp. 560–568, Sep. 1992.
- [58] J. K. Myers, C. N. Pace, and J. M. Scholtz, "A direct comparison of helix propensity in proteins and peptides," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, no. 7, pp. 2833–2837, Apr. 1997.
- [59] J. K. Myers, C. N. Pace, and J. M. Scholtz, "Helix Propensities Are Identical in Proteins and Peptides †," *Biochemistry*, vol. 36, no. 36, pp. 10923–10929, Sep. 1997.
- [60] A. J. Doig, "Recent advances in helix-coil theory," *Biophys. Chem.*, vol. 101–102, no. December 2001, pp. 281–293, Dec. 2002.
- [61] A. J. Doig, A. Chakrabartty, T. M. Klingler, and R. L. Baldwin, "Determination of Free Energies of N-Capping in .alpha.-Helices by Modification of the Lifson-Roig Helix-Coil Theory To Include N- and C-Capping," *Biochemistry*, vol. 33, no. 11, pp. 3396–3403, Mar. 1994.

- [62] C. a Rohl and A. J. Doig, "Models for the 3₁₀-helix/coil, π -helix/coil, and α -helix/3₁₀-helix/coil transitions in isolated peptides," *Protein Sci.*, vol. 5, no. 8, pp. 1687–1696, Aug. 1996.
- [63] C. A. Rohl, A. Chakrabarty, and R. L. Baldwin, "Helix propagation and N-cap propensities of the amino acids measured in alanine-based peptides in 40 volume percent trifluoroethanol," *Protein Sci.*, vol. 5, no. 12, pp. 2623–2637, Dec. 1996.
- [64] B. J. Stapley, C. A. Rohl, and A. J. Doig, "Addition of side chain interactions to modified Lifson-Roig helix-coil theory: Application to energetics of Phenylalanine-Methionine interactions," *Protein Sci.*, vol. 4, no. 11, pp. 2383–2391, Nov. 1995.
- [65] L. Presta and G. Rose, "Helix signals in proteins," *Science (80-.)*, vol. 240, no. 4859, pp. 1632–1641, Jun. 1988.
- [66] J. S. Richardson and D. C. Richardson, "Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices.," *Science*, vol. 240, no. 4859, pp. 1648–52, Jun. 1988.
- [67] D. F. Sticke, L. G. Presta, K. A. Dill, and G. D. Rose, "Hydrogen bonding in globular proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 226, no. 4, pp. 1143–1159, 1992.
- [68] R. Aurora, R. Srinivasan, and G. Rose, "Rules for alpha-helix termination by glycine," *Science (80-.)*, vol. 264, no. 5162, pp. 1126–1130, May 1994.
- [69] J. W. Seale, R. Srinivasan, and G. D. Rose, "Sequence determinants of the capping box, a stabilizing motif at the N-termini of alpha-helices," *Protein Sci.*, vol. 3, no. 10, pp. 1741–1745, 1994.
- [70] V. Munoz, F. J. Blanco, and S. Luis, "The hydrophobic-staple motif and a role for loop-residues in alpha-helix stability and protein folding," *Struct. Biol.*, vol. 2, no. 5, pp. 380–385, 1995.
- [71] E. T. Harper and G. D. Rose, "Helix stop signals in proteins and peptides: the capping box.," *Biochemistry*, vol. 32, no. 30, pp. 7605–7609, 1993.
- [72] S. DASGUPTA and J. A. BELL, "Design of helix ends," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 41, no. 5, pp. 499–511, Jan. 2009.
- [73] R. Aurora and G. D. Rose, "Helix capping," *Protein Sci.*, vol. 7, no. 1, pp. 21–38, 1998.
- [74] R. H. Yun, A. Anderson, and J. Hermans, "Proline in alpha-helix: stability and conformation studied by dynamics simulation.," *Proteins*, vol. 10, no. 3, pp. 219–28, 1991.
- [75] Schulz and Schirmer, "Principles of protein structure.," 1979.
- [76] J. S. Richardson, "The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure," 1981, pp. 167–339.
- [77] R. Fairman, K. R. Shoemaker, E. J. York, J. M. Stewart, and R. L. Baldwin, "Further studies of the helix dipole model: Effects of a free α -NH₃⁺ or α -COO⁻ group on helix stability," *Proteins Struct. Funct. Genet.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–7, 1989.
- [78] M. D. Bruch, M. M. Dhingra, and L. M. Gierasch, "Side chain-backbone hydrogen bonding contributes to helix stability in peptides derived from an α -helical region of carboxypeptidase A," *Proteins Struct. Funct. Genet.*, vol. 10, no. 2, pp. 130–139, Feb. 1991.
- [79] P. C. Lyu, D. E. Wemmer, H. X. Zhou, R. J. Pinker, and N. R. Kallenbach, "Capping interactions in isolated .alpha. helices: position-dependent substitution effects and

- structure of a serine-capped peptide helix," *Biochemistry*, vol. 32, no. 2, pp. 421–425, Jan. 1993.
- [80] H. X. X. Zhou, P. C. Lyu, D. E. Wemmer, and N. R. Kallenbach, "Alpha-Helix Capping in Synthetic Model Peptides by Reciprocal Side-Chain Main-Chain Interactions - Evidence for an N-Terminal Capping Box," *Proteins-Structure Funct. Genet.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–7, 1994.
- [81] Y. Gong, H. X. Zhou, M. Guo, and N. R. Kallenbach, "Structural analysis of the N- and C-termini in a peptide with consensus sequence," *Protein Sci.*, vol. 4, no. 8, pp. 1446–1456, Aug. 1995.
- [82] B. Forood, E. J. Feliciano, and K. P. Nambiar, "Stabilization of alpha-helical structures in short peptides via end capping.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 90, no. 3, pp. 838–842, Feb. 1993.
- [83] A. Chakrabartty, A. J. Doig, and R. L. Baldwin, "Helix capping propensities in peptides parallel those in proteins.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 90, no. 23, pp. 11332–11336, Dec. 1993.
- [84] V. Muñoz, L. Serrano, M. A. Jiménez, and M. Rico, "Structural analysis of peptides encompassing all α -helices of three α/β parallel proteins: Che-Y, flavodoxin and P21-Ras: Implications for α -Helix stability and the folding of α/β parallel proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 247, no. 4, pp. 648–669, Apr. 1995.
- [85] M. Siedlecka, G. Goch, A. Ejchart, H. Sticht, and A. Bierzynski, "Helix nucleation by a calcium-binding peptide loop," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, no. 3, pp. 903–908, Feb. 1999.
- [86] J. Yang, K. Zhao, Y. Gong, A. Vologodskii, and N. R. Kallenbach, "Helix nucleation constant in copolypeptides of alanine and ornithine or lysine," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, no. 41, pp. 10646–10652, 1998.
- [87] D. S. Kemp and T. P. Curran, "(2S,5S,8S,11S)-1-Acetyl-1,4-diaza-3-keto-5-carboxy-10-thia-tricyclo-[2.8.04,8]-tridecane, 1 synthesis of prolyl-proline-derived, peptide-functionalized templates for α -helix formation," *Tetrahedron Lett.*, vol. 29, no. 39, pp. 4931–4934, Jan. 1988.
- [88] D. S. Kemp, T. J. Allen, and S. L. Oslick, "The Energetics of Helix Formation by Short Templated Peptides in Aqueous Solution. 1. Characterization of the Reporting Helical Template Ac-Hel1," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 25, pp. 6641–6657, Jun. 1995.
- [89] D. S. Kemp, T. P. Curran, J. G. Boyd, and T. J. Allen, "Studies of N-terminal Templates for α -Helix Formation. Synthesis and Conformational Analysis of Peptide Conjugates of...," *J. Org. Chem.*, vol. 56, no. 1, pp. 6683–6697, 1991.
- [90] D. S. Kemp, S. L. Oslick, and T. J. Allen, "The Structure and Energetics of Helix Formation by Short Templated Peptides in Aqueous Solution. 3. Calculation of the Helical Propagation Constant s from the Template Stability Constants t/c for Ac-Hel 1-Ala_n-OH, $n = 1–6$," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, no. 18, pp. 4249–4255, Jan. 1996.
- [91] R. N. Chapman, G. Dimartino, and P. S. Arora, "A Highly Stable Short α -Helix Constrained by a Main-Chain Hydrogen-Bond Surrogate," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 39, pp. 12252–12253, Oct. 2004.
- [92] T. M. Trnka and R. H. Grubbs, "The Development of L₂X₂RuCHR Olefin Metathesis Catalysts: An Organometallic Success Story," *Acc. Chem. Res.*, vol. 34, no. 1, pp. 18–29, Jan. 2001.

- [93] H. E. Blackwell and R. H. Grubbs, "Highly Efficient Synthesis of Covalently Cross-Linked Peptide Helices by Ring-Closing Metathesis," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 37, no. 23, pp. 3281–3284, Dec. 1998.
- [94] E. Cabezas and A. C. Satterthwait, "The Hydrogen Bond Mimic Approach: Solid-Phase Synthesis of a Peptide Stabilized as an α -Helix with a Hydrazone Link," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, no. 16, pp. 3862–3875, Apr. 1999.
- [95] D. Wang, K. Chen, J. L. Kulp, and P. S. Arora, "Evaluation of biologically relevant short α -helices stabilized by a main-chain hydrogen-bond surrogate," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 28, pp. 9248–9256, 2006.
- [96] J. Liu, D. Wang, Q. Zheng, M. Lu, and P. S. Arora, "Atomic structure of a short α -helix stabilized by a main chain hydrogen-bond surrogate," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 13, pp. 4334–4337, 2008.
- [97] D. Wang, W. Liao, and P. S. Arora, "Enhanced metabolic stability and protein-binding properties of artificial alpha helices derived from a hydrogen-bond surrogate: application to Bcl-xL," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 44, no. 40, pp. 6525–9, Oct. 2005.
- [98] D. Wang, M. Lu, and P. S. Arora, "Inhibition of HIV-1 Fusion by Hydrogen-Bond-Surrogate-Based α Helices," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 47, no. 10, pp. 1879–1882, Feb. 2008.
- [99] L. K. Henchey, J. R. Porter, I. Ghosh, and P. S. Arora, "High specificity in protein recognition by hydrogen-bond-surrogate α -helices: Selective inhibition of the p53/MDM2 complex," *ChemBioChem*, vol. 11, no. 15, pp. 2104–2107, 2010.
- [100] A. Patgiri, K. K. Yadav, P. S. Arora, and D. Bar-Sagi, "An orthosteric inhibitor of the Ras-Sos interaction," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 9, pp. 585–587, Jul. 2011.
- [101] S. Kushal *et al.*, "Protein domain mimetics as in vivo modulators of hypoxia-inducible factor signaling," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 39, pp. 15602–15607, Sep. 2013.
- [102] B. N. Bullock, A. L. Jochim, and P. S. Arora, "Assessing helical protein interfaces for inhibitor design," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 36, pp. 14220–14223, 2011.
- [103] H. N. Hoang *et al.*, "Helix Nucleation by the Smallest Known α -Helix in Water," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 55, no. 29, pp. 8275–8279, 2016.
- [104] N. E. Shepherd, G. Abbenante, and D. P. Fairlie, "Consecutive Cyclic Pentapeptide Modules Form Short α -Helices that are Very Stable to Water and Denaturants," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 43, no. 20, pp. 2687–2690, May 2004.
- [105] N. E. Shepherd, H. N. Hoang, G. Abbenante, and D. P. Fairlie, "Single Turn Peptide Alpha Helices with Exceptional Stability in Water," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 9, pp. 2974–2983, Mar. 2005.
- [106] R. S. Harrison *et al.*, "Downsizing human, bacterial, and viral proteins to short water-stable alpha helices that maintain biological potency," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 26, pp. 11686–11691, Jun. 2010.
- [107] T. Cierpicki and J. Otlewski, "Amide proton temperature coefficients as hydrogen bond indicators in proteins," *J. Biomol. NMR*, pp. 249–261, 2001.
- [108] G. Wagner, W. Braun, T. F. Havel, T. Schaumann, N. Gö, and K. Wüthrich, "Protein structures in solution by nuclear magnetic resonance and distance geometry," *J. Mol. Biol.*, vol. 196, no. 3, pp. 611–639, Aug. 1987.

- [109] H. N. Hoang, C. Wu, R. L. Beyer, T. A. Hill, and D. P. Fairlie, "Alpha Helix Nucleation by a Simple Cyclic Tetrapeptide," *Aust. J. Chem.*, vol. 70, no. 2, pp. 213–219, 2017.
- [110] H. Zhao *et al.*, "Crosslinked Aspartic Acids as Helix-Nucleating Templates," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 55, no. 39, pp. 12088–12093, Sep. 2016.
- [111] S. H. Gellman, "Foldamers: A Manifesto," *Acc. Chem. Res.*, vol. 31, no. 4, pp. 173–180, Apr. 1998.
- [112] W. S. Horne and S. H. Gellman, "Foldamers with heterogeneous backbones," *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 10, pp. 1399–1408, 2008.
- [113] A. Roy, P. Prabhakaran, P. K. Baruah, and G. J. Sanjayan, "Diversifying the structural architecture of synthetic oligomers: the hetero foldamer approach," *Chem. Commun.*, vol. 47, no. 42, p. 11593, 2011.
- [114] G. Pasco, M., Dolain, C., Guichard, *Foldamers in Medicinal Chemistry*, vol. 5. 2017.
- [115] S. De Pol, C. Zorn, C. D. Klein, O. Zerbe, and O. Reiser, "Surprisingly Stable Helical Conformations in α/β -Peptides by Incorporation of cis- β -Aminocyclopropane Carboxylic Acids," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 43, no. 4, pp. 511–514, 2004.
- [116] A. Hayen, M. A. Schmitt, F. N. Ngassa, K. A. Thomasson, and S. H. Gellman, "Two Helical Conformations from a Single Foldamer Backbone: 'Split Personality' in Short α/β -Peptides," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 43, no. 4, pp. 505–510, Jan. 2004.
- [117] S. H. Choi, I. A. Guzei, L. C. Spencer, and S. H. Gellman, "Crystallographic Characterization of Helical Secondary Structures in α/β -Peptides with 1:1 Residue Alternation," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 20, pp. 6544–6550, May 2008.
- [118] P. Harbury, T. Zhang, P. Kim, and T. Alber, "A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants," *Science (80-)*, vol. 262, no. 5138, pp. 1401–1407, Nov. 1993.
- [119] M. A. Schmitt, S. H. Choi, I. A. Guzei, and S. H. Gellman, "Residue requirements for helical folding in short α/β -peptides: Crystallographic characterization of the 11-helix in an optimized sequence," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 38, pp. 13130–13131, 2005.
- [120] G. V. M. Sharma, P. Nagendar, P. Jayaprakash, P. R. Krishna, K. V. S. Ramakrishna, and A. C. Kunwar, "9/11 Mixed helices in α/β peptides derived from C-linked carbo- β -amino acid and L-Ala repeats," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 44, no. 36, pp. 5878–5882, 2005.
- [121] M. A. Schmitt, S. H. Choi, I. A. Guzei, and S. H. Gellman, "New helical foldamers: Heterogeneous backbones with 1:2 and 2:1 $\alpha:\beta$ -amino acid residue patterns," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 14, pp. 4538–4539, 2006.
- [122] L. M. Johnson and S. H. Gellman, *α -Helix mimicry with α/β -peptides*, 1st ed., vol. 523. Elsevier Inc., 2013.
- [123] W. S. Horne, J. L. Price, and S. H. Gellman, "Interplay among side chain sequence, backbone composition, and residue rigidification in polypeptide folding and assembly," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 27, pp. 9151–9156, 2008.
- [124] J. L. Price, W. S. Horne, and S. H. Gellman, "Structural Consequences of β -Amino Acid Preorganization in a Self-Assembling α/β -Peptide: Fundamental Studies of Foldameric Helix Bundles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 35, pp. 12378–12387, Sep. 2010.
- [125] W. S. Horne, J. L. Price, J. L. Keck, and S. H. Gellman, "Helix Bundle Quaternary

- Structure from α/β -Peptide Foldamers," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 14, pp. 4178–4180, Apr. 2007.
- [126] T. Sawada and S. H. Gellman, "Structural Mimicry of the α -Helix in Aqueous Solution with an Isoatomic $\alpha/\beta/\gamma$ -Peptide Backbone," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 19, pp. 7336–7339, May 2011.
- [127] I. L. Karle, A. Pramanik, A. Banerjee, S. Bhattacharjya, and P. Balaram, " ω -Amino Acids in Peptide Design. Crystal Structures and Solution Conformations of Peptide Helices Containing a β -Alanyl- γ -Aminobutyryl Segment," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, no. 39, pp. 9087–9095, Oct. 1997.
- [128] Y. H. Shin, D. E. Mortenson, K. A. Satyshur, K. T. Forest, and S. H. Gellman, "Differential Impact of beta and gamma Residue Preorganization on alpha/beta/gamma-Peptide Helix Stability in Water," *J Am Chem Soc*, no. Figure 2, pp. 1–4, 2013.
- [129] A. Bandyopadhyay, S. V. Jadhav, and H. N. Gopi, " α/γ 4-Hybrid peptide helices: synthesis, crystal conformations and analogy with the α -helix," *Chem. Commun.*, vol. 48, no. 57, p. 7170, 2012.
- [130] F. Colland *et al.*, "Functional proteomics mapping of a human signaling pathway," *Genome Res.*, vol. 14, no. 7, pp. 1324–1332, 2004.
- [131] J. A. Wells and C. L. McClendon, "Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces.," *Nature*, vol. 450, no. 7172, pp. 1001–9, 2007.
- [132] D. W. Christianson and W. N. Lipscomb, "X-ray crystallographic investigation of substrate binding to carboxypeptidase A at subzero temperature.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, no. 20, pp. 7568–72, Oct. 1986.
- [133] S. Fletcher and A. D. Hamilton, "Protein surface recognition and proteomimetics: Mimics of protein surface structure and function," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 632–638, 2005.
- [134] B. C. Cunningham and J. a Wells, "High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis.," *Science*, vol. 244, no. 4908, pp. 1081–1085, 1989.
- [135] I. S. Moreira, P. A. Fernandes, and M. J. Ramos, "Hot spots-A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues," *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 68, no. 4, pp. 803–812, Jun. 2007.
- [136] M. R. Arkin and J. A. Wells, "Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 3, no. 4, pp. 301–317, Apr. 2004.
- [137] P. Chène, "Drugs Targeting Protein-Protein Interactions," *ChemMedChem*, vol. 1, no. 4, pp. 400–411, Apr. 2006.
- [138] S. Surade and T. L. Blundell, "Structural Biology and Drug Discovery of Difficult Targets: The Limits of Ligandability," *Chem. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 42–50, Jan. 2012.
- [139] M. R. Arkin, Y. Tang, and J. A. Wells, "Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Progressing toward the Reality," *Chem. Biol.*, vol. 21, no. 9, pp. 1102–1114, Sep. 2014.
- [140] M. Bakail and F. Ochsenbein, "Targeting protein-protein interactions, a wide open field for drug design," *Comptes Rendus Chim.*, vol. 19, no. 1–2, pp. 19–27, Jan. 2016.

- [141] A. A. Kaspar and J. M. Reichert, "Future directions for peptide therapeutics development," *Drug Discov. Today*, vol. 18, no. 17–18, pp. 807–817, Sep. 2013.
- [142] A. L. Jochim and P. S. Arora, "Systematic analysis of helical protein interfaces reveals targets for synthetic inhibitors," *ACS Chem. Biol.*, vol. 5, no. 10, pp. 919–923, 2010.
- [143] A. M. Watkins, M. G. Wuo, and P. S. Arora, "Protein–Protein Interactions Mediated by Helical Tertiary Structure Motifs," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, no. 36, pp. 11622–11630, Sep. 2015.
- [144] C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, and C. Peggion, "Control of peptide conformation by the Thorpe-Ingold effect (C[?]-tetrasubstitution)," *Biopolymers*, vol. 60, no. 6, pp. 396–419, 2001.
- [145] F. Bernal, A. F. Tyler, S. J. Korsmeyer, L. D. Walensky, and G. L. Verdine, "Reactivation of the p53 tumor suppressor pathway by a stapled p53 peptide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 9, pp. 2456–2457, 2007.
- [146] G. Philippe *et al.*, "Development of cell-penetrating peptide-based drug leads to inhibit MDMX:p53 and MDM2:p53 interactions," *Biopolymers*, vol. 106, no. 6, pp. 853–863, Nov. 2016.
- [147] Y. S. Chang *et al.*, "Stapled α -helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 36, pp. E3445–54, 2013.
- [148] D. S. Kemp, "Peptidomimetics and the template approach to nucleation of β -sheets and α -helices in peptides," *Trends Biotechnol.*, vol. 8, no. C, pp. 249–255, 1990.
- [149] A. B. Mahon and P. S. Arora, "End-capped α -helices as modulators of protein function," *Drug Discov. Today Technol.*, vol. 9, no. 1, pp. e57–e62, Mar. 2012.
- [150] C. H. Douse *et al.*, "Crystal structures of stapled and hydrogen bond surrogate peptides targeting a fully buried protein-helix interaction," *ACS Chem. Biol.*, vol. 9, no. 10, pp. 2204–2209, 2014.
- [151] C. García-Echeverría, P. Chène, M. J. J. Blommers, and P. Furet, "Discovery of Potent Antagonists of the Interaction between Human Double Minute 2 and Tumor Suppressor p53," *J. Med. Chem.*, vol. 43, no. 17, pp. 3205–3208, Aug. 2000.
- [152] L. D. Walensky and G. H. Bird, "Hydrocarbon-stapled peptides: Principles, practice, and progress," *J. Med. Chem.*, vol. 57, no. 15, pp. 6275–6288, 2014.
- [153] J. Kallen *et al.*, "Crystal structures of human MdmX (HdmX) in complex with p53 peptide analogues reveal surprising conformational changes," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 13, pp. 8812–8821, 2009.
- [154] S. Baek *et al.*, "Structure of the stapled p53 peptide bound to Mdm2," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 1, pp. 103–106, 2012.
- [155] B. B. Lao *et al.*, "Rational Design of Topographical Helix Mimics as Potent Inhibitors of Protein–Protein Interactions," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 22, pp. 7877–7888, Jun. 2014.
- [156] P. Juin, O. Geneste, F. Gautier, S. Depil, and M. Campone, "Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 7, pp. 455–465, Jun. 2013.
- [157] A. R. D. Delbridge, S. Grabow, A. Strasser, and D. L. Vaux, "Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 16,

- no. 2, pp. 99–109, 2016.
- [158] J. D. Sadowsky *et al.*, “($\alpha/\beta+\alpha$)-peptide antagonists of BH3 domain/Bcl-x L recognition: Toward general strategies for foldamer-based inhibition of protein-protein interactions,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 1, pp. 139–154, 2007.
- [159] E. F. Lee *et al.*, “High-Resolution Structural Characterization of a Helical α/β -Peptide Foldamer Bound to the Anti-Apoptotic Protein Bcl-x L,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 48, no. 24, pp. 4318–4322, Jun. 2009.
- [160] W. S. Horne, M. D. Boersma, M. A. Windsor, and S. H. Gellman, “Sequence-based design of α/β -peptide foldamers that mimic BH3 domains,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 47, no. 15, pp. 2853–2856, 2008.
- [161] E. F. Lee *et al.*, “Structural Basis of Bcl-xL Recognition by a BH3-Mimetic α/β -Peptide Generated by Sequence-Based Design,” *ChemBioChem*, vol. 12, no. 13, pp. 2025–2032, Sep. 2011.
- [162] M. D. Boersma *et al.*, “Evaluation of diverse α/β -backbone patterns for functional α -helix mimicry: Analogues of the Bim BH3 domain,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 1, pp. 315–323, 2012.
- [163] M. D. Boersma *et al.*, “Evaluation of Diverse α/β -Backbone Patterns for Functional α -Helix Mimicry: Analogues of the Bim BH3 Domain,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 1, pp. 315–323, Jan. 2012.
- [164] J. W. Checco *et al.*, “ α/β -Peptide Foldamers Targeting Intracellular Protein-Protein Interactions with Activity in Living Cells,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, no. 35, pp. 11365–11375, Sep. 2015.
- [165] D. M. Eckert and P. S. Kim, “Mechanisms of Viral Membrane Fusion and Its Inhibition,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 70, no. 1, pp. 777–810, Jun. 2001.
- [166] D. C. Chan, D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim, “Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein,” *Cell*, vol. 89, no. 2, pp. 263–273, 1997.
- [167] W. Weissenhorn, A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley, “Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41,” *Nature*, vol. 387, no. 6631, pp. 426–430, May 1997.
- [168] K. Tan, J. Liu, J. Wang, S. Shen, and M. Lu, “Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 23, pp. 12303–12308, 1997.
- [169] L. Morand-Joubert, “Place du maraviroc dans la stratégie antirétrovirale: Intérêt et faisabilité des tests génotypiques dans la détermination du tropisme viral,” *Virologie*, vol. 13, no. 3, pp. 159–169, 2009.
- [170] D. C. Chan, C. T. Chutkowski, and P. S. Kim, “Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, no. 26, pp. 15613–15617, Dec. 1998.
- [171] V. N. Malashkevich, D. C. Chan, C. T. Chutkowski, and P. S. Kim, “Crystal structure of the simian immunodeficiency virus (SIV) gp41 core: conserved helical interactions underlie the broad inhibitory activity of gp41 peptides,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 16, pp. 9134–9, 1998.
- [172] C. T. Wild, D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, and T. J. Matthews, “Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human

- immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, no. 21, pp. 9770-9774, Oct. 1994.
- [173] G. H. Bird *et al.*, "Mucosal delivery of a double-stapled RSV peptide prevents nasopulmonary infection," *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 5, pp. 2113-2124, May 2014.
- [174] J. J. Dwyer *et al.*, "Design of helical, oligomeric HIV-1 fusion inhibitor peptides with potent activity against enfuvirtide-resistant virus," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 31, pp. 12772-12777, Jul. 2007.
- [175] W. S. Horne *et al.*, "Structural and biological mimicry of protein surface recognition by alpha/beta-peptide foldamers.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 35, pp. 14751-6, 2009.
- [176] K. L. Pierce, R. T. Premont, and R. J. Lefkowitz, "Signalling: Seven-transmembrane receptors," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 9, pp. 639-650, 2002.
- [177] S. K. Shenoy and R. J. Lefkowitz, "Seven-Transmembrane Receptor Signaling Through -Arrestin," *Sci. Signal.*, vol. 2005, no. 308, p. cm10-cm10, 2005.
- [178] S. M. DeWire, S. Ahn, R. J. Lefkowitz, and S. K. Shenoy, "β-Arrestins and Cell Signaling," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 69, no. 1, pp. 483-510, Mar. 2007.
- [179] T. Kenakin, "Ligand-selective receptor conformations revisited: The promise and the problem," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 24, no. 7, pp. 346-354, 2003.
- [180] B. K. Kobilka and X. Deupi, "Conformational complexity of G-protein-coupled receptors," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 28, no. 8, pp. 397-406, 2007.
- [181] T. Kenakin and A. Christopoulos, "Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 12, no. 3, pp. 205-216, 2012.
- [182] S. Rajagopal, K. Rajagopal, and R. J. Lefkowitz, "Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9, no. 5, pp. 373-386, 2010.
- [183] E. Reiter, S. Ahn, A. K. Shukla, and R. J. Lefkowitz, "Molecular Mechanism of β-Arrestin-Biased Agonism at Seven-Transmembrane Receptors," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 52, no. 1, pp. 179-197, Feb. 2012.
- [184] L. L. Baggio and D. J. Drucker, "Biology of Incretins: GLP-1 and GIP," *Gastroenterology*, vol. 132, no. 6, pp. 2131-2157, 2007.
- [185] L. Hansen, C. F. Deacon, C. Ørskov, and J. J. Holst, "Glucagon-Like Peptide-1-(7-36)Amide Is Transformed to Glucagon-Like Peptide-1-(9-36)Amide by Dipeptidyl Peptidase IV in the Capillaries Supplying the L Cells of the Porcine Intestine 1," *Endocrinology*, vol. 140, no. 11, pp. 5356-5363, Nov. 1999.
- [186] F. S. Willard and K. W. Sloop, "Physiology and emerging biochemistry of the glucagon-like peptide-1 receptor," *Exp. Diabetes Res.*, vol. 2012, 2012.
- [187] G. I. Robles and D. Singh-Franco, "A review of exenatide as adjunctive therapy in patients with type 2 diabetes," *Drug Des. Devel. Ther.*, no. 3, pp. 219-240, 2009.
- [188] L. B. Knudsen *et al.*, "Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration," *J. Med. Chem.*, vol. 43, no. 9, pp. 1664-1669, 2000.
- [189] J. J. Neumiller and R. K. Campbell, "Liraglutide: A Once-Daily Incretin Mimetic for

- the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus," *Ann. Pharmacother.*, vol. 43, no. 9, pp. 1433-1444, Sep. 2009.
- [190] C. R. Underwood *et al.*, "Crystal structure of glucagon-like peptide-1 in complex with the extracellular domain of the glucagon-like peptide-1 receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 1, pp. 723-730, 2010.
- [191] K. Adelhorst, B. B. Hedegaard, L. B. Knudsen, and O. Kirk, "Structure-activity studies of glucagon-like peptide-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 9, pp. 6275-8, 1994.
- [192] C. Sarrauste De Menthière *et al.*, "Structural requirements of the N-terminal region of GLP-1-[7-37]-NH₂ for receptor interaction and cAMP production," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 39, no. 6, pp. 473-80, Jun. 2004.
- [193] L. P. Miranda *et al.*, "Design and Synthesis of Conformationally Constrained Glucagon-Like Peptide-1 Derivatives with Increased Plasma Stability and Prolonged in Vivo Activity," *J. Med. Chem.*, vol. 51, no. 9, pp. 2758-2765, May 2008.
- [194] E. N. Murage, G. Gao, A. Bisello, and J.-M. Ahn, "Development of Potent Glucagon-like Peptide-1 Agonists with High Enzyme Stability via Introduction of Multiple Lactam Bridges," *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 17, pp. 6412-6420, Sep. 2010.
- [195] Y. Salomon, C. Londos, and M. Rodbell, "A highly sensitive adenylate cyclase assay," *Anal. Biochem.*, vol. 58, no. 2, pp. 541-548, 1974.
- [196] J. L. Price, E. B. Hadley, J. D. Steinkruger, and S. H. Gellman, "Detection and Analysis of Chimeric Tertiary Structures by Backbone Thioester Exchange: Packing of an α Helix against an α/β -Peptide Helix," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 49, no. 2, pp. 368-371, Jan. 2010.
- [197] L. Jessen *et al.*, "Suppression of Food Intake by Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists: Relative Potencies and Role of Dipeptidyl Peptidase-4," *Endocrinology*, vol. 153, no. 12, pp. 5735-5745, Dec. 2012.
- [198] K. Hupe-Sodmann *et al.*, "Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides," *Regul. Pept.*, vol. 58, no. 3, pp. 149-156, Aug. 1995.
- [199] C. F. Deacon, L. B. Knudsen, K. Madsen, F. C. Wiberg, O. Jacobsen, and J. J. Holst, "Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity," *Diabetologia*, vol. 41, no. 3, pp. 271-278, Feb. 1998.
- [200] K. Burgess, H. Shin, and D. S. Linthicum, "Solid-Phase Syntheses of Unnatural Biopolymers Containing Repeating Urea Units," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 34, no. 8, pp. 907-909, May 1995.
- [201] K. Burgess *et al.*, "Solid Phase Syntheses of Oligoureas," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, no. 7, pp. 1556-1564, Feb. 1997.
- [202] W. D. Kumler and G. M. Fohlen, "The Dipole Moment and Structure of Urea and Thiourea 1," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 64, no. 8, pp. 1944-1948, Aug. 1942.
- [203] V. Semetey *et al.*, "Stable Helical Secondary Structure in Short-Chain N,N'-Linked Oligoureas Bearing Proteinogenic Side Chains Access to both the Bruker ARX 500 facilities of the Service Commun de RMN (Faculté de Chimie, Strasbourg) and the Bruker DRX 600 NMR facilities of t," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 41, no. 11, p. 1893, Jun. 2002.

- [204] A. Violette *et al.*, "N, N'-Linked Oligoureas as Foldamers: Chain Length Requirements for Helix Formation in Protic Solvent Investigated by Circular Dichroism, NMR Spectroscopy, and Molecular Dynamics," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 7, pp. 2156–2164, Feb. 2005.
- [205] A. Violette *et al.*, "Exploring helical folding of oligoureas during chain elongation by high-resolution magic-angle-spinning (HRMAS) NMR spectroscopy," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 14, no. 13, pp. 3874–3882, Apr. 2008.
- [206] G. Guichard, A. Violette, G. Chassaing, and E. Miclet, "Solution structure determination of oligoureas using methylene spin state selective NMR at 13 C natural abundance," *Magn. Reson. Chem.*, vol. 46, no. 10, pp. 918–924, Oct. 2008.
- [207] L. Fischer *et al.*, "The Canonical Helix of Urea Oligomers at Atomic Resolution: Insights Into Folding-Induced Axial Organization," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 49, no. 6, pp. 1067–1070, Dec. 2009.
- [208] J. Fremaux, L. Fischer, T. Arbogast, B. Kauffmann, and G. Guichard, "Condensation approach to aliphatic oligourea foldamers: Helices with N-(Pyrrolidin-2-ylmethyl)ureido junctions," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 50, no. 48, pp. 11382–11385, 2011.
- [209] T. Hintermann, K. Gademann, B. Jaun, and D. Seebach, "β-Peptides Forming More Stable Secondary Structures than α-Peptides: Synthesis and helical NMR-solution structure of the β-hexapeptide analog of H-(Val-Ala-Leu)2-OH," *Helv. Chim. Acta*, vol. 81, no. 5–8, pp. 983–1002, 1998.
- [210] Y.-R. Nelli, C. Douat-Casassus, P. Claudon, B. Kauffmann, C. Didierjean, and G. Guichard, "An activated building block for the introduction of the histidine side chain in aliphatic oligourea foldamers," *Tetrahedron*, vol. 68, no. 23, pp. 4492–4500, Jun. 2012.
- [211] L. Fischer and G. Guichard, "Folding and self-assembly of aromatic and aliphatic urea oligomers: Towards connecting structure and function," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 8, no. 14, p. 3101, 2010.
- [212] N. Pendem *et al.*, "Helix-Forming Propensity of Aliphatic Urea Oligomers Incorporating Noncanonical Residue Substitution Patterns," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 12, pp. 4884–4892, Mar. 2013.
- [213] A. Violette *et al.*, "Mimicking Helical Antibacterial Peptides with Nonpeptidic Folding Oligomers," *Chem. Biol.*, vol. 13, no. 5, pp. 531–538, May 2006.
- [214] P. Claudon *et al.*, "Consequences of isostructural main-chain modifications for the design of antimicrobial foldamers: Helical mimics of host-defense peptides based on a heterogeneous amide/urea backbone," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 49, no. 2, pp. 333–336, 2010.
- [215] C. Douat *et al.*, "A cell-penetrating foldamer with a bioreducible linkage for intracellular delivery of DNA," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 54, no. 38, pp. 11133–7, Sep. 2015.
- [216] J. D. Sadowsky *et al.*, "Chimeric (α/β + α)-Peptide Ligands for the BH3-Recognition Cleft of Bcl-x L: Critical Role of the Molecular Scaffold in Protein Surface Recognition," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 34, pp. 11966–11968, Aug. 2005.

Chapitre 2

Stabilisation de peptides via l'ajout de segments oligourées

La fonction des protéines est intimement liée à leur structuration dans l'espace. Les approches chimiques visant à renforcer ou à imiter les éléments de structure secondaire/tertiaire des protéines représentent actuellement une stratégie innovante pour développer des outils thérapeutiques. En effet, 62% des complexes protéine/protéine dont la structure a été publiée dans la « *Protein Data Bank* » (PDB) mettent en jeu des interfaces interfélicales.[1] Parvenir à moduler la biodisponibilité ainsi que la pénétration cellulaire des hélices peptidiques ciblant ce type d'interfaces est une voie prometteuse vers le développement de traitements médicaux.[2][3][4][5] Différentes stratégies permettant de stabiliser la structure en hélice des peptides naturels, utilisant des méthodes établies; telles que l'introduction d'acides aminés α,α -disubstitués[6][7][8][9] ainsi que la macrocyclisation de chaînes latérales[10][11][12][13][14], ont conduit au développement de peptides modulateurs d'interactions protéine/protéine (**Figure II.50**).[15][16][17]

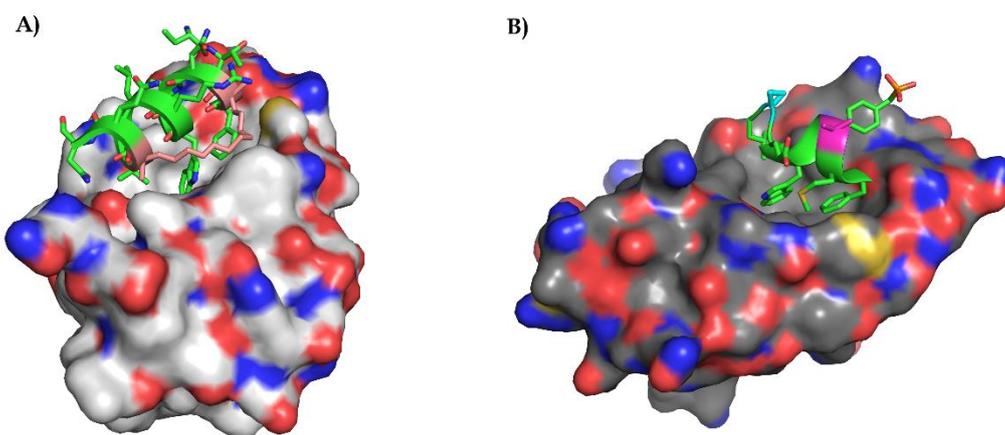


Figure II.50 : Structures cristallographiques d'hélices stabilisées en complexe avec la protéine ciblée : a) « stapled » peptide en complexe avec la protéine MDM2 (PDB ID : 3V3B) [15] et b) peptide contenant un acide aminé $C\alpha,\alpha$ -disubstitué (rose) ainsi qu'un dérivé cyclopropanique (bleu) en complexe avec la protéine HDMX (PDB ID : 3FE7).[17]

L'introduction de « caps », aux extrémités des séquences peptidiques, développée dans le chapitre 1, est une autre approche prometteuse pour augmenter la propension de peptides courts à adopter des structures hélicoïdales. Parallèlement, le développement des foldamères[18] et particulièrement les foldamères hétérogènes mimant le repliement des hélices peptidiques,[19] a également conduit au développement d'IPP.[20][21][22] La possibilité d'utiliser le foldamère comme un « cap » permettant d'amorcer et de stabiliser la structuration en hélice d'un segment peptidique contigu n'a été que très modestement explorée dans le contexte des peptides chimériques ($\alpha/\beta+\alpha$) conçus par Gellman (chapitre 1).

Dans cette partie de mon travail de thèse, nous avons étudié la possibilité d'utiliser un segment foldamère de type oligourée comme un nouveau type de cap non-naturel pour stabiliser la structure en hélice α des peptides, la compatibilité entre les deux hélices passant par la formation d'un réseau de liaisons hydrogène continu entre les deux types d'hélices. C'est donc une approche de « foldamère à blocs » et non pas d'insertion ponctuelle que nous avons souhaité explorer. L'hybridation du squelette peptidique naturel avec celui d'un foldamère non-naturel en une seule et même hélice continue nécessite qu'indépendamment les deux hélices possèdent des paramètres de structure très proches. Les oligourées aliphatiques sont des foldamères peptidomimétiques dans lesquelles la conformation hélicoïdale est stabilisée par un réseau régulier de liens hydrogène à trois centres et partagent des caractéristiques avec des hélices peptidiques naturelles telles que la polarité et le pas de l'hélice (**Figure II.51**).[23][24][25][26]

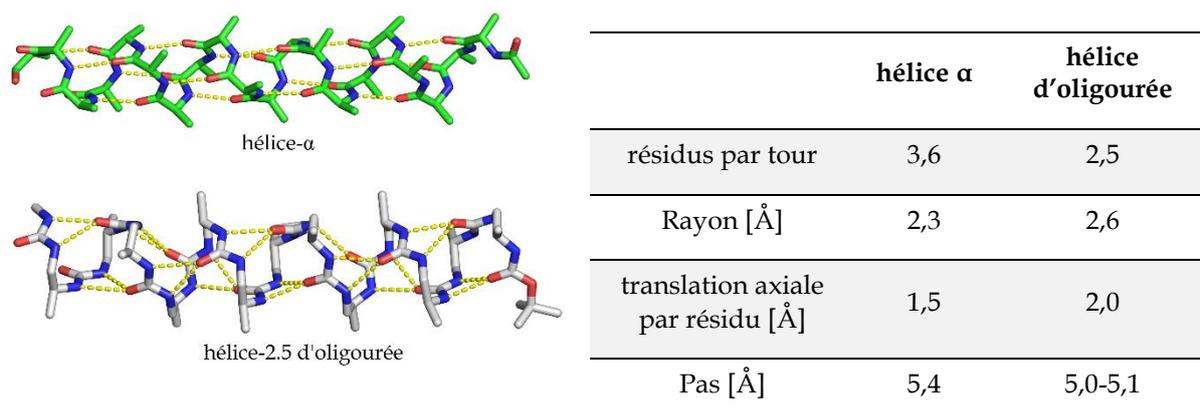


Figure II.51 : Structures cristallographiques d'une hélice α peptidique et d'une hélice-2.5 d'oligourée. Table descriptive des paramètres de l'hélice α -peptidique et de l'hélice-2.5 d'oligourée.

La capacité des oligourées aliphatiques fusionnées à des segments peptidiques courts à nucléer des structures α -hélicoïdales a été étudiée au laboratoire par J. Fremaux à la fois en solvant organique polaire et à l'état cristallin.[27] Les oligomères chimères **II.1** et **II.2**, constitués d'un segment peptidique de 7 résidus, ont été décorés d'une portion oligourée à 6 résidus positionnée à l'extrémité C-terminale de la portion peptidique pour le composé **II.1** et à l'extrémité N-terminale de la portion peptidique pour le composé **II.2**. A l'état cristallin, les chimères adoptent sur toute la longueur de la séquence une structure en hélice continue et bien définie (**Figure II.52**). Les hélices peptidiques et oligourées sont connectées par un réseau de liaisons hydrogènes unique C=O...H-N : $i, i+3$ et $i, i+4$.

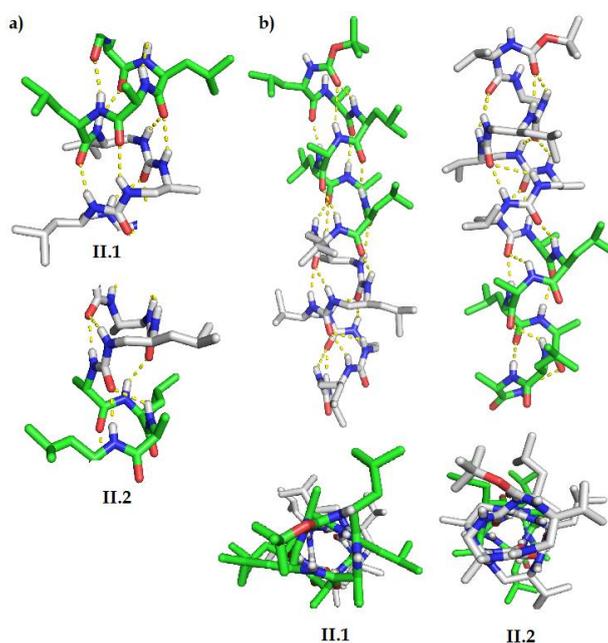


Figure II.52 : Représentation des structures cristallographiques des oligomères chimères **II.1** et **II.2** : (a) réseau de liaisons hydrogène spécifiques à la zone de jonction entre le segment oligourée (atomes de carbone en gris) et le segment peptidique (atomes de carbone en vert) ; (b) vue de côté et vue de dessus.

Dans l'oligomère chimère **II.1**, les trois carbonyles des liens amides terminaux forment des liaisons hydrogènes avec les NHs urée ainsi que le NH du premier lien amide de la jonction. Pour l'oligomère chimère **II.2**, les deux carbonyles des liens urées terminaux forment des liaisons hydrogènes avec les 3 premiers NHs des liens amides. L'examen du réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires dans le segment peptidique des composés **II.1** et **II.2**, et

des angles de torsion du squelette pour les 7 résidus α -acides aminés (**Figure II.53**), révèlent des différences subtiles entre les 2 hélices peptidiques. Les paramètres d'hélice des segments peptidiques des composés **II.1** et **II.2** ont été reportés dans la **Figure II.53** et comparés avec ceux reportés pour les hélices canoniques 3_{10} et α . Alors que la conformation hélicoïdale du segment peptidique du composé **II.1** possède les paramètres de l'hélice α , la portion peptidique de composé **II.2** partage des caractéristiques structurales avec l'hélice 3_{10} .

| | II.1 | II.2 | α-helix | 3_{10}-helix |
|--------------------------------|-------------|-------------|----------------------------------|----------------------------------|
| (Φ , Ψ) [°] | (-66, -40) | (-69, -29) | (-63, -42) | (-57, -30) |
| résidus par tour | 3,6 | 3,6 | 3,6 | 3,2 |
| Rayon [Å] | 2,3 | 2,2 | 2,3 | |
| translation axiale /résidu [Å] | 1,5 | 1,6 | 1,5 | 1,9 |
| Pas [Å] | 5,4 | 5,8 | 5,4 | 6,3 |

Figure II.53 : Tableau descriptif des angles moyens de torsion du squelette peptidique et des paramètres de l'hélice peptidique dans les structures cristallines des chimères **II.1** et **II.2** et comparaison avec les hélices canoniques α et 3_{10} . Ces paramètres ont été calculés à l'aide du programme Helanal en utilisant uniquement les carbones ^{13}C des résidus acides aminés.[28]

Pour caractériser d'avantage la propension du segment peptidique à adopter une conformation hélicoïdale, des expériences de RMN du proton en 1D et 2D ont été réalisées dans le CD_3OH . [27] Les constantes de couplage vicinales $^3\text{J}(\text{NH}, ^1\text{CH})$ le long du squelette peptidique se situent dans la gamme des valeurs typiques pour les peptides adoptant une conformation en hélice (3.0-6.4 Hz pour le composé **II.1** et 3.2-6.9 Hz pour le composé **II.2**). Les interactions NOEs mesurées pour les oligomères chimères **II.1** et **II.2** ont mis en évidence des couplages (i, i+4) et (i, i+3) au niveau des segments peptidiques des deux composés caractéristiques de la structuration en hélice. Ces résultats ont permis de valider la capacité des hélices d'oligourée et des hélices peptidiques à former des hélices hybrides chimères qui conservent les paramètres caractéristiques de chaque hélice aux extrémités. La zone de jonction hybride assure la communication entre les deux hélices, elle permet la cohésion du système en une seule et même hélice chimère. Forts de ce constat, nous avons souhaité développer une approche utilisant la portion oligourée des oligomères chimères comme un tuteur d'hélice α peptidique, un exemple inédit de cap non-naturel à base de foldamères.

I. Introduction d'un « cap » uréido aux extrémités C- et/ou N-terminales d'un peptide modèle soluble en solvant organique

Pour mieux comprendre la communication entre les deux squelettes structurés en hélice ainsi que la taille minimale du segment uréido requise pour promouvoir/stabiliser la structuration en hélice de la séquence peptidique, nous avons conçu une nouvelle série d'oligomères hybrides. Comme le mettent en évidence les structures cristallographiques des oligomères **II.1** et **II.2** (**Figure II.52**), les 4 COs amides situés à l'extrémité C-terminale de la séquence peptidique sont stabilisés par des liaisons hydrogène formées avec les NHs urées (oligomère **II.1**) et réciproquement les 4 NHs amides situés à l'extrémité N-terminale de la séquence peptidique sont stabilisés par des liaisons hydrogène formées avec les COs urées (oligomère **II.2**). En analysant ces données, il apparaît que 2 à 3 résidus urées semblent nécessaires pour établir ces interactions clés dans le processus de nucléation de l'hélice peptidique. Les nouvelles séquences sont donc constituées d'un segment peptidique de 7 résidus auquel un fragment uréido constitué de deux ou trois résidus a été inséré à l'extrémité N- et/ou C-terminale. Afin de déterminer l'influence de ces « caps » uréido sur la stabilisation de la structure en hélice de la portion peptidique, nous avons préparé les peptides apparentés constitués respectivement de 7 à 9 acides aminés, afin de prendre en compte l'augmentation de la longueur de la chaîne principale des composés hybrides (**Figure II.54**).

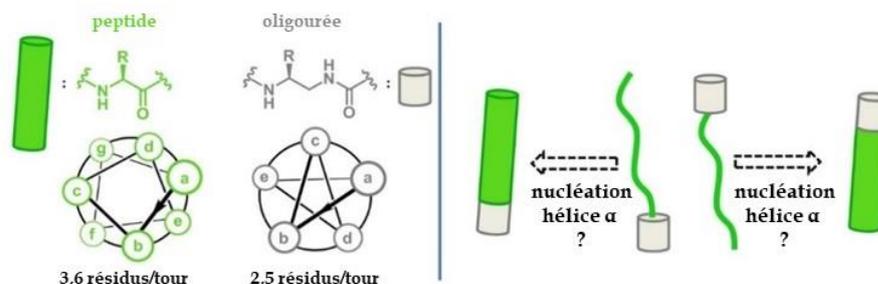


Figure II.54 : Représentation de la stabilisation de l'hélice peptidique en fonction de l'insertion d'un fragment oligourée.[27]

1. Synthèse

Les séquences ainsi que les rendements associés à la synthèse des oligomères visant à insérer un fragment uréido aux extrémités N- ou C-terminales d'un peptide modèle soluble en milieu organique sont listées **Figure II.55**.

| Composé | Séquence | Rdt ^a | ESI-MS [M+Na] ⁺ | HPLC <i>t_R</i> (min) ^b |
|-------------|---|------------------|----------------------------|--|
| II.3 | Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Val ^U -Ala ^U -NH ₂ | 11% | 1033,67 | 7,06 |
| II.4 | Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Val ^U -Ala ^U -Leu ^U -NH ₂ | 10% | 1175,73 | 7,26 |
| II.5 | Boc-Val ^U -Ala ^U -Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-NH ₂ | 2% | 1033,73 | 6,98 |
| II.6 | Boc-Val ^U -Ala ^U -Leu ^U -Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-NH ₂ | 3% | 1175,87 | 7,27 |
| II.7 | Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-NH ₂ | 7% | 805,40 | 5,42 |
| II.8 | Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-NH ₂ | 10% | 989,60 | 5,37 |

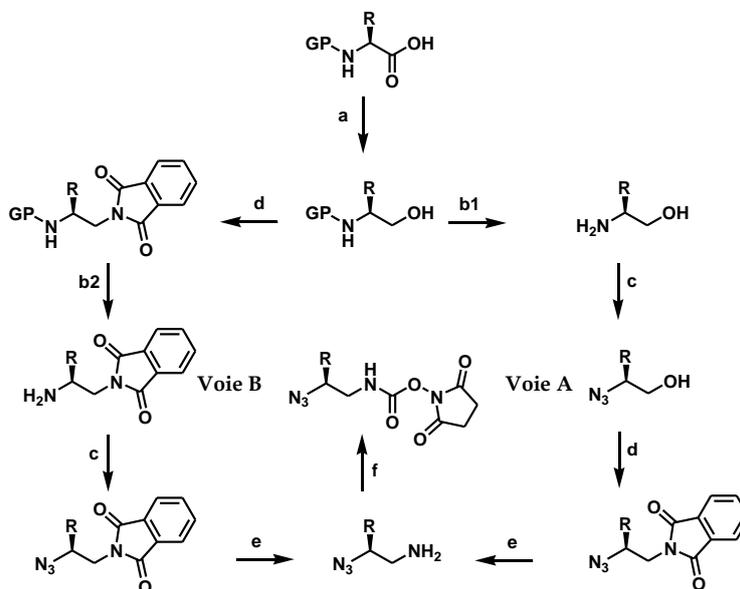
Figure II.55 : Séquences, masses, temps de rétentions HPLC, et rendements de synthèse des oligomères chimères organosolubles et possédant un « cap » oligourée à l'une ou l'autre extrémité de la partie peptidique. ^a Rendement après purification HPLC ; ^b système RP-HPLC : gradient linéaire 10 à 100% de B en 10 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans CH₃CN), détection UV à 200 nm.

Pour favoriser la propension des oligomères décrits ci-dessus à adopter une structure hélicoïdale, l'extrémité N-terminale de ces composés a été protégée par un groupement tert-butyloxycarbonyle (Boc) permettant de fournir un accepteur de liaisons hydrogène supplémentaire. Nous avons donc choisi une stratégie de protection de nos monomères qui soit compatible avec la synthèse peptidique, et l'emploi d'une résine labile en milieu acide faible (Sieber amide [29]) ; la stratégie N₃. [30] Afin de pouvoir conserver le groupement protecteur Boc à l'extrémité N-terminale de chaque séquence, nous avons également utilisé un monomère N-Boc protégé pour les séquences pourvues d'un fragment oligourée à l'extrémité N-terminale.

a. Synthèse de monomères en solution

i. Synthèse des monomères azoture activés

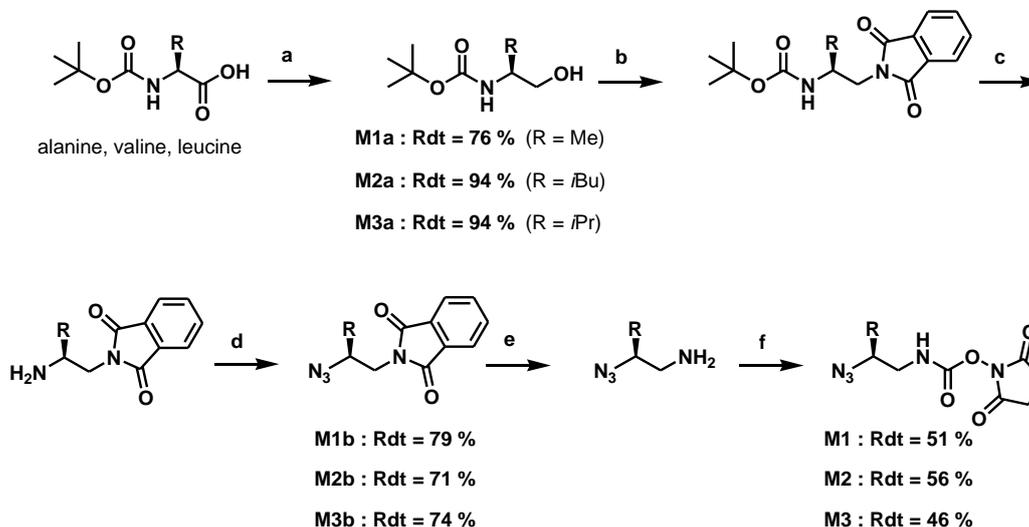
Deux voies de synthèse ont été développées dans l'équipe pour synthétiser les monomères d'azoture activés (**Figure II.56**), en fonction de la nature de la chaîne latérale des acides α -aminés N-protégés de départ. [30] Après la réduction de l'acide en alcool, la voie **A** conduit à la conversion de la fonction amine du dérivé β -amino-alcool déprotégé en azoture suivant la méthode de Wong [31] qui utilise du chlorhydrate d'imidazole-1-sulfonyl azoture comme agent de transfert (N₃SO₂Im.HCl). [32][33] Une réaction de Mitsunobu permet ensuite de générer le dérivé phtalimide correspondant. [34][35] Cependant, en raison de la grande volatilité des intermédiaires azido-alcools pourvus de chaînes latérales à faible poids moléculaire (**R = i-Bu, i-Pr, Me**), la voie **B** a été développée. Cette voie de synthèse consiste à former directement le dérivé phtalimide à partir du dérivé β -amino-alcool protégé par un groupe alkoxy-carbonyl. Après déprotection, l'amine est mise en présence de l'agent de transfert (N₃SO₂Im.HCl), [32][33] pour donner le dérivé azoture correspondant. [31] Ces deux voies de synthèse conduisent à l'obtention de l'intermédiaire commun azido-phtalimide. La réduction du phtalimide avec l'hydrazine hydratée [36] conduit ensuite à la formation des dérivés azido-amines qui ont directement été activés sous forme de carbamates de succinimide par traitement avec du carbonate de N, N'-disuccinimidyle (DSC).



a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20 °C ; 2) NaBH₄, H₂O ; **b** : 1) H₂, Pd/C, MeOH, 25 °C ; 2) TFA, 25 °C ; **c** : N₃SO₂Im.HCl, K₂CO₃, CuSO₄.5H₂O, CH₃CN, H₂O, 25 °C ; **d** : PPh₃, DIAD, phtalimide, CH₂Cl₂, 25 °C ; **e** : N₂H₄, MeOH, 70 °C ; **f** : N,N'-Disuccinimide carbonate, CH₂Cl₂, 25 °C.

Figure II.56 : Schéma de synthèse des monomères azoture activés sous forme de carbamate de succinimide

Les carbamates activés dérivés de l'alanine, la valine et de la leucine ont été obtenus respectivement à partir des acides aminés protégés Boc-L-Ala-OH, Boc-L-Val-OH et Boc-L-Leu-OH suivant la *voie B* de synthèse des monomères d'azoture activés décrite ci-dessus.[30] Dans ces conditions, les monomères activés **M1** dérivé de l'alanine, **M2** dérivé de la valine et **M3** dérivé de la leucine ont été obtenus avec des rendements respectifs de 28 %, 37 %, et 35 % (**Figure II.57**).

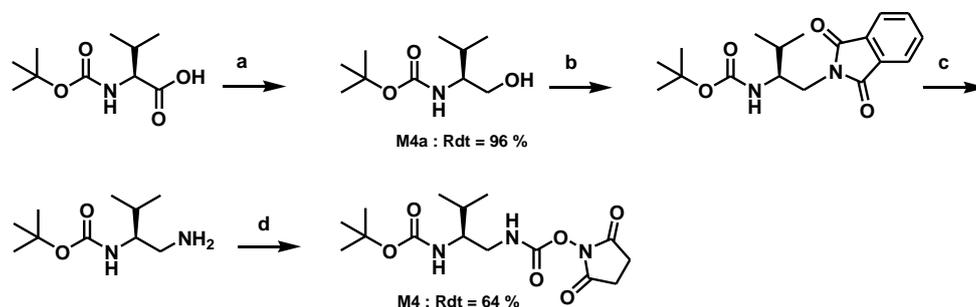


a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20°C ; 2) NaBH_4 , H_2O ; **b** : PPh_3 , DIAD, phthalimide, CH_2Cl_2 , 25°C ; **c** : TFA, 25°C ; **d** : $\text{N}_3\text{SO}_2\text{IM.HCl}$, K_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, CH_3CN , H_2O , 25°C ; **e** : N_2H_4 , MeOH, 70°C ; **f** : *N,N'*-Disuccinimide carbonate, CH_2Cl_2 , 25°C .

Figure II.57 : Schéma de synthèse par la *voie B* des monomères azoture activés sous forme de carbamate de succinimide **M1-M3**.

ii. Synthèse des monomères *N*-Boc protégés activés

La voie de synthèse permettant d'obtenir les monomères Boc protégés et activés sous forme de carbamate de succinimide a été développée au laboratoire.[37] Le carbamate activé dérivé de la valine a été obtenu à partir de l'acide aminé protégé Boc-L-Val-OH suivant la procédure décrite dans la **Figure II.58**. Après la réduction de l'acide en alcool, une réaction de Mitsunobu conduit à la formation du dérivé phthalimide correspondant. L'amine issue de la réduction du phthalimide avec l'hydrazine hydratée est ensuite activée avec le carbonate de dissuccinimide pour générer le monomère souhaité avec un rendement de 62 % pour **M4**.



a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20°C ; 2) NaBH_4 , H_2O ; **b** : PPh_3 , DIAD, phthalimide, CH_2Cl_2 , 25°C ; **c** : N_2H_4 , MeOH, 70°C ; **d** : *N,N'*-Disuccinimide carbonate, CH_2Cl_2 , 25°C .

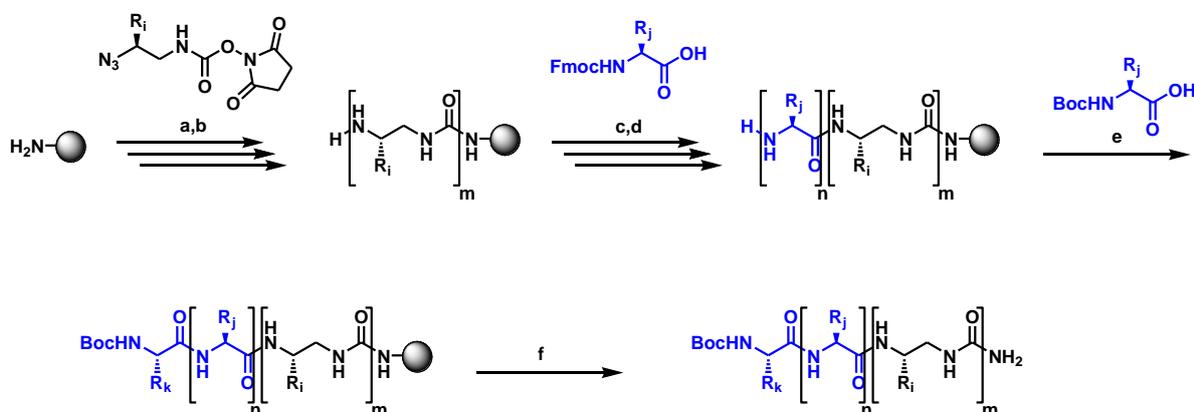
Figure II.58 : Schéma de synthèse du monomère **M4** *N*-Boc protégé activé sous forme de carbamate de succinimide.

b. Synthèse sur support solide des oligomères

Durant l'intégralité de mon travail de thèse, j'ai privilégié la synthèse sur support solide des oligomères chimères et peptides en raison de sa flexibilité et de sa rapidité. La synthèse des oligourées a été très rapidement adaptée sur support solide.[38][39] Toutefois, la méthodologie initiale utilisée dans le laboratoire[40] bien que très robuste restait limitée à l'utilisation de monomères N-Boc protégés. La molécule finale devait être séparée de la résine par un traitement à l'acide fluorhydrique qui n'était pas pratiqué sur place. Une nouvelle approche de synthèse sur support solide, rapide et compatible avec l'emploi de résines sensibles aux acides a été développée au laboratoire par C. Douat-Casassus et K. Pulka.[30]

i. Synthèse sur support solide des oligomères II.3 à II.4

Cette méthodologie utilise le couplage sous champ micro-ondes de monomères azoture activés sous forme de carbamate de succinimide. L'amine est ensuite régénérée sur le support par une réaction de Staudinger sous champ micro-ondes pour permettre le couplage du monomère suivant. Cette stratégie couramment utilisée au laboratoire a été appliquée pour préparer avec succès les oligomères **II.3** et **II.4** possédant des portions α -peptidiques localisées à l'extrémité N-terminale de ces composés (**Figure II.59**). Ces synthèses ont été réalisées sur une échelle de 100 μ moles à l'aide d'une résine Sieber amide[29] (loading : 0.62 mmol.g⁻¹) clivable en milieu acide faible (2% de TFA dans le CH₂Cl₂) et permettant de conserver le groupement Boc terminal. Les acides α -aminés protégés par un groupement Fmoc ont été couplés sous champ micro-ondes (appareil CEM Discovery), en présence d'O-(benzotriazol-1-yl)-N, N, N', N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) et d'hydroxybenzotriazole (HOBT). Les composés ont ensuite été clivés de leur support, purifiés par HPLC semi-préparative et caractérisés par RP-HPLC analytique et spectrométrie de masse (*electrospray*).



a : monomère azoture protégé activé : **M1**, **M2**, **M3** (1,5 equiv), DIEA (3 equiv), (50 W, 50 °C, 15 min) ; b : PMe₃ (1M) dans le THF (10 equiv), dioxane/H₂O (7 :3), (50 W, 50 °C, 15 min) ; c : Fmoc-Xaa-OH (5 equiv), HBTU (5 equiv), HOBT (5 equiv), (50 W, 50 °C, 10 min) ; d : 20% pipéridine, DMF, (50 W, 50 °C, 8 min) ; e : Boc-Xaa-OH (5 equiv), HBTU (5 equiv), HOBT (5 equiv), (50 W, 50 °C, 10 min) ; f : 2% TFA, CH₂Cl₂, 20% pyridine, MeOH.

Figure II.59 : Schéma général de synthèse sur support solide des oligomères chimères **II.3** et **II.4**

L'insertion d'un « cap » uréido à l'extrémité C-terminale de la séquence peptidique **II.7**, ne pose pas de difficulté particulière.

Le chromatogramme RP-HPLC de l'oligomère **II.4** (**Figure II.60**), avant purification par RP-HPLC semi-préparative, souligne la présence d'un produit largement majoritaire (plus de 70% de pureté) : l'oligomère **II.4** (temps de rétention : 7,26 minutes).

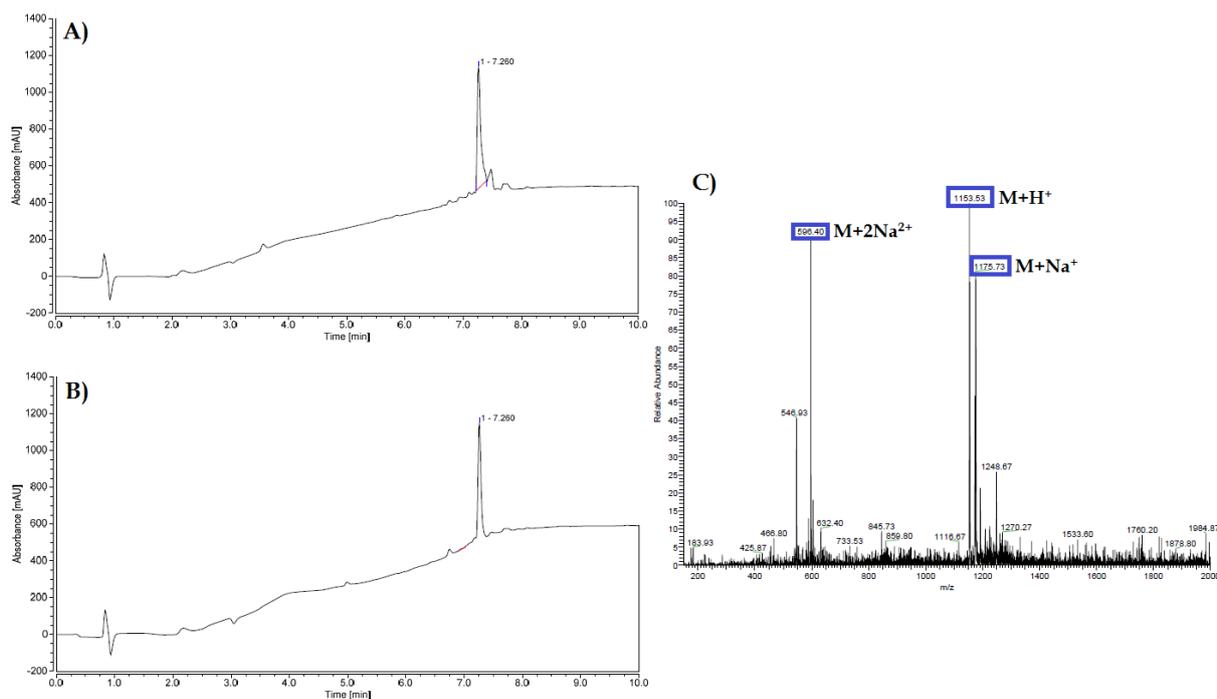


Figure II.60 : Caractérisation de l'oligomère **II.4** : **A** & **B**) chromatogramme HPLC de l'oligomère **II.4** avant et après purification par RP-HPLC semi-préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 50 à 100% de B en 10 min puis 100% de B pendant 10 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans MeOH)] ; **C**) spectre de masse de l'oligomère **II.4** après purification par RP-HPLC semi-préparative.

ii. Synthèse sur support solide des oligomères II.5 et II.6

La synthèse des oligomères chimères **II.5** et **II.6** a été réalisée selon les conditions précédemment décrites dans le chapitre 2 [paragraphe I.1.b.i.]. Afin de fournir un accepteur de liaison hydrogène supplémentaire aux composés **II.5** et **II.6**, le résidu urée situé à l'extrémité N-terminale a été inséré sous forme de monomère N-Boc protégé (**M4**).

Les oligomères **II.5** et **II.6** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 2 % et 3 % (**Figure II.55**). L'insertion du fragment oligourée à l'extrémité N-terminale de la séquence peptidique conduit donc à une chute significative du rendement. Le chromatogramme HPLC de l'oligomère **II.6** (**Figure II.61**), avant purification par RP-HPLC semi-préparative, met en évidence la présence de deux produits de synthèse, dans des proportions équivalentes : l'oligomère **II.6** (temps de rétention : 7,26 minutes) ainsi que le produit de délétion comportant uniquement la portion peptidique (temps de rétention : 5,43 minutes). Ces résultats pourraient s'expliquer par des phénomènes d'agrégations liés à l'élongation de la séquence peptidique, qui peuvent compromettre l'efficacité de la réaction de couplage et nécessiter un temps réactionnel plus long. La diminution de la substitution initiale de la résine (« loading ») est une bonne alternative pour lutter contre les phénomènes d'agrégations.

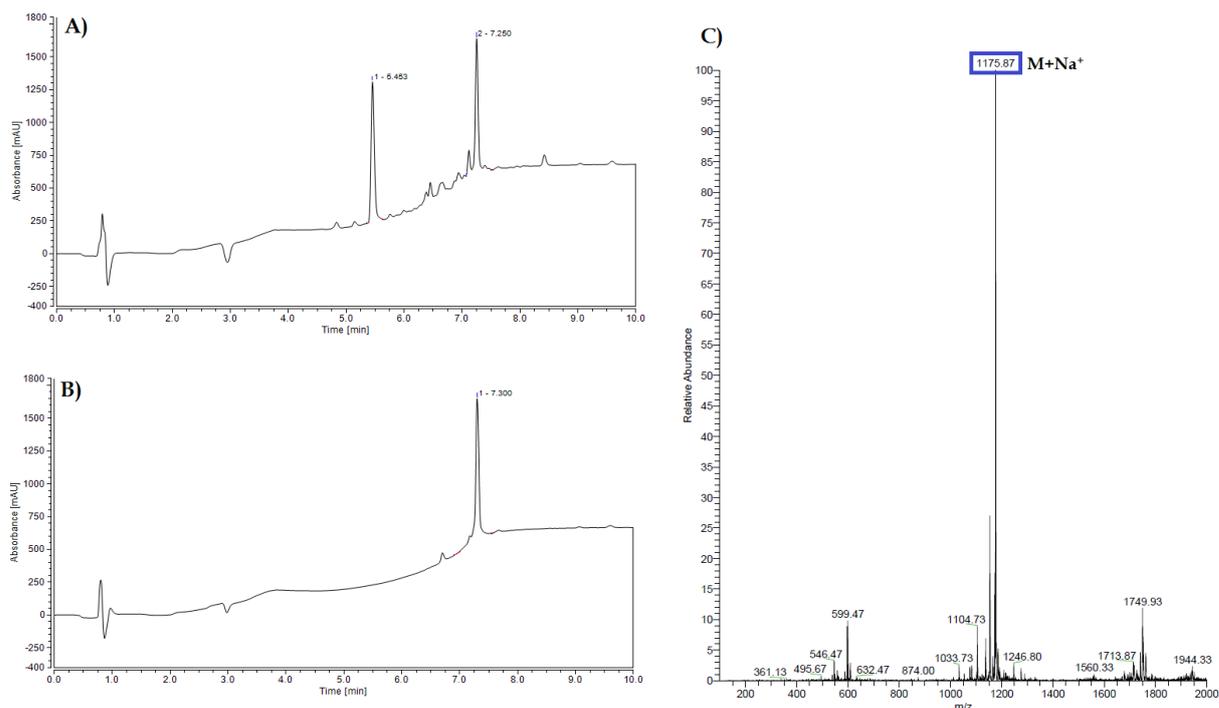


Figure II.61 : Caractérisation de l'oligomère **II.6** : **A & B**) chromatogramme HPLC de l'oligomère **II.6** avant et après purification par RP-HPLC semi-préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 50 à 100% de B en 10 min puis 100% de B pendant 10 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans MeOH)] ; **C**) spectre de masse de l'oligomère **II.6** après purification par RP-HPLC semi-préparative.

iii. Synthèse sur support solide des peptides II.7 et II.8

La synthèse des peptides **II.7** et **II.8** a été réalisée selon les conditions précédemment décrites dans le chapitre 2 [paragraphe I.1.b.i.].

La synthèse des peptides **II.7** et **II.8** n'a pas posé de problème particulier.

Le chromatogramme RP-HPLC de l'oligomère **II.8** (**Figure II.62**) souligne la présence d'un produit largement majoritaire (plus de 80% de pureté) : le peptide **II.8** (temps de rétention : 5,37 minutes). Le large pic observé au début du chromatogramme RP-HPLC correspond à l'éluion du DMF. En effet, quelques gouttes de DMF ont été ajoutées pour pouvoir solubiliser l'échantillon. Le spectre de masse met en évidence la présence d'un seul produit de synthèse.

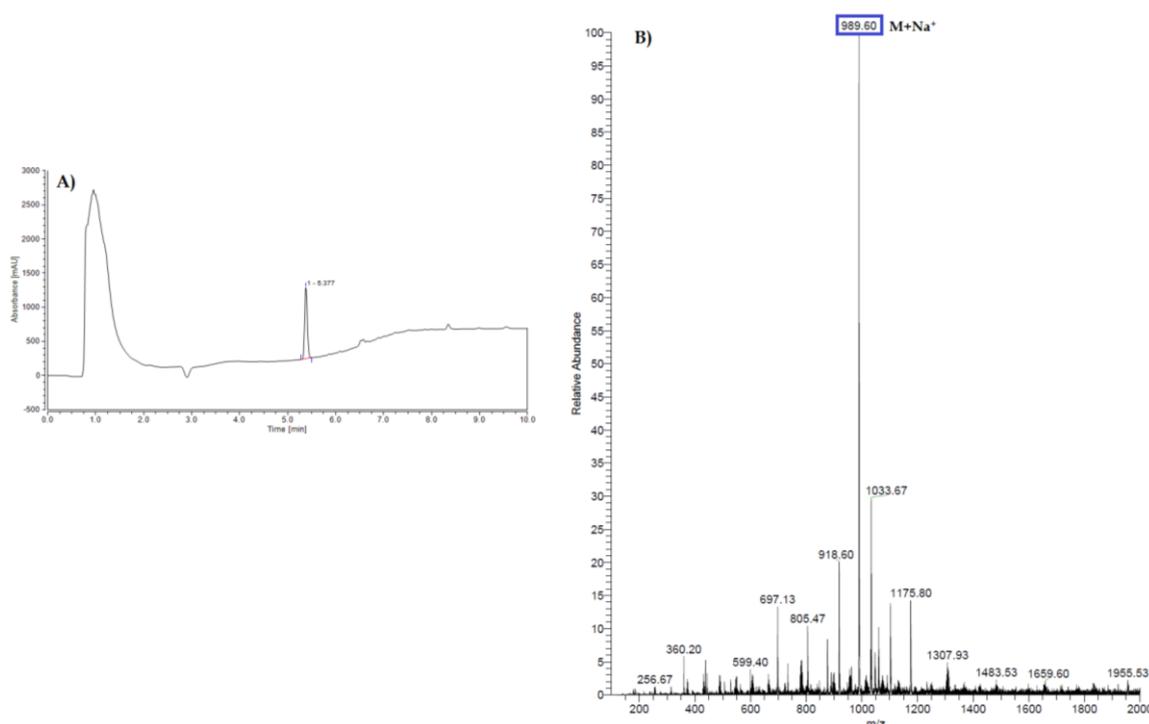


Figure II.62 : Caractérisation de le peptide **II.8** : **A**) chromatogramme HPLC de le peptide **II.8** après purification par précipitation dans Et₂O ; **B**) spectre de masse de le peptide **II.8** après purification par précipitation dans Et₂O.

2. Analyse conformationnelle des oligomères chimères

a. En solution : par dichroïsme circulaire

Les peptides **II.7** et **II.8** ont été étudiés par dichroïsme circulaire. Pour les peptides il est possible d'observer la signature caractéristique de l'hélice α avec un minimum caractéristique à 222nm. Le pourcentage de structuration en hélice dans chacune des séquences peptidiques a été déterminé en supposant une relation linéaire de l'ellipticité à 222 nm, utilisant l'équation suivante :

$$fh = ([\theta]_{obs222} - [\theta]_c) \div ([\theta]_{\infty 222} - [\theta]_c).$$

$[\theta]_c$ et $[\theta]_{\infty 222}$ correspondent respectivement à l'ellipticité molaire d'un peptide non structuré et à l'ellipticité molaire d'une séquence peptidique totalement structurée en hélice α . Ces deux paramètres peuvent être exprimés de la façon suivante :

$$[\theta]_c = (2220 - 53T)$$

$$[\theta]_{\infty 222} = (-44000 + 250T) \times (1 - k \div N)$$

Où T est la température d'expérimentation en degrés Celsius et N le nombre d'unités peptidiques constituant le peptide. Le terme $(1 - k \div N)$ est une correction pour les effets terminaux dans lequel k est le nombre de groupements carbonyles qui ne sont pas impliqués dans le réseau de liaisons hydrogène de l'hélice peptidique. Pour les peptides amidés à l'extrémité C-terminale, une valeur de $k = 3$ est généralement utilisée.[41][42]

Différentes conditions d'expérimentation ont été évaluées. L'ellipticité molaire à 222 nm a tout d'abord été mesurée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les expériences de RMN structurale ; à la concentration de 50 μ M en solution dans le MeOH. Le pourcentage d'hélicité calculé pour les peptides **II.7** et **II.8**, dans ces conditions, se situe entre 27 et 30 % (**Table II.63**). Nous avons ensuite choisi d'utiliser, à la même concentration, un

solvant connu pour favoriser la formation d'hélice α dans les séquences peptidiques ; le TFE. Les mesures d'ellipticité molaire ont été réalisées à deux températures différentes (20°C et 4°C) (Table II.63). Les valeurs mesurées soulignent la structuration en hélice du peptide II.8 dans le TFE aux alentours de 80%.

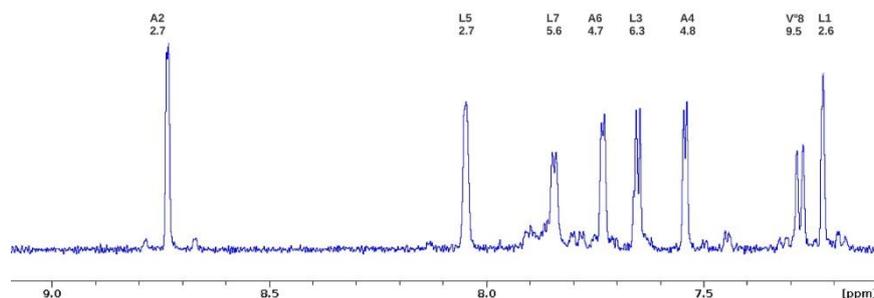
| Composé | Solvant | Température | $[\theta]_{\text{obs}222}$ | % d'hélicité |
|---------|---------|-------------|----------------------------|--------------|
| II.7 | MeOH | 20°C | -5284 | 27% |
| II.7 | TFE | 20°C | -10469 | 50% |
| II.7 | TFE | 4°C | -12475 | 54% |
| II.8 | MeOH | 20°C | -7192 | 30% |
| II.8 | TFE | 20°C | -20177 | 79% |
| II.8 | TFE | 4°C | -23133 | 82% |

Table II.63 : Table des valeurs mesurées de l'ellipticité molaire à 222nm et du pourcentage d'hélicité calculé pour les peptides II.7 et II.8 dans différentes conditions expérimentales.

b. En solution : par Résonance Magnétique Nucléaire

i. Caractérisation du composé II.3

Des expériences de RMN du proton en 1D et 2D ont été conduites sur l'oligomère chimère II.3 dans le CD₃OH. Les données acquises mettent en évidence la définition et la dispersion des signaux caractéristiques des protons des NHs amide (Figure II.64). De plus, les petites valeurs des constantes de couplages $^3J(\text{NH}, \alpha\text{CH})$ (entre 2,6 et 6,3 Hz) sont caractéristiques d'une structuration en hélice α du segment peptidique du composé II.3. Ces constantes de couplage sont comparables à celles mesurées pour le nonapeptide II.8 dans le CF₃CD₂OH, solvant pour lequel le pourcentage d'hélicité de ce peptide a été estimé, par dichroïsme circulaire, aux alentours de 80%.



| Composé | X | Leu1 | Ala2 | Leu3 | Ala4 | Leu5 | Ala6 | Leu7 | Y |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| II.8 | Boc- | nd | nd | nd | 3,6 | 4,8 | 4,4 | 5,2 | -Ala8-Leu9-NH ₂ |
| II.3 | Boc- | 2,6 | 2,7 | 6,3 | 4,8 | 2,7 | 4,7 | 5,6 | -Val ^U 8-Ala ^U 9-NH ₂ |

Figure II.64 : Les résonances des NHs amide dans le spectre RMN ¹H de l'oligomère chimère II.3. Tableau des constantes de couplage $^3J(\text{NH}, \alpha\text{CH})$ de la portion peptidique de l'oligomère chimère II.3 dans le CD₃OH et du peptide II.8 dans le CF₃CD₂OH.

Nous avons aussi pu observer un certain nombre de corrélations NOE répétées le long de la séquence qui permettent d'affirmer que la molécule II.3 adopte une structure hélicoïdale (Figure II.65). Les corrélations de type NH_i/NH_{i+1}, NH_i/ α CH_i/NH_{i+3} et α CH_i/NH_{i+1} témoignent de la formation d'une hélice sur le segment peptidique de ce composé. Cependant le nombre de corrélation n'est pas suffisant pour déterminer avec certitude le type d'hélice peptidique formée.

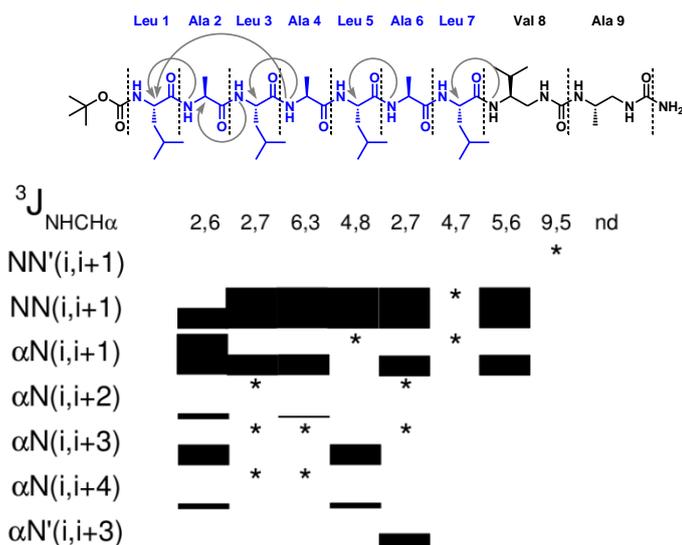
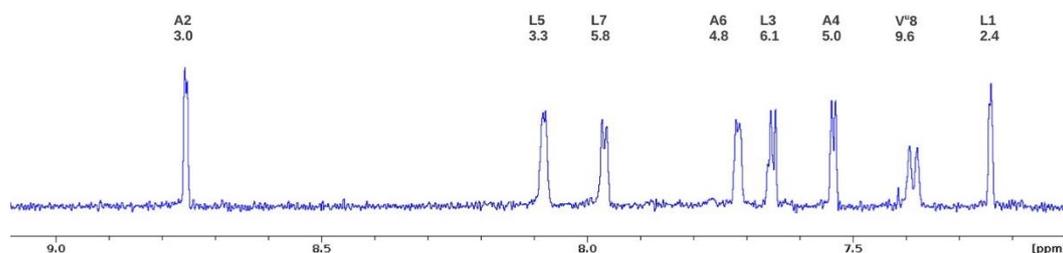


Figure II.65 : Vue d'ensemble de la séquence et de la portée moyenne des interactions ^1H - ^1H NOEs et des constantes de couplage $^3J(\text{NH}, \alpha\text{CH})$ mesurés à 700MHz dans le segment peptidique de l'oligomère chimère **II.3**. L'épaisseur des barres est proportionnelle à l'intensité des NOEs observés. Les astérisques indiquent le chevauchement des signaux excluant une attribution des NOEs sans ambiguïté.

ii. Caractérisation du composé **II.4**

Les expériences de RMN du proton en 1D et 2D conduites sur l'oligomère chimère **II.4** dans les mêmes conditions ont donné des informations assez similaires avec une bonne dispersion des signaux caractéristiques des protons des NHs amide (**Figure II.66**) et l'observation de constantes de couplages $^3J(\text{NH}, \alpha\text{CH})$ (entre 2,4 et 6,1 Hz) caractéristiques de la structuration en hélice α du segment peptidique.



| Composé | X | Leu1 | Ala2 | Leu3 | Ala4 | Leu5 | Ala6 | Leu7 | Y |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| II.8 | Boc- | nd | nd | nd | 3,6 | 4,8 | 4,4 | 5,2 | -Ala8-Leu9-NH ₂ |
| II.4 | Boc- | 2,4 | 3,0 | 6,1 | 5,0 | 3,3 | 4,8 | 5,8 | -Leu ^U 8-Val ^U 9-Ala ^U 10-NH ₂ |

Figure II.66 : Les résonances des NHs amide dans le spectre RMN ^1H de l'oligomère chimère **II.4**. Tableau des constantes de couplage $^3J(\text{NH}, \alpha\text{CH})$ de la portion peptidique de l'oligomère chimère **II.4** dans le CD_3OH et du peptide **II.8** dans le $\text{CF}_3\text{CD}_2\text{OH}$.

Les corrélations NOEs caractéristiques, observées le long de la séquence témoignent également de la formation d'une hélice sur le segment peptidique de ce composé (**Figure II.67**).

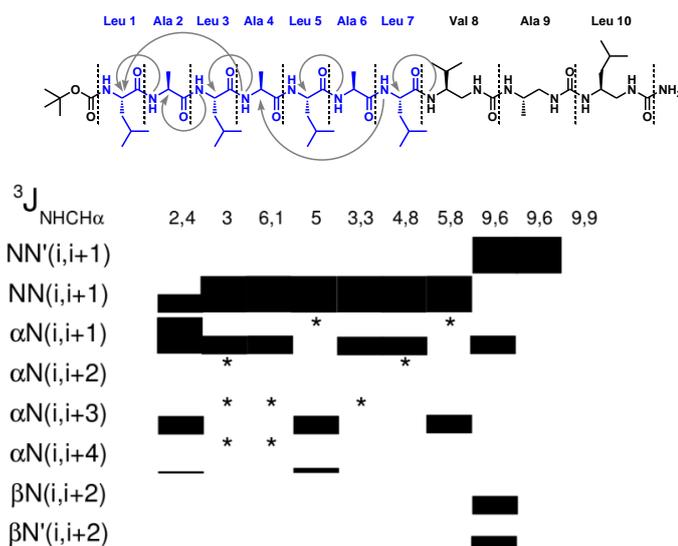
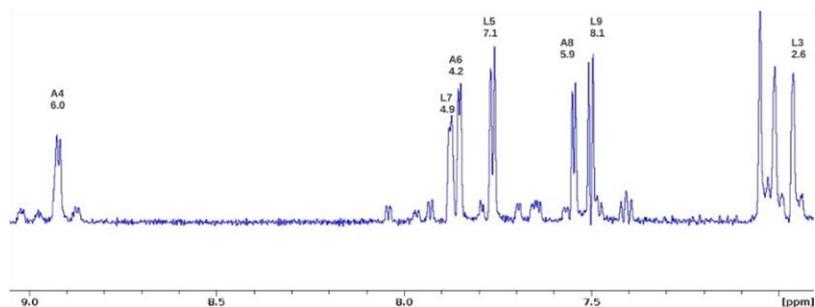


Figure II.67 : Vue d'ensemble de la séquence et de la portée moyenne des interactions ^1H - ^1H NOEs et des constantes de couplage $^3\text{J}(\text{NH}, \alpha\text{CH})$ mesurés à 700MHz dans le segment peptidique de l'oligomère chimère **II.4**. L'épaisseur des barres est proportionnelle à l'intensité des NOEs observés. Les astérisques indiquent le chevauchement des signaux excluant une attribution des NOEs sans ambiguïté.

iii. Caractérisation du composé II.5

Des expériences de RMN du proton en 1D et 2D ont été conduites sur l'oligomère chimère **II.5** dans le CD_3OH . Les données acquises, mettent en évidence la mauvaise définition et la multiplicité des signaux dans la zone caractéristique des protons des NHs amide (**Figure II.68**). On peut voir que les protons amides des acides α aminés possèdent des valeurs de constantes de couplages $^3\text{J}(\text{NH}, \alpha\text{CH})$ plus élevées que dans les cas précédents suggérant que la conformation hélicoïdale n'est plus aussi bien définie.



| Composé | X | Leu3 | Ala4 | Leu5 | Ala6 | Leu7 | Ala8 | Leu9 | Y |
|-------------|--|------|------|------|------|------|------|------|------------------|
| II.8 | Boc-Leu1-Ala2- | nd | 3,6 | 4,8 | 4,4 | 5,2 | 4,8 | nd | -NH ₂ |
| II.5 | Boc-Val ^U 1-Ala ^U 2- | 2,6 | 6,0 | 7,1 | 4,2 | 4,9 | 5,9 | 8,1 | -NH ₂ |

Figure II.68 : Les résonances des NHs amide dans le spectre RMN ^1H de l'oligomère chimère **II.5**.
Tableau des constantes de couplage $^3\text{J}(\text{NH}, \alpha\text{CH})$ de la portion peptidique de l'oligomère chimère **II.5** dans le CD_3OH et du peptide **II.8** dans le $\text{CF}_3\text{CD}_2\text{OH}$.

Les corrélations NOEs que nous avons pu observer ne sont pas suffisantes pour affirmer que la molécule **II.5** adopte une structure hélicoïdale (**Figure II.69**). Les corrélations entre les protons NH_i et ${}^{\alpha}\text{CH}_{i+3}$ et NH_i et ${}^{\alpha}\text{CH}_{i+1}$ témoignent d'un amorçage de nucléation à l'extrémité N-terminale qui semble néanmoins très localisé.

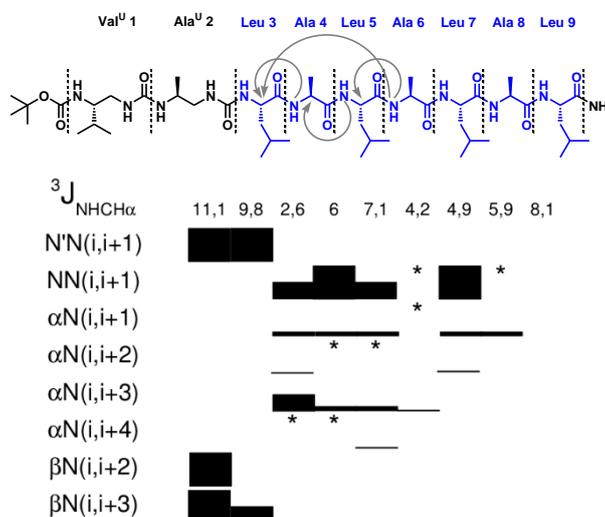
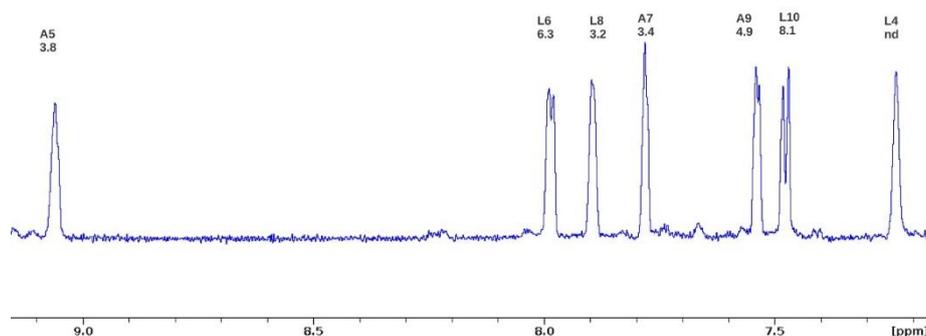


Figure II.69 : Vue d'ensemble de la séquence et de la portée moyenne des interactions ${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$ NOEs et des constantes de couplage ${}^3J(\text{NH}, \alpha\text{CH})$ mesurées à 700MHz dans le segment peptidique de l'oligomère chimère **II.5**. L'épaisseur des barres est proportionnelle à l'intensité des NOEs observés.

Les astérisques indiquent le chevauchement des signaux excluant une affectation des NOEs sans ambiguïté.

iv. Caractérisation du composé II.6

Des expériences de RMN du proton en 1D et 2D analogues aux précédentes ont finalement été conduites sur l'oligomère chimère **II.6**. Dans ce cas, on retrouve (**Figure II.70**) des constantes de couplages ${}^3J(\text{NH}, \alpha\text{CH})$ entre 3,2 et 6,3 Hz dans la gamme attendue pour un segment peptidique replié en hélice α



| Composé | X | Leu3 | Ala4 | Leu5 | Ala6 | Leu7 | Ala8 | Leu9 | Y |
|-------------|---|------|------|------|------|------|------|------|----------------|
| II.8 | Boc-Leu1-Ala2- | nd | 3.6 | 4.8 | 4.4 | 5.2 | 4.8 | nd | $-\text{NH}_2$ |
| II.6 | Boc-Val ^U 1-Ala ^U 2-Leu ^U 3- | nd | 3.8 | 6.3 | 3.4 | 3.2 | 4.9 | 8.1 | $-\text{NH}_2$ |

Figure II.70 : Les résonances des NHs amide dans le spectre RMN ${}^1\text{H}$ de l'oligomère chimère **II.6**. Tableau des constantes de couplage ${}^3J(\text{NH}, \alpha\text{CH})$ de la portion peptidique de l'oligomère chimère **II.6** dans le CD_3OH et du peptide **II.8** dans le $\text{CF}_3\text{CD}_2\text{OH}$.

Par rapport au composé **II.5**, on retrouve pour **II.6** une répartition et une intensité des corrélations NOEs notamment de type $\text{NH}_i/\text{NH}_{i+1}$ et ${}^{\alpha}\text{CH}_i/\text{NH}_{i+1}$ plus conforme à l'adoption d'une conformation hélicoïdale (**Figure II.71**).

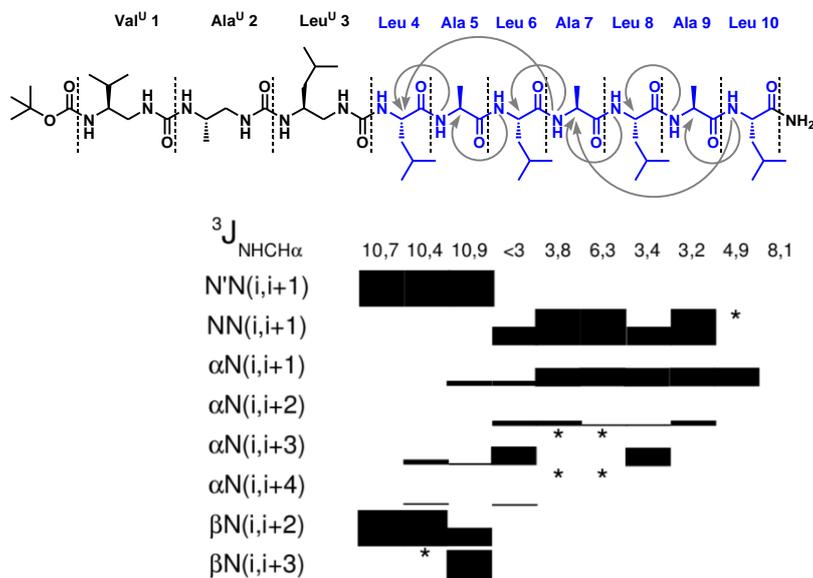


Figure II.71 : Vue d'ensemble de la séquence et de la portée moyenne des interactions ${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$ NOEs et des constantes de couplage ${}^3J(\text{NH}, \alpha\text{CH})$ mesurées à 700MHz dans le segment peptidique de l'oligomère chimère **II.6**. L'épaisseur des barres est proportionnelle à l'intensité des NOEs observés. Les astérisques indiquent le chevauchement des signaux excluant une attribution des NOEs sans ambiguïté.

La stabilisation en hélice de la séquence peptidique à 7 résidus est, dans le cas où le « cap » est inséré à l'extrémité N-terminale, fonction de la taille du fragment oligourée. Les résultats soulignent la stabilisation partielle en hélice du segment peptidique de l'oligomère chimère **II.5** ainsi que la stabilisation en hélice plus complète de la séquence peptidique dans l'oligomère chimère **II.6**. Globalement, les résultats des expériences de RMN et notamment l'observation de signaux NOEs caractéristiques le long de la chaîne peptidique et entre les segments oligourée et oligoamide mettent en évidence la capacité d'un court segment oligourée de 2 ou 3 résidus à stabiliser une conformation en hélice α dans le segment peptidique associé dans un solvant polaire comme le méthanol.

c. En phase cristalline

Différentes conditions de cristallisation ont été testées pour les trois oligomères chimères **II.3**, **II.4** et **II.5**. Nous avons réussi à obtenir des cristaux de l'oligomère chimère **II.4**. La structure de l'oligomère **II.4** a pu être résolue. Comme suggéré par les analyses en solution, le composé **II.4** adopte une structure en hélice continue entre la partie oligourée et peptidique (**Figure II.72**).

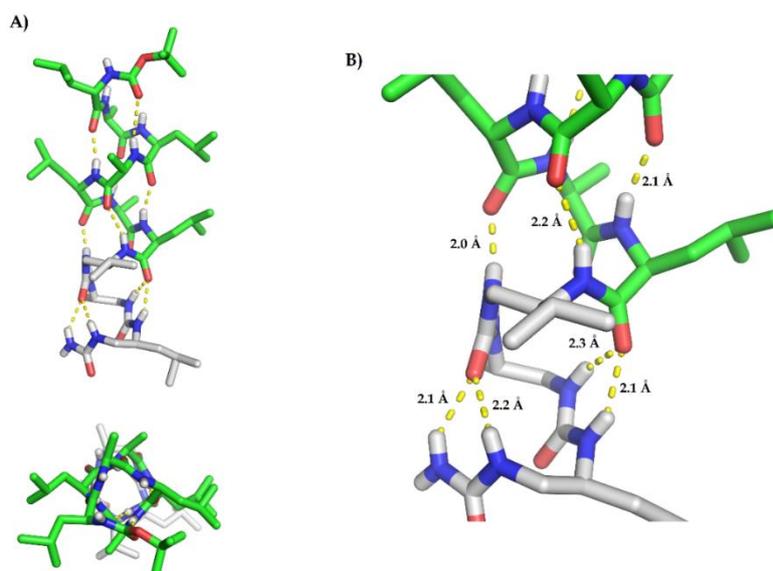


Figure II.72 : Structure cristallographique de la molécule **II.4** : (A) vu de côté et de dessus ; (B) réseau de liaisons hydrogène à la jonction entre les deux parties oligourée et peptidique

La structure est stabilisée par des liaisons hydrogène présentes sur l'ensemble de la séquence (**Table II.73**). Comme attendu, le réseau de liaisons hydrogène à 3 centres caractéristique de la formation de l'hélice-2.5 est conservé le long du fragment uréido. Dans la portion peptide, on observe également la formation de liaisons hydrogène à 2 centres fermant des pseudo-cycles à 13 atomes, caractéristique des hélices α peptidiques. En ce qui concerne la jonction entre les deux types de segments, on observe 2 types de liaisons : des liaisons entre les CO_i (amide) et les NH_{i+3} ou $\text{N}'\text{H}_{i+3}$ (urée), conduisant à la formation de pseudo-cycles à 12 et 14 atomes ainsi qu'une liaison entre le CO_4 (amide) et le NH_8 (urée), conduisant à la formation d'un pseudo-cycle à 13 atomes.

| Hélice II.4 | distance des liaisons CO-NH | nombre d'atomes pseudo-cycles |
|---|-----------------------------|-------------------------------|
| $\text{CO}_{\text{Boc}}\text{---NH}_4$ | 2,8 Å | 13 |
| $\text{CO}_1\text{---NH}_5$ | 2,1 Å | 13 |
| $\text{CO}_2\text{---NH}_6$ | 2,0 Å | 13 |
| $\text{CO}_3\text{---NH}_7$ | 2,1 Å | 13 |
| $\text{CO}_4\text{---NH}_8$ | 2,2 Å | 13 |
| $\text{CO}_5\text{---N}'\text{H}_8$ | 2,0 Å | 13 |
| $\text{CO}_7\text{---N}'\text{H}_9$ | 2,3 Å | 12 |
| $\text{CO}_7\text{---NH}_{10}$ | 2,1 Å | 14 |
| $\text{CO}_8\text{---N}'\text{H}_{10}$ $\text{CO}_8\text{---NH}_{\text{amide}}$ | 2,2 Å 2,1 Å | 12 14 |

Table II.73 : Table récapitulative des longueurs des liaisons hydrogène.

Les deux segments peptide/oligourée ont conservé leurs paramètres d'hélices aux extrémités. La zone de jonction entre les deux hélices assure la communication entre les deux systèmes. C'est une zone hybride qui possède ses propres paramètres. Nos résultats soulignent la capacité de courts segments de tri-urées à stabiliser la formation d'une structure en hélice dans le segment peptidique des oligomères chimères **II.4** et **II.6**. Les données structurales à haute résolution obtenues peuvent suggérer d'utiliser cette approche pour stabiliser et mimer des hélices peptidiques bioactives. Dans cette perspective, la possibilité de stabiliser des hélices peptidiques par insertion de « caps » oligourée dans un environnement aqueux est un aspect important que nous avons choisi d'explorer dans la suite de ce travail.

II. Stabilisation de peptides modèles hydrosolubles par l'ajout de « caps » oligourées : développement de la « foldamer capping box »

Afin d'étendre notre approche de « cap » uréido aux oligomères solubles en milieu aqueux, nous avons sélectionné trois peptides modèles hydrosolubles (**II.9**, **II.12** et **II.15**) conçus dans les années 1990 par Baldwin pour étudier l'hélicogénicité de certains résidus d'acides α -aminés (voir **Figure II.74**) [43]. Ces peptides modèles constitués de 17 résidus, possèdent des séquences relativement similaires : seuls trois résidus les différencient. Ces variations relativement mineures dans la séquence permettent néanmoins de moduler la capacité de ces peptides à adopter une structure en hélice α , en faisant varier leur taux d'hélicité de 18 à 70%. Pour évaluer l'impact de l'insertion de nos « caps » uréido sur la stabilisation de ces différentes séquences peptidiques en hélice α , nous avons choisi d'insérer des fragments tri-alanines urées aux extrémités N- ou C-terminales de ces trois peptides modèles hydrosolubles.

Sur la base des résultats obtenus, nous avons ensuite développé de nouveaux motifs de « capping » mettant en jeu des fragments oligourée. Afin d'augmenter la propension du « cap » uréido (« foldamer capping box ») à stabiliser une séquence peptidique modèle, nous avons postulé que plus la structuration du fragment oligourée en hélice 2.5 serait stable plus son impact sur la stabilisation du segment peptidique en hélice α serait importante. Nous avons ainsi développé différentes stratégies basées sur l'augmentation du nombre de résidus ainsi que sur la variation de la nature des chaînes latérales des résidus constituant le « cap » oligourée.

1. Synthèse

Les séquences ainsi que les rendements associés à la synthèse des oligomères visant à insérer un fragment uréido aux extrémités N- ou C-terminales de peptides modèles solubles en milieu aqueux sont listées **Figure II.74**.

| Composé | Séquence | Rdt ^a | ESI-MS [M+3H] ³⁺ | HPLC t_R (min) ^b |
|--------------|---|------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| II.9 | Ac-(peptide 3Leu)-NH ₂ | 50 % | 572,03 | 5,63 |
| II.10 | Ac-(peptide 3Leu)-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 31 % | 672,42 | 6,05 |
| II.11 | Ac-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -(peptide 3Leu)-NH ₂ | 12 % | 672,42 | 6,16 |
| II.12 | Ac-(peptide 3Phe)-NH ₂ | 23 % | 606,35 | 5,73 |
| II.13 | Ac-(peptide 3Phe)-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 30 % | 706,41 | 5,94 |
| II.14 | Ac-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -(peptide 3Phe)-NH ₂ | 11 % | 706,41 | 6,12 |
| II.15 | Ac-(peptide 3Ile)-NH ₂ | 12 % | 572,27 | 5,80 |
| II.16 | Ac-(peptide 3Ile)-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 6 % | 672,43 | 5,60 |
| II.17 | Ac-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 12 % | 672,33 | 6,24 |
| II.18 | Ac-(peptide 3Ile)-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 25 % | 705,61 | 5,83 |
| II.19 | Ac-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 14 % | 705,67 | 5,88 |
| II.20 | Ac-(peptide 3Ile)-Val ^U -Val ^U -Val ^U -NH ₂ | 21 % | 700,46 | 6,39 |
| II.21 | Ac-Val ^U -Val ^U -Val ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 5 % | 700,46 | 6,64 |
| II.22 | Ac-(peptide 3Ile)-Glu ^U -Ala ^U -Lys ^U -NH ₂ | 39 % | 701,66 | 5,69 |
| II.23 | Ac-Glu ^U -Ala ^U -Lys ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 14 % | 710,67 | 5,27 |

| | | | | |
|-------|---|------|--------|------|
| II.24 | Ac-(peptide 3Ile)-Lys ^U -Ala ^U -Glu ^U -NH ₂ | 29 % | 710,60 | 5,62 |
| II.25 | Ac-Lys ^U -Ala ^U -Glu ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 19 % | 710,60 | 5,54 |

-Tyr-Lys-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys- = -(peptide 3Leu)-

-Tyr-Lys-Ala-Ala-Phe-Ala-Lys-Ala-Ala-Phe-Ala-Lys-Ala-Ala-Phe-Ala-Lys- = -(peptide 3Phe)-

-Tyr-Lys-Ala-Ala-Ile-Ala-Lys-Ala-Ala-Ile-Ala-Lys-Ala-Ala-Ile-Ala-Lys- = -(peptide 3Ile)-

Figure II.74 : Séquences, masses, temps de rétention HPLC et rendements de synthèse des peptides II.9, II.12, et II.15 ainsi que des oligomères chimères correspondant issus d'une approche de type « capping » en milieu aqueux. ^a Rendement après purification HPLC ; ^b système RP-HPLC : gradient linéaire 10 à 100% de B en 10 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) and B (0,1% TFA dans CH₃CN), détection UV à 200 nm.

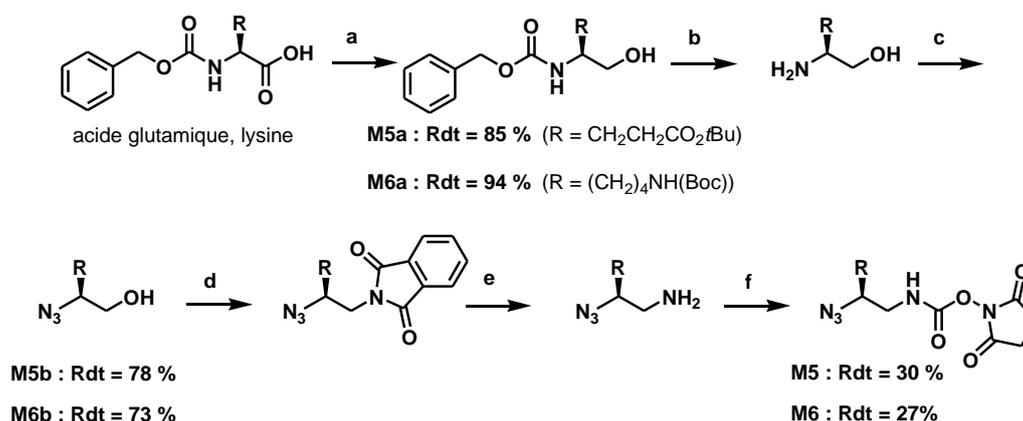
Pour favoriser la propension des oligomères décrits ci-dessus à adopter une structure hélicoïdale, l'extrémité N-terminale de ces composés a été protégée par un groupement acétyle (Ac) permettant de fournir un accepteur de liaisons hydrogène supplémentaire. Nous avons choisi une stratégie de protection de nos monomères qui soit compatible avec la synthèse peptidique en stratégie Fmoc, et l'emploi d'une résine labile en milieu acide (Rink amide polystyrène) : la stratégie N₃. [30]

a. Synthèse de monomères en solution

La synthèse des monomères azoture activés **M1** (N₃-Ala^U-OSu), **M2** (N₃-Val^U-OSu) a été décrite précédemment dans le chapitre II.

i. Synthèse des monomères azoture activés

Les carbamates activés dérivés de la lysine et de l'acide glutamique ont été obtenus respectivement à partir des acides aminés protégés Z-L-Lys(Boc)-OH et Z-L-Glu(OtBu)-OH suivant la *voie A* de synthèse des monomères d'azoture activés décrite précédemment dans le chapitre II. Dans ces conditions, les monomères activés **M5**, dérivé de la lysine et **M6**, dérivé de l'acide glutamique, ont été obtenus avec des rendements respectifs de 44%, 38% (**Figure II.75**).



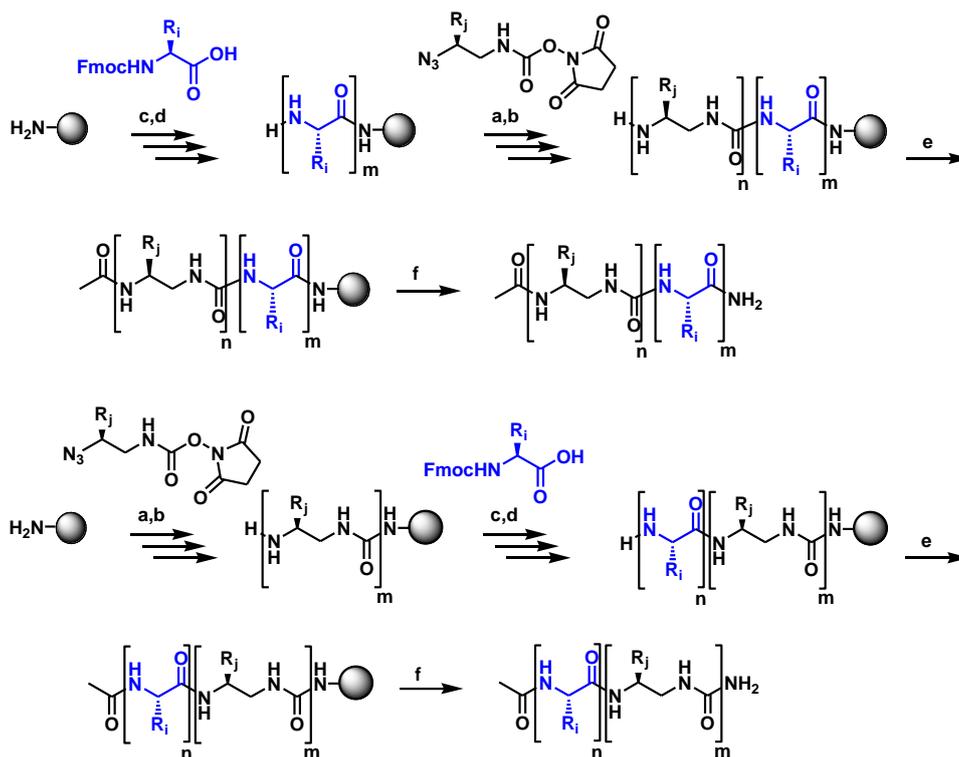
a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20 °C ; 2) NaBH₄, H₂O ; **b** : H₂, Pd/C, MeOH, 25 °C ; **c** : N₃SO₂IM.HCl, K₂CO₃, CuSO₄.5H₂O, CH₃CN, H₂O, 25 °C ; **d** : PPh₃, DIAD, phthalimide, CH₂Cl₂, 25 °C ; **e** : N₂H₄, MeOH, 70 °C ; **f** : N,N'-Disuccinimide carbonate, CH₂Cl₂, 25 °C.

Figure II.75 : Schéma de synthèse par la *voie A* du monomère azoture activé sous forme de carbamate de succinimide

b. Synthèse sur support solide des oligomères

i. Synthèse sur support solide des oligomères II.10, II.11, II.13, II.14, II.16 à II.27

Les monomères azoture activés sous forme de carbamate de succinimide ont été insérés en suivant la procédure décrite précédemment dans ce chapitre [paragraphe I.1.b.i]. Néanmoins, une différence notable d'appareillage est à souligner : l'achat d'un système de réacteur sous atmosphère inerte compatible avec l'utilisation de champs micro-ondes (CEM Discover Bio). En effet, des phénomènes de réductions partielles de l'azoture des résidus urées dans le cadre de la synthèse d'oligourées hydrosolubles constituées de 12 résidus, ont été observés. Le point d'ébullition de la triméthylphosphine, réactif clé de la réaction de Staudinger, se situe aux alentours des 50 °C. Cependant afin de pouvoir diminuer les temps de synthèse, la réduction de l'azoture est assistée par les micro-ondes avec une puissance de 50 Watts, à 50°C, durant 15 minutes. Par conséquent, une partie de la triméthylphosphine peut donc s'évaporer et s'oxyder avant d'être recondensée sur les parois du réacteur. L'investissement dans ce système de réacteur sous atmosphère inerte a permis d'utiliser la triméthylphosphine sous champs micro-ondes sans conduire à son oxydation partielle. Cette stratégie couramment utilisée au laboratoire a été appliquée pour préparer avec succès les oligomères **II.10, II.11, II.13, II.14, II.16 à II.27** possédant des portions α -peptidiques localisées aux extrémités C- et/ou N-terminales de ces composés (**Figure II.76**). Ces synthèses ont été réalisées sur une échelle de 50 μ moles à l'aide d'une résine Rink amide polystyrène (loading : 0.45 mmol.g⁻¹) clivable en milieu acide (95 TFA : 2.5 TIS : 2.5 H₂O). Les acides α -aminés protégés par un groupement Fmoc ont été couplés à l'aide d'un synthétiseur automatique sous atmosphère inerte, sous champ micro-ondes (CEM Liberty blue), en présence de DIC et d'éthyl cyano(hydroxyimino)acetate (oxyma) comme alternative à l'HOBt. La réaction d'acétylation de l'amine N-terminale a été réalisée en présence d'anhydride acétique dans le DMF durant 20 minutes. Les composés ont ensuite été clivés de leur support, purifiés par HPLC semi-préparative et caractérisés par RP-HPLC analytique et spectrométrie de masse (*electrospray*).



a : monomère azoture protégé activé : **M1**, **M2**, **M5** et **M6** (1,5 equiv), DIEA (3 equiv), (50 W, 50 °C, 15 min) ; **b** : PMe_3 (1M) dans le THF (10 equiv), dioxane/ H_2O (7 : 3), (50 W, 50 °C, 15 min) ; **c** : Fmoc-Xaa-OH (5 equiv), DIC (5 equiv), oxyma (5 equiv), (170 W, 75 °C, 15 sec) + (35 W, 90 °C, 110 sec) ; **d** : 20% pipéridine, DMF, (155 W, 75 °C, 15 sec) + (35 W, 90 °C, 50 sec) ; **e** : Ac_2O , DMF, (0 W, 25 °C, 20 min) ; **f** : TFA/TIS/ H_2O (95 : 2,5 : 2,5).

Figure II.76 : Schéma de synthèse sur support solide des oligomères chimères **II.10**, **II.11**, **II.13**, **II.14**, **II.16** à **II.27**

L'insertion de « caps » uréido à l'extrémité C-terminale des séquences peptidiques **II.9**, **II.12**, et **II.15** ne pose aucun problème particulier. De plus on observe une augmentation significative des rendements de synthèse en comparaison avec les rendements de synthèse obtenus pour les oligomères **II.3** et **II.4** précédemment décrits. L'oligomère **II.16** est l'unique composé pourvu d'un rendement inférieur à son pendant « cappé » à l'extrémité C-terminale : l'oligomère **II.17**. Cette valeur est liée à un problème technique lors de la purification du composé. La valeur du rendement de synthèse de l'oligomère **II.16** n'est donc pas représentative.

Le chromatogramme HPLC de l'oligomère **II.16** (**Figure II.77**) avant purification par RP-HPLC semi-préparative, souligne la présence d'un produit largement majoritaire (plus de 80% de pureté) : l'oligomère **II.16** (temps de rétention : 5,80 minutes).

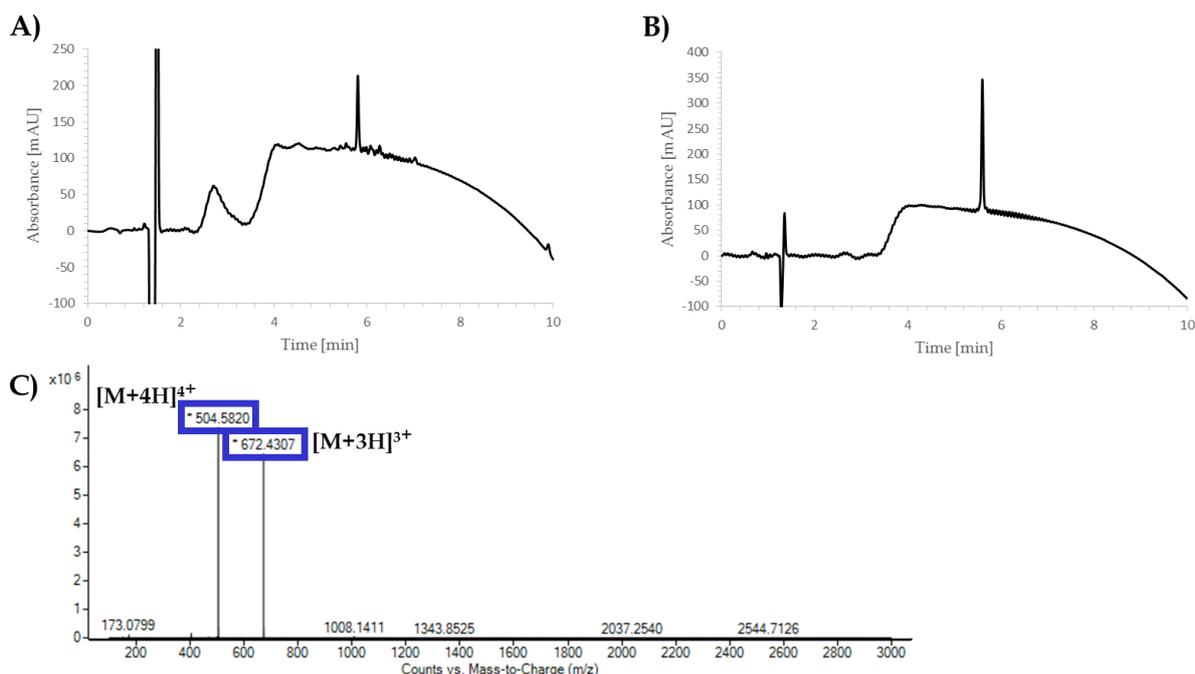


Figure II.77 : Caractérisation de l'oligomère **II.16** : **A** & **B**) chromatogramme HPLC de l'oligomère **II.16** avant et après purification par RP-HPLC semi-préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 20 à 40% de B en 20 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans CH₃CN)] ; **C**) spectre de masse de l'oligomère **II.16** après purification par RP-HPLC semi-préparative.

L'insertion de monomères azoture à l'extrémité N-terminale des séquences peptidiques **II.9**, **II.12** et **II.15** est problématique donnant lieu à des réductions partielles de la fonction azoture des résidus de type urée. Malgré la diminution du « loading » de la résine et l'acquisition du réacteur sous atmosphère inerte compatible avec l'utilisation des champs micro-ondes, des phénomènes de réductions partielles, dans des proportions non-négligeables (40 à 70%), ont été observées pour la totalité des synthèses. L'insertion des urées à l'extrémité N-terminale de séquences peptidiques est plus difficile qu'une synthèse peptidique sur un segment oligourée. Cependant, on observe une augmentation significative des rendements de synthèse (**Figure II.74**) en comparaison avec ceux obtenus pour les oligomères **II.5** et **II.6** précédemment décrits.

Le chromatogramme HPLC de l'oligomère **II.17** (**Figure II.78**), avant purification par RP-HPLC semi-préparative, met en évidence la présence de deux produits de synthèse dans des proportions équivalentes : l'oligomère **II.17** (temps de rétention : 6,04 min) ainsi que le produit de réduction partielle du résidu Ala^{U2} (temps de rétention : 5,74 min).

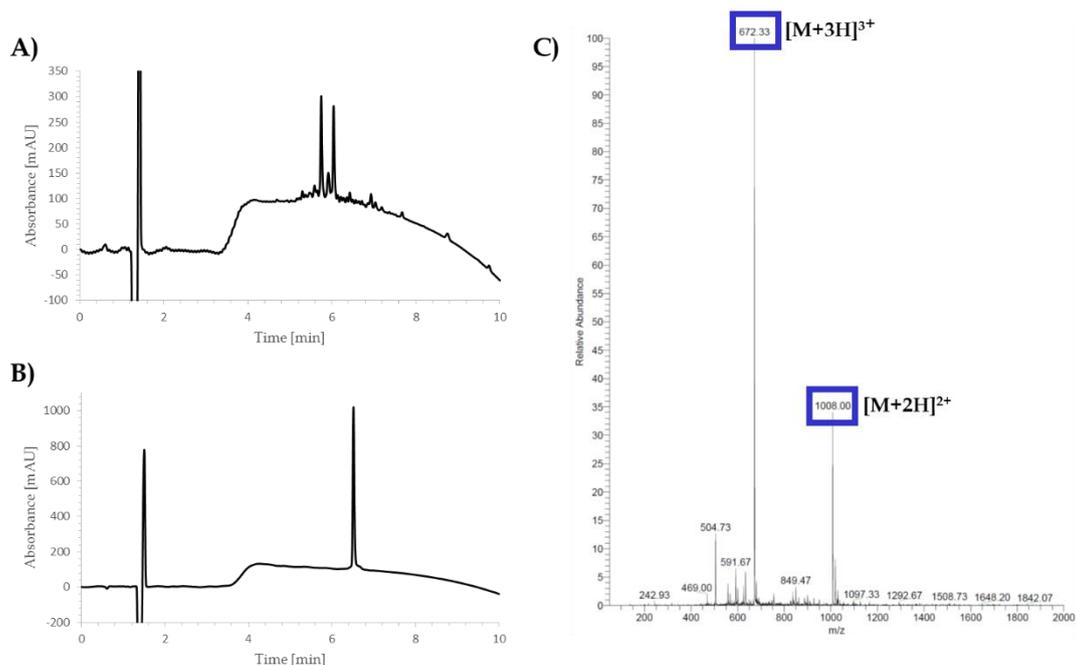


Figure II.78 : Caractérisation de l'oligomère **II.17** : **A & B**) chromatogramme HPLC de l'oligomère **II.17** avant purification par RP-HPLC semi-préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 20 à 40% de B en 20 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans CH₃CN)] ; **C**) spectre de masse de l'oligomère **II.17** après purification par RP-HPLC semi-préparative.

ii. Synthèse sur support solide des peptides II.9, II.12 et II.15

La synthèse des peptides **II.9**, **II.12**, et **II.15** a été réalisée selon les conditions précédemment décrites dans le chapitre 2 [paragraphe II.1.b.i.].

La synthèse des peptides **II.9**, **II.12**, et **II.15** ne pose aucun problème particulier. Le chromatogramme RP-HPLC de l'oligomère **II.15** (**Figure II.79**), avant purification par RP-HPLC semi-préparative, souligne que le peptide **II.15** (temps de rétention : 5,71 min) est largement majoritaire (plus de 80% de pureté).

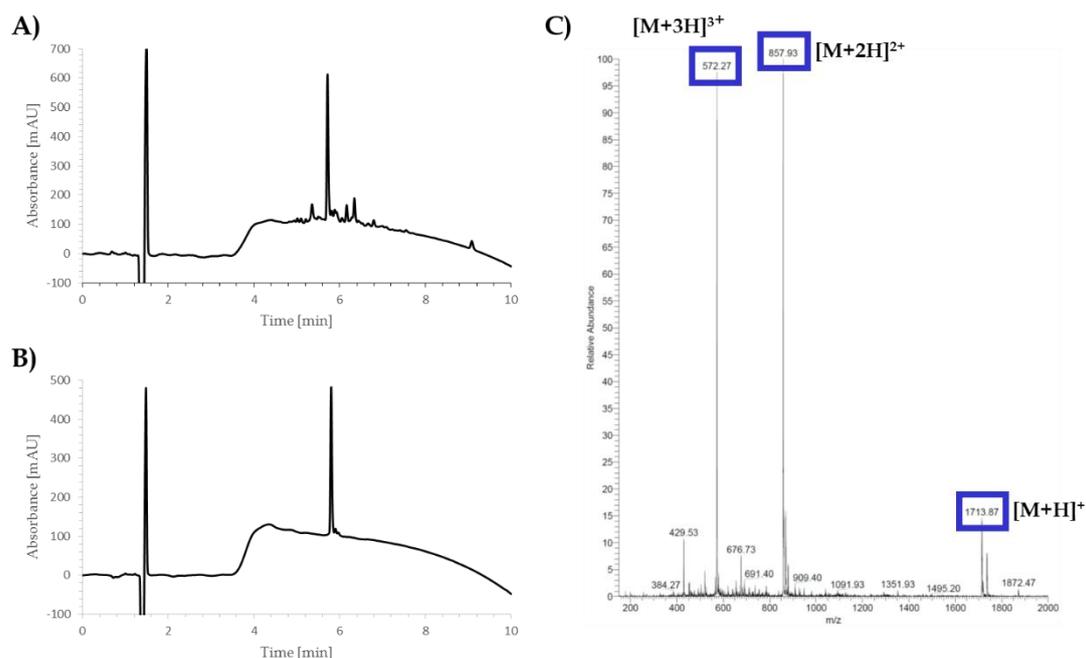


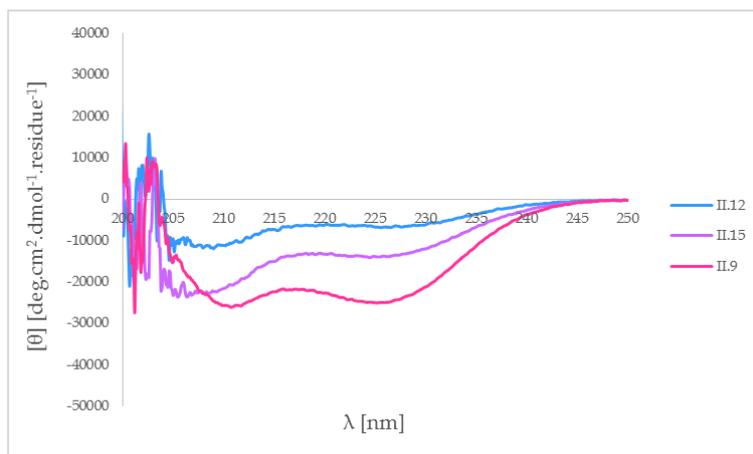
Figure II.79 : Caractérisation du peptide **II.15** : **A & B**) chromatogramme HPLC du peptide **II.15** avant purification par RP-HPLC semi-préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 20 à 40% de B en 20 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans CH₃CN)] ; **C**) spectre de masse du peptide **II.15** après purification par RP-HPLC semi-préparative.

2. Etude conformationnelle en solution

a. Par dichroïsme circulaire

Les expériences de dichroïsme circulaire ont été réalisées selon les conditions précédemment décrites dans ce chapitre [paragraphe I.2.a.].

Les peptides **II.9**, **II.12** et **II.15** ont été étudiés par dichroïsme circulaire. L'ellipticité molaire à 222 nm a été mesurée pour chacun des peptides **II.9**, **II.12** et **II.15** en milieu tamponné (**Figure II.80**). Ces peptides ayant précédemment été caractérisés par dichroïsme circulaire dans la littérature, nous avons choisi de conserver les mêmes conditions d'analyse.[43]

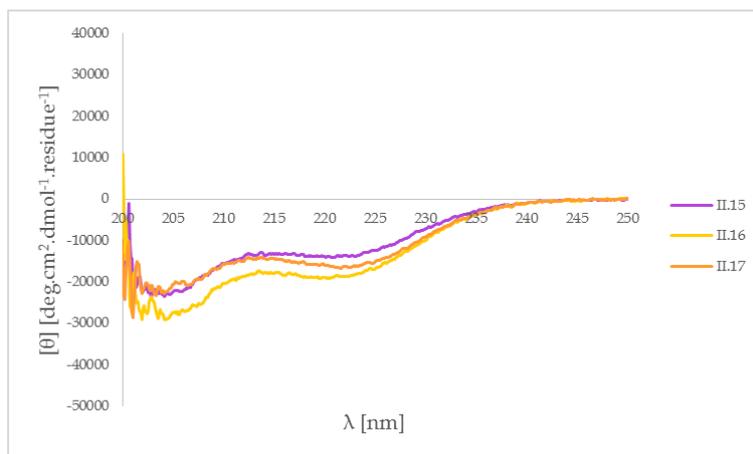


| Composé | Abréviation | $-\theta_{\text{obs}222}$ | % d'hélicité |
|---------|-----------------------------------|---------------------------|--------------|
| II.9 | Ac-(peptide 3Leu)-NH ₂ | 6132 | 70% |
| II.12 | Ac-(peptide 3Phe)-NH ₂ | 23219 | 18% |
| II.15 | Ac-(peptide 3Ile)-NH ₂ | 13638 | 40% |

Figure II.80 : Spectres CD des peptides **II.9**, **II.12** et **II.15** à 0.05 mM dans un tampon PBS à pH 7.0 (1 mM de phosphate de sodium et 1 M de NaCl) enregistrés à 0 °C dans une cuve de 5 mm. Tableau des valeurs mesurées d'ellipticité molaire à 222 nm et des pourcentages d'hélicité calculés.[41][42]

Les valeurs que nous avons obtenues en utilisant la méthode précédemment décrite dans ce chapitre [paragraphe I.2.a.], correspondent à celles décrites dans la littérature. Nous souhaitons, dès lors, réaliser l'acquisition des spectres CD pour les oligomères décorés de « caps » uréido aux extrémités N- ou C-terminales. Ces oligomères sont pourvus de deux chromophores, et dans l'hypothèse de la formation d'une conformation hélicoïdale, d'une signature caractéristique des hélices-2.5 d'oligourée avec un maximum à 203 nm associée à la signature caractéristique de l'hélice α peptidique avec un minimum à 222 nm. Les oligourées ne présentant aucun signal dichroïque à 222 nm, nous avons émis l'hypothèse que la valeur d'ellipticité molaire mesurée à 222 nm dans les spectres d'oligomères hybrides pouvait être utilisée pour évaluer le degré de repliement hélicoïdale de la portion peptidique.

Afin d'évaluer l'impact de segments oligourée sur la capacité de ces séquences peptidiques à se replier, des « caps » tri-alanines urées ont été insérés à l'extrémité N- ou C-terminale des peptides **II.9**, **II.12**, **II.15**. L'ellipticité molaire à 222 nm a été mesurée pour chacun des composés résultants **II.10**, **II.11**, **II.13**, **II.14**, **II.16** et **II.17** dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les peptides **II.9**, **II.12**, **II.15** (Figure II.81).

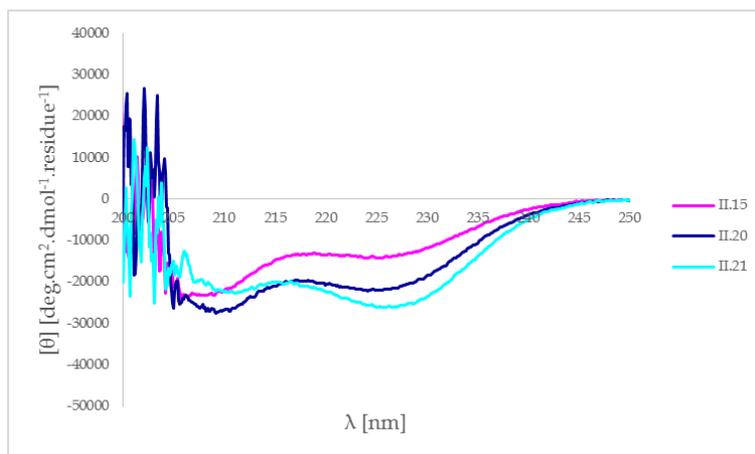


| Composé | Abréviation | $-\theta_{\text{obs}222}$ | Taux d'hélicité |
|---------|---|---------------------------|-----------------|
| II.9 | Ac-(peptide 3Leu)-NH ₂ | 23219 | 70% |
| II.10 | Ac-(peptide 3Leu)-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 33628 | 100% |
| II.11 | Ac-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -(peptide 3Leu)-NH ₂ | 26950 | 82% |
| II.12 | Ac-(peptide 3Phe)-NH ₂ | 6132 | 18% |
| II.13 | Ac-(peptide 3Phe)-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 7753 | 23% |
| II.14 | Ac-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -(peptide 3Phe)-NH ₂ | 8011 | 24% |
| II.15 | Ac-(peptide 3Ile)-NH ₂ | 13638 | 40% |
| II.16 | Ac-(peptide 3Ile)-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 18702 | 54% |
| II.17 | Ac-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 16200 | 48% |

Figure II.81 : Spectres CD des oligomères **II.15**, **II.16** et **II.17** à 0.05 mM dans un tampon PBS à pH 7.0 (1 mM de phosphate de sodium et 1 M de NaCl) enregistrés à 0 °C dans une cuve de 5 mm. Tableau des valeurs mesurées d'ellipticité molaire à 222 nm et des pourcentages d'hélicité estimés.[41][42]

Dans tous les cas, on observe que l'ajout d'une terminaison oligourée à l'extrémité N- ou C-terminale du peptide s'accompagne d'une augmentation de l'ellipticité molaire à 222 nm ce que nous interprétons comme une stabilisation de l'hélice peptidique. L'intensité de cette variation d'ellipticité à 222 nm (et donc du pourcentage d'hélicité estimé) dépend à la fois de la position N- ou C-terminal de la terminaison oligourée et de la propension du peptide de référence à se structurer en hélice. En effet, le peptide **II.9** qui possède un pourcentage d'hélicité initial de 70% a été fortement impacté par l'insertion du cap tri-alanines urées contrairement au peptide **II.12** qui a peu tendance à se structurer en hélice (18%). Le peptide **II.15**, qui possède un pourcentage d'hélice intermédiaire (40%), est également sensible à l'insertion du cap tri-alanines urées avec une augmentation de 14 points du pourcentage d'hélicité lorsque le « cap » est positionné à l'extrémité C-terminale et de 8 points lorsque ce dernier est situé à l'extrémité N-terminale.

Dans le but de stabiliser encore davantage la conformation hélicoïdale dans le segment peptidique du peptide **II.15** (**Figure II.82**), nous avons analysé différentes modifications de la terminaison oligourée et leur impact sur le spectre CD.



| Composé | Abréviation | $-[\theta]_{\text{obs}222}$ | taux d'hélicité |
|---------|---|-----------------------------|-----------------|
| II.15 | Ac-(peptide 3Ile)-NH ₂ | 13638 | 40% |
| II.16 | Ac-(peptide 3Ile)-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 18702 | 54% |
| II.17 | Ac-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 16200 | 48% |
| II.18 | Ac-(peptide 3Ile)-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 22430 | 66% |
| II.19 | Ac-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 22358 | 64% |
| II.20 | Ac-(peptide 3Ile)-Val ^U -Val ^U -Val ^U -NH ₂ | 21285 | 61% |
| II.21 | Ac-Val ^U -Val ^U -Val ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 23951 | 68% |
| II.22 | Ac-(peptide 3Ile)-Glu ^U -Ala ^U -Lys ^U -NH ₂ | 19913 | 58% |
| II.23 | Ac-Glu ^U -Ala ^U -Lys ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 23966 | 69% |
| II.24 | Ac-(peptide 3Ile)-Lys ^U -Ala ^U -Glu ^U -NH ₂ | 19534 | 57% |
| II.25 | Ac-Lys ^U -Ala ^U -Glu ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 21886 | 63% |

Figure II.82 : Spectres CD des oligomères **II.15**, **II.20** et **II.21** à 0.05 mM dans un tampon PBS à pH 7.0 (1 mM de phosphate de sodium et 1 M de NaCl) enregistrés à 0 °C dans une cuve de 5 mm. Tableau des valeurs mesurées d'ellipticité molaire à 222 nm et des pourcentages d'hélicité calculés.[41][42]

Tout d'abord, nous avons choisi d'augmenter la taille du « cap » oligourée en ajoutant un résidu alanine urée. Ce résidu supplémentaire permet d'amorcer un deuxième tour d'hélice-2.5 oligourée et donc de renforcer l'hélice urée à l'extrémité du peptide. Nous avons mesuré une augmentation du pourcentage d'hélicité de 26 points lorsque le cap est positionné à l'extrémité C-terminale (**II.18**) et de 24 points lorsqu'il est situé à l'extrémité N-terminale (**II.19**). L'augmentation d'hélicité est donc directement reliée à la longueur de la terminaison oligourée, un phénomène déjà observé dans la première partie de ce chapitre entre les terminaisons de type di-urée et tri-urée.

Dans un deuxième temps, les résidus alanine urée (Ala^U) ont été substitués par des résidus de type valine urée (Val^U). En effet, des résultats communiqués au sein de notre laboratoire, ont mis en évidence la capacité de résidus à chaîne latérale branchée (ex. R = *i*Pr) à stabiliser davantage les hélices-2.5 d'oligourée. Cet effet stabilisateur des chaînes β-branchées avait déjà été noté il y a quelques années pour les β³-peptides par le groupe de Gellman.[44] Effectivement, la substitution des triades Ala^U₃ par Val^U₃ conduit à une augmentation significative de l'ellipticité à 222 nm associée à une stabilisation de l'hélice α dans les oligomères **II.20** et **II.21**. Nous avons mesuré une augmentation du pourcentage d'hélicité

de 21 points lorsque la triade est positionnée à l'extrémité C-terminale (**II.20**) et de 28 points lorsqu'elle est située à l'extrémité N-terminale (**II.21**).

Enfin, nous avons cherché à stabiliser la triade oligourée par la formation de ponts salins entre les résidus i et $i+2$. Deux types de triades ont été considérées résultant d'une permutation des chaînes latérales chargées (ex : **II.22** versus **II.23**). L'impact est modeste lorsque les triades $\text{Glu}^{\text{U}}\text{-Ala}^{\text{U}}\text{-Lys}^{\text{U}}$ et $\text{Lys}^{\text{U}}\text{-Ala}^{\text{U}}\text{-Glu}^{\text{U}}$ sont installés à l'extrémité C-terminale du peptide (pas de différence significative avec **II.16**). En revanche, l'effet de l'introduction de résidus chargés se fait davantage sentir lorsque les triades sont installées à l'extrémité N-terminale. Ainsi, nous avons mesuré une augmentation du pourcentage d'hélicité de 29 points lorsque le cap $\text{Glu}^{\text{U}}\text{-Ala}^{\text{U}}\text{-Lys}^{\text{U}}$ est positionné à l'extrémité N-terminale (**II.23**). De manière assez similaire, la triade $\text{Lys}^{\text{U}}\text{-Ala}^{\text{U}}\text{-Glu}^{\text{U}}$ situé à l'extrémité N-terminale (**II.25**) induit une augmentation de 23 points.

Les résultats de ces expériences soulignent donc une tendance plus importante à la stabilisation de la portion peptidique lorsque les « caps » oligourées sont insérés à l'extrémité N-terminale du peptide **II.15**. La stabilisation obtenue par insertion de « caps » oligourée à l'extrémité C-terminale est loin d'être négligeable, jusqu'à 26 points d'augmentation du pourcentage d'hélicité pour le composé **II.26** et l'un des rares exemples de « caps » C-terminaux des séquences peptidiques.

b. Par résonance magnétique nucléaire

Afin de confirmer la tendance donnée par les expériences de dichroïsme circulaire le peptide **II.15** et les oligomères **II.20** et **II.21** ont été analysés par RMN. L'attribution complète des systèmes de « spin » des résidus d'acides aminés dans ses séquences a été réalisé à partir d'expériences RMN du ^1H , ^{13}C et ^{15}N en 1D et 2D. Les déplacements chimiques $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$, N, NH, H α pour chaque résidu ont ensuite été utilisés dans l'algorithme PANAV (Probabilistic Approach to NMR Assignment and Validation, <http://panav.wishartlab.com>) pour accéder à la probabilité pour chaque résidu de se structurer en hélice α . [45]

i. Caractérisation du peptide II.15

Sur la base des calculs réalisés par PANAV, le peptide **II.15** présente une faible probabilité à se structurer en l'hélice α à ces extrémités (5 à 21%) (**Table II.83**). La probabilité de former de l'hélice est plus importante (26 à 60%) au cœur de de la séquence entre Ala 3 et Ala 14 (**Table II.83**).

| Résidu | C α | C β | N | NH | H α | hélice probabilité |
|--------|------------|-----------|-------|-------|------------|-----------------------|
| Tyr 1 | 59,68 | 38,90 | 127,7 | 8,413 | 4,428 | 5% |
| Lys 2 | 57,54 | 32,96 | 123,0 | 8,299 | 4,077 | 17% |
| Ala 3 | 53,65 | 18,96 | 124,6 | 8,298 | 4,184 | 42% |
| Ala 4 | 53,88 | 18,96 | 122,7 | 8,241 | 4,228 | 60% |
| Ile 5 | 62,68 | 38,77 | 120,6 | 8,092 | 3,979 | 46% |
| Ala 6 | 53,64 | 18,94 | 126,0 | 8,189 | 4,281 | 31% |
| Lys 7 | 58,15 | 33,19 | 120,1 | 8,299 | 4,138 | 58% |
| Ala 8 | 53,64 | 18,94 | 123,6 | 8,222 | 4,264 | 53% |
| Ala 9 | 53,64 | 18,94 | 122,6 | 8,131 | 4,265 | 47% |
| Ile 10 | 62,68 | 38,80 | 120,7 | 8,017 | 3,976 | 45% |
| Ala 11 | 53,64 | 18,94 | 126,3 | 8,191 | 4,280 | 26% |
| Lys 12 | 57,85 | 33,06 | 120,0 | 8,256 | 4,176 | 48% |
| Ala 13 | 53,64 | 18,96 | 123,6 | 8,156 | 4,262 | 53% |
| Ala 14 | 53,64 | 18,96 | 122,2 | 8,118 | 4,273 | 51% |
| Ile 15 | 62,07 | 38,80 | 119,9 | 7,976 | 4,043 | 21% |
| Ala 16 | 53,16 | 18,96 | 126,8 | 8,268 | 4,296 | 6% |
| Lys 17 | 56,76 | 33,04 | 120,8 | 8,220 | 4,224 | 9% |

Table II.83 : Table des déplacements chimiques (en ppm) des atomes C α , C β , N, NH et H α des acides aminés constituant le peptide **II.15** [mesures réalisées à 800 MHz ; à la concentration de 1,00 mM dans un tampon PBS à pH 7,0 (1 mM de phosphate de sodium et 1 M de NaCl) enregistrés à 0 °C] ainsi que le pourcentage de probabilité pour chaque résidu d'adopter une structure en hélice α .

ii. *Caractérisation de l'oligomère chimère II.20*

L'oligomère **II.20** est constitué d'un segment peptidique analogue à celui du peptide **II.15** auquel un cap tri-valines urées a été inséré à l'extrémité C-terminale. On observe l'impact direct de l'insertion du cap sur le résidu Lys 17 qui voit sa probabilité de se structurer en hélice augmenter de 24 points. La stabilisation induite par l'insertion du cap à l'extrémité C-terminale se propage le long de la séquence avec des augmentations de 0 à 16 points (**Table II.84**). Les résidus Lys 7 et Ala 14 semblent être déstabilisés par l'insertion du cap tri-valine urées. Néanmoins la tendance globale est une stabilisation du segment peptidique de l'oligomère **II.20**, ce qui confirme de manière affinée les résultats obtenus par dichroïsme circulaire.

| Résidu | C α | C β | N | NH | H α | hélice probabilité | Stabilisation ^a |
|--------|------------|-----------|-------|-------|------------|-----------------------|----------------------------|
| Tyr 1 | 59,65 | 38,82 | 127,7 | 8,410 | 4,430 | 5% | +0 |
| Lys 2 | 58,13 | 33,02 | 123,0 | 8,298 | 4,141 | 26% | +9 |
| Ala 3 | 53,67 | 18,84 | 123,4 | 8,229 | 4,266 | 58% | +16 |
| Ala 4 | 53,89 | 18,84 | 122,6 | 8,224 | 4,224 | 64% | +4 |
| Ile 5 | 62,70 | 38,66 | 120,6 | 8,085 | 3,977 | 49% | +3 |
| Ala 6 | 53,64 | 18,84 | 125,2 | 8,211 | 4,285 | 47% | +16 |
| Lys 7 | 57,53 | 33,02 | 120,2 | 8,296 | 4,078 | 46% | -12 |
| Ala 8 | 53,64 | 18,84 | - | 8,176 | 4,263 | 53% | +0 |
| Ala 9 | 53,64 | 18,84 | 122,2 | 8,120 | 4,268 | 54% | +7 |
| Ile 10 | 62,70 | 38,66 | 120,8 | 8,011 | 3,977 | 48% | +3 |
| Ala 11 | 53,64 | 18,84 | 125,9 | 8,184 | 4,273 | 35% | +9 |
| Lys 12 | 57,88 | 33,02 | 119,9 | 8,246 | 4,174 | 52% | +4 |
| Ala 13 | 53,64 | 18,84 | 123,3 | 8,147 | 4,278 | 58% | +5 |
| Ala 14 | 53,64 | 18,84 | 123,3 | 8,147 | 4,278 | 38% | -13 |
| Ile 15 | 62,17 | 38,66 | 119,4 | 7,933 | 4,054 | 26% | +5 |
| Ala 16 | 53,17 | 18,84 | 125,9 | 8,175 | 4,288 | 14% | +8% |
| Lys 17 | 57,58 | 33,02 | 120,2 | 8,171 | 4,219 | 35% | +24 |

Table II.84 : Table des déplacements chimiques (en ppm) des atomes C α , C β , N, NH et H α des acides aminés du segment peptidique de l'oligomère **II.20** [mesures réalisées à 800 MHz ; à la concentration de 1,00 mM dans un tampon PBS à pH 7,0 (1 mM de phosphate de sodium et 1 M de NaCl) enregistrés à 0 °C] ainsi que le pourcentage de probabilité pour chaque résidu d'adopter une structure en hélice α . Les variations du pourcentage de probabilité par rapport au peptide référent **II.15** sont indiquées. ^aEn point de pourcentage d'hélicité.

iii. Caractérisation de l'oligomère chimère II.21

L'oligomère **II.21** est constitué d'un segment peptidique analogue à celui du peptide **II.15** auquel un cap tri-valines urées a été inséré à l'extrémité N-terminale. On observe l'impact direct de l'insertion du cap sur les premiers résidus (Tyr 1, Lys2) dont la probabilité de se structurer en hélice augmente très fortement. L'insertion du cap à l'extrémité N-terminale induit une stabilisation qui se propage sur l'ensemble de la séquence (de 4 à 26 points d'augmentation) (**Table II.85**). Seul le résidu Lys 17 situé à l'extrémité C-terminale, n'est pas impacté. C'est une tendance nette à la stabilisation du segment peptidique de l'oligomère **II.21**, plus marquée que celle observée pour l'oligomère **II.20**. Ces résultats vont dans le sens des données obtenues lors des expériences de dichroïsme circulaire qui soulignent un effet plus marqué du « capping » N-terminal.

| Résidu | C α | C β | N | NH | H α | hélice probabilité | Stabilisation |
|--------|------------|-----------|-------|-------|------------|-----------------------|---------------|
| Tyr 1 | 60,40 | 39,22 | - | 6,511 | 4,266 | 59% | +54 |
| Lys 2 | 58,16 | 33,00 | 118,5 | 8,563 | 4,181 | 72% | +55 |
| Ala 3 | 53,67 | 18,84 | 124,1 | 8,276 | 4,284 | 46% | +4 |
| Ala 4 | 53,89 | 18,84 | 122,3 | 8,035 | 4,245 | 67% | +7 |
| Ile 5 | 63,30 | 38,77 | 120,8 | 8,087 | 3,942 | 71% | +25 |
| Ala 6 | 53,64 | 18,85 | 125,3 | 8,146 | 4,285 | 45% | +14 |
| Lys 7 | 58,53 | 33,00 | 119,5 | 8,264 | 4,117 | 77% | +19 |
| Ala 8 | 53,64 | 18,85 | 123,2 | 8,175 | 4,286 | 58% | +5 |
| Ala 9 | 53,64 | 18,85 | 122,3 | 8,090 | 4,264 | 53% | +6 |
| Ile 10 | 63,30 | 38,76 | 120,6 | 7,975 | 3,947 | 71% | +26 |
| Ala 11 | 53,64 | 18,85 | 125,3 | 8,120 | 4,274 | 47% | +21 |
| Lys 12 | 58,17 | 33,00 | 119,7 | 8,227 | 4,164 | 64% | +16 |
| Ala 13 | 53,64 | 18,84 | 123,0 | 8,095 | 4,259 | 63% | +10 |
| Ala 14 | 53,64 | 18,84 | 122,0 | 8,059 | 4,270 | 56% | +5 |
| Ile 15 | 62,21 | 38,76 | 119,6 | 7,928 | 4,033 | 28% | +7 |
| Ala 16 | 53,17 | 18,84 | 126,4 | 8,220 | 4,287 | 10% | +4 |
| Lys 17 | 56,81 | 33,27 | 120,6 | 8,178 | 4,223 | 8% | +0 |

Table II.85 : Table des déplacements chimiques (en ppm) des C α , C β , N, NH et H α des acides aminés du segment peptidique de l'oligomère **II.21** [mesures réalisées à 800 MHz ; à la concentration de 1 mM dans un tampon PBS à pH 7,0 (1 mM de phosphate de sodium et 1 M de NaCl) enregistrés à 0 °C] ainsi que le pourcentage de probabilité pour chaque résidu d'adopter une structure en hélice α . Les variations du pourcentage de probabilité par rapport au peptide référent **II.15** sont indiquées. ^aEn point de pourcentage d'hélicité.

Dans l'ensemble, les résultats des expériences RMN obtenues sur la série **II.15**, **II.20** et **II.21** corroborent plutôt bien les résultats des expériences de dichroïsme circulaire. Il existe une tendance plus marquée à la stabilisation du segment peptidique lorsque le « cap » uréido est positionné à l'extrémité N-terminale en milieu aqueux. Cependant la stabilisation induite par l'insertion à l'extrémité C-terminale de « caps » oligourée en milieu aqueux, est loin d'être négligeable contenu des rares exemples de « caps » C-terminaux de synthèse décrits dans la littérature. La technologie que nous avons développée, la « foldamer capping box » pourrait s'avérer utile pour stabiliser des peptides bioactifs adoptant une conformation hélicoïdale. Dans le chapitre suivant, nous avons cherché à utiliser cette approche sur un peptide bioactif modèle inhibiteur de l'interaction protéine/protéine p53/MDM2.

Bibliographie

- [1] A. L. Jochim and P. S. Arora, "Systematic analysis of helical protein interfaces reveals targets for synthetic inhibitors," *ACS Chem. Biol.*, vol. 5, no. 10, pp. 919–923, 2010.
- [2] A. J. Wilson, "Inhibition of protein-protein interactions using designed molecules.," *Nat. Chem.*, vol. 5, no. March, pp. 161–173, 2013.
- [3] K. Estieu-Gionnet and G. Guichard, "Stabilized helical peptides: overview of the technologies and therapeutic promises," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 6, no. 9, pp. 937–963, 2011.
- [4] R. M. J. Liskamp, D. T. S. Rijkers, J. A. W. Kruijtzter, and J. Kemmink, "Peptides and Proteins as a Continuing Exciting Source of Inspiration for Peptidomimetics," *ChemBioChem*, vol. 12, no. 11, pp. 1626–1653, 2011.
- [5] J. M. Davis, L. K. Tsou, and A. D. Hamilton, "Synthetic non-peptide mimetics of α -helices," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 36, no. 2, pp. 326–334, 2007.
- [6] I. L. Karle and P. Balaram, "Structural characteristics of alpha-helical peptide molecules containing Aib residues.," *Biochemistry*, vol. 29, no. 29, pp. 6747–6756, 1990.
- [7] C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, and C. Peggion, "Control of peptide conformation by the Thorpe-Ingold effect (C γ -tetrasubstitution)," *Biopolymers*, vol. 60, no. 6, pp. 396–419, 2001.
- [8] J. F. Hernandez *et al.*, "Synthesis and relative potencies of new constrained CRF antagonists," *J. Med. Chem.*, vol. 36, no. 20, pp. 2860–2867, Oct. 1993.
- [9] C. García-Echeverría, P. Chène, M. J. J. Blommers, and P. Furet, "Discovery of Potent Antagonists of the Interaction between Human Double Minute 2 and Tumor Suppressor p53," *J. Med. Chem.*, vol. 43, no. 17, pp. 3205–3208, Aug. 2000.
- [10] Christian E. Schafmeister, A. Julia Po, and G. L. Verdine*, "An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides," *J. Am. Chem. Soc.*, no. 6, pp. 12364–12365, 2000.
- [11] E. N. Murage, G. Gao, A. Bisello, and J.-M. Ahn, "Development of Potent Glucagon-like Peptide-1 Agonists with High Enzyme Stability via Introduction of Multiple Lactam Bridges," *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 17, pp. 6412–6420, Sep. 2010.
- [12] H. Jo *et al.*, "Development of α -helical calpain probes by mimicking a natural protein-protein interaction," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 42, pp. 17704–17713, 2012.
- [13] A. M. Spokoyny, Y. Zou, J. J. Ling, H. Yu, Y. Lin, and B. L. Pentelute, "A Perfluoroaryl-Cysteine S_NAr Chemistry Approach to Unprotected Peptide Stapling," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 16, pp. 5946–5949, Apr. 2013.
- [14] A. D. De Araujo *et al.*, "Comparative α -helicity of cyclic pentapeptides in water," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 53, no. 27, pp. 6965–6969, 2014.
- [15] S. Baek *et al.*, "Structure of the stapled p53 peptide bound to Mdm2," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 1, pp. 103–106, 2012.
- [16] G. Philippe *et al.*, "Development of cell-penetrating peptide-based drug leads to inhibit MDMX:p53 and MDM2:p53 interactions," *Biopolymers*, vol. 106, no. 6, pp. 853–863, Nov. 2016.
- [17] J. Kallen *et al.*, "Crystal structures of human MdmX (HdmX) in complex with p53 peptide analogues reveal surprising conformational changes," *J. Biol. Chem.*, vol. 284,

- no. 13, pp. 8812–8821, 2009.
- [18] G. Guichard and I. Huc, "Synthetic foldamers," *Chem. Commun.*, vol. 47, no. 21, p. 5933, 2011.
- [19] W. S. Horne and S. H. Gellman, "Foldamers with heterogeneous backbones," *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 10, pp. 1399–1408, 2008.
- [20] L. M. Johnson *et al.*, "A Potent α/β -Peptide Analogue of GLP-1 with Prolonged Action in Vivo," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 37, pp. 12848–12851, 2015.
- [21] M. D. Boersma *et al.*, "Evaluation of diverse α/β -backbone patterns for functional α -helix mimicry: Analogues of the Bim BH3 domain," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 1, pp. 315–323, 2012.
- [22] L. M. Johnson *et al.*, "Enhancement of α -helix mimicry by an α/β -peptide foldamer via incorporation of a dense ionic side-chain array," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 17, pp. 7317–7320, 2012.
- [23] N. Pendem *et al.*, "Helix-Forming Propensity of Aliphatic Urea Oligomers Incorporating Noncanonical Residue Substitution Patterns," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 12, pp. 4884–4892, Mar. 2013.
- [24] J. Fremaux, C. Dolain, B. Kauffmann, J. Clayden, and G. Guichard, "Influence of achiral units with gem-dimethyl substituents on the helical character of aliphatic oligourea foldamers," *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 67, pp. 7415–7417, 2013.
- [25] J. Fremaux, L. Fischer, T. Arbogast, B. Kauffmann, and G. Guichard, "Condensation approach to aliphatic oligourea foldamers: Helices with N-(Pyrrolidin-2-ylmethyl)ureido junctions," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 50, no. 48, pp. 11382–11385, 2011.
- [26] L. Fischer *et al.*, "The Canonical Helix of Urea Oligomers at Atomic Resolution: Insights Into Folding-Induced Axial Organization," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 49, no. 6, pp. 1067–1070, Dec. 2009.
- [27] J. Fremaux, L. Mauran, K. Pulka-Ziach, B. Kauffmann, B. Odaert, and G. Guichard, " α -Peptide-Oligourea Chimeras: Stabilization of Short α -Helices by Non-Peptide Helical Foldamers," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 54, no. 34, pp. 9816–9820, Aug. 2015.
- [28] P. Kumar and M. Bansal, "HELANAL-Plus: a web server for analysis of helix geometry in protein structures," *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 30, no. 6, pp. 773–83, 2012.
- [29] P. Sieber, "A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method," *Tetrahedron Lett.*, vol. 28, no. 19, pp. 2107–2110, 1987.
- [30] C. Douat-Casassus, K. Pulka, P. Claudon, and G. Guichard, "Microwave-Enhanced Solid-Phase Synthesis of N, N' -Linked Aliphatic Oligoureas and Related Hybrids," *Org. Lett.*, vol. 14, no. 12, pp. 3130–3133, Jun. 2012.
- [31] P. B. Alper, S.-C. Hung, and C.-H. Wong, "Metal catalyzed diazo transfer for the synthesis of azides from amines," *Tetrahedron Lett.*, vol. 37, no. 34, pp. 6029–6032, Aug. 1996.
- [32] E. D. Goddard-Borger and R. V. Stick, "An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride," *Org. Lett.*, vol. 9, no. 19, pp. 3797–3800, Sep. 2007.
- [33] N. Fischer, E. D. Goddard-Borger, R. Greiner, T. M. Klapötke, B. W. Skelton, and J.

- Stierstorfer, "Sensitivities of Some Imidazole-1-sulfonyl Azide Salts," *J. Org. Chem.*, vol. 77, no. 4, pp. 1760–1764, Feb. 2012.
- [34] Z. Zhang and E. Fan, "Solid-Phase and Solution-Phase Syntheses of Oligomeric Guanidines Bearing Peptide Side Chains," *J. Org. Chem.*, vol. 70, no. 22, pp. 8801–8810, Oct. 2005.
- [35] K. Burgess *et al.*, "Solid Phase Syntheses of Oligoureas," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, no. 7, pp. 1556–1564, Feb. 1997.
- [36] J. C. Sheehan, D. W. Chapman, and R. W. Roth, "The Synthesis of Stereochemically Pure Peptide Derivatives by the Phthaloyl Method," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 74, no. 15, pp. 3822–3825, Aug. 1952.
- [37] Y.-R. Nelli, C. Douat-Casassus, P. Claudon, B. Kauffmann, C. Didierjean, and G. Guichard, "An activated building block for the introduction of the histidine side chain in aliphatic oligoureia foldamers," *Tetrahedron*, vol. 68, no. 23, pp. 4492–4500, Jun. 2012.
- [38] A. Violette *et al.*, "Mimicking Helical Antibacterial Peptides with Nonpeptidic Folding Oligomers," *Chem. Biol.*, vol. 13, no. 5, pp. 531–538, May 2006.
- [39] L. Fischer *et al.*, "Succinimidyl carbamate derivatives from N-protected α -amino acids and dipeptides-synthesis of ureidopeptides and oligoureia/peptide hybrids," *European J. Org. Chem.*, no. 15, pp. 2511–2525, 2007.
- [40] P. Claudon *et al.*, "Consequences of isostructural main-chain modifications for the design of antimicrobial foldamers: Helical mimics of host-defense peptides based on a heterogeneous amide/urea backbone," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 49, no. 2, pp. 333–336, 2010.
- [41] A. CHAKRABARTTY and R. BALDWIN, "Stability of α -Helices," in *Advances in Protein Chemistry Volume 46*, vol. 46, Elsevier, 1995, pp. 141–176.
- [42] P. Luo and R. L. Baldwin, "Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: A framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water," *Biochemistry*, vol. 36, no. 27, pp. 8413–8421, 1997.
- [43] S. Padmanabhan, S. Marqusee, T. Ridgeway, T. M. Laue, and R. L. Baldwin, "Relative helix-forming tendencies of nonpolar amino acids," *Nature*, vol. 344, no. 6263, pp. 268–270, Mar. 1990.
- [44] T. L. Raguse, J. R. Lai, and S. H. Gellman, "Evidence that the α -Peptide 14-Helix is Stabilized by 3-Residues with Side-Chain Branching Adjacent to the α -Carbon Atom," *Helv. Chim. Acta*, vol. 85, no. 12, pp. 4154–4164, Dec. 2002.
- [45] B. Wang, Y. Wang, and D. S. Wishart, "A probabilistic approach for validating protein NMR chemical shift assignments," *J. Biomol. NMR*, vol. 47, no. 2, pp. 85–99, 2010.

Chapitre 3

Conception de foldamères à base d'urées inhibiteurs de l'interaction p53/MDM2

I. Interaction p53/MDM2 et MDMX

La protéine p53, garante de l'intégrité cellulaire, est un facteur de transcription qui régule l'expression de nombreux gènes codants pour des protéines impliquées dans diverses fonctions biologiques comme par exemple : la réparation de l'ADN endommagé, le métabolisme, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose (Bax, Fas, DR5 par exemple) ainsi que la sénescence. Le niveau d'expression de p53 est très surveillé et gardé bas grâce à un mécanisme de régulation négatif dirigé par la protéine double-minute 2 (MDM2 chez la souris et HDM2 chez l'homme). La protéine MDM2, qui possède une activité d'ubiquitine ligase, se lie de façon sélective au domaine de transactivation à l'extrémité N-terminale de la protéine p53. L'interaction entre ces deux protéines conduit à l'insertion d'un tag ubiquitine sur des résidus lysine à l'extrémité C-terminale de la protéine p53 qui sera ensuite dégradée par le protéasome. Ce mécanisme est en réalité une boucle de régulation négative puisque l'un des facteurs de transcription de la protéine MDM2 est la protéine p53.[1] La surexpression de la protéine MDM2 a été observée dans de nombreux cas de cancer et conduit, par l'inactivation de la protéine p53, au développement anarchique de cellules dont l'intégrité a été compromise. Pour les patients qui ne présentent pas de mutations au niveau de la séquence de p53 (50% des cas de cancers humains), inhiber l'interaction entre les protéines p53 et MDM2 de façon à restaurer l'activité de la protéine p53 dans les cellules tumorales surexprimant MDM2 est une stratégie de lutte contre le cancer.[2] La structure cristallographique du complexe formé par le domaine d'interaction de p53 (résidus 15-27) avec la surface de MDM2 révèle qu'au contact de cette dernière, la portion de p53 impliquée dans cette interaction adopte une structure en hélice- α (**Figure III.86**). Cette interaction est médiée par trois résidus d'ancrage : la Phe19, le Trp23 et la Leu26, tous trois localisés sur la même face de l'hélice peptidique et qui viennent se loger dans une vaste poche hydrophobe située à la surface de la protéine MDM2.[3]

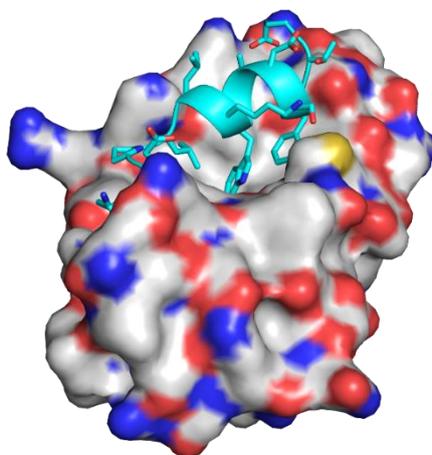


Figure III.86 : Structure cristallographique du complexe entre les protéines p53⁽¹⁵⁻²⁷⁾ et MDM2 (PDB ID : 1YCR).[3]

La protéine MDMX est un analogue structural de la protéine MDM2. Le plus haut pourcentage d'homologie entre ces deux protéines : 49,7%, a été caractérisé au niveau des 111 premiers acides aminés contenant le domaine de liaison à la protéine p53.[4] Cependant, bien que ne possédant pas l'activité d'ubiquitylation de la protéine p53, MDMX se lie de façon sélective à l'extrémité N-terminale de la protéine p53. La formation de l'hétérodimère p53/MDMX facilite la réaction d'insertion du tag ubiquitine par MDM2.[1][5] La surexpression de MDMX a également été observée dans de nombreux cas de cancers. Concevoir un inhibiteur capable d'inhiber sélectivement l'interaction p53/MDM2 et également l'interaction p53/MDMX pourrait être une approche intéressante dans le développement de nouveaux agents anticancéreux.

II. Inhibiteurs mimes d'hélices α peptidiques

Au début du 21^{ème} siècle, des chercheurs du groupe pharmaceutique Novartis ont mis en évidence que la stabilisation de la conformation en hélice- α de peptides courts dérivés de la séquence de p53⁽¹⁷⁻²⁸⁾ (ETFSDLWKLLEPE) augmentait de façon significative leur capacité à inhiber l'interaction de p53 avec MDM2.[6] A la suite de cette observation essentielle, de nombreuses approches basées sur la conception de séquences peptidiques reproduisant la structure secondaire de p53⁽¹⁷⁻²⁸⁾ ont vu le jour afin de générer différentes familles d'inhibiteurs de l'interaction p53/MDM2. L'équipe de recherche de Novartis a choisi d'introduire des résidus α,α -dialkylés, décrits comme stabilisateurs d'hélices α peptidiques, tout en maintenant la triade de résidus hydrophobes[7]. Des substitutions locales d'acides aminés ont été réalisées dans la séquence native du peptide p53⁽¹⁷⁻²⁸⁾, au profit de l'insertion de résidus α,α -dialkylés permettant d'accéder à des composés inhibant 50% de l'interaction p53/MDM2 dans le bas nanomolaire. Un des intérêts de cette approche est qu'elle permet d'augmenter la stabilité des peptides modifiés à l'action des protéases.

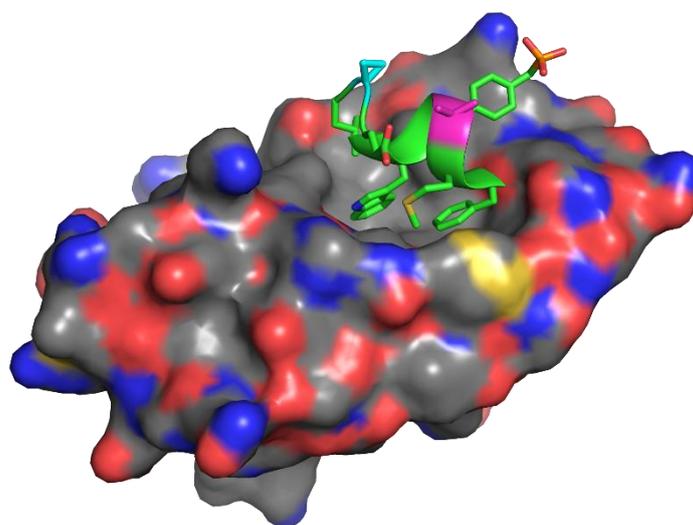


Figure III.87 : Structure cristallographique du peptide contenant un acide aminé α,α -disubstitué (rose) et un dérivé cyclopropanique (bleu) en complexe avec la protéine HDMX (PDB ID : 3FE7).[8]

L'équipe d'A. Shepartz a développé deux approches distinctes pour générer des inhibiteurs de l'interaction p53/MDM2. La première approche est basée sur l'utilisation de mini-protéines comme l'avian pancreatic polypeptide (aPP) possédant une hélice α dont les résidus exposés en surface peuvent être mutés.[9] La seconde approche repose sur le développement d'hélices 3_{14} non-naturelles constituées de β -acides aminés dans lesquelles les résidus clés Phe, Trp et Leu sont situés sur la même face de l'hélice dans une relation $i/i+3$. [10] Grâce à l'assistance d'outils de modélisation moléculaire, le remplacement de la chaîne latérale indole du résidu Trp23 a été optimisé en utilisant d'autres groupements aromatiques et conduit à une augmentation significative de l'affinité de ces composés pour la surface de la protéine MDM2 (**Figure III.88**). [11]

| Composés | Kd (HDM2) | Kd (HDMX) |
|--|-----------|-----------|
| $\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Ile}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Ile}-\beta^3\text{Trp}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Ile}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Glu}$ | 204 nM | 2130 nM |
| $\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Ile}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Ile}-\beta^3(3\text{-CF}_3)\text{Phe}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Ile}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Glu}$ | 28.2 nM | 518 nM |
| $\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Ile}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Ile}-\beta^3(3,4\text{-Cl})\text{Phe}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Ile}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Glu}$ | 27.6 nM | 155 nM |

Figure III.88 : Hélices-3¹⁴ de peptides- β mimes de (17-28)p53

Cette stratégie, basée sur l'utilisation de mimes architecturaux reproduisant la structure conformationnelle et la projection des chaînes latérales des 3 résidus hydrophobes clés pour l'interaction p53/MDM2, a été exploitée par d'autres groupes de recherche. [12][13] Cependant et malgré une résistance à la protéolyse accrue, l'obstacle majeur à l'utilisation de ces molécules *in cellulo* et au-delà *in vivo* reste leur faible capacité à traverser les membranes cellulaires. Le groupe d'Arora a utilisé la technologie des HBS, décrite dans le chapitre 1, pour développer des inhibiteurs de l'interaction p53/MDM2. L'insertion du « cap » de synthèse, substitut de liaison hydrogène, a été réalisée à l'extrémité N-terminale du peptide (17-27)p53.[14] Cette approche a ensuite été combinée avec l'insertion ponctuelle de résidus β -acides aminés en respectant l'enchaînement suivant $\alpha\alpha\beta$, décrit dans le chapitre 1 pour favoriser la structuration en hélice des peptides hybrides.[15] La combinaison des deux stratégies ne perturbe pas l'affinité de liaison des composés hybrides avec la surface de MDM2 et des affinités de 80 nM ont été obtenues. Dans un tout autre contexte, des peptides D, constitués d'acides aminés non-naturels de configuration (D), ligands de la protéine MDM2 et possédant des valeurs d'IC₅₀ dans le bas nanomolaire, ont été identifiés par la technique de « *mirror image phage display* » (**Figure III.89**).[16][17] Malgré la puissance de cette approche, les peptides D ne sont pas reconnus par les protéases plasmatiques, la mauvaise perméabilité cellulaire de ces peptides limite encore leur développement comme candidats médicaments.

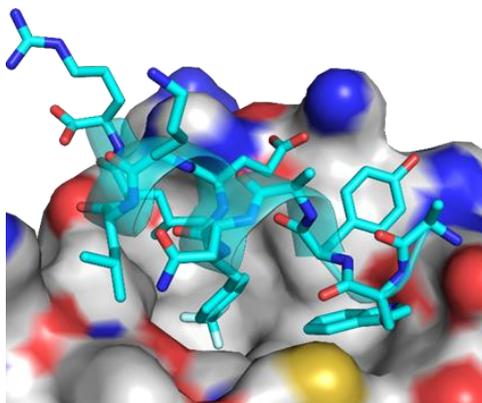


Figure III.89 : Structure cristallographique du complexe entre l'inhibiteur peptidique D (AWYAN(4-trifluorométhyl)FEKLLR) et MDM2 (PDB ID : 3TPX).[18]

Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à la cyclisation de chaînes latérales de p53 afin de stabiliser la conformation hélicoïdale et éventuellement accroître la perméabilité membranaire.[19][20][21] L'équipe de Fairlie a développé des inhibiteurs peptidiques dont les chaînes latérales de résidus en $i/i+4$ ont été connectées entre elles via la formation d'un pont lactame. Ce sont des composés très actifs avec des valeurs d'IC₅₀ pour p53/MDM2 et p53/MDMX dans le bas nanomolaire. Afin de favoriser la pénétration cellulaire de ces molécules, des peptides pénétrant les cellules (CPP) ont été conjugués à l'extrémité N-terminale de ces inhibiteurs peptidiques.[20] Une autre approche consiste à verrouiller la structuration en hélice du cœur peptide dans une relation $i/i+7$ de façon à avoir un positionnement idéal des chaînes latérales de la triade hydrophobe, répartie sur 8 résidus. Walensky et son équipe ont développé une stratégie de cyclisation des chaînes latérales basée

sur la formation d'un lien transverse constitué d'une chaîne hydrocarbonée. Cette étape de macrocyclisation est réalisée via une réaction de métathèse cyclisante d'oléfines catalysée au ruthénium entre deux résidus non-naturels α,α -disubstitués portant des chaînes latérales oléfines.[22][23] Le peptide macrocyclique obtenu par cette méthodologie possède des propriétés pharmacologiques remarquables avec notamment une capacité à inhiber à la fois MDM2 et MDMX. A l'heure actuelle, c'est le seul inhibiteur peptidique, développé par la compagnie Ailerons Therapeutic (ASTP7041), en phase d'essai clinique (**Figure III.90**).[21]

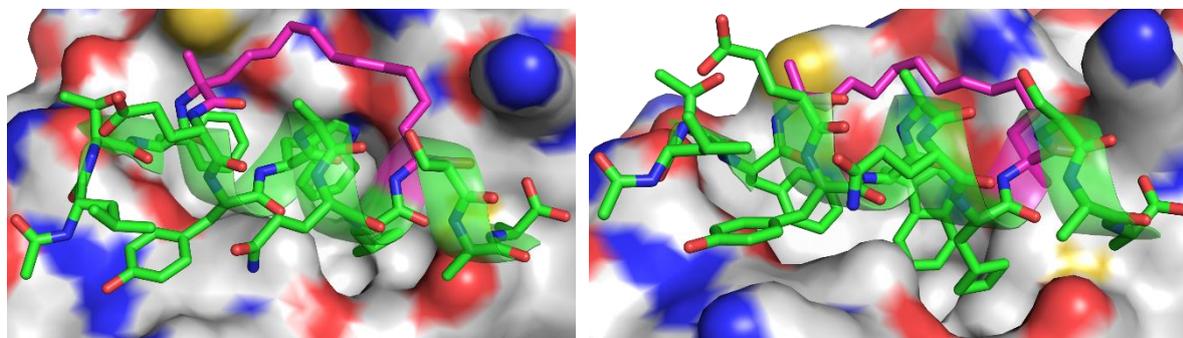


Figure III.90 : Structure cristallographique du complexe entre l'inhibiteur peptidique AST7041 et MDMX (PDB ID : 4N5T).[21]

Malgré les différentes approches et technologie de mimes d'hélices, la majorité des composés testés à l'heure actuelle en essais clinique restent des petites molécules organiques.[24] Les problèmes de biodisponibilités des peptides mimant l'hélice p53⁽¹⁷⁻²⁸⁾ limitent leur développement comme candidat médicament. Afin de chercher à nous affranchir de cette limitation nous avons choisi d'explorer une approche qui consiste à moduler les propriétés pharmacologiques de l'inhibiteur peptidique PMI [25] en développant des foldamères hétérogènes permettant l'introduction de variations chimiques du squelette peptidique.

III. Inhibiteur peptidique PMI

Le peptide PMI a été décrit par Lu comme l'un des meilleurs inhibiteurs de l'interaction entre p53 et MDM2 [25]. Ce peptide a été obtenu par « phage display » et possède une IC₅₀ de 0,4 nM pour HDM2. Afin d'évaluer l'impact de chaque chaîne latérale du peptide PMI dans l'interaction avec MDM2, l'équipe de Lu a rapporté, en 2010, un « AlaScan » où chaque résidu de la séquence de PMI a été tour à tour remplacé par une alanine (**Table III.91**).[26]. Cette stratégie permet d'identifier quels sont les résidus clés pour l'interaction avec ici MDM2 comme partenaire protéique.

| Séquence peptidique | K_d (nM) | $K_d(\text{pep})/K_d(\text{PMI})$ | $\Delta\Delta G$ (kcal/mol) |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| <i>TSFAEYWNLSP</i> (PMI) | 3.2 | 1.00 | 0.00 |
| <i>ASFAEYWNLSP</i> | 6.2 | 1.90 | 0.39 |
| <i>TAFAEYWNLSP</i> | 27 | 8.40 | 1.24 |
| <i>TSAAEYWNLSP</i> | $38000 \cdot 10^{-5}$ | 11750.00 | 5.46 |
| <i>TSFAEYWNLSP</i> | 3.2 | 1.00 | 0.00 |
| <i>TSFAAYWNLSP</i> | 21 | 6.70 | 1.10 |
| <i>TSFAEAWNLSP</i> | 610 | 191.00 | 3.06 |
| <i>TSFAEYANLSP</i> | 160000 | 50720.00 | 6.31 |
| <i>TSFAEYWALLSP</i> | 0.49 | 0.20 | -1.10 |
| <i>TSFAEYWNALSP</i> | 2.4 | 0.80 | -0.17 |
| <i>TSFAEYWNLASP</i> | 890 | 277.00 | 3.28 |
| <i>TSFAEYWNLAP</i> | 3.9 | 1.20 | 0.12 |
| <i>TSFAEYWNLISA</i> | 2.1 | 0.70 | -0.25 |

Table III.91 : Table récapitulative des résultats de l'Alascan réalisé sur PMI

Les résultats de ce scan confirment la forte contribution des résidus Phe3, Tyr6, Trp7 et Leu10 du peptide PMI dans l'interaction avec la surface de la protéine MDM2. Ces résidus sont qualifiés de tétrade hydrophobe. Une structure cristallographique du peptide PMI en complexe avec la protéine MDM2 a été obtenue par ce groupe (**Figure III.92**).

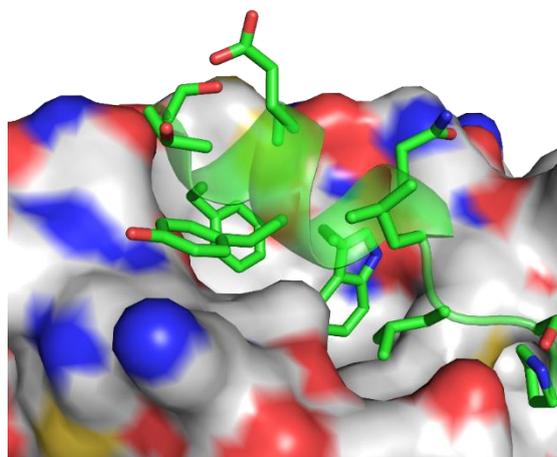


Figure III.92 : Structure cristallographique du peptide PMI en complexe avec la protéine MDM2 (PDB ID : 3EQY).[25]

Cette structure apporte des informations quant au mode d'interaction entre ces deux biomolécules. Les chaînes latérales des trois résidus du peptide PMI : la Phe3, le Trp7 et la Leu10, viennent s'asseoir dans la large poche hydrophobe à la surface de MDM2. Ces données cristallographiques expliquent la chute brutale de l'affinité lors du remplacement de chacun de ces résidus par une alanine. La Tyr6 interagit avec la surface de MDM2 via plusieurs types d'interactions : des interactions de type Van der Waals avec les chaînes latérales des résidus His73 et Val93 de MDM2, des interactions de type cation- π avec la chaîne latérale du résidu Lys94 de MDM2 et des liaisons hydrogène faisant intervenir un relai de molécules d'eau avec les chaînes latérales des résidus Gln72 et Lys94 de MDM2. La Tyr6 est donc un résidu central qui interagit avec la surface de MDM2 via plusieurs types d'interactions non-covalentes ce qui explique l'impact négatif mesuré lors de son remplacement par un résidu alanine. Deux autres résidus sont également impliqués dans des interactions mineures conduisant à la nucléation

de l'hélice α de la séquence peptidique. Le peptide PMI utilise une « *capping box* », un motif de « *capping* » N-terminal décrit dans le chapitre 1, afin d'amorcer sa structuration en hélice- α . Les résidus Ser2 et Glu5 sont impliqués dans cette « *capping box* », leur substitution en Ala induit une chute drastique de la valeur du K_d . L'impact des chaînes latérales dans l'interaction avec MDM2 est représenté dans la **Figure III.93**.



Figure III.93 : Mise en évidence des résidus clés de l'interaction du peptide PMI avec MDM2.

Cette représentation souligne la difficulté potentielle d'effectuer des modifications au niveau de la séquence du peptide PMI entre les résidus Ser2 et Trp7. En revanche, la substitution de l'Asn8 par un résidu Ala, générant le peptide PMI-A⁸, permet d'accroître d'un facteur 5 l'affinité du peptide PMI pour la surface de la protéine MDM2. Comme nous venons de l'évoquer, PMI-A⁸ possède la meilleure affinité pour MDM2 rapportée jusqu'à ce jour dans la littérature. Cependant sa nature entièrement peptidique rend son développement thérapeutique plus difficile.

L'objectif de ma thèse a donc été d'élaborer des analogues « foldamères à blocs » de PMI-A⁸ et tout en maintenant une bonne affinité pour MDM2, d'augmenter leur biostabilité et à terme faciliter leur pénétration cellulaire.

IV. Remplacement systématique d'un acide aminé par un monomère de type urée dans la séquence du peptide PMI

Afin de valoriser le travail de développement de la « *foldamer capping box* » décrit dans le chapitre précédent et de l'appliquer à un modèle pertinent d'IPP, nous avons cherché à concevoir un inhibiteur hybride peptide/oligourée de l'interaction protéine/protéine p53/MDM2 basé sur la séquence du peptide PMI-A⁸. Des expériences de dégradation enzymatique conduites sur des oligomères d'urée à activité antibactérienne ont mis en évidence la résistance à la protéolyse de ces composés.[27] Outre leur capacité à interagir avec les membranes bactériennes, des séquences oligourées cationiques amphiphiles ont également été développées pour complexer et transporter l'ADN plasmidique dans le cytoplasme cellulaire[28]. Cependant pour toutes les raisons évoquées précédemment, insérer des résidus urées dans la séquence de PMI-A⁸ tout en maintenant une bonne affinité de liaison à MDM2 représentait un travail délicat. Il était nécessaire de prendre en compte la distribution précise des chaînes latérales dans l'espace qui n'avait jusqu'alors pas été intégrée dans notre démarche de *capping* basée sur l'utilisation de séquences courtes d'oligourées. En effet, les différences entre squelettes peptidiques et oligourées (diamètre de l'hélice, élévation par tour, nombre de résidus par tour, « *pitch* ») peuvent se répercuter sur la localisation ainsi que la projection de la chaîne latérale du résidu urée et peuvent également conduire à des décalages dans le squelette de la partie peptidique. Ce décalage de l'hélice-2.5 oligourée avec l'hélice- α peptidique est tout particulièrement visible en alignant la liaison NH- α CH d'un résidu d'acide α -aminé en conformation α -hélicoïdale sur le lien NH- β CH d'une unité urée (**Figure III.94.a**).

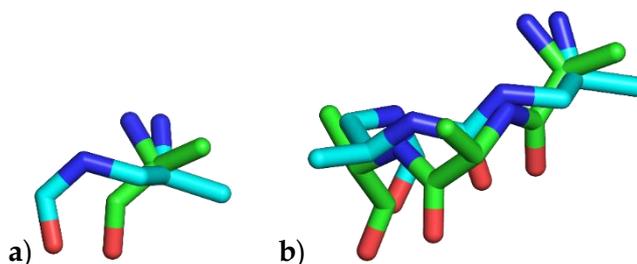


Figure III.94 : Schéma de la superposition de résidus d'acides α -aminés adoptant une conformation α -hélicoïdale et de résidus urées adoptant une conformation en hélice-2.5. (a) : Superposition d'un acide aminé avec un résidu urée ($1\alpha/1^U$) ; (b) : superposition de 3 acides aminés avec 2 résidus urées ($3\alpha/2^U$).

La substitution d'un acide α -aminé par un résidu urée ($1\alpha/1^U$) induit un décalage de 2 atomes au niveau de la chaîne principale, ce qui est loin d'être négligeable. En revanche, ce type de substitution a l'avantage d'être simple à mettre en œuvre d'un point de vue de la synthèse et peut s'avérer utile pour rapidement scanner le peptide et identifier les zones les plus sensibles à des modifications structurales. Il est possible d'atténuer le décalage en utilisant des règles de remplacement plus subtiles comme par exemple la substitution de trois acides aminés par deux résidus urées ($3\alpha/2^U$) ou bien de quatre acides aminés par trois résidus urée ($4\alpha/3^U$). A titre d'exemple, le motif de substitution ($3\alpha/2^U$) (**Figure III.94.b**, voir section V) induit un décalage d'un atome au niveau de la chaîne principale, moins impactant en comparaison avec le décalage induit par le motif de substitution ($1\alpha/1^U$). Cependant, la chaîne latérale du deuxième résidu urée n'est pas du tout projetée dans la même direction que la chaîne latérale du troisième résidu- α . Pour pallier à ce problème, une possibilité était de transférer la chaîne latérale sur le $C\alpha$ du deuxième résidu urée tout en inversant sa configuration. De manière intéressante la stratégie ($4\alpha/3^U$) correspond au remplacement d'un tour entier d'hélice α par un insert oligourée.

Dans cette première partie nous avons choisi d'explorer le remplacement systématique d'un acide aminé par un résidu urée (scan $1\alpha/1^U$) sans ajustement de la nature de la chaîne latérale du résidu modifié. Le peptide PM1-A⁸, qui a servi de référence dans cette étude, a été renommé **III.1**.

1. Synthèse

Un remplacement ponctuel de chaque résidu- α par son équivalent urée a été réalisé (**Figure III.95**). Ici nous avons cherché à évaluer l'impact de la modification locale du squelette peptidique par un lien urée sur l'interaction avec la protéine MDM2.

| Composé | Séquence | Rdt ^a | ESI-MS [M+H] ⁺ | HPLC <i>t_R</i> (min) ^b |
|---------------|---|------------------|------------------------------|---|
| III.1 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 39 % | 1384,54 | 6,50 |
| III.2 | H-Thr ^U -Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 6 % | 1413,60 | 6,49 |
| III.3 | H-Thr-Ser ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 8 % | 1413,60 | 6,52 |
| III.4 | H-Thr-Ser-Phe ^U -Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 27 % | 1413,60 | 6,75 |
| III.5 | H-Thr-Ser-Phe-Ala ^U -Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 10 % | 1413,67 | 6,41 |
| III.6 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu ^U -Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 17 % | 1413,60 | 6,96 |
| III.7 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr ^U -Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 18 % | 1413,60 | 6,71 |
| III.8 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 12 % | 1413,47 | 6,10 |
| III.9 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 17 % | 1413,60 | 6,79 |
| III.10 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu ^U -Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 19 % | 1413,40 | 5,99 |
| III.11 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu ^U -Ser-Pro-NH ₂ | 20 % | 1413,53 | 6,01 |
| III.12 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser ^U -Pro-NH ₂ | 28 % | 1413,53 | 6,45 |
| III.13 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro ^U -NH ₂ | 31 % | 1413,53 | 6,86 |

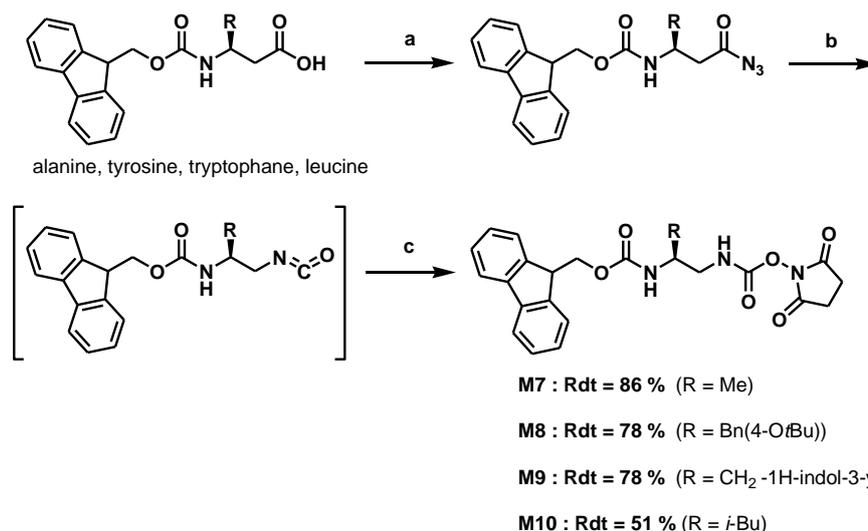
Figure III.95 : Liste des dérivés du peptide **III.1** (PM1-A⁸) issus du remplacement systématique d'un lien amide par un lien urée et de l'insertion d'un groupe méthylène. ^a Rendement après purification HPLC ; ^b système RP-HPLC : gradient linéaire 10 à 100% de B en 10 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) and B (0,1% TFA dans CH₃CN), détection UV à 200 nm.

L'insertion d'une unité uréido au sein d'une séquence peptidique ne posant pas de difficulté majeure de synthèse, une approche entièrement automatisée nous a semblé une alternative séduisante en termes de temps et de coût pour accéder aux 12 molécules de ce « scan ». Nous avons donc choisi une stratégie de protection de nos monomères qui soit compatible avec la synthèse peptidique, l'emploi d'une résine labile au TFA (Rink amide) et l'utilisation d'un synthétiseur automatique (**CEM Liberty Blue**) : la stratégie Fmoc. Nous avons également utilisé certains monomères protégés par un groupement Teoc (vide infra) qui est également compatible avec une synthèse peptidique en stratégie Fmoc.

a. Synthèse des monomères de type éthylène diamine

i. Synthèse de monomères N-Fmoc protégés activés

Une première voie de synthèse permettant d'obtenir les monomères Fmoc protégés et activés sous forme de carbamate de succinimide avait été développée au laboratoire.[29] Les carbamates activés dérivés de l'alanine, la tyrosine, le tryptophane et la leucine ont été obtenus respectivement à partir des acides β-aminés protégés Fmoc-L-βhAla-OH, Fmoc-L-βhTyr(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-βhTrp(Boc)-OH, Fmoc-L-βhLeu-OH, suivant la procédure décrite dans la **Figure III.96**. Après la formation de l'azoture d'acyle correspondant, un réarrangement de Curtius en présence de N-hydroxysuccinimide conduit aux monomères souhaités avec des rendements respectifs de 86% pour **M7** dérivé de l'alanine, 78% pour **M8** dérivé de la tyrosine, 78% pour **M9** dérivé du tryptophane et 51% pour **M10** dérivé de la leucine.

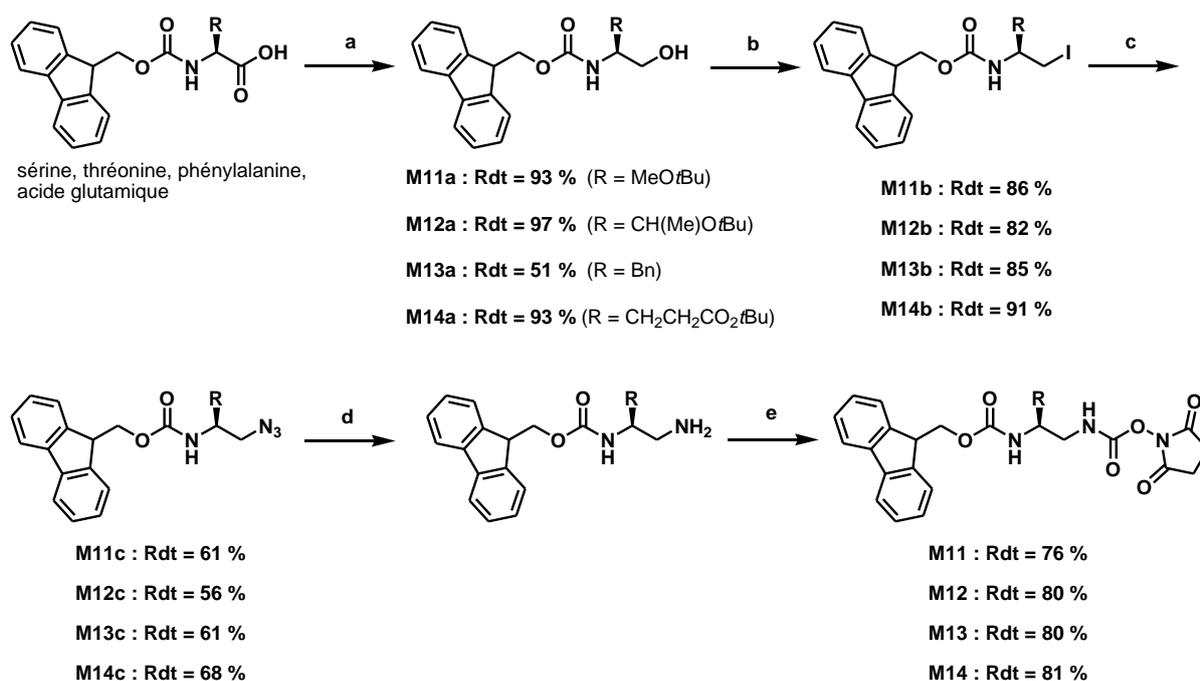


a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20 °C ; 2) NaN₃, H₂O; b : toluene, 65 °C; c : N-hydroxysuccinimide, pyridine.

Figure III.96 : Synthèse des monomères Fmoc protégés activés sous forme de carbamate de succinimide (**M7-M10**) à partir des acides β -aminés correspondants

Bien que le réarrangement de Curtius soit une méthode très efficace pour accéder aux carbamates activés, cette voie de synthèse est limitée par les quantités d'acides β -aminés pouvant être produits en utilisant la méthode de Arndt-Eistert et la nécessité de préparer du diazométhane de manière régulière.

Nous avons donc privilégié une autre voie de synthèse permettant d'accéder plus facilement aux dérivés 1,2-diaminé. Les carbamates activés dérivés de la sérine, la thréonine, la phénylalanine et l'acide glutamique ont été obtenus respectivement à partir des acides α -aminés protégés Fmoc-L-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Glu(*O*tBu)-OH, suivant la procédure décrite dans la **Figure III.97**. Après réduction de l'acide en alcool, une réaction d'iodation de l'alcool en présence de triphénylphosphine conduit à la formation du dérivé iodé correspondant. Des tentatives visant à former un mésylate, au lieu du dérivé iodé, ont été réalisées au laboratoire mais l'espèce générée n'était pas stable dans ces conditions, conduisant principalement à la dégradation du groupement Fmoc. L'azoture, obtenu par une réaction de substitution nucléophile de l'iode, est ensuite réduit en amine par une réaction d'hydrogénation en présence de chloroforme. La formation d'un sel d'HCl permet de désactiver l'amine formée et éviter une déprotection non souhaitée du groupement Fmoc. Cette amine est ensuite activée avec le carbonate de succinimide pour générer les monomères souhaités avec des rendements globaux de 13% pour **M11** dérivé de la sérine, 11% pour **M12** dérivé de la thréonine, 18% pour **M13** dérivé de la phénylalanine et 22% pour **M14** dérivé de l'acide glutamique.



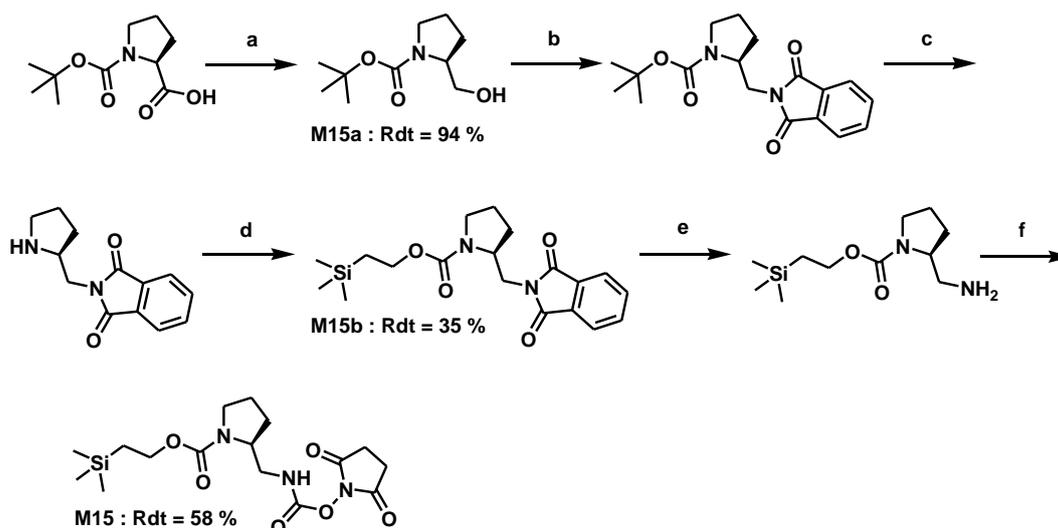
a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20 °C ; 2) NaBH₄, H₂O; b : I₂, PPh₃, Imidazole, CH₂Cl₂, 0 °C; c : NaN₃, DMF, 25 °C; d : H₂, Pd/C, MeOH, CHCl₃, 25 °C; e : , *N,N'*-Disuccinimide carbonate, pyridine, CH₂Cl₂.

Figure III.97 : Synthèse des monomères Fmoc protégés activés **M11-M14** à partir des dérivés iodoalcanes correspondants.

Le monomère dérivé de la proline activé protégé par un groupe Teoc a initialement été développé pour disposer d'un bloc de type pyrrolidine (analogue de proline) compatible avec la stratégie azoture de synthèse des oligomères à base d'urées assistée par micro-onde décrite dans le chapitre 2 [paragraphe II.1.b.i]. La proline étant constituée d'un noyau pyrrolidine, la stratégie azoture n'est pas envisageable pour introduire le résidu urée correspondant. L'emploi d'un groupement protecteur Teoc est compatible avec l'utilisation d'une résine TFA-labile et compatible avec une l'élongation du peptide en stratégie Fmoc. Cette chimie Teoc est également compatible avec l'utilisation des micro-ondes lors des couplages sous atmosphère inerte (CEM Discover Bio) ce qui la rend attrayante pour ce programme.

ii. Synthèse du monomère *N*-Teoc protégé dérivé de la proline

Le monomère activé avec un cycle pyrrolidine a donc été obtenu à partir de l'acide aminé protégé Boc-L-Pro-OH, suivant la procédure de synthèse des monomères *N*-Teoc protégés activés décrite dans la **Figure III.98**. Après réduction de l'acide en alcool, le dérivé phthalimide correspondant est obtenu par réaction de Mitsunobu. L'amine générée par déprotection du Boc en présence de TFA est ensuite mise en présence de TEA et de 2-(triméthylsilyl)éthyle carbonate de 4-nitrophényle pour donner accès à l'amine protégée par un groupement triméthylsilyléthoxy carbonyle. Le phthalimide est ensuite converti en amine primaire par réaction en présence d'hydrate d'hydrazine et l'amine obtenue est activée à l'aide de carbonate de succinimide pour donner le monomère **M15** désiré avec un rendement global de 16%.



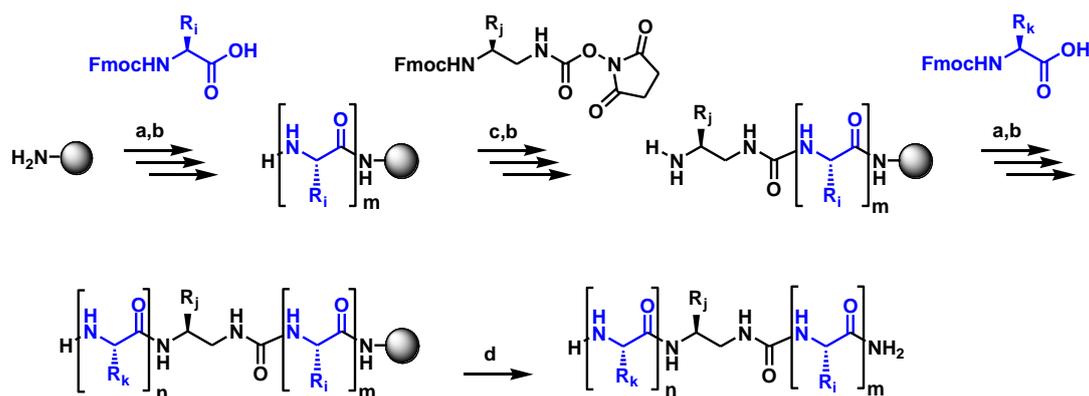
a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2) NaBH_4 , H_2O ; **b :** PPh_3 , DIAD, phthalimide, CH_2Cl_2 , $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; **c :** TFA, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$;
d : 2-(triméthylsilyl)éthyle carbonate de 4-nitrophényle, TEA, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; **e :** N_2H_4 , H_2O , MeOH, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$; **f :** *N,N'*-Disuccinimide carbonate, CH_2Cl_2 , $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figure III.98 : Synthèse du monomère N-Teoc protégé activé **M15** dérivé de la proline

b. Synthèse sur support solide des oligomères III.1 à III.13

i. Synthèse sur support solide des oligomères chimères III.2 à III.12

Afin de faciliter la synthèse des différents analogues de PMI représentés dans la **Figure III.9**, j'ai choisi de privilégier une synthèse sur support solide de ces composés. Contrairement aux chimères décrites dans le chapitre II, nous avons fait le choix de ne pas utiliser la stratégie mettant en jeu des monomères de type azoture. En effet, souhaitant réaliser toutes les synthèses en parallèles avec l'utilisation d'un synthétiseur automatique de peptide (CEM Liberty Blue) l'utilisation des monomères azotures activés était proscrite. L'utilisation de monomères N-Fmoc protégés activés a été développée au sein de notre laboratoire[30][31] pour réaliser des synthèses sur support solide compatible avec l'emploi de résines sensibles aux acides comme par exemple le TFA (ex : résine Rink amide novapag, résine Rink amide polystyrène, résine Sieber[32]). Cette stratégie présente des limites et avait été mise de côté au bénéfice de la stratégie azoture décrite dans le chapitre 2. En effet, les monomères N-Fmoc sont incompatibles avec l'utilisation de champs micro-ondes (risques de sur-insertions multiples) et nécessitent donc des temps de couplages beaucoup plus long ($2 \times 2\text{ h}$). Dans le cadre de cette série de molécules qui comporte une mono-substitution, les monomères N-Fmoc protégés activés représentent néanmoins une alternative séduisante. Cette méthodologie met en jeu le couplage sans utilisation de champ micro-ondes de monomères N-Fmoc protégés activés sous forme de carbamate de succinimide. L'amine N-Fmoc est ensuite déprotégée par utilisation d'une solution de DMF contenant 20% de pipéridine pour permettre le couplage du résidu suivant. J'ai utilisé cette stratégie afin de préparer les oligomères **III.2 à III.12** (**Figure III.99**). Ces synthèses ont été réalisées sur une échelle de $50\text{ }\mu\text{moles}$ à l'aide d'une résine Rink amide clivable en milieu acide (95 TFA : 2,5 TIS : 2,5 H_2O). Les acides α -aminés ont été couplés au support en utilisant la procédure décrite précédemment dans le chapitre 2 [paragraphe II.1.b.i]. Les composés ont ensuite été clivés de leur support, purifiés par HPLC semi-préparative et caractérisés par RP-HPLC analytique et spectrométrie de masse (*electrospray*).



a : Fmoc-Xaa-OH (5 eq), DIC (5 eq), oxyma (5 eq), (170 W, 75 °C, 15 sec) + (35 W, 90 °C, 110 sec) ; **b** : 20% piperidine, DMF, (155 W, 75 °C, 15 sec) + (35 W, 90 °C, 50 sec) ; **c** : monomères N-Fmoc protégés activés **M7**, **M8**, **M9**, **M10**, **M11**, **M12**, **M13**, et **M14** (5 eq), DIEA (10 eq), (25 °C, 120 min) ; **d** : TFA/TIS/H₂O (95 : 2,5 : 2,5).

Figure III.99 : Schéma général de synthèse sur support solide des oligomères chimères **III.2** à **III.12**

Lors de l'utilisation des monomères N-Fmoc des problèmes de couplages donnant lieu à des délétions en résidus urée ont été observés. L'insertion du résidu urée sans assistance des micro-ondes reste très problématique. Malgré le large excès de monomères N-Fmoc protégés utilisé, la durée et la répétition des étapes de couplage, une délétion du résidu urée dans des proportions non-négligeables (30 à 60%) a été observé pour la totalité des synthèses. En conséquence, de faibles rendements de synthèse de ces oligomères chimères **III.2** à **III.12** ont été obtenus après purification par RP-HPLC semi-préparative (partie expérimentale). Cette stratégie a donc été abandonnée au profit de la stratégie azoture, décrite dans le chapitre 2 [paragraphe II.1.b.i] (et qui permet une assistance des micro-ondes), pour les synthèses des autres familles d'oligomères hybrides.

Le chromatogramme HPLC de l'oligomère **III.7** (**Figure III.100**), avant purification par RP-HPLC semi-préparative, met en évidence la présence de deux produits de synthèse dans des proportions équivalentes : l'oligomère **III.6** (temps de rétention : 6,33 minutes) ainsi que le produit de délétion du résidu Tyr⁶ comportant uniquement la portion peptidique (temps de rétention : 5,76 minutes). Après purification par RP-HPLC semi-préparative, 12,5 mg de l'oligomère **III.7** ont été isolés et caractérisés.

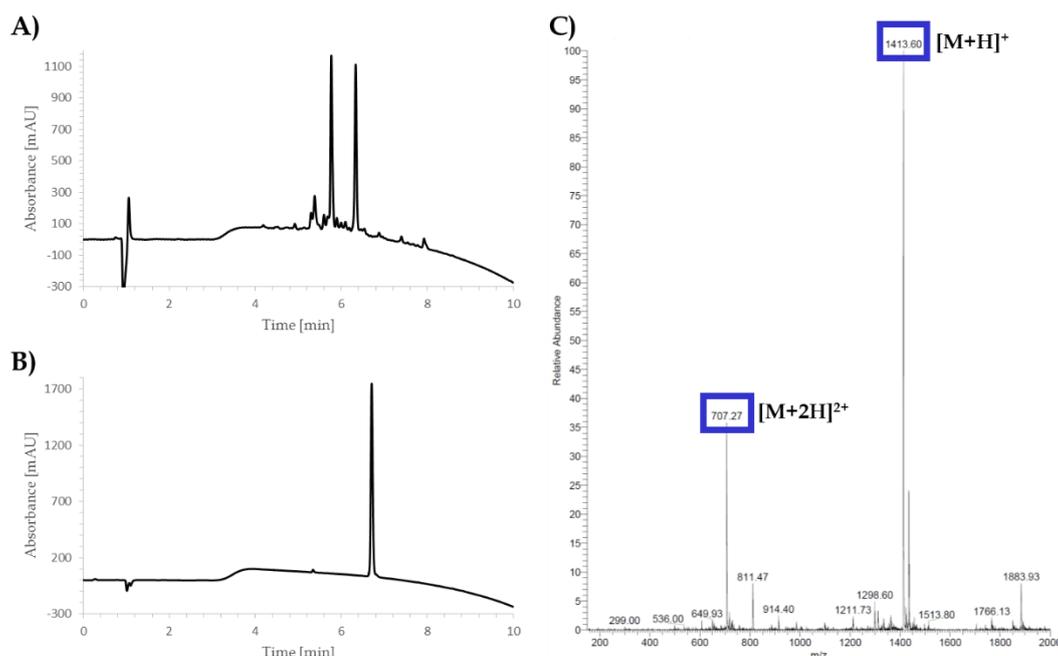
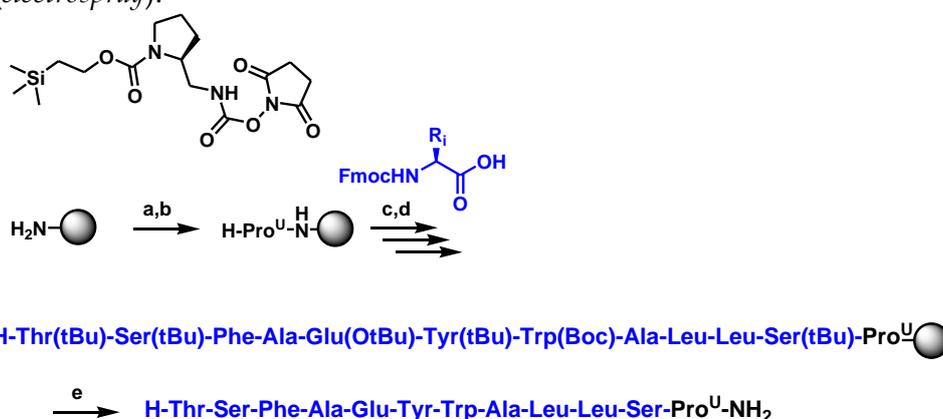


Figure III.100 : Caractérisation de l'oligomère **III.7** : **A & B**) chromatogramme HPLC de l'oligomère **III.7** avant et après purification par RP-HPLC semi-préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 30 à 50% de B en 20 min avec A (0.1% TFA dans H₂O) et B (0.1% TFA dans CH₃CN)] ; **C**) spectre de masse de l'oligomère **III.7** après purification par RP-HPLC semi-préparative.

ii. Synthèse sur support solide de l'oligomère **III.13**

La synthèse mise en œuvre ici est largement similaire à celle décrite ci-dessus mais le groupement Teoc sur le dérivé proline est suffisamment robuste pour autoriser l'emploi des micro-ondes pour son couplage. Le groupement Teoc est éliminé par utilisation d'une solution de TBAF (1M) en solution dans le THF en employant également l'assistance des micro-ondes. Cette stratégie a été utilisée pour préparer l'oligomère **III.13** incorporant ce résidu urée sur son extrémité C-terminale (**Figure III.101**). Ces synthèses ont été réalisées sur une échelle de 50 μ moles à l'aide d'une résine Rink amide clivable en milieu acide (95 TFA : 2,5 TIS : 2,5 H₂O). Les acides α -aminés ont été couplés au support en utilisant la procédure décrite précédemment dans le chapitre 2 [paragraphe II.1.b.i]. L'oligomère **III.13** a ensuite été clivé de son support, purifié par RP-HPLC semi-préparative et caractérisé par RP-HPLC analytique et spectrométrie de masse (*electrospray*).



a : monomère N-Teoc protégé activé **M15** (1,5 eq), DIEA (3 eq), (50 W, 50 °C, 15 min); **b** : TBAF (1M) dans le THF (10 eq), DMF, (0 W, 25 °C, 240 min) ; **c** : Fmoc-Xaa-OH (5 eq), DIC (5 eq), oxyma (5 eq), (170 W, 75 °C, 15 sec) + (35 W, 90 °C, 110 sec); **d** : 20% piperidine, DMF, (155 W, 75 °C, 15 sec) + (35 W, 90 °C, 50 sec) ; **e** : TFA/TIS/H₂O (95 : 2,5 : 2,5).

Figure III.101 : Schéma de synthèse sur support solide de l'oligomère chimère **III.13**

L'insertion du résidu Pro^U en utilisant le monomère **M15**, l'extrémité C-terminale de la séquence peptidique **III.1** (sans Pro) ne pose pas de difficulté particulière. Le chromatogramme RP-HPLC de l'oligomère **III.13** (**Figure III.102**), avant purification par RP-HPLC semi-préparative, souligne la présence d'un produit largement majoritaire (plus de 70% de pureté) : l'oligomère **III.13** (temps de rétention : 6,69 minutes). Le large pic observé au début du chromatogramme RP-HPLC correspond à l'élution du DMF. En effet, quelques gouttes de DMF ont été ajoutées pour pouvoir solubiliser l'échantillon. Après purification par RP-HPLC semi-préparative, 21,8 mg de l'oligomère **III.13** ont été isolés et caractérisés.

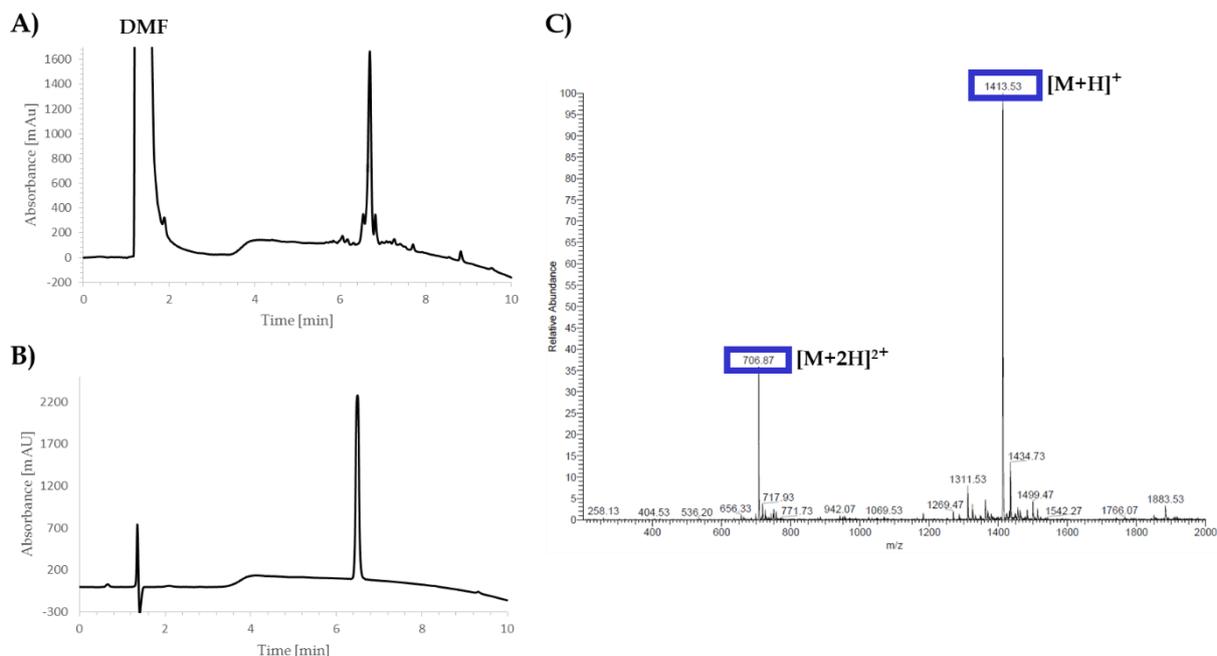


Figure III.102 : Caractérisation de l'oligomère **III.13** : **A & B**) chromatogramme HPLC de l'oligomère **III.13** avant et après purification par RP-HPLC semi-préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 30 à 45% de B en 15 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans CH₃CN)] ; **C**) spectre de masse de l'oligomère **III.13** après purification par RP-HPLC semi-préparative.

iii. Synthèse sur support solide du peptide III.1

La synthèse du peptide **III.1** a été réalisée selon les conditions précédemment décrites dans le chapitre 2 [paragraphe I.1.b.i.].

La synthèse du peptide **III.1** n'a pas posé de problème particulier. Le chromatogramme RP-HPLC de l'oligomère **III.1** (**Figure III.103**), avant purification par RP-HPLC semi-préparative, souligne la présence d'un produit largement majoritaire (plus de 70% de pureté) : le peptide **III.1** (temps de rétention : 6,51 minutes). Le large pic observé au début du chromatogramme RP-HPLC correspond à l'élution du DMF. En effet, quelques gouttes de DMF ont été ajoutées pour pouvoir solubiliser l'échantillon. Le spectre de masse met en évidence la présence d'un produit de synthèse majoritaire. Après purification par RP-HPLC semi-préparative, 26,9 mg de l'oligomère **III.1** ont été isolés et caractérisés.

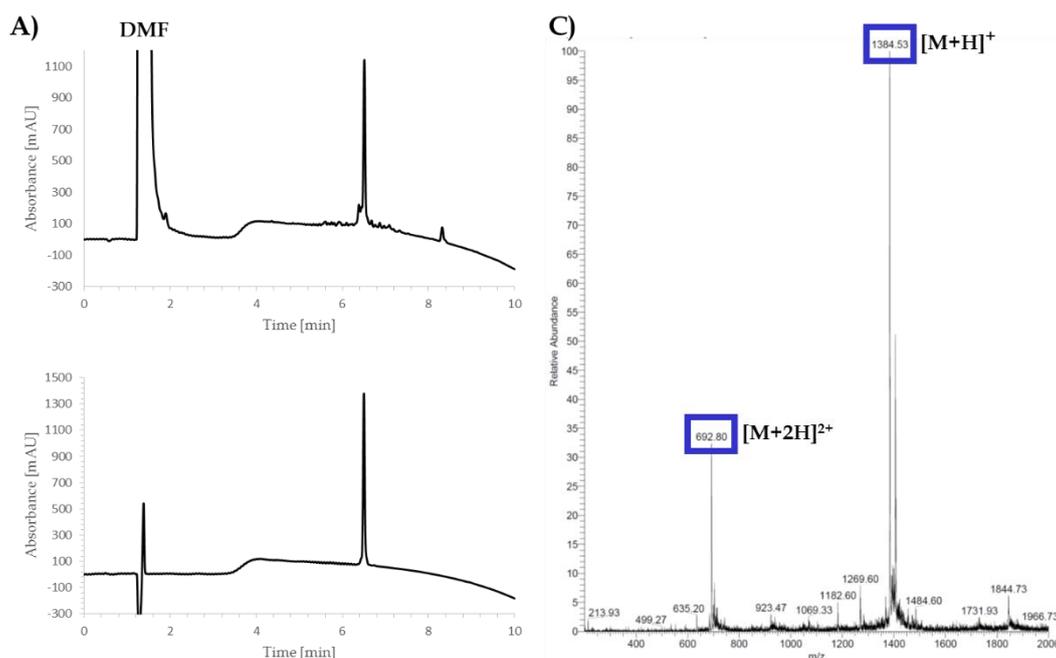


Figure III.103 : Caractérisation du peptide **III.1** : **A & B**) chromatogramme HPLC du peptide **III.1** avant purification par RP-HPLC semi-préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 30 à 39% de B en 20 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans CH₃CN)] ; **C**) spectre de masse du peptide **III.1** après purification par RP-HPLC semi-préparative.

2. Caractérisation de l'inhibition

a. Estimation de la concentration pour laquelle 50% d'inhibition de l'interaction p53/MDM2 est observée par fluorescence

La détermination de l'affinité de liaison par mesure de l'IC₅₀ de chaque urée-peptide a été réalisée par la compagnie Hybrigenics qui utilise la technologie HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence) (**Figure III.104**).[33] Cette technologie, développée par la compagnie Cisbio, est basée sur le transfert d'énergie de fluorescence (TR-FRET) résolue dans le temps[34][33] qui se produit entre des fluorophores à longue portée : les cryptates d'Europium (EuK) ou de Terbium (Tb) comme donneurs de fluorescence et l'allophycocyanine (XL665) qui joue le rôle d'accepteur de fluorescence. Un grand nombre de molécules et protéines présentes dans les fluides biologiques sont naturellement fluorescents. L'utilisation d'une fluorescence conventionnelle et rapide entraîne donc de graves limitations dans la sensibilité au dosage. L'utilisation de fluorophores à longue durée de vie combinée à une détection résolue dans le temps (un délai entre l'excitation et la détection des émissions) minimise les interférences de fluorescence rapides. Les interactions entre les protéines MDM2 (ou MDMX) et p53 purifiées peuvent être détectées par un test HTRF optimisé. Un anticorps anti-GST spécifique portant le donneur de fluorescence (EuK) reconnaît spécifiquement la protéine de fusion MDM2- (ou MDMX) GST et un autre anticorps anti-6His portant l'accepteur de fluorescence (XL665) reconnaît spécifiquement la protéine p53. L'interaction entre les deux protéines est détectée par transfert de fluorescence (excitation à 337 nm, émission à 665 nm). L'émission à 620 nm se produit indépendamment de l'interaction et permet de normaliser l'analyse. La perturbation volontaire de l'interaction protéine/protéine supprime le signal de FRET.

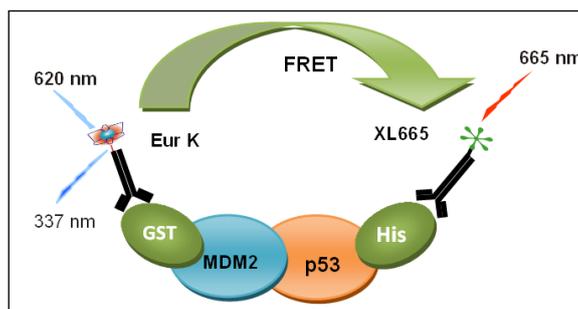


Figure III.104 : Principe d'analyse de l'interaction p53/MDM2 par HTRF.

La mesure du signal HTRF obtenu pour l'interaction protéine/protéine a été modélisée par l'équation décrite ci-dessous.

$$\Delta F (\%) = 100 * \frac{(ratio_{\text{échantillon}} - ratio_{\text{fond}})}{ratio_{\text{fond}}}$$

Le terme ratio (rapport en Français) correspond au rapport entre la fluorescence mesurée à 665 nm sur la fluorescence mesurée à 620 nm. Le terme échantillon désigne une mesure réalisée en présence de tous les réactifs alors que le terme fond reflète une mesure effectuée dans un milieu tamponné ne contenant que les anticorps HTRF. Les solutions mères des deux protéines et des anticorps ont été fraîchement préparées avant d'être diluées dans le tampon de réaction (PBS pH 7,4 + DTT 2,5 mM + Tween 0,075% + KF 400 mM). Les plaques de dilution des composés ont été préparées immédiatement avant le début de chaque expérience. Les solutions contenant les molécules à tester en mélange avec les protéines et les anticorps ont été réparties dans des plaques de réaction de 384 puits avec un système robotique Perkin Elmer Janus. Pour chaque composé testé, l'expérience a été reproduite trois fois (triplicata). Deux types de manipulations ont été réalisés. La première consiste à fournir le pourcentage d'inhibition de l'interaction entre p53 et MDM2 (ou MDMX) à une concentration donnée (100 nM) pour chaque molécule étudiée. C'est une évaluation rapide qui permet d'obtenir une première idée de l'activité d'un composé, c.à.d. inhibe ou non l'interaction de manière significative à 100 nM. La seconde expérience permet de déterminer les valeurs d'IC₅₀ des composés. Ces valeurs ont été calculées pour chaque composé en utilisant une régression non-linéaire dose-réponse sigmoïdal avec une pente variable. Cette manipulation plus coûteuse car nécessitant des mesures pour un minimum de 8 concentrations, n'a été réalisée que sur les composés les plus prometteurs.

i. Résultats et discussion

Les résultats de la première série d'expériences ont permis de déterminer quel était le pourcentage d'inhibition à 100 nM (**Table III.105**). Ces résultats soulignent la relative bonne tolérance du remplacement d'un résidu d'acide aminé par un résidu urée dans les parties flanquantes en N- et C-terminal. Comme on pouvait s'y attendre, les résidus Phe3, Tyr6 et Trp7 sont totalement intolérants à ce type de substitution. En revanche, la Leu10, résidu clé impliqué dans la tétrade hydrophobe, n'est que très modestement impactée par ce remplacement systématique.

| Composé | Séquence | %inhibition à [100nM] p53/MDM2 | %inhibition à [100nM] p53/MDMX |
|---------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| III.1 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 100 % | 100 % |
| III.2 | H-Thr ^U -Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 100 % | 100 % |
| III.3 | H-Thr-Ser ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 100 % | 70 % |
| III.4 | H-Thr-Ser-Phe ^U -Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.5 | H-Thr-Ser-Phe-Ala ^U -Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 44 % | 0 % |
| III.6 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu ^U -Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 60 % | 50 % |
| III.7 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr ^U -Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.8 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.9 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 100 % | 100 % |
| III.10 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu ^U -Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 100 % | 45 % |
| III.11 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu ^U -Ser-Pro-NH ₂ | 100 % | 100 % |
| III.12 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser ^U -Pro-NH ₂ | 100 % | 100 % |
| III.13 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro ^U -NH ₂ | 100 % | 100 % |

Table III.105 : Table récapitulative des résultats des expériences réalisées à 100 nM.

Les valeurs d'IC₅₀ des composés produisant une inhibition totale de l'interaction entre p53 et MDM2 à la concentration de 100 nM ont ensuite été déterminées (**Table III.106**). Les peptides modifiés aux extrémités N- et C-terminales sont ceux qui tolèrent le mieux l'insertion de résidus non-naturels. Ces résultats soulignent la perte d'un facteur 8 au niveau des valeurs d'IC_{50s} pour les composés **III.3** et **III.9**. Cette perte d'affinité pour la surface de la protéine MDM2 peut s'expliquer d'une part, par le décalage induit par l'insertion du résidu urée au niveau du squelette des composés chimères et d'autre part, par la projection de la chaîne latérale du résidu urée qui n'est peut-être plus optimale.

| Composé | Séquence | IC ₅₀ p53/MDM2 | Ratio III.x/III.1 |
|---------|---|------------------------------|----------------------|
| III.1 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 0,8 nM | 1 |
| III.2 | H-Thr ^U -Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 2,3 nM | 3 |
| III.3 | H-Thr-Ser ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 6,9 nM | 8 |
| III.9 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 6,0 nM | 8 |
| III.10 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu ^U -Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 1,3 nM | 2 |
| III.11 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu ^U -Ser-Pro-NH ₂ | 2 nM | 3 |
| III.12 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser ^U -Pro-NH ₂ | 0,9 nM | 1 |
| III.13 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro ^U -NH ₂ | 0,7 nM | 1 |

Table III.106 : Table récapitulative des résultats de détermination d'IC₅₀ de l'interaction p53/MDM2.

Les valeurs d'IC₅₀ pour ces mêmes composés ont également été déterminées pour l'interaction p53/MDMX (**Table III.107**). On observe les mêmes tendances que pour l'interaction p53/MDM2. Une différence notable se traduit par la perte d'un facteur 81 au niveau de la valeur d'IC₅₀ pour le composé **III.10**.

| Composé | Séquence | IC ₅₀ p53/MDMX | Ratio III.x/III.1 |
|---------------|---|------------------------------|----------------------|
| III.1 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 3,1 nM | 1 |
| III.2 | H-Thr ^U -Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 7,7 nM | 3 |
| III.3 | H-Thr-Ser ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 22,6 nM | 7 |
| III.9 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 25 nM | 8 |
| III.10 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu ^U -Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 252 nM | 81 |
| III.11 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu ^U -Ser-Pro-NH ₂ | 4,9 nM | 2 |
| III.12 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser ^U -Pro-NH ₂ | 17 nM | 5 |
| III.13 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro ^U -NH ₂ | 3,3 nM | 1 |

Table III.107 : Table récapitulative des résultats de détermination d'IC₅₀ de l'interaction p53/MDMX.

Le remplacement systématique d'un acide aminé par un résidu urée met en avant la plus grande modularité de l'extrémité C-terminale du peptide de référence PMI (**III.1**). En revanche, les résidus situés au cœur de la séquence peptidique de la Phe3 au Trp7 sont eux très sensibles aux modifications ponctuelles. Les résultats de la Phe3, Tyr6 et Trp7 contrastent avec celui de la Leu10. Ces modifications uréido ponctuelles, qui potentiellement génèrent un décalage au niveau de la chaîne principale des composés en raison de l'ajout de 2 atomes supplémentaires N' et C α du résidu urée, sont donc loin d'être les mimes les plus pertinents des acides aminés dans la séquence du peptide **III.1**. Nous nous sommes donc penchés sur l'utilisation du remplacement ponctuel de 3 acides aminés par 2 urées qui minimiserait l'impact induit, au niveau de la chaîne principale, par l'insertion de fragments oligourées. Par contre la difficulté de mimer précisément la distribution des chaînes latérales dans l'hélice α , est accentuée avec cette nouvelle modification (3 α /2^U) qui supprime une chaîne latérale par rapport au peptide de référence.

3. Dégradation enzymatique

Afin d'évaluer la stabilité de nos composés à la dégradation enzymatique, des expériences de suivi de dégradation *in vitro* par une famille de protéases ont été menées sur la base des conditions récemment mises au point au laboratoire.[35] Les expériences de dégradation enzymatique ont été conduites dans des plaques 96 puits en duplicata. Dans chaque puit, une solution d'enzyme en milieu tamponné (TRIS 10 mM pH 7,5) à 0,1 mg/ml (1,7 μ l) suivi d'une solution de l'oligomère testé en solution dans l'eau à 2 mM (8,3 μ l) ont été ajoutées à 40 μ L d'une solution tampon (TRIS 10 mM pH 7,5). À des points de temps fixes suivant l'addition des oligomères aux solutions de protéase, les réactions ont été stoppées en ajoutant une solution de 5% de TFA (v/v, 100 μ l) dans l'eau. Un puit contrôle pour chaque oligomère a été réalisé. Chaque puit a été analysé par HPLC analytique puis les différentes espèces obtenues ont été caractérisées par un système UPLC couplé à un spectromètre de masse (source d'ionisation : ESI, analyseur : TOF).

a. Chymotrypsine

La chymotrypsine est une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons amides peptidiques après un acide aminé aromatique (Tyr, Trp, Phe). La chymotrypsine est une enzyme pancréatique. Elle est synthétisée sous forme de chymotrypsinogène (proenzyme inactive) puis stockée dans les vésicules enzymatiques des cellules acineuses d'où elle est excrétée au moment de la digestion. L'activation du chymotrypsinogène en chymotrypsine est le résultat de plusieurs hydrolyses détachant des petits fragments de 2 acides aminés sous l'action de la trypsine et de la chymotrypsine elle-même.

i. Résultats et discussion

Lorsque notre peptide de référence **III.1** a été mis en présence de chymotrypsine, celui-ci a été dégradé pour moitié après 15 minutes pour donner lieu à la formation de produits de clivage. Le peptide **III.1** possède 3 résidus aromatiques dans sa séquence (Phe3, Tyr6 et Trp7) donc 3 sites potentiels de clivage. Néanmoins l'analyse des fragments résultants de cette expérience met en évidence un seul site de clivage au niveau de la liaison peptidique Trp7-Ala8. Afin d'évaluer l'impact du remplacement des acides aminés voisins du site de clivage de la chymotrypsine par des résidus urées, des expériences de dégradation enzymatique ont été conduites sur les oligomères **III.7**, **III.8** et **III.9**. La concentration en oligomère chimère **III.7**, dont le résidu Tyr6 a été remplacé par un résidu Tyr^U, a été réduite de moitié au bout de 75 minutes. Il est donc 5 fois plus stable que notre composé de référence. Là aussi, un unique site de clivage a été mis évidence également au niveau de la fonction acide du résidu Trp7. La concentration en oligomère chimère **III.9**, dont le résidu Ala8 a été remplacé par un résidu Ala^U, a été réduite de moitié au bout de 30 minutes. Il semble donc 2 fois plus stable que le composé de référence **III.1**. Un seul site de clivage a également été observé mais cette fois au niveau de la fonction acide du résidu Tyr6. Le premier site de clivage étant protégé par le résidu urée, la chymotrypsine s'est dirigée vers un site secondaire de clivage. De manière intéressante, l'oligomère **III.8** dans lequel le résidu Trp7 a été substitué par un résidu Trp^U est présent à 85% dans la solution après 4h en présence de chymotrypsine. L'insertion du résidu urée à cette position inhibe fortement l'action de la chymotrypsine, en protégeant les deux sites de clivage potentiels.

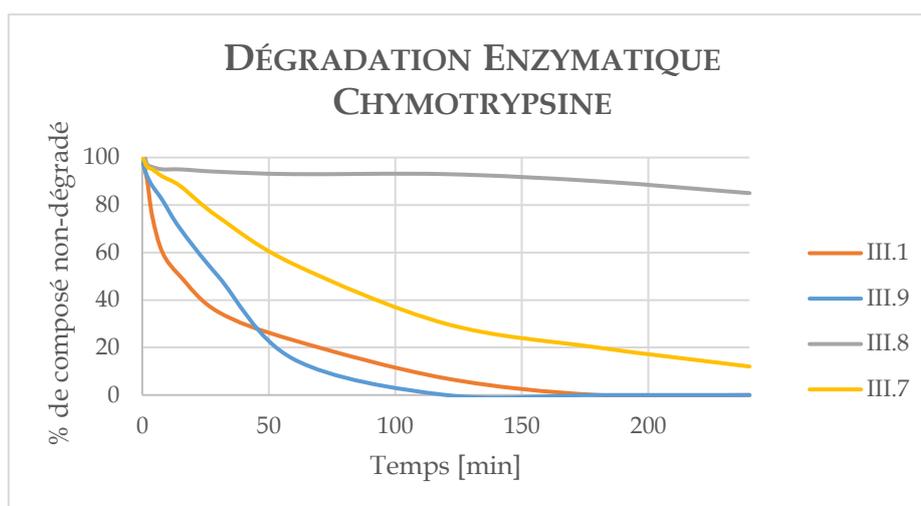


Figure III.108 : Courbes correspondant aux résultats des expériences de dégradation enzymatique des oligomères hybrides **III.7-III.9** à l'aide de chymotrypsine et comparaison à **III.1**.

Les résultats soulignent l'impact de l'insertion locale de résidus urées dans la séquence du peptide **III.1** sur l'action de la chymotrypsine. Le remplacement de l'acide aminé Trp7 par un résidu urée ralentit significativement le processus de dégradation enzymatique. Cependant l'oligomère **III.8** possède une IC₅₀ supérieure à 100 nM sur l'interaction entre p53 et MDM2. Afin d'optimiser le mimétisme de l'interaction entre la chaîne latérale d'un résidu urée et la poche hydrophobe à la surface de MDM2, nous avons expérimenté un autre motif de substitution systématique : le motif (3α/2^U).

V. Remplacement de 3 acides aminés consécutifs par un fragment di-urées dans la séquence du peptide PMI

Comme nous l'avons représenté dans le **Figure III.94**, plusieurs motifs de substitution nous sont offerts comme par exemple le motif (1 α /1^U) ainsi que le motif (3 α /2^U). Chacun présente ses avantages et inconvénients [paragraphe IV.]. Après avoir évalué l'impact du remplacement ponctuel d'un acide α -aminé par un résidu urée, nous avons choisi de substituer un fragment di-urées à trois acides aminés consécutifs sur l'intégralité de la séquence du peptide **III.1**. Seules les chaînes latérales impliquées dans l'interaction avec la poche hydrophobe à la surface de la protéine MDM2 ont été conservées dans les fragments di-urées. Les chaînes latérales des autres résidus ont été remplacées par un groupement méthyle.

1. Synthèse

Le remplacement de 3 acides aminés consécutifs par un motif « di-urées » a été sélectionné afin d'évaluer les conséquences structurales d'une telle substitution sur la projection des chaînes latérales clés et donc sur l'interaction avec la surface de MDM2.

| Composé | Séquence | Rdt ^a | ESI-MS [M+H] ⁺ | HPLC <i>t_R</i> (min) ^b |
|---------------|---|------------------|---------------------------|--|
| III.14 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu ^U -Ala ^U -NH ₂ | 44 % | 1328,90 | 6,39 |
| III.15 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Nle ^U -Ala ^U -NH ₂ | 18 % | 1328,55 | 5,08 |
| III.16 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu ^U -Ala ^U -Pro-NH ₂ | 52 % | 1312,87 | 5,41 |
| III.17 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Leu ^U -Ser-Pro-NH ₂ | 38 % | 1328,86 | 5,20 |
| III.18 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Val ^U -Ser-Pro-NH ₂ | 46 % | 1314,82 | 4,66 |
| III.19 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Ser-Pro-NH ₂ | 37 % | 1286,79 | 4,63 |
| III.20 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 33 % | 1328,84 | 5,25 |
| III.21 | H-Thr-Ser-Phe-Ala ^U -Ala ^U -Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 36 % | 1220,61 | 5,59 |
| III.22 | H-Thr-Ser-Phe ^U -Ala ^U -Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 44 % | 1312,91 | 5,94 |
| III.23 | H-Thr-Ala ^U -Ala ^U -Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 30 % | 1278,53 | 6,11 |
| III.24 | H-Ala ^U -Ala ^U -Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 42 % | 1248,53 | 7,68 |

Figure III.109 : Liste des composés issus du remplacement systématique de 3 acides aminés par un segment di-urées dans la séquence de **III.1**. ^a Rendement après purification HPLC ; ^b système RP-HPLC : gradient linéaire 10 à 100% de B en 10 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) and B (0,1% TFA dans CH₃CN), détection UV à 200 nm

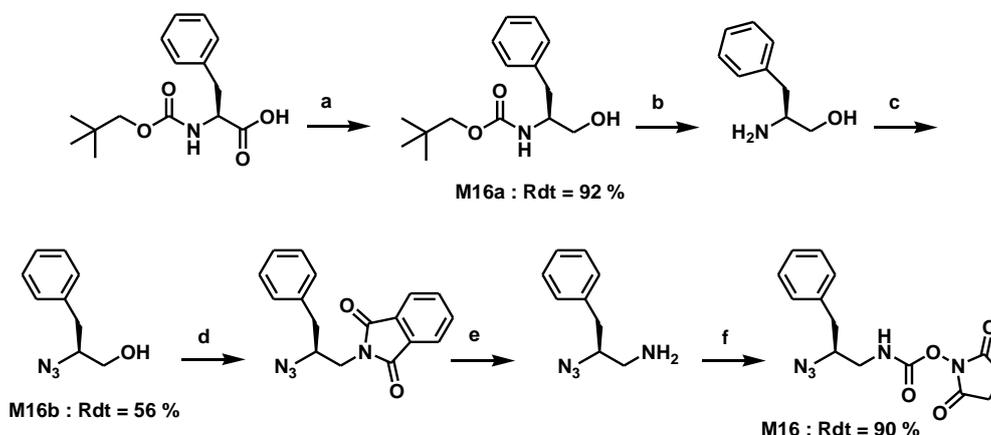
Bien que l'automatisation de la synthèse des oligomères soit une option séduisante, nous avons dû renoncer à cette option au vu des problèmes de délétion générés par l'utilisation des monomères N-Fmoc protégés. Nous avons choisi de basculer sur une stratégie de protection de nos monomères qui soit compatible avec l'utilisation de champs micro-ondes, la synthèse peptidique en stratégie Fmoc et l'emploi d'une résine labile en milieu acide (Rink amide polystyrène) ; la stratégie N₃, précédemment utilisée dans le chapitre 2 [paragraphe II.1.b]. [36]

a. Synthèse en solution des monomères

i. Synthèse des monomères azoture activés

La synthèse des monomères azoture activés **M1** (N₃-Ala^U-OSu), **M2** (N₃-Val^U-OSu) et **M3** (N₃-Leu^U-OSu) a été décrite dans le chapitre 2 [paragraphe I.1.a.i].

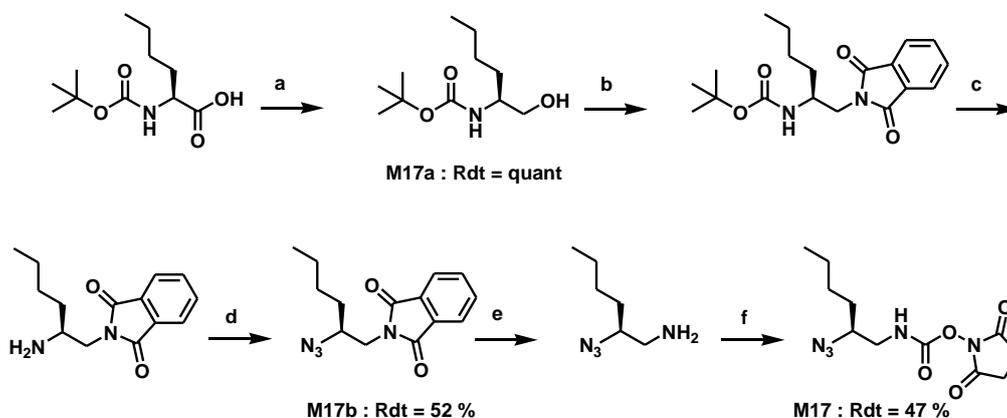
Le carbamate activé dérivé de la phénylalanine a été obtenu à partir de l'acide aminé protégé Boc-L-Phe-OH suivant la *voie A* de synthèse des monomères d'azoture activés décrite précédemment dans le chapitre 2 [paragraphe I.1.a.i]. [36] Dans ces conditions, le monomère activé **M16** dérivé de la phénylalanine a été obtenu avec un rendement de 54 % (**Figure III.110**).



a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20 °C ; 2) NaBH₄, H₂O ; b : TFA, 25°C ; c : N₃SO₂IM.HCl, K₂CO₃, CuSO₄.5H₂O, CH₃CN, H₂O, 25°C ; d : PPh₃, DIAD, phthalimide, CH₂Cl₂, 25°C ; e : N₂H₄, MeOH, 70°C ; f : N,N'-Disuccinimide carbonate, CH₂Cl₂, 25°C.

Figure III.110 : Schéma de synthèse par la *voie A* du monomère azoture activé sous forme de carbamate de succinimide **M16**.

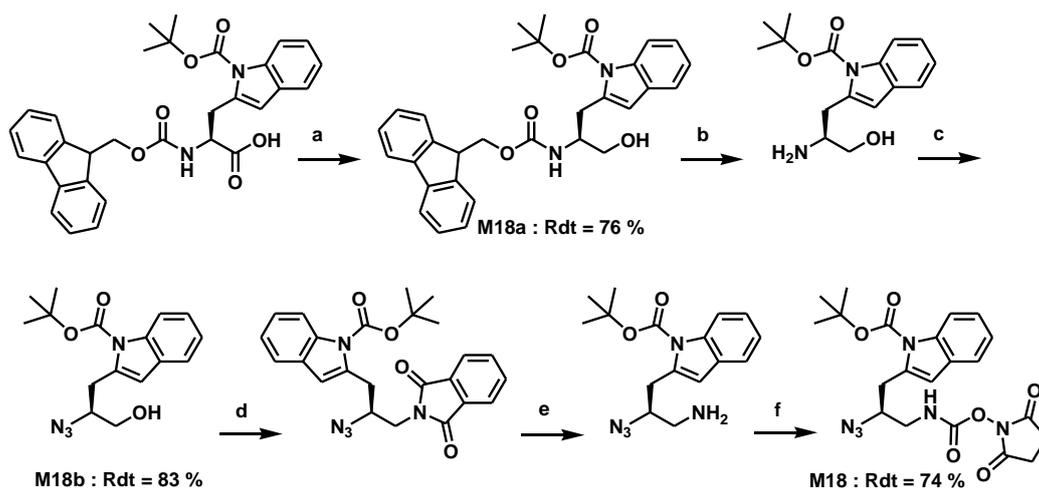
Le carbamate activé dérivé de la norleucine a été obtenu à partir de l'acide aminé protégé Boc-L-Nle-OH suivant la *voie B* de synthèse des monomères d'azoture activés décrite précédemment dans le chapitre 2 [paragraphe I.1.a.i]. [36] Dans ces conditions, le monomère activé **M17** dérivé de la norleucine a été obtenu avec un rendement de 23 % (**Figure III.111**).



a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20 °C ; 2) NaBH₄, H₂O ; b : PPh₃, DIAD, phthalimide, CH₂Cl₂, 25°C ; c : TFA, 25°C ; d : N₃SO₂IM.HCl, K₂CO₃, CuSO₄.5H₂O, CH₃CN, H₂O, 25°C ; e : N₂H₄, MeOH, 70°C ; f : N,N'-Disuccinimide carbonate, CH₂Cl₂, 25°C.

Figure III.111 : Schéma de synthèse par la *voie B* du monomère azoture activé sous forme de carbamate de succinimide **M17**.

Le carbamate activé dérivé du tryptophane a été obtenu à partir de l'acide aminé protégé Fmoc-L-Trp(Boc)-OH suivant la *voie A* de synthèse des monomères d'azoture activés décrite précédemment dans le chapitre 2 [paragraphe I.1.a.i]. [36] Dans ces conditions, le monomère activé **M18** dérivé du tryptophane a été obtenu avec un rendement de 47 % (**Figure III.112**).



a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20°C ; 2) NaBH_4 , H_2O ; b : DBU, DMF, 25°C ; c : $\text{N}_3\text{SO}_2\text{IM.HCl}$, K_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, CH_3CN , H_2O , 25°C ; d : PPh_3 , DIAD, phthalimide, CH_2Cl_2 , 25°C ; e : N_2H_4 , MeOH, 70°C ; f : *N,N'*-Disuccinimide carbonate, CH_2Cl_2 , 25°C .

Figure III.112 : Schéma de synthèse par la *voie A* du monomère azoture activé sous forme de carbamate de succinimide **M18**.

b. Synthèse sur support solide des oligomères chimères

i. Synthèse sur support solide des oligomères III.14 à III.24

La synthèse des oligomères chimères **III.14** à **III.24** a été réalisée selon les conditions précédemment décrites dans le chapitre 2 [paragraphe II.1.b.i].

L'insertion de deux résidus urées en utilisant la stratégie N_3 , le long de la séquence peptidique **III.1**, ne pose pas de difficulté particulière et ce indépendamment de la localisation du fragment di-urées. Aucun phénomène de réduction partielle n'a été observé. Ces résultats qui diffèrent de ceux obtenus dans la section II du chapitre 2 et pourraient s'expliquer par la tendance de la portion peptidique des oligomères à s'agréger. Le chromatogramme RP-HPLC de l'oligomère **III.24** (**Figure III.113**), avant purification par RP-HPLC préparative, souligne la présence d'un produit largement majoritaire (plus de 70% de pureté) : l'oligomère **III.24** (temps de rétention : 7,68 minutes). Après purification par RP-HPLC préparative, 26,0 mg de l'oligomère **III.24** ont été isolés et caractérisés.

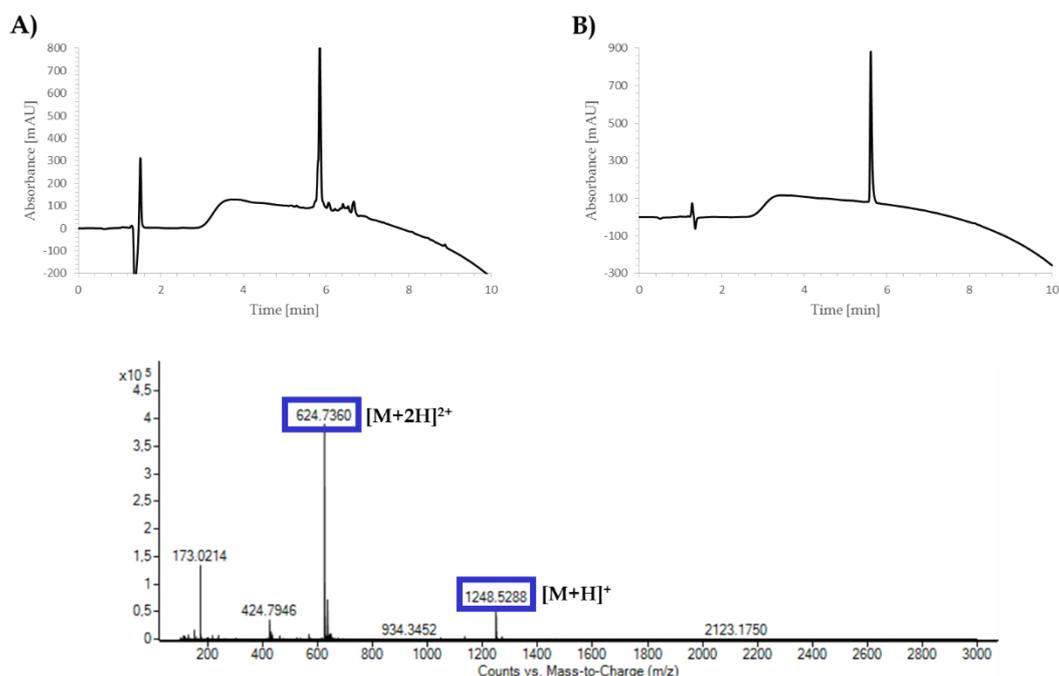


Figure III.113 : Caractérisation de l'oligomère **III.24** : **A & B**) chromatogramme HPLC de l'oligomère **III.24** avant purification par RP-HPLC préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 32 à 36% de B en 15 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans CH₃CN)] ; **C**) spectre de masse de l'oligomère **III.24** après purification par RP-HPLC préparative.

2. Caractérisation de l'inhibition

a. Estimation de la concentration pour laquelle 50% d'inhibition de l'interaction p53/MDM2 est observée par fluorescence

Les expériences de fluorescence ont été réalisées selon les conditions précédemment décrites dans ce chapitre [paragraphe IV.2.a.].

i. Résultats et discussions

Les résultats de l'expérience d'inhibition par HTRF, pour une concentration en composé de 100 nM, mettent en évidence une intolérance globalement générale au remplacement de 3 α AA \rightarrow 2 urées (**Table III.114**). Seules les modifications localisées sur les 4 derniers résidus à l'extrémité C-terminale de la séquence peptidique sont tolérées. Il est également intéressant de noter que le composé **III.19** modifié au cœur de la séquence par l'insertion d'un fragment di-urée Trp^U-Ala^U possède un pourcentage d'inhibition de 10% à 100 nM. De façon globale, le peptide **III.1** tolère mieux l'introduction de résidus non-naturels à l'extrémité C-terminale.

| Composé | Séquence | % inhibition à [100nM] p53/MDM2 | % inhibition à [100nM] p53/MDMX |
|---------------|---|---------------------------------|---------------------------------|
| III.14 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu ^U -Ala ^U -NH ₂ | 90 % | 51 % |
| III.15 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Nle ^U -Ala ^U -NH ₂ | 98 % | 60 % |
| III.16 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu ^U -Ala ^U -Pro-NH ₂ | 37 % | 0 % |
| III.17 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Leu ^U -Ser-Pro-NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.18 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Val ^U -Ser-Pro-NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.19 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Ser-Pro-NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.20 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 10 % | 0 % |
| III.21 | H-Thr-Ser-Phe-Ala ^U -Ala ^U -Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.22 | H-Thr-Ser-Phe ^U -Ala ^U -Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.23 | H-Thr-Ala ^U -Ala ^U -Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.24 | H-Ala ^U -Ala ^U -Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 0 % | 0 % |

Table III.114 : Table récapitulative des résultats des expériences d'HTRF

La technologie HTRF a ensuite été utilisée pour déterminer l'IC₅₀ des composés **III.14** et **III.15** seuls composés présentant une activité inhibitrice significative pour les interactions p53/MDM2 (**Table III.115**) et p53/MDMX (**Table III.116**) à une concentration de 100 nM.

| Composé | Séquence | IC ₅₀ de l'interaction p53/MDM2 | Ratio III.x/III.1 |
|---------------|---|--|-------------------|
| III.1 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 0,8 nM | 1 |
| III.14 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu ^U -Ala ^U -NH ₂ | 2,6 nM | 3 |
| III.15 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Nle ^U -Ala ^U -NH ₂ | 5,0 nM | 6 |

Table III.115 : Table récapitulative du résultat de la détermination des valeurs d'IC₅₀ de l'interaction p53/MDM2

Ces modifications, bien tolérées par la structure secondaire, n'entraînent pas de perte significative d'affinité pour les deux oligomères pour la surface de la protéine MDM2. Il est intéressant de souligner que le composé **III.15** est deux fois moins afin pour la surface de MDM2 que le composé **III.14**.

| Composé | Séquence | IC ₅₀ de l'interaction p53/MDM2 | Ratio III.x/III.1 |
|---------------|---|--|-------------------|
| III.1 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 4,9 nM | 1 |
| III.14 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu ^U -Ala ^U -NH ₂ | 57,0 nM | 12 |
| III.15 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Nle ^U -Ala ^U -NH ₂ | 34,0 nM | 7 |

Table III.116 : Table récapitulative du résultat de la détermination des valeurs d'IC₅₀ de l'interaction p53/MDMX.

La relation entre les deux composés s'inverse lorsqu'on s'intéresse à l'inhibition de l'interaction p53/MDMX. Ces données reflètent les différences subtiles entre les surfaces d'interactions des 2 protéines cibles (MDM2 et MDMX).

Les résultats du remplacement systématique de trois acides aminés par un fragment di-urées ne semblent pas permettre la conception d'oligomères chimères affins pour la surface de la protéine MDM2. Ces résultats peuvent s'expliquer soit par l'introduction d'un décalage trop important dans les parties peptidiques adjacentes au segment uréido soit par la difficulté

de mimer la distribution des chaînes latérales natives dans le segment uréido. Ce phénomène de décalage est peut-être amplifié par le fait que les segments modifiés correspondent à moins d'un tour d'hélice. Néanmoins, les remplacements à l'extrémité C-terminale semblent être bien tolérés par l'hélice avec des valeurs d'IC₅₀ intéressantes. Sur la base des résultats présentés dans le chapitre précédent, sur le développement de la « *foldamer capping box* », nous avons envisagé ensuite d'appliquer cette technologie de stabilisation/initiation de la structure en hélice à notre modèle le peptide PMI-A⁸.

VI. Modifications à l'extrémité C-terminale du peptide PMI : insertion d'un cap oligourée

Dans le chapitre 2, nous avons montré que l'ajout de courts fragments oligourée permettait de stabiliser de façon significative, en milieu aqueux, la structuration en hélice de séquences peptidiques. Dans le cadre de ce projet, l'ajout pur et simple de fragments oligourée ne peut être envisagé. La zone d'interaction ciblée est limitée en termes d'espace permettant l'insertion d'une hélice α constituée de 9 résidus, la Thr1, la Ser11 et la Pro12 n'adoptant pas de structuration secondaire. Augmenter la taille de l'inhibiteur peptidique en y accolant un « *cap* » tri- ou tétra-urées conduirait à une perte drastique d'affinité pour la surface de la protéine MDM2. Le « *cap* » utilisé doit plutôt être inséré en remplacement des acides aminés à l'extrémité N- ou C-terminale du peptide **III.1**. Les « *caps* » conçus possèdent une double action de stabilisation de la structure en hélice α de la portion peptidique des oligomères chimères et de mimétisme des chaînes latérales clés de l'interaction avec la surface de la protéine MDM2. Plusieurs types de « *caps* » C-terminaux ont été expérimentés. Les oligomères **III.25** et **III.26** miment l'intégralité de la séquence peptidique **III.1**. Les acides aminés Leu9, Leu10, Ser11 et Pro12 ont été remplacés par des « *caps* » constitués de 3 résidus urées (4 α / 3 \cup) dont la chaîne latérale du premier résidu mime l'interaction de la Leu10 avec la surface de MDM2. La conception des oligomères chimères **III.27** à **III.44** a pris en compte le paramètre stabilisant de l'insertion du cap oligourée sur la portion peptidique des oligomères chimères. Le peptide **III.1** adoptant, au contact de sa cible, une structuration en hélice α à partir de la Ser2 jusqu'à la Leu10, nous avons choisi de ne pas mimer spécifiquement les résidus Ser11 et Pro12 à l'extrémité C-terminale du peptide. Différents types de remplacement ont été évalués :

- L'oligomère chimère **III.27** a subi un remplacement des résidus Leu9 et Leu10 par un fragment di-urées dans lequel la chaîne latérale du deuxième résidu a été positionnée sur le carbone C α et la configuration du carbone asymétrique a été inversée afin de mimer la projection de la chaîne latérale du résidu Leu10. Il s'apparente également à une version raccourcie (des-Pro12) de la chimère **III.16**.
- Le remplacement des cinq derniers acides aminés Ala8, Leu9 et Leu10, Ser 11 et Pro12 par un « *cap* » tri-urées a été réalisée sur les oligomères chimères **III.28** à **III.32**. Plusieurs chaînes alkyles au niveau de la chaîne latérale du troisième résidu urée ont été étudiées pour un meilleur mimétisme de la Leu10. De plus, un remplacement ponctuel de la Thr1 par son équivalent urée a été réalisé sur le composé **III.33** pour évaluer l'impact d'une double modification N- et C-terminale.
- Dans les oligomères chimères **III.33** à **III.44**, les six acides aminés C-terminaux (Trp7-Pro12) ont été remplacés par des « *caps* » tri- ou tétra-urées (triades et tetrades). Plusieurs chaînes aromatiques au niveau de la chaîne latérale du premier résidu urée ont été étudiées en vue d'une substitution à l'indole du Trp7. La chaîne latérale du troisième résidu a été positionnée sur le carbone C α et la configuration du carbone asymétrique a été inversée afin de mimer la projection de la chaîne latérale du résidu Leu10. Plusieurs chaînes aliphatiques au niveau de la chaîne latérale du troisième résidu urée ont été évaluées. Les composés **III.38** et **III.44** sont des contrôles négatifs.

Ils permettent de caractériser la pertinence de l'insertion d'un résidu urée inversé en position 3 du « cap » oligourée.

1. Synthèse

Les séquences de cette série de composés chimères visant à remplacer l'extrémité C-terminale du peptide par des différents « caps » oligourée sont listées **Figure III.25**.

| Composé | Séquence | Rdt ^a | ESI-MS [M+H] ⁺ | HPLC <i>t_R</i> (min) ^b |
|---------|--|------------------|---------------------------|--|
| III.25 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu ^U -Ala ^U -Pro ^U -NH ₂ | 27 % | 1341,55 | 5,19 |
| III.26 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu ^U -Ser ^U -Pro ^U -NH ₂ | 19 % | 1357,55 | 4,91 |
| III.27 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 27 % | 1215,48 | 5,20 |
| III.28 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Nle ^U -NH ₂ | 6 % | 1244,50 | 5,33 |
| III.29 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Leu ^U -NH ₂ | 35 % | 1244,51 | 5,26 |
| III.30 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Val ^U -NH ₂ | 36 % | 1230,49 | 5,12 |
| III.31 | H-Thr ^U -Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Val ^U -NH ₂ | 34 % | 1259,43 | 4,50 |
| III.32 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 41 % | 1202,38 | 4,06 |
| III.33 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Val ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 29 % | 1259,43 | 4,43 |
| III.34 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Val ^{INVU} -NH ₂ | 26 % | 1159,38 | 4,27 |
| III.35 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-(3-Cl)Phe ^U -Ala ^U -Val ^{INVU} -NH ₂ | 24 % | 1154,33 | 4,68 |
| III.36 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Phe ^U -Ala ^U -Val ^{INVU} -NH ₂ | 34 % | 1120,37 | 4,36 |
| III.37 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 13 % | 1273,62 | 4,67 |
| III.38 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^U -Ala ^U -NH ₂ | 60 % | 1273,70 | 4,64 |
| III.39 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 27 % | 1173,55 | 4,48 |
| III.40 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-(3-Cl)Phe ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 20 % | 1168,50 | 4,89 |
| III.41 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Phe ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 25 % | 1134,54 | 4,57 |
| III.42 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Ala ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 33 % | 1231,56 | 4,15 |
| III.43 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Ala ^{INVU} -NH ₂ | 41 % | 1131,51 | 4,00 |
| III.44 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 37 % | 1131,51 | 4,12 |

Figure III.25 : Séquences hybrides dérivés du peptide **III.1** modifiés par des « caps » oligourée à l'extrémité C-terminale. ^a Rendement après purification HPLC ; ^b système RP-HPLC: gradient linéaire 10 à 100% de B en 10 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) and B (0,1% TFA dans CH₃CN), détection UV à 200 nm.

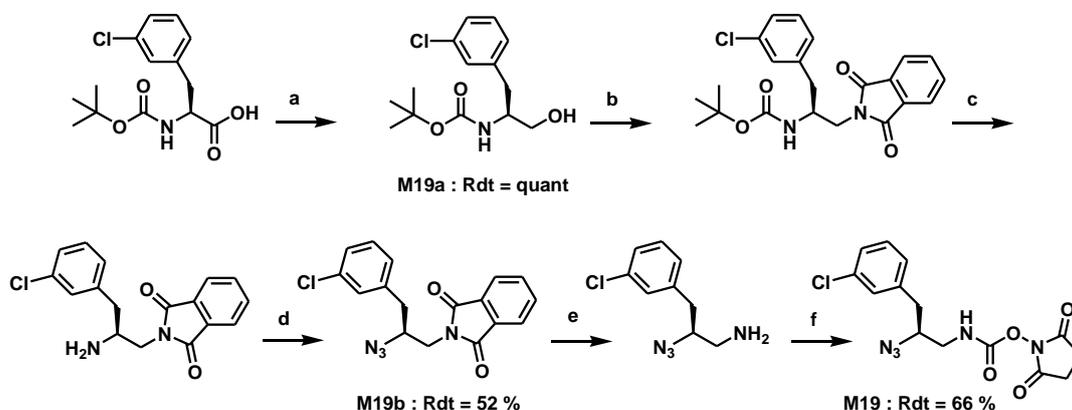
Au vu des bons résultats obtenus pour la synthèse des composés issus du remplacement (3α/2^U) nous avons choisi de continuer à utiliser la stratégie azoture.[36]

a. Synthèse en solution des monomères

La synthèse des monomères azoture activés **M1** (N₃-Ala^U-OSu), **M2** (N₃-Val^U-OSu) et **M3** (N₃-Leu^U-OSu) a été décrite précédemment dans le chapitre 2 [paragraphe I.1.a.i]. La synthèse des monomères azoture activés **M18** (N₃-Trp^U-OSu), **M17** (N₃-Nle^U-OSu), **M16** (N₃-Phe^U-OSu) ainsi que la synthèse du monomère N-Teoc protégé activé **M15** (Teoc-Pro^U-OSu) ont été décrites précédemment dans les sections précédentes de ce chapitre 3.

i. Synthèse des monomères azoture activés

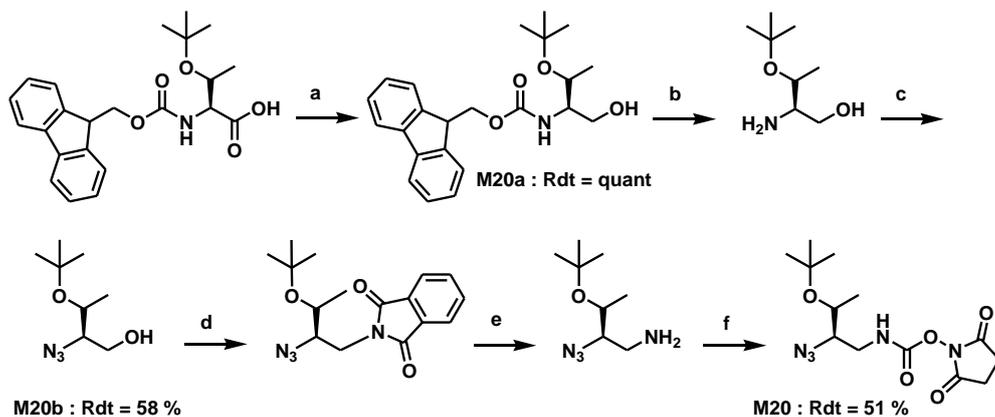
Le carbamate activé dérivé de la (3-chloro)phénylalanine a été obtenu à partir de l'acide aminé protégé Boc-L-(3-Cl)Phe-OH suivant la *voie B* de synthèse des monomères d'azoture activés décrite précédemment dans le chapitre 2 [paragraphe I.1.a.i]. [36] Dans ces conditions, le monomère activé **M19** dérivé de la (3-chloro)phénylalanine a été obtenu avec un rendement de 34 % (**Figure III.117**).



a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20 °C ; 2) NaBH₄, H₂O; b : PPh₃, DIAD, phthalimide, CH₂Cl₂, 25 °C; c : TFA, 25 °C; d : N₃SO₂IM.HCl, K₂CO₃, CuSO₄.5H₂O, CH₃CN, H₂O, 25 °C; e : N₂H₄, MeOH, 70 °C; f : N,N'-Disuccinimide carbonate, CH₂Cl₂, 25 °C.

Figure III.117 : Schéma de synthèse par la *voie B* du monomère azoture activé sous forme de carbamate de succinimide **M19**.

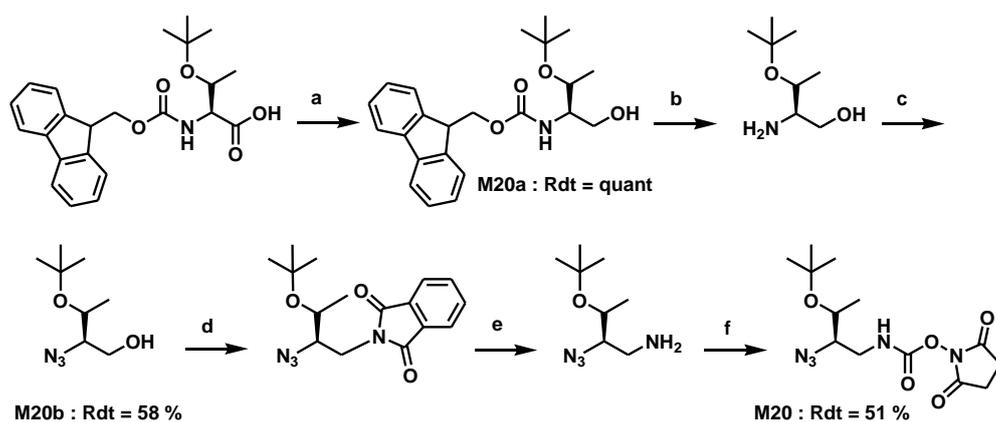
Le carbamate activé dérivé de la thréonine a été obtenu à partir de l'acide aminé protégé Fmoc-L-Thr(OtBu)-OH suivant la *voie A* de synthèse des monomères d'azoture activés décrite précédemment dans le chapitre 2 [paragraphe I.1.a.i]. [36] Dans ces conditions, le monomère activé **M20** dérivé de la thréonine a été obtenu avec un rendement de 29 % (**Figure III.118**).



a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20 °C ; 2) NaBH₄, H₂O; b : DBU, DMF, 25 °C; c : N₃SO₂IM.HCl, K₂CO₃, CuSO₄.5H₂O, CH₃CN, H₂O, 25 °C; d : PPh₃, DIAD, phthalimide, CH₂Cl₂, 25 °C; e : N₂H₄, MeOH, 70 °C; f : N,N'-Disuccinimide carbonate, CH₂Cl₂, 25 °C.

Figure III.118 : Schéma de synthèse par la *voie A* du monomère azoture activé sous forme de carbamate de succinimide **M20**.

Le carbamate activé dérivé de la sérine a été obtenu à partir de l'acide aminé protégé Z-L-Ser(OtBu)-OH suivant la *voie A* de synthèse des monomères d'azoture activés décrite précédemment dans le chapitre 2 [paragraphe I.1.a.i]. [36] Dans ces conditions, le monomère activé **M21** dérivé de la thréonine a été obtenu avec un rendement de 41 % (**Figure III.119**).

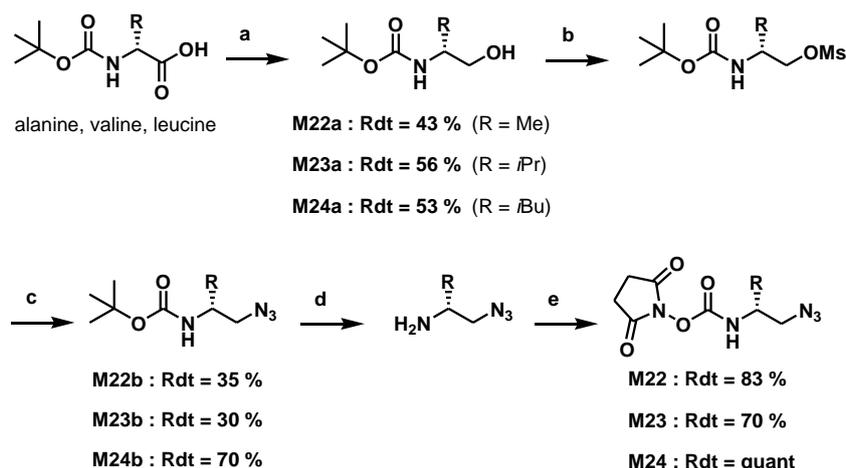


a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20°C ; 2) NaBH_4 , H_2O ; b : H_2 , Pd/C, MeOH, 25°C ; c : $\text{N}_3\text{SO}_2\text{IM.HCl}$, K_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, CH_3CN , H_2O , 25°C ; d : PPh_3 , DIAD, phthalimide, CH_2Cl_2 , 25°C ; e : N_2H_4 , MeOH, 70°C ; f : N,N' -Disuccinimide carbonate, CH_2Cl_2 , 25°C .

Figure III.119 : Schéma de synthèse par la *voie A* du monomère azoture activé sous forme de carbamate de succinimide **M21**.

ii. Synthèse des monomères azoture inversés activés.

Dans ces blocs ($\text{N}_3\text{-Ala}^{\text{Uinv-OSu}}$ (**M22**), $\text{N}_3\text{-Val}^{\text{Uinv-OSu}}$ (**M23**) et $\text{N}_3\text{-Leu}^{\text{Uinv-OSu}}$ (**M24**)), la chaîne latérale alkyle est déplacée sur le carbone adjacent et la configuration est inversée par rapport aux blocs canoniques. Cette inversion de configuration rend ces monomères compatibles avec les autres blocs et avec la géométrie de l'hélice droite des oligourées.[37] Les monomères activés **M22**, **M23**, **M24** ont été obtenus respectivement à partir des acides aminés protégés Boc-D-Ala-OH suivant la voie de synthèse des monomères d'azoture activés inversés décrite dans la **Figure III.120**. [38] Après réduction de l'acide en alcool, une réaction de méthylation de l'alcool conduit à la formation du dérivé mésylate correspondant. Le dérivé azoture est obtenu par une réaction de substitution nucléophile du mésylate. L'amine, générée par réaction avec le TFA, est ensuite activée avec le carbonate de succinimide pour générer les monomères inversés souhaités avec des rendements globaux de 13 % pour **M22** dérivé de l'alanine, 12% pour **M23** dérivé de la valine et 37% pour **M24** dérivé de la leucine.



a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20°C ; 2) NaBH_4 , H_2O ; b : MsCl, Et N_3 , CH_2Cl_2 , 0°C ; c : NaN_3 , DMF, 25°C ; d : TFA, 25°C ; e : N,N' -Disuccinimide carbonate, CH_2Cl_2 , 25°C .

Figure III.120 : Schéma de synthèse des monomères azoture inversés activés sous forme de carbamate de succinimide **M22**, **M23**, et **M24**.

b. Synthèse sur support solide des oligomères chimères

i. Synthèse sur support solide des oligomères chimères

La synthèse des oligomères chimères **III.25** à **III.44** a été réalisée selon les conditions précédemment décrites dans le chapitre 2 [paragraphe II.1.b.i]. Les monomères azoture inversés ont été insérés sur le support suivant la même procédure que les monomères azoture standards. Le monomère dérivé de la proline N-Teoc protégé a été inséré selon la procédure décrite précédemment dans ce chapitre [paragraphe IV.1.b.ii].

L'insertion de résidus urées à l'extrémité C-terminale du peptide **III.1** modifié, en utilisant la stratégie N₃, ne pose globalement pas de difficulté particulière, corrélant les résultats précédemment obtenus dans ce chapitre. Néanmoins il est intéressant de noter que des phénomènes de délétions ont été observés dans des proportions limitées (moins de 25%) lors de l'insertion des résidus urées inversés. Le chromatogramme RP-HPLC de l'oligomère **III.33** (Figure **III.121**), avant purification par RP-HPLC préparative, souligne la présence d'un produit largement majoritaire (plus de 70% de pureté) : l'oligomère **III.33** (temps de rétention : 4.38 minutes) ainsi que le produit de délétion du résidu Val^{invU9} (temps de rétention : 4.22 minutes). Après purification par RP-HPLC préparative, 26.0 mg de l'oligomère **III.24** ont été isolés et caractérisés.

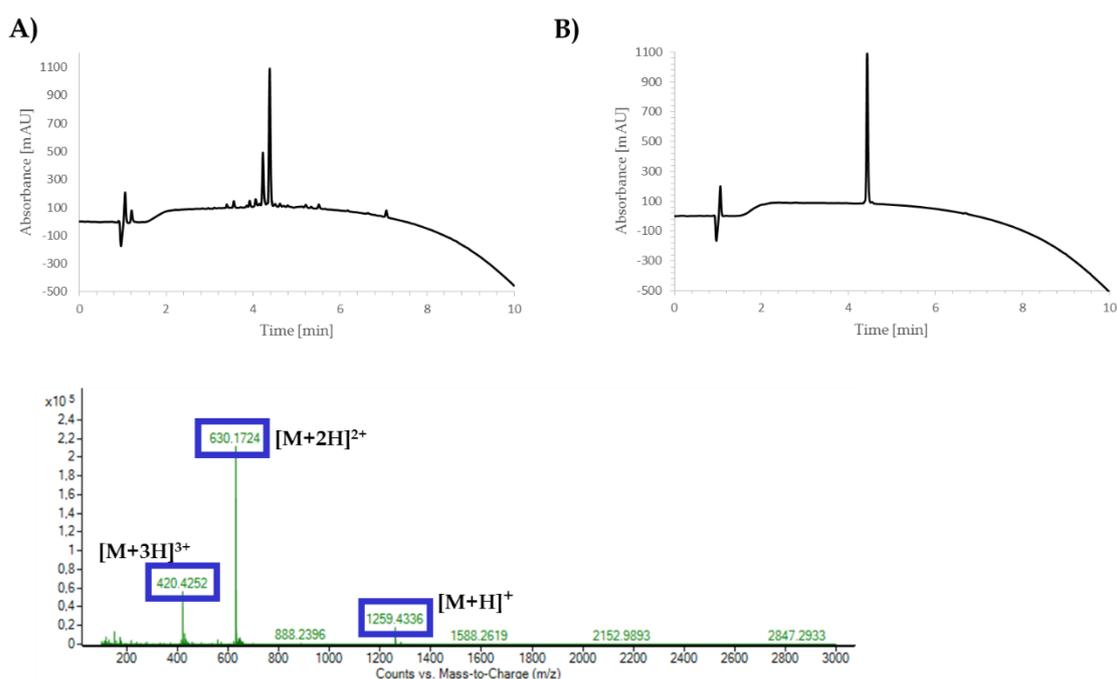


Figure III.121 : Caractérisation de l'oligomère **III.33** : A & B) chromatogramme HPLC de l'oligomère **III.33** avant purification par RP-HPLC préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 30 à 45% de B en 20 min avec A (0.1% TFA dans H₂O) et B (0.1% TFA dans CH₃CN)] ; C) spectre de masse de l'oligomère **III.33** après purification par RP-HPLC semi-préparative.

2. Caractérisation de l'inhibition

a. Estimation de la concentration pour laquelle 50% d'inhibition de l'interaction p53/MDM2 est observée par fluorescence

Les expériences de fluorescence ont été réalisées selon les conditions précédemment décrites dans ce chapitre [paragraphe IV.2.a.].

i. Résultats et discussions

De manière intéressante, le remplacement de l'extrémité C-terminale de la séquence du peptide **III.1** (tétrade Leu9-Pro12) est beaucoup mieux toléré que les tentatives de remplacements plus ponctuelles (1 α /1^U ou 2 α /3^U). Dans le cas du remplacement des résidus Leu9, Leu10, Ser11 et Pro12 par le cap tri-urées Leu^UAla^UPro^U, l'oligomère chimère correspondant **III.25** montre un pourcentage d'inhibition de l'interaction p53/MDM2 de 98% à la concentration de 100 nM. En revanche, lorsque ces mêmes résidus sont substitués par la triade Leu^USer^UPro^U, l'oligomère chimère **III.26** résultant affiche un pourcentage d'inhibition plus faible aux alentours de 54%. Il semble donc que le groupement méthyle porté par la chaîne latérale du deuxième résidu urée soit plus adapté pour l'interaction avec la surface de la protéine MDM2. Ces premiers résultats prometteurs ont donc renforcé notre volonté d'explorer l'insertion d'autres types de « cap » uréido remplaçant toute l'extrémité C-terminale du peptide **III.1**. L'introduction d'un « cap » di-urées porteur d'une chaîne latérale inversée sur le deuxième résidu est également bien tolérée et l'oligomère chimère **III.29** montre un excellent pourcentage d'inhibition de l'interaction p53/MDM2 (98%) à la concentration de 100 nM. Nous avons ensuite choisi d'étendre la zone de remplacement aux cinq derniers résidus Ala8-Pro12 (composés **III.28** à **III.32**). Différents « cap » tri-urées Ala^U-Ala^U-Xaa^U ont été utilisés en faisant varier le nombre d'atomes de carbone présents sur la chaîne latérale aliphatique du troisième résidu urée. L'oligomère chimère **III.30** avec une chaîne Val^U présente un pourcentage d'inhibition de l'interaction p53/MDM2 de 97% à la concentration de 100 nM, la valeur la plus importante mesurée pour les différents composés de cette série. Les résultats obtenus mettent donc en évidence que la nature de la chaîne latérale Xaa^U permet de moduler finement la reconnaissance avec MDM2, la chaîne isopropyle étant la plus adaptée. Notons que l'interaction est conservée lorsqu'on conjugue cette modification à la substitution du résidu Thr1 par son équivalent urée (composé **III.31**). Nous avons à nouveau cherché à étendre le nombre de résidus- α substitués par des unités uréido en incluant Trp7. Nous avons alors expérimenté 2 types de « caps » : des triades (Xaa1^U-Ala^U-Xaa3^{Uinv}) et des tétrades (Xaa1^U-Ala^U-Xaa3^{Uinv}-Ala^U) avec la difficulté majeure de reproduire l'ancrage du résidu Trp7 avec le résidu Xaa1^U. Nous avons introduit différentes chaînes latérales aromatiques sur le premier résidu urée afin d'optimiser l'interaction avec la poche hydrophobe de MDM2. Dans ce même but et pour moduler la reconnaissance du peptide à la surface de la protéine, nous avons en parallèle fait varier le nombre d'atomes de carbone sur la chaîne latérale aliphatique du troisième résidu du cap. L'oligomère chimère **III.37** est le meilleur composé dans cette série avec un pourcentage d'inhibition de l'interaction p53/MDM2 de 80% à la concentration de 100 nM. Ces résultats mettent en évidence la pertinence de l'insertion de « caps » comportant un premier résidu pourvu d'une chaîne latérale indole ainsi qu'un troisième résidu inversé portant une chaîne latérale isobutyle. Il est également intéressant de souligner que la version à quatre urées **III.37** (Trp^U-Ala^U-Leu^{Uinv}-Ala^U) est plus active que son pendant tri-urées **III.39** (Trp^U-Ala^U-Leu^{Uinv}) suggérant qu'une tétrade est plus adaptée pour le remplacement d'un chaînon peptidique de six résidus. En revanche, ces modifications impactent de façon drastique la capacité des oligomères générés à se lier à la surface de la protéine MDM2. Le remplacement le mieux toléré par le système étant la substitution des résidus Ala8-Pro12 par le « cap » : Ala^U-Ala^U-Ala^U.

| Composé | Séquence | % inhibition à [100nM] p53/MDM2 | % inhibition à [100nM] p53/MDMX |
|---------|--|---------------------------------|---------------------------------|
| III.1 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 100 % | 100 % |
| III.25 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu ^U -Ala ^U -Pro ^U -NH ₂ | 98 % | 16 % |
| III.26 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu ^U -Ser ^U -Pro ^U -NH ₂ | 54 % | 0 % |
| III.27 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 98 % | 7 % |
| III.28 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Nle ^U -NH ₂ | 86 % | 0 % |
| III.29 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Leu ^U -NH ₂ | 92 % | 0 % |
| III.30 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Val ^U -NH ₂ | 97 % | 24 % |
| III.31 | H-Thr ^U -Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Val ^U -NH ₂ | 81 % | 39 % |
| III.32 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 9 % | 53 % |
| III.33 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Val ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 1 % | 0 % |
| III.34 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Val ^{INVU} -NH ₂ | 7 % | 0 % |
| III.35 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-(3-Cl)Phe ^U -Ala ^U -Val ^{INVU} -NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.36 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Phe ^U -Ala ^U -Val ^{INVU} -NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.37 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 80 % | 5 % |
| III.38 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^U -Ala ^U -NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.39 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 59 % | 8 % |
| III.40 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-(3-Cl)Phe ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.41 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Phe ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.42 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Ala ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 16 % | 13 % |
| III.43 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Ala ^{INVU} -NH ₂ | 0 % | 0 % |
| III.44 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 0 % | 0 % |

Table III.122 : Table récapitulative des résultats des expériences d'HTRF réalisés avec les composés III.25-III.44.

Afin de déterminer l'IC₅₀ de certains composés, des expériences de fluorescence ont été réalisées selon les conditions précédemment décrites dans ce chapitre [paragraphe IV.2.a)].

Dans l'ensemble les valeurs d'IC₅₀ confirment les tendances discutées précédemment. En fonction du nombre de résidus acides aminés substitués à l'extrémité C-terminale de la séquence du peptide III.1 des modifications fines au niveau des chaînes latérales des résidus du « cap » uréido sont nécessaires pour parvenir à concevoir des inhibiteurs de l'interaction p53/MDM2 dans le bas nanomolaire. Dans la série de « cap » substituant des résidus Trp7-Pro12, l'utilisation d'un résidu urée inversé a également été l'un des points clés de la conception de l'oligomère III.37 qui possède un IC₅₀ de 11,0 nM. En comparaison, l'IC₅₀ mesurée pour l'oligomère III.38, dans lequel la chaîne latérale du troisième résidu n'a pas été inversée, est de 874 nM, soit un ratio de 80 entre les oligomères III.38/III.37.

| Composé | Séquence | IC ₅₀ p53/MDM2 | Ratio III.x/III.1 |
|---------|--|------------------------------|----------------------|
| III.1 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 0,8 nM | 1 |
| III.25 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu ^U -Ala ^U -Pro ^U -NH ₂ | 10,2 nM | 12 |
| III.27 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 5,7 nM | 7 |
| III.28 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Nle ^U -NH ₂ | 17,9 nM | 22 |
| III.29 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Leu ^U -NH ₂ | 10,8 nM | 13 |
| III.30 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Val ^U -NH ₂ | 6,2 nM | 8 |
| III.31 | H-Thr ^U -Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Val ^U -NH ₂ | 14,0 nM | 17 |
| III.32 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 87,0 nM | 109 |
| III.42 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Ala ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 1400 nM | 1750 |
| III.33 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Val ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 265 nM | 331 |
| III.37 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 11,0 nM | 14 |
| III.38 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^U -Ala ^U -NH ₂ | 874 nM | 1092 |
| III.39 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 21,0 nM | 26 |
| III.40 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-(3-Cl)Phe ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 87,0 nM | 109 |
| III.41 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Phe ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 5400 nM | 6750 |

Table III.123 : Table récapitulative des résultats de détermination d'IC₅₀ de l'interaction p53/MDM2.

De façon globale les différentes substitutions par des « caps » uréido à l'extrémité C-terminale des résidus acides aminés de la séquence du peptide **III.1** sont beaucoup moins tolérées par la surface de la protéine MDMX. Néanmoins, l'oligomère **III.32** est le seul composé à interagir de manière plus spécifique avec surface de MDMX. Grâce à des modifications fines nous sommes parvenus à faire varier la spécificité d'interaction des oligomères pour la protéine cible MDM2 ou MDMX.

| Composé | Séquence | IC ₅₀ p53/MDMX | Ratio III.x/III.1 |
|---------|--|------------------------------|----------------------|
| III.1 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 4,9 nM | 1 |
| III.25 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu ^U -Ala ^U -Pro ^U -NH ₂ | 68,1 nM | 14 |
| III.27 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 104,7 nM | 21 |
| III.28 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Nle ^U -NH ₂ | 113,0 nM | 23 |
| III.29 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Leu ^U -NH ₂ | 110,0 nM | 22 |
| III.30 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Val ^U -NH ₂ | 33,0 nM | 6.7 |
| III.31 | H-Thr ^U -Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Val ^U -NH ₂ | 82,0 nM | 17 |
| III.32 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 37,0 nM | 7 |
| III.42 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Ala ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 7000 nM | 1429 |
| III.33 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Val ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | > 10000 nM | -- |
| III.37 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 2000 nM | 408 |
| III.38 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^U -Ala ^U -NH ₂ | 3400 nM | 694 |
| III.39 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | 2000 nM | 408 |
| III.40 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-(3-Cl)Phe ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | > 10000 nM | -- |
| III.41 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Phe ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -NH ₂ | > 10000 nM | -- |

Table III.124 : Table récapitulative des résultats de détermination d'IC₅₀ de l'interaction p53/MDMX.

Nous sommes parvenus à mettre en place une démarche de conception d'oligomères inhibiteurs de l'interaction p53/MDM2 et également p53/MDMX. Nous avons tout d'abord réalisé deux séries de modifications ponctuelles [(1 α /1^U)/(3 α /2^U)] sur l'ensemble de la séquence du peptide de référence III.1. Grâce à ces différentes séries de remplacements, nous avons déterminé la région de la séquence peptidique de référence III.1 la plus susceptible de tolérer des modifications. Au vu des résultats, nous avons choisi d'appliquer l'approche de « capping » précédemment développée dans le chapitre 2. En fonction du nombre de résidus substitués à l'extrémité C-terminale du peptide III.1, l'utilisation de résidus avec la chaîne latérale inversée est souvent très utile pour mimer plus efficacement le peptide de départ. De plus, des modifications fines permettent également de changer la spécificité pour la protéine cible : MDM2/MDMX.

3. Dégradation enzymatique

Les expériences de dégradation enzymatique ont été réalisées selon les conditions précédemment décrites dans ce chapitre [paragraphe IV.3.].

a. Chymotrypsine

Les expériences de dégradation enzymatique ont été conduites en présence de chymotrypsine [paragraphe IV.3.a)].

i. Résultats et discussion

Comme nous l'avons mis en évidence précédemment dans ce chapitre, le peptide III.1, en présence de chymotrypsine, possède un site de clivage de la liaison peptidique après le résidu Trp7. Afin d'évaluer l'impact du remplacement des acides aminés voisins du site de clivage de la chymotrypsine (position P1' et suivantes) par des résidus urées, des expériences

de dégradation enzymatique ont été conduites sur l'oligomère **III.30**. Le remplacement des résidus Ala8, Leu9 et Leu10 par un « cap » constitué de 3 résidus urées Ala^U-Ala^U-Val^U dans **III.30** permet de retarder l'hydrolyse (50% de dégradation au bout de 30 minutes versus 50 % de dégradation au bout de 15 minutes pour **III.1**), mais pas de la stopper. L'absence de résidu d'acide aminé en positions P1', P2' et P3' ne semble pas affecter l'efficacité de l'enzyme. Aucun autre site de clivage que la liaison amide Trp7-Ala^U n'a été mis en évidence. Comme on pouvait s'y attendre, le remplacement de la liaison amide Trp7-Ala^U par un lien urée dans l'oligomère chimère **III.37** (les résidus Trp7, Ala8, Leu9 et Leu10 ont été remplacés par un cap constitué de 4 résidus urées Trp^U-Ala^U-Leu^{INV}-Ala^U) rend l'enzyme inefficace à cette position. De manière intéressante, on ne voit pas apparaître d'autre site de clivage (notamment après Phe3 ou Tyr6) ce qui suggère un effet protecteur à longue distance de la modification introduite.

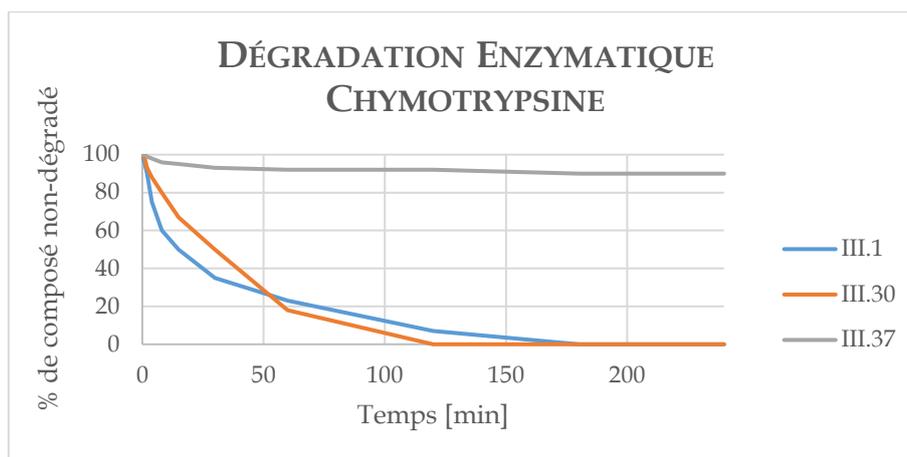


Figure III.125 : Courbes de dégradation enzymatique des composés : **III.1**, **III.30** et **III.37**.

Ces résultats soulignent l'impact de l'insertion de « caps » oligourée à l'extrémité C-terminale du peptide **III.1** sur la reconnaissance des oligomères par la chymotrypsine. Le remplacement de l'acide aminé Trp7 par un résidu urée ralentit de façon extrême le processus de dégradation enzymatique par cette enzyme. Cette propriété associée aux valeurs d'IC₅₀ dans le bas nM obtenues pour l'oligomère chimère **III.37** fait de ce composé un candidat légitime pour une évaluation *in cellulo* (pénétration cellulaire, engagement de la cible, ...).

VII. Modifications à l'extrémité N-terminale de l'oligomère chimère **III.37**

Une série de modifications à l'extrémité N-terminale du composé **III.37** : H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Leu^{INV}-Ala^U-NH₂, a été réalisée dans le but d'améliorer encore l'affinité pour MDM2 et de moduler la biodisponibilité du composé (pénétration cellulaire notamment). La structure cristallographique du peptide **III.1** en complexe avec la protéine MDM2, souligne que le résidu Thr1 n'est pas impliqué dans la structure en hélice. En effet, ce résidu adopte une conformation particulière. L'insertion du « cap » tétra-urées : Trp^U-Ala^U-Leu^{INV}-Ala^U pourrait donc s'il venait à induire une conformation hélicoïdale sur l'ensemble de la séquence du composé **III.37**, conduire à la formation d'une gêne stérique. Nous avons donc choisi de réaliser une série de modifications en soustrayant le résidu Thr1 de la portion peptidique de ces oligomères. Afin d'augmenter la capacité de l'oligomère **III.37** à pénétrer les cellules, le résidu Ala4 a été substitué par sa version N-méthylée (**III.48**).[39] En parallèle, un travail visant à mimer le cap naturel amorçant l'hélice α peptidique de PMI entre les résidus Ser2 et Glu5 a été mis en œuvre, notamment en introduisant des résidus uréido déaminés et par la formation d'un pont lactame.

1. Synthèse

Une série de composés chimères dérivés de l'oligomère chimère **III.37** visant à introduire des modifications à l'extrémité N-terminale de ce composé a été réalisée.

| Composé | Séquence | Rdt ^a | ESI-MS [M+H] ⁺ | HPLC t _R [min] ^b |
|---------------|--|------------------|---------------------------|--|
| III.45 | H-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 34 % | 1172,65 | 4,27 |
| III.46 | H-Ser ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 33 % | 1201,68 | 4,38 |
| III.47 | H ₂ N-CO-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 18 % | 1215,66 | 5,24 |
| III.48 | H-Ser-Phe-(N-Me)Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 42 % | 1186,66 | 4,36 |
| III.49 | (dé-N)Ser ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 31 % | 1172,65 | 5,16 |
| III.50 | (dé-N)Orn ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 13 % | 1185,68 | 4,50 |
| III.51 | (dé-N)Orn ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 7 % | 1167,67 | 5,50 |
| III.52 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Asn-Leu-Leu-NH ₂ | 50 % | 1242,61 | 4,69 |
| III.53 | H-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Asn-Leu-Leu-NH ₂ | 21 % | 1141,57 | 4,71 |

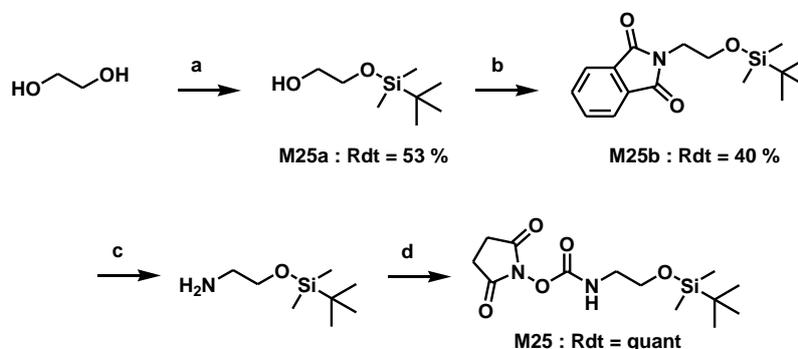
Figure III.126 : Nouvelle série d'oligomères dérivant du composé **III.37** avec une modification sur le fragment N-terminal. ^a Rendement après purification HPLC ; ^b système RP-HPLC : gradient linéaire 10 à 100% de B en 10 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) and B (0,1% TFA dans CH₃CN), détection UV à 200 nm.

a. Synthèse en solution des monomères

La synthèse du monomère azoture activé **M1** (N₃-Ala^U-OSu) a été décrite dans le chapitre 2 [paragraphe I.1.a.i]. La synthèse du monomère azoture activé **M18** (N₃-Trp^U-OSu) ainsi que la synthèse du monomère azoture activé inversé **M24** (N₃-Leu^{INVU}-OSu) ont été décrites précédemment dans le chapitre 3.

i. Synthèse du monomère O-TBDMS protégé activé dérivé de la dé-amino sérine : (de-N)Ser(TBDMS)-Osu

Le carbamate activé dérivé de la déamino sérine a été obtenu à partir de l'éthylène glycol suivant la voie de synthèse décrite dans la **Figure III.127**. Après une réaction de mono-protection de l'alcool,[40] une réaction de Mitsunobu génère le dérivé phtalimide correspondant. L'amine obtenue par réaction avec l'hydrazine hydratée est ensuite activée avec le carbonate de dissuccinimide pour donner le monomère souhaité **M25** avec un rendement de 21%.

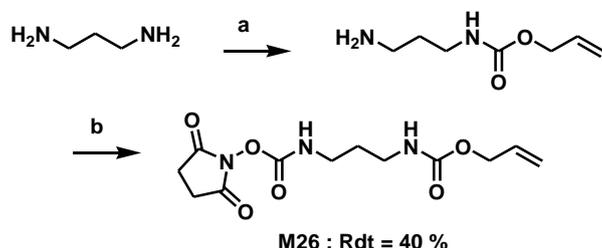


a : TBDMSCl (0.25 eq), I₂ (0.5 eq), N-méthylimidazole (0.5 eq), DCM, 0 °C; **b** : PPh₃, DIAD, phtalimide, DCM, 25 °C; **c** : N₂H₄, MeOH, 70 °C; **d** : N,N'-Disuccinimide carbonate, DCM, 25 °C.

Figure III.127 : Schéma de synthèse du monomère O-TBDMS protégé activé sous forme de carbamate de succinimide dérivé de la déamino-sérine **M25**

ii. Synthèse du monomère *N*-Alloc protégé activé dérivé de la déamino ornitine : (dé-*N*)Orn(Alloc)-Osu

Le carbamate activé dérivé de la déamino ornitine a été obtenu à partir de la 1,3-diaminopropane, suivant la voie de synthèse décrite dans la **Figure III.128**. Après une réaction de mono-protection de l'amine, celle-ci est ensuite activée avec le carbonate de dissuccinimide pour donner le monomère souhaité **M26** avec un rendement de 40%.



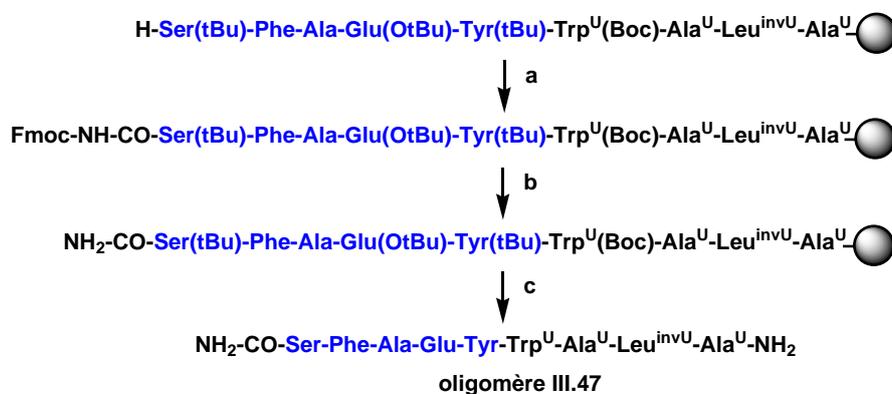
a : AllocCl (0.3 eq), DIEA (2.2 eq), DCM, 0 °C; **b** : *N,N'*-Disuccinimide carbonate (1.1 eq), DCM, 25 °C.

Figure III.128 : Schéma de synthèse du monomère *N*-Alloc protégé activé sous forme de carbamate de succinimide dérivé de la déamino-ornitine **M26**.

b. Synthèse sur support solide des oligomères chimères

i. Synthèse sur support solide des oligomères chimères III.45 à III.48

La synthèse des oligomères chimères **III.45** à **III.48** a été réalisée selon les conditions précédemment décrites dans ce chapitre [paragraphe VI.1.b.i]. Dans le cas de la synthèse de l'oligomère **III.47**, le « capping » N-terminale de la résine, par insertion d'un lien urée a été réalisé à l'aide d'isocyanate *N*-Fmoc protégé sans assistance des micro-ondes qui favorisent la polymérisation de ce composé au détriment de la formation du lien urée souhaité.



a : Fmoc-isocyanate (1,5 eq), DIEA (3 eq), (0 W, 25 °C, 20 min); **b** : 20% piperidine, DMF, (50 W, 50 °C, 8 min); **c** : TFA/TIS/H₂O (95 : 2,5 : 2,5).

Figure III.129 : Schéma de synthèse sur support solide de l'oligomère chimère **III.47**

La synthèse des oligomères **III.45** à **III.48** n'a pas posé de problème particulier. Le chromatogramme RP-HPLC de l'oligomère **III.47** (**Figure III.130**), avant purification par RP-HPLC préparative, souligne la présence d'un produit largement majoritaire (plus de 75% de pureté) : l'oligomère (temps de rétention : 5,22 minutes) ainsi que le produit de délétion de l'isocyanate *N*-Fmoc protégé (temps de rétention : 4,59 minutes). Après purification par RP-HPLC préparative, 11,0 mg de l'oligomère **III.47** ont été isolés et caractérisés.

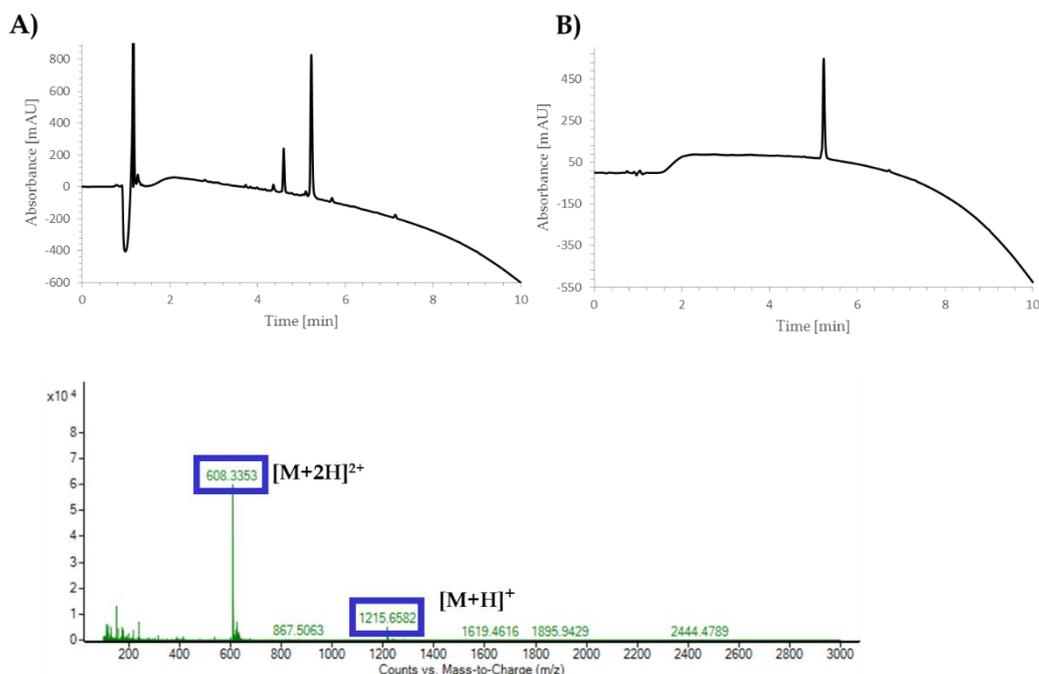
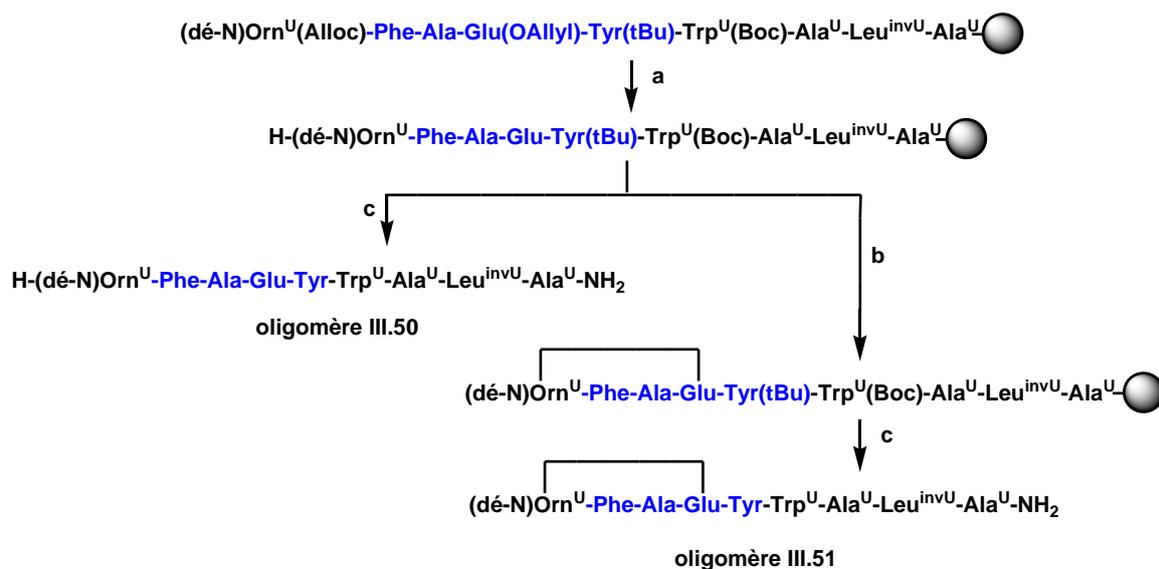


Figure III.130 : Caractérisation de l'oligomère **III.47** : **A & B**) chromatogramme HPLC de l'oligomère **III.47** avant purification par RP-HPLC préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 30 à 50% de B en 15 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans CH₃CN)] ; **C**) spectre de masse de l'oligomère **III.47** après purification par RP-HPLC semi-préparative.

ii. Synthèse sur support solide des oligomères chimères **III.49** à **III.51**

La synthèse des oligomères chimères **III.49** à **III.51** a été réalisée selon les conditions précédemment décrites dans ce chapitre [paragraphe VI.1.b.i.]. L'insertion des monomères **M25** et **M26** se fait dans les mêmes conditions que les monomères d'azoture activés. La fonction alcool du monomère **M25** sera directement régénérée dans les conditions de clivage du support. Dans le cas de l'oligomère **III.50**, l'amine a ensuite été régénérée sur le support par une réaction de réduction du groupement protecteur Alloc en présence de tétrakis(triphénylphosphine)-palladium (0). Cette même procédure, suivie d'une réaction de couplage peptidique sous atmosphère inerte, sous champs micro-ondes (CEM Discover Bio), en présence de DIC et d'oxyma, a été appliquée directement sur le support afin de former une liaison amide entre l'amine et la fonction acide portée par la chaîne latérale de l'acide glutamique protégée par un groupement allyl.



a : Pd(PPh₃)₄ (0,1 eq), phénylsilane (10 eq), (0 W, 25 °C, 20 min); b : DIC (1,5 eq), oxyma (1,5 eq), (50 W, 50 °C, 10 min) ; c : TFA/TIS/H₂O (95 : 2,5 : 2,5).

Figure III.131 : Schéma de synthèse sur support solide des oligomères chimères **III.50** et **III.51**

La synthèse des oligomères **III.49**, **III.50** et **III.51** n'a pas posé de problème particulier. Le chromatogramme RP-HPLC de l'oligomère **III.49** (Figure III.132), avant purification par RP-HPLC préparative, souligne la présence d'un produit largement majoritaire (plus de 80% de pureté) : l'oligomère (temps de rétention : 5,17 minutes) ainsi que le produit de délétion du résidu (dé-N)Orn^U1 (temps de rétention : 4,02 minutes). Après purification par RP-HPLC préparative, 18,0 mg de l'oligomère **III.49** ont été isolés et caractérisés.

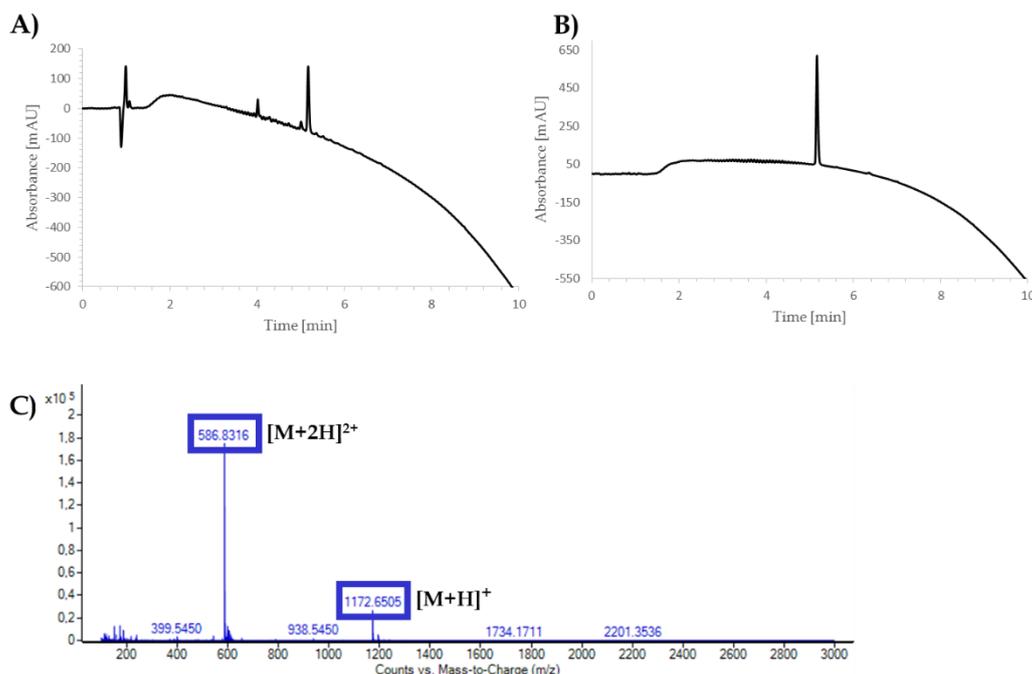


Figure III.132 : Caractérisation de l'oligomère **III.49** : **A & B**) chromatogramme HPLC de l'oligomère **III.49** avant purification par RP-HPLC préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 30 à 70% de B en 20 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans CH₃CN)] ; **C**) spectre de masse de l'oligomère **III.49** après purification par RP-HPLC préparative.

iii. Synthèse sur support solide des peptides III.52 et III.53

La synthèse des peptides **III.52** et **III.53** a été réalisée selon les conditions précédemment décrites dans le chapitre 2 [paragraphe II.1.b.i].

La synthèse des peptides **III.52** et **III.53** n'a pas posé de problème particulier. Le chromatogramme RP-HPLC de l'oligomère **III.52** (**Figure III.133**), avant purification par RP-HPLC préparative, souligne la présence d'un produit largement majoritaire (plus de 80% de pureté) : le peptide **III.52** (temps de rétention : 4,77 minutes). Après purification par RP-HPLC préparative, 22,0 mg de l'oligomère **III.1** ont été isolés et caractérisés.

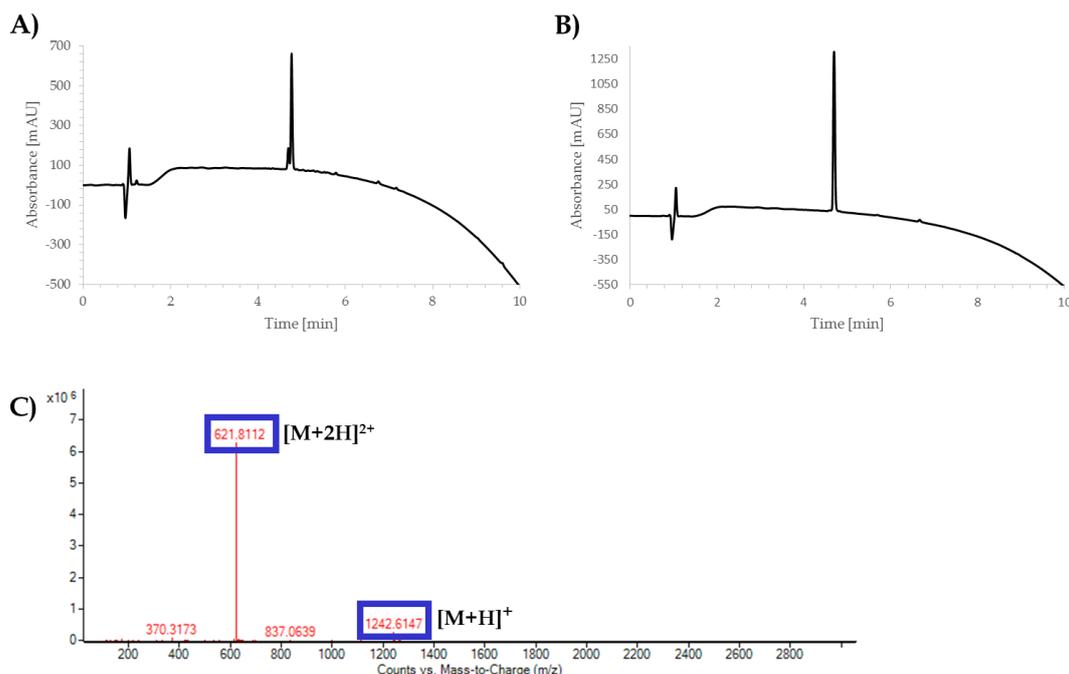


Figure III.133 : Caractérisation de l'oligomère **III.52** : **A & B**) chromatogramme HPLC de l'oligomère **III.52** avant purification par RP-HPLC préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 30 à 70% de B en 20 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans CH₃CN)] ; **C**) spectre de masse de l'oligomère **III.52** après purification par RP-HPLC préparative.

2. Caractérisation de l'inhibition

a. Estimation de la concentration pour laquelle 50% d'inhibition de l'interaction p53/MDM2 est observée par fluorescence

Les expériences de fluorescence ont été réalisées selon les conditions précédemment décrites dans ce chapitre [paragraphe IV.2.a)].

i. Résultats et discussions

Les résultats des expériences de fluorescence soulignent le rôle critique du résidu Thr1 impliqué dans une « capping box » avec le résidu Glu5. En effet, la suppression de ce résidu dans le peptide **III.52** et dans le chimère **III.37** conduit à une capacité d'inhibition très réduite. La substitution du résidu Ala4 par son analogue N-méthyle, générant le composé **III.48**, conduit également à une perte drastique de la capacité à inhiber l'interaction p53/MDM2. En revanche, les différentes approches visant à restaurer l'interaction de « capping » avec le résidu Glu5 s'avèrent plutôt prometteuse. En effet, les composés **III.49**, **III.50** et **III.51** possèdent des pourcentages respectifs d'inhibition de l'interaction p53/MDM2, de 54%, 65% et 56% à la concentration de 100 nM. Ces résultats traduisent une augmentation notable de la capacité de ces composés à interagir avec la surface de MDM2 en comparaison avec celle du peptide **III.53**.

| Composé | Séquence | % inhibition à [100nM] p53/MDM2 | % inhibition à [100nM] p53/MDMX |
|---------|--|---------------------------------|---------------------------------|
| III.1 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 100 % | 100 % |
| III.52 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Asn-Leu-Leu-NH ₂ | 80% | 58 % |
| III.53 | H-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Asn-Leu-Leu-NH ₂ | 21% | 12 % |
| III.37 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 80 % | 5 % |
| III.45 | H-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 0% | 0 % |
| III.46 | H-Ser ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 35% | 0 % |
| III.47 | H ₂ N-CO-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 54% | 0 % |
| III.48 | H-Ser-Phe-(N-Me)Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 0% | 0 % |
| III.49 | (dé-N)Ser ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 54% | 5 % |
| III.50 | (dé-N)Orn ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 65% | 28 % |
| III.51 | (dé-N)Orn ^U - Phe-Ala-Glu-Tyr -Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 56% | 18 % |

Table III.134 : Table récapitulative des résultats des expériences d'HTRF.

Afin de déterminer l'IC₅₀ de certains composés, des expériences de fluorescence ont été réalisées selon les conditions précédemment décrites dans ce chapitre [paragraphe IV.2.a)]

La comparaison des valeurs d'IC₅₀ mesurées pour les peptides **III.52** et **III.53** souligne l'impact de la perte du résidu Thr1 au niveau de l'interaction avec la surface de la protéine MDM2. Ce même phénomène s'applique également entre les oligomères **III.37/III.45** : la perte de la Thr 1 pour la séquence **III.45** entraîne une perte de d'affinité de 360 fois par rapport au composé de référence **III.1**. En comparaison avec la séquence **III.45**, les différentes stratégies développées afin de restaurer l'interaction de « capping » entre les résidus Ser2 et Glu5 semblent efficaces conduisant à une augmentation globale de la capacité des composés **III.47-III.51** à interagir avec la surface de MDM2.

| Composé | Séquence | IC ₅₀ p53/MDM2 | Ratio III.x/III.1 |
|---------|--|---------------------------|-------------------|
| III.1 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 0,8 nM | 1 |
| III.52 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Asn-Leu-Leu-NH ₂ | 2,5 nM | 3 |
| III.53 | H-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Asn-Leu-Leu-NH ₂ | 104 nM | 130 |
| III.37 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 11,0 nM | 14 |
| III.45 | H-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 288 nM | 360 |
| III.47 | H ₂ N-CO-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 16,0 nM | 20 |
| III.49 | (dé-N)Ser ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 36,0 nM | 45 |
| III.50 | (dé-N)Orn ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 35,0 nM | 44 |
| III.51 | (dé-N)Orn ^U - Phe-Ala-Glu-Tyr -Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 51,0 nM | 64 |

Table III.135 : Table récapitulative des résultats de détermination d'IC₅₀ de l'interaction p53/MDM2.

La perte du résidu Thr1 conduit également à une diminution drastique de l'affinité du peptide **III.53** de 204 fois en comparaison avec le composé de référence **III.1**. Comme nous l'avons décrit précédemment dans ce chapitre, l'oligomère **III.37** possède une propension plus faible à se lier à la surface de MDMX en comparaison avec MDM2. La perte du résidu Thr1 accentue ce phénomène (IC₅₀ : > 10000 nM). Néanmoins les oligomères **III.47** et **III.49** permettent de regagner de l'affinité pour la surface de MDMX en comparaison avec

l'oligomère **III.45**. En revanche, les composés pourvus du résidu uréido déaminé ornithine à l'extrémité N-terminale conduisent à une chute drastique de l'affinité pour la surface de la protéine MDMX.

| Composé | Séquence | IC ₅₀ p53/MDMX | Ratio III.x/III.1 |
|---------------|--|------------------------------|----------------------|
| III.1 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH ₂ | 4,9 nM | 1 |
| III.52 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Asn-Leu-Leu-NH ₂ | 23,0 nM | 5 |
| III.53 | H-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Asn-Leu-Leu-NH ₂ | 1000 nM | 204 |
| III.37 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 2000 nM | 408 |
| III.45 | H-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | >10000 nM | -- |
| III.47 | H ₂ N-CO-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 6000 nM | 1224 |
| III.49 | (dé-N)Ser ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 5400 nM | 1102 |
| III.50 | (dé-N)Orn ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | >10000 nM | -- |
| III.51 | (dé-N)Orn ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | >10000 nM | -- |

Table III.136 : Table récapitulative des résultats de détermination d'IC₅₀ de l'interaction p53/MDMX.

Nous sommes donc parvenus à concevoir de puissants inhibiteurs de l'interaction p53/MDM2, les oligomères **III.47** et **III.49**, pour lesquels la moitié de la séquence peptidique de référence **III.1** a été substituée par des résidus urées. Par analogie avec leur séquence parente (**III.37**), ces oligomères chimères résistent à l'hydrolyse des liens amides dirigée par chymotrypsine. Nous souhaitons à présent évaluer leur résistance à l'hydrolyse face à des enzymes plasmatiques. En parallèle, Jérémie Buratto, un stagiaire post-doctoral dans notre équipe, mène des expériences de co-cristallisation de la protéine MDM2 avec les composés **III.30**, **III.37**, **III.47**, et **III.49**. Des structures à haute résolution de tels complexes pourraient nous permettre de mieux décrire le mode d'interaction de nos oligomères à la surface de MDM2 et potentiellement de concevoir une nouvelle série d'oligomères optimisés. De plus, ces données pourraient également faciliter la conception de composés pouvant inhiber l'interaction p53/MDM2 et également l'interaction p53/MDMX. En parallèle, nous sommes en train d'amorcer une collaboration avec l'équipe de Martin Teichmann dans le laboratoire régulations naturelles et artificielles (ANRA/INSERM U 1212), à Bordeaux, pour évaluer la perméabilité cellulaire des oligomères **III.30**, **III.37**, **III.47**, et **III.49** et leur activité *in cellulo*.

Bibliographie

- [1] A. Hock and K. H. Vousden, "Regulation of the p53 pathway by ubiquitin and related proteins," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 42, no. 10, pp. 1618–1621, 2010.
- [2] P. Chène, "Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 2, pp. 102–9, 2003.
- [3] P. H. Kussie *et al.*, "Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain," *Science (80-.)*, vol. 274, no. 5289, pp. 948–953, 1996.
- [4] A. Shvarts *et al.*, "MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2," *EMBO J.*, vol. 15, no. 19, pp. 5349–57, Oct. 1996.
- [5] L. Huang *et al.*, "The p53 inhibitors MDM2/MDMX complex is required for control of p53 activity in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 29, pp. 12001–6, 2011.
- [6] C. García-Echeverría, P. Chène, M. J. J. Blommers, and P. Furet, "Discovery of Potent Antagonists of the Interaction between Human Double Minute 2 and Tumor Suppressor p53," *J. Med. Chem.*, vol. 43, no. 17, pp. 3205–3208, Aug. 2000.
- [7] R. Banerjee, G. Basu, P. Chene, and S. Roy, "Aib-based peptide backbone as scaffolds for helical peptide mimics," *J. Pept. Res.*, vol. 60, pp. 88–94, 2002.
- [8] J. Kallen *et al.*, "Crystal structures of human MdmX (HdmX) in complex with p53 peptide analogues reveal surprising conformational changes," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 13, pp. 8812–8821, 2009.
- [9] J. A. Kritzer *et al.*, "Miniature protein inhibitors of the p53-hDM2 interaction," *ChemBioChem*, vol. 7, no. 1, pp. 29–31, 2006.
- [10] J. a Kritzer, M. E. Hodsdon, and A. Schepartz, "Solution structure of a beta-peptide ligand for hDM2," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 12, pp. 4118–4119, 2005.
- [11] J. Michel, E. A. Harker, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen, and A. Schepartz, "In Silico Improvement of β 3-Peptide inhibitors of p53.hDM2 and p53.hDMX," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 18, pp. 6356–6357, 2009.
- [12] C. M. Grison, J. A. Miles, S. Robin, A. J. Wilson, and D. J. Aitken, "An α -Helix-Mimicking 12,13-Helix: Designed $\alpha/\beta/\gamma$ -Foldamers as Selective Inhibitors of Protein-Protein Interactions," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 55, no. 37, pp. 11096–11100, 2016.
- [13] V. Azzarito *et al.*, "Probing Protein Surfaces: QSAR Analysis with Helix Mimetics," *ChemBioChem*, vol. 17, no. 8, pp. 768–773, 2016.
- [14] L. K. Henchey, J. R. Porter, I. Ghosh, and P. S. Arora, "High specificity in protein recognition by hydrogen-bond-surrogate α -helices: Selective inhibition of the p53/MDM2 complex," *ChemBioChem*, vol. 11, no. 15, pp. 2104–2107, 2010.
- [15] A. Patgiri, S. T. Joy, and P. S. Arora, "Nucleation effects in peptide foldamers," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 28, pp. 11495–11502, 2012.
- [16] M. Liu, M. Pazgier, C. Li, W. Yuan, C. Li, and W. Lu, "A left-handed solution to peptide inhibition of the p53-MDM2 interaction," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 49, no. 21, pp. 3649–3652, 2010.
- [17] M. Liu *et al.*, "D-peptide inhibitors of the p53-MDM2 interaction for targeted molecular therapy of malignant neoplasms," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 32, pp. 14321–6, 2010.

- [18] C. Zhan *et al.*, "An Ultrahigh Affinity α -Peptide Antagonist Of MDM2," *J. Med. Chem.*, vol. 55, no. 13, pp. 6237–6241, Jul. 2012.
- [19] M. Xie *et al.*, "Structural Basis of Inhibition of ER α -Coactivator Interaction by High-Affinity N-Terminus Isoaspartic Acid Tethered Helical Peptides," *J. Med. Chem.*, vol. 60, no. 21, pp. 8731–8740, Nov. 2017.
- [20] G. Philippe *et al.*, "Development of cell-penetrating peptide-based drug leads to inhibit MDMX:p53 and MDM2:p53 interactions," *Biopolymers*, vol. 106, no. 6, pp. 853–863, Nov. 2016.
- [21] Y. S. Chang *et al.*, "Stapled α -helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 36, pp. E3445–54, 2013.
- [22] F. Bernal *et al.*, "A Stapled p53 Helix Overcomes MDMX-Mediated Suppression of p53," *Cancer Cell*, vol. 18, no. 5, pp. 411–422, 2010.
- [23] F. Bernal, A. F. Tyler, S. J. Korsmeyer, L. D. Walensky, and G. L. Verdine, "Reactivation of the p53 tumor suppressor pathway by a stapled p53 peptide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 9, pp. 2456–2457, 2007.
- [24] K. H. Khoo, K. K. Hoe, C. S. Verma, and D. P. Lane, "Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 13, no. 3, pp. 217–36, 2014.
- [25] M. Pazgier *et al.*, "Structural basis for high-affinity peptide inhibition of p53 interactions with MDM2 and MDMX.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 12, pp. 4665–4670, 2009.
- [26] C. Li *et al.*, "Systematic Mutational Analysis of Peptide Inhibition of the p53-MDM2/MDMX Interactions," *J. Mol. Biol.*, vol. 398, no. 2, pp. 200–213, 2010.
- [27] E. Teyssières *et al.*, "Proteolytically Stable Foldamer Mimics of Host-Defense Peptides with Protective Activities in a Murine Model of Bacterial Infection," *J. Med. Chem.*, vol. 59, no. 18, pp. 8221–8232, Sep. 2016.
- [28] C. Douat *et al.*, "A cell-penetrating foldamer with a bio reducible linkage for intracellular delivery of DNA.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 54, no. 38, pp. 11133–7, Sep. 2015.
- [29] G. Guichard, V. Semetey, M. Rodriguez, and J.-P. Briand, "Solid phase synthesis of oligoureas using O-succinimidyl-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)ethylcarbamate derivatives as activated monomers," *Tetrahedron Lett.*, vol. 41, no. 10, pp. 1553–1557, Mar. 2000.
- [30] A. Violette *et al.*, "Mimicking Helical Antibacterial Peptides with Nonpeptidic Folding Oligomers," *Chem. Biol.*, vol. 13, no. 5, pp. 531–538, May 2006.
- [31] L. Fischer *et al.*, "Succinimidyl carbamate derivatives from N-protected α -amino acids and dipeptides-synthesis of ureidopeptides and oligourea/peptide hybrids," *European J. Org. Chem.*, no. 15, pp. 2511–2525, 2007.
- [32] P. Sieber, "A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method.," *Tetrahedron Lett.*, vol. 28, no. 19, pp. 2107–2110, 1987.
- [33] F. Degorce, A. Card, S. Soh, E. Trinquet, G. P. Knapik, and B. Xie, "HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent

- applications,” *Curr. Chem. Genomics*, vol. 3, pp. 22–32, 2009.
- [34] S. a Kane, C. a Fleener, Y. S. Zhang, L. J. Davis, a L. Musselman, and P. S. Huang, “Development of a binding assay for p53/HDM2 by using homogeneous time-resolved fluorescence,” *Anal. Biochem.*, vol. 278, no. 1, pp. 29–38, 2000.
- [35] J. D. Sadowsky, J. K. Murray, Y. Tomita, and S. H. Gellman, “Exploration of backbone space in foldamers containing α - and β -amino acid residues: Developing protease-resistant oligomers that bind tightly to the BH3-recognition cleft of Bcl-xL,” *ChemBioChem*, vol. 8, no. 8, pp. 903–916, 2007.
- [36] C. Douat-Casassus, K. Pulka, P. Claudon, and G. Guichard, “Microwave-Enhanced Solid-Phase Synthesis of N , N' -Linked Aliphatic Oligoureas and Related Hybrids,” *Org. Lett.*, vol. 14, no. 12, pp. 3130–3133, Jun. 2012.
- [37] N. Pendem *et al.*, “Helix-Forming Propensity of Aliphatic Urea Oligomers Incorporating Noncanonical Residue Substitution Patterns,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 12, pp. 4884–4892, Mar. 2013.
- [38] J.-M. Kim, Y. Bi, S. J. . Paikoff, and P. G. . Schultz, “The solid phase synthesis of oligoureas,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 37, no. 30, pp. 5305–5308, Jul. 1996.
- [39] T. R. White *et al.*, “On-resin N-methylation of cyclic peptides for discovery of orally bioavailable scaffolds,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 11, pp. 810–817, Sep. 2011.
- [40] A. Bartoszewicz, M. Kalek, J. Nilsson, R. Hiresova, and J. Stawinski, “A new reagent system for efficient silylation of alcohols: Silyl chloride-N-methylimidazole-iodine,” *Synlett*, no. 1, pp. 0037–0040, 2008.

Chapitre 4

Assemblages d'hélices chimères en milieu aqueux

Svedberg a rapporté, il y a près d'un siècle, que les polypeptides préparés à partir d'acides aminés étaient capables de s'assembler en structures quaternaires discrètes constituées de plusieurs sous unités. La formation de structures quaternaires discrètes permet la diversité et la spécificité au niveau moléculaire et a guidé l'évolution des processus cellulaires qui sont considérés comme essentiels pour le développement de la vie à partir de précurseurs simples. Les faisceaux d'hélices sont des domaines omniprésents de repliement et également d'interaction des protéines qui résultent de l'association de plusieurs chaînes hélicoïdales de manière parallèle ou antiparallèle.[1][2] Certaines protéines de structure, comme la kératine [3] et le collagène,[4] sont constituées de faisceaux d'hélices. Les mécanismes de fusion membranaire (ex : protéine du VIH [5]) ainsi que les processus de transcription d'ADN sont également médiés par des faisceaux d'hélices (ex : opéron lactose chez *Escherichia coli* [6]). La **Figure IV.137** souligne la variabilité du degré d'oligomérisation de ce type de structures. Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes sont souvent dirigés par des faisceaux constitués de deux hélices, l'activateur de transcription GCN4, décrit précédemment dans le chapitre 1, étant un parfait exemple. Les procédés de coagulation du sang [7] ainsi que les voie de signalisation cellulaire [8] peuvent être conduit par des faisceaux d'hélices trimériques. Des faisceaux constitués de trois hélices, impliqués dans la propagation de l'infection virale, ont également été observées à la surface des capsides virales (ex : VIH [5]). L'augmentation du degré d'oligomérisation des assemblages en faisceaux d'hélices est inversement proportionnel au nombre de structures à haute résolution décrites dans la littérature. Il existe néanmoins quelques exemples de faisceaux constitués de 5 ou 6 hélices dont la structure a pu être résolue. Le plus souvent, les faisceaux pentamériques s'organisent sous forme de pores impliqués dans le transport d'ions métalliques ou de petites molécules organiques.[9] La cobalamine adénosyltransférase est l'unique exemple de protéine naturelle dont la structure à haute résolution souligne l'existence d'un faisceau constitué de 6 hélices.[10]

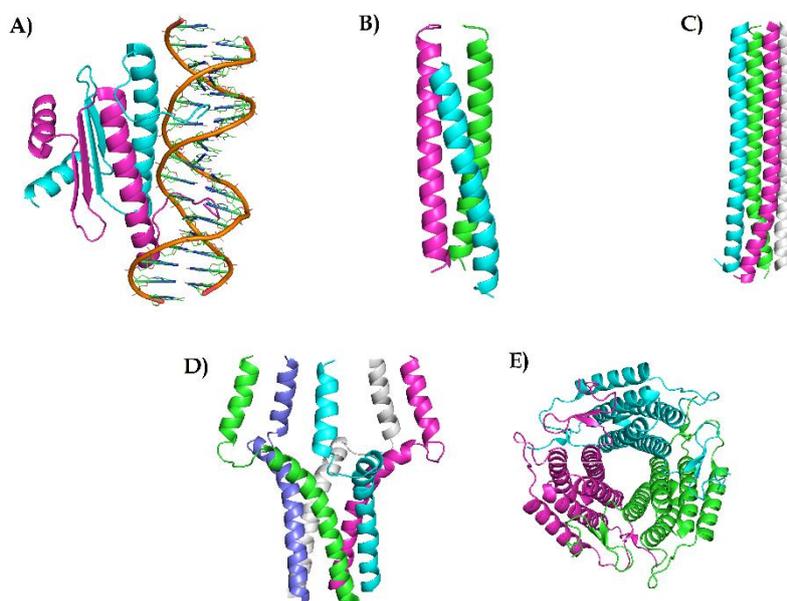


Figure IV.137 : Exemple de faisceaux d'hélices α -peptidiques : (A) dimérique : le facteur de transcription MEF2 lié à l'ADN (PDB ID : 1EGW)[11] ; (B) trimérique : une glycoprotéine gp41 (PDB ID : 1AIK)[5] ; (C) tétramérique : tetrabrachion (PDB ID : 1FE6)[12] ; (D) pentamérique :

phospholamban cardiaque (PDB ID : 1ZLL)[9] ; (E) hexamérique : cobalamine adenosyltransférase (PDB ID : 2NT8).[10]

Les différents faisceaux d'hélices peptidiques naturels décrits dans la littérature ont été répertoriés de manière systématique par Woolfson et son équipe sous forme de « table périodique » pour faciliter la prédiction et la conception de ce type d'objet. [13]

VIII. De novo peptides formant des faisceaux d'hélices

Le perfectionnement des techniques de caractérisation (Rayons X, RMN, ...) a conduit à une augmentation du nombre de structures protéiques résolues. Ces données ont permis à différents groupes de recherche d'étudier le repliement des structures naturelles formant des faisceaux d'hélices α . Ces recherches ont conduit à l'établissement de certains principes récurrents de la formation et de la fonction de ces objets. Comme Crick l'a défini,[14] les interactions hélice-hélice sont dirigées et consolidées par les interactions « knobs-into-holes » (KIH) permettant d'enfouir les chaînes latérales hydrophobes à l'intérieur de la structure. Ce sont des interactions intimes dans lesquelles les chaînes latérales provenant d'hélices adjacentes dans les structures en faisceau d'hélices n'interagissent pas simplement les unes avec les autres, elles s'interpénètrent de manière spécifique : une chaîne latérale, appelée « knob », portée par une hélice s'emboîte à l'intérieur d'un groupe de 4 chaînes latérales formant une cavité « hole » sur l'hélice partenaire. De façon générale, les assemblages hélicoïdaux doivent être pourvus de portions continues d'interactions KIH de façon à pouvoir être qualifiés de structures en faisceau d'hélices α , autrement ce sont simplement des domaines structurés en hélice α dans des protéines globulaires,[15] où des arrangement structuraux de nature différente et moins intimes opèrent.[16][17] Cependant les séquences primaires des faisceaux d'hélices naturelles présentent des discontinuités qui rendent les études et les interprétations difficiles. Dans ce domaine, la stratégie *de novo* qui consiste à remodeler une séquence naturelle choisie en y introduisant des mutations ponctuelles pour en moduler les propriétés structurales et comprendre plus finement les règles régissant la formation des assemblages résultant a été exploitée par de nombreux groupes. L'objectif étant de générer un ensemble de motifs de base de faisceaux d'hélices pour d'autres projets d'ingénierie des protéines et de biologie de synthèse.

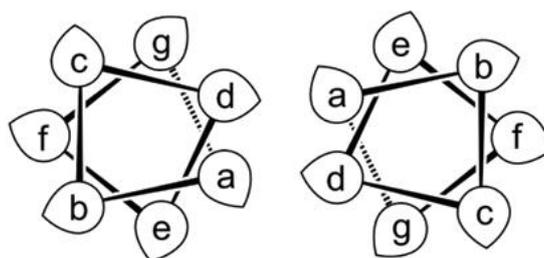


Figure IV.138 : Diagramme du motif de répétition d'une séquence formant des auto-assemblages, en heptade d'un tour d'hélice : le motif de répétition en heptade, *abcdefg*, se répète sur plusieurs tours d'hélices pour un assemblage en faisceau de deux hélices classique.[18]

Certaines règles de base ont ainsi pu être établies.[19] De façon générale, la force motrice qui dirige les processus d'assemblages est l'effet hydrophobe. En effet, dans un environnement biologique, les macromolécules se replient de façon à minimiser la surface hydrophobe en contact avec le milieu aqueux. Cette dynamique conduit donc à la formation d'un cœur hydrophobe (pour les assemblages d'hélices) stabilisé de part et d'autre par des interactions électrostatiques. Un motif répétitif constitué de 7 acides aminés (*abcdefg*)_n, appelé motif en heptade, se répète le long de la séquence de ces hélices (**Figure IV.138**). Les interactions hydrophobes sont dirigées par des chaînes latérales hydrophobes appartenant à des résidus situés au niveau des positions *a* et *d* alors que les résidus pourvus de chaînes

latérales portant des charges complémentaires formant des ponts salins sont situés au niveau des positions *e* et *g*. Ces interactions électrostatiques via des ponts salins entre les chaînes latérales situées de chaque côté de la face hydrophobe, influencent l'orientation parallèle ou anti parallèle des faisceaux d'hélices ainsi que la formation d'hétéro- ou d'homo-oligomères. Cependant ces interactions ne sont pas spécifiques et ne permettent pas de déterminer la stoechiométrie du faisceau. La séquence d'acides aminés guide la stoechiométrie du faisceau. La variation de certains résidus dans la séquence peut donc conduire à des variations du degré d'oligomérisation.[19][20]

1. Faisceaux constitués de dimères, trimères et tétramères d'hélices conçus par *de novo design*

Kim et Alber ont mené des travaux visant à comprendre la relation entre la séquence et la structuration du peptide naturel GCN4-p1 qui a précédemment été décrite dans le chapitre 1. Ils ont montré que différentes combinaisons de résidus Leu et Ile (un résidu β branché tout comme la Val) aux sites *a* et *d* conduisent à la formation d'assemblages pourvus de différents degrés d'oligomérisation. Par exemple, la combinaison de *a* = Ile et *d* = Leu favorise les dimères parallèles, *a* = *d* = Ile spécifie les trimères, et *a* = Leu plus *d* = Ile dirige l'assemblage vers des tétramères. [21]. Les peptides synthétiques : **IV.1**, **IV.2**, et **IV.3** ont été conçus *de novo* à partir de la séquence de GCN4-p1.[22][23] Ces composés sont tous solubles dans l'eau, totalement hélicoïdaux et très stable thermiquement. Le résultat de ces expériences est un ensemble de faisceaux d'hélices, avec des degrés d'oligomérisation différents, entièrement caractérisés avec des structures cristallines à haute résolution (

Figure IV.139).

| Composé | Stœchiométrie | Séquence |
|---------|---------------|--|
| IV.1 | dimère | Ac-GEIAALKQEIAALKKENAAALKWEIAALKQGYG-NH ₂ |
| IV.2 | trimère | Ac-GEIAAIKQEIAAIKKEIAAIKWEIAAIKQGYG-NH ₂ |
| IV.3 | tétramère | Ac-GELAAIKQELAAIKKELAAIKWELAAIKQGAG-NH ₂ |

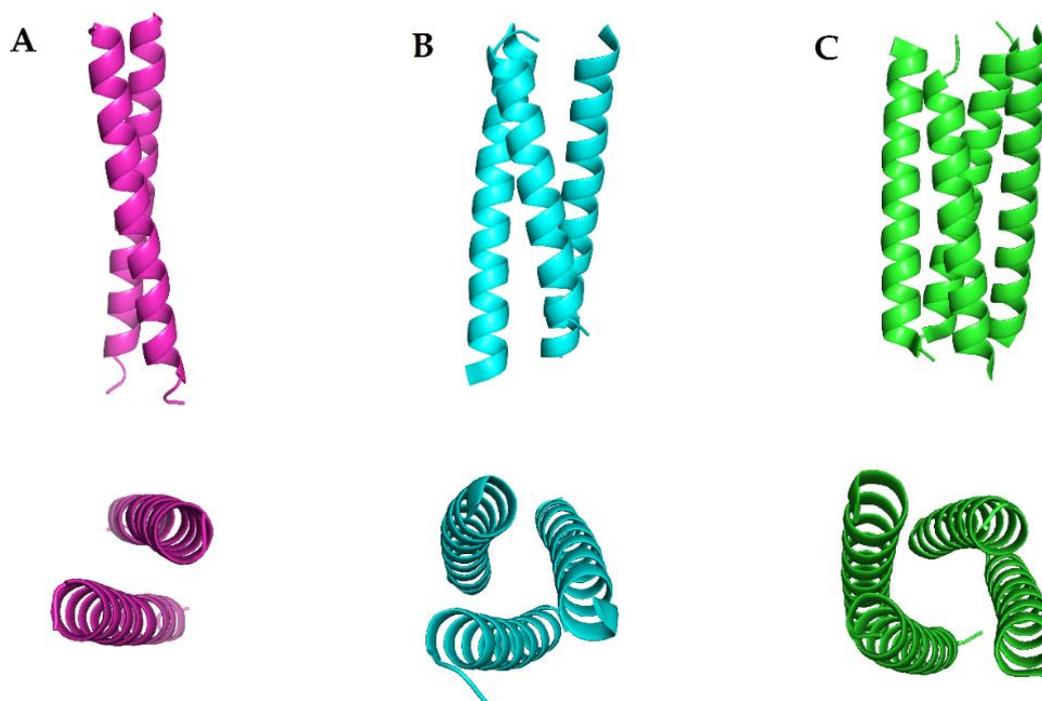


Figure IV.139 : Structures cristallographiques des faisceaux d'hélices conçus par *de novo design*: A) dimère : composé **IV.1** (PDB ID : 4DZM)[22] ; trimère : composé **IV.2** (PDB ID : 4DZL)[22] ; tétramère : composé **IV.3** (PDB ID : 3R4A).[23]

2. Justification structurale pour une oligomérisation d'ordre supérieur

Les modes d'assemblage en faisceaux d'hélices observés dans les dimères classiques jusqu'aux tétramères [21][22] s'appliquent aussi pour expliquer les assemblages d'ordre supérieur telles que les hexamères. Dans un assemblage en faisceau d'hélices α , chaque hélice interagit avec deux voisins, via des interactions KIH indépendantes. Il existe trois façons différentes d'y parvenir à partir d'un motif de répétition en heptade : les deux interactions KIH peuvent partager 1 résidu (interface de type I), être adjacent (interface de type II), ou être séparés par un résidu (interface de type III).[24][25] Woolfson et son équipe ont donc tenté de contrôler le degré d'oligomérisation du faisceau d'hélice pour des interfaces de type II. Plus spécifiquement, en utilisant la nomenclature heptade (*gabcdef*) traditionnelle comme référence, les sites *a* et *d* sont principalement occupés par les résidus Leu et Ile, et les sites voisins *e* et *g* sont occupés par des résidus qui affinent efficacement le degré d'oligomérisation. Pour l'oligomère **IV.4**, les résidus *e* et *g* positionnés de part et d'autre du cœur hydrophobe, sont pourvus de grandes chaînes latérales Ile et Glu. Dans le cas de l'oligomère **IV.5**, ces sites sont occupés par un résidu Ser (site *g*) ainsi qu'un résidu Ala (site *e*). L'oligomère **IV.6** est lui pourvu de deux résidus Ala au niveau des sites *g* et *e*. Les structures cristallographiques des oligomères **IV.4**, **IV.5**, et **IV.6** souligne la variation du degré d'oligomérisation entre ces différents composés donnant accès à des faisceaux constitués de cinq à sept hélices (**Figure IV.140**). En résumé, plus le volume des chaînes latérales est faible au niveau des sites *e* et *g*, plus la valeur de l'angle d'interface hélice-hélice augmente et plus le faisceau possède une stoechiométrie élevée.[26]

| Composé | Stœchiométrie | Motif de répétition (<i>gabcde</i>) |
|-------------|---------------|---------------------------------------|
| IV.4 | Pentamère | ILQKIE |
| IV.5 | Hexamère | SLKEIA |
| IV.6 | Heptamère | ALKEIA |

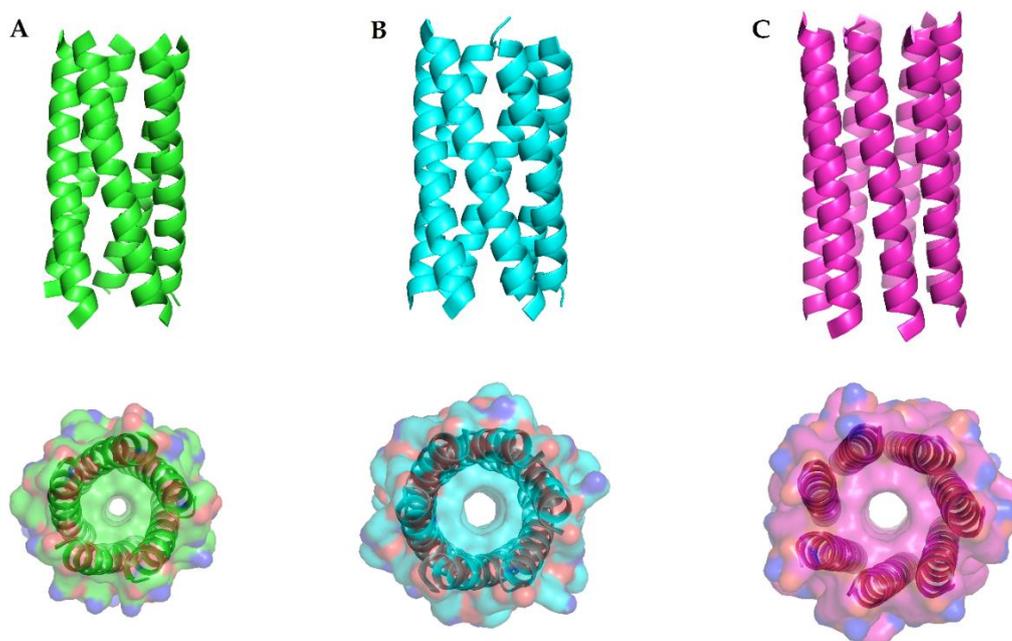


Figure IV.140 : Structures cristallographiques des faisceaux d'hélices conçus par de *novo design*: (A) pentamère : composé **IV.4** (PDB ID : 4PN8); (B) hexamère : composé **IV.5** (PDB ID : 4PN9); (C) heptamère : composé **IV.6** (PDB ID : 4PNA).[26]

3. Installation d'une triade catalytique dans la séquence de l'oligomère IV.6

Les structures, décrites précédemment, sont pourvues d'un pore central continu accessible qui tolère l'introduction de mutations,[27] ce qui fournit une base pour l'installation précise de résidus fonctionnels dans un environnement défini. En utilisant le tonneau à sept hélices parallèles : le composé **IV.6**, thermiquement très stable et pourvu un canal d'un diamètre de 8 Å,[26] Woolfson et son équipe ont démontré que de multiples mutations, située au niveau des résidus dont les chaînes latérales sont projetées à l'intérieur du canal, permettent d'installer une activité catalytique de type hydrolase pour cet assemblage en faisceau de 7 hélices parallèles (**Figure IV.141**). En effet l'insertion de la triade Cys-His-Glu à l'extrémité C-terminale conduit à une activité hydrolase comparable à celles obtenues avec des hydrolases modifiées (sans les cofacteurs métalliques). Ces travaux sont donc les premiers exemples de triades Cys-His-Glu pourvues d'une activité hydrolytique incorporée dans un cadre protéique conçu *de novo*.

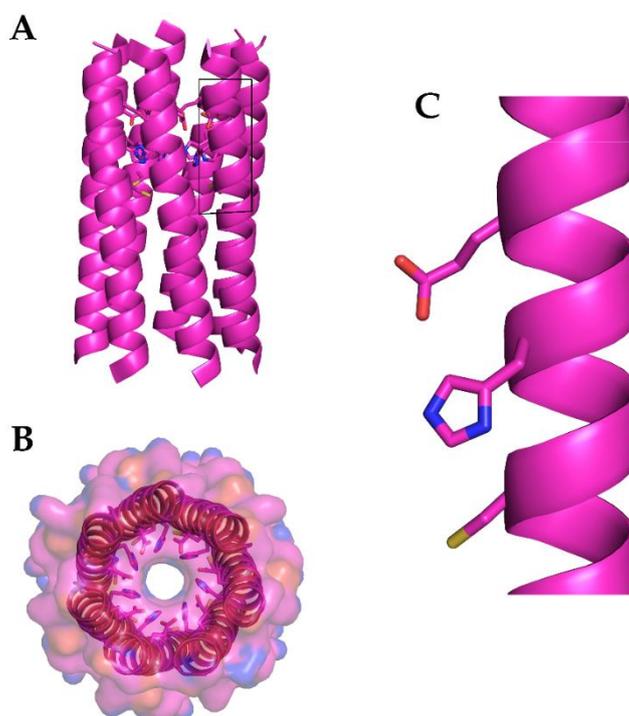


Figure IV.141 : Structure cristallographique du composé **IV.7** formant un assemblage de type tonneau (faisceaux de 7 hélices parallèles) conçus par *de novo design* pourvu d'une triade catalytique à l'extrémité C-terminale de la cavité hydrophobe ; **A**) : vue de face sur l'assemblage ; **B**) vue de dessus sur l'assemblage ; **C**) zoom sur la triade catalytique.

Le développement de systèmes à base de peptides α non naturels a permis d'étendre nos connaissances et donc notre compréhension des règles de structuration ainsi que de la capacité de ces objets à acquérir des fonctions biologiques. Cependant, la coopérativité mise en jeu est souvent difficile à prendre en compte dans sa globalité ce qui rend les prédictions difficiles. Le développement de foldamères constitue une alternative intéressante à ces problèmes. En effet, ces petits oligomères non naturels sont capables d'adopter une variété de conformations qu'il est *a priori* possible de prévoir. Dans quelques cas, ces objets permettent de s'affranchir en partie de la coopérativité dans le phénomène de repliement. Plusieurs exemples d'assemblages d'hélices foldamères conduisant à des structures quaternaires ont été décrits dans la littérature.

La conception de structures similaires avec des squelettes peptidiques non naturels représente donc un défi que certains chimistes ont entrepris de relever. Ces dernières années,

les équipes de recherche de Gellman, Schepartz ainsi que notre laboratoire se sont intéressés aux associations intermoléculaires de foldamères hélicoïdaux dans l'objectif de former des faisceaux d'hélices en milieu aqueux.

Deux approches différentes ont été développées pour répondre à cette problématique, l'une qualifiée de descendante « top-down » et l'autre d'ascendante « bottom-up ». L'approche descendante consiste à réaliser des modifications ponctuelles sur une séquence α -peptidique dérivant généralement d'une séquence naturelle capable de former des structures quaternaires bien définies. Un nombre limité de résidus d'acides aminés sont remplacés par leur pendant homologués (acides β aminés) en tentant de conserver, dans une large mesure, les propriétés de structuration et d'assemblage de la séquence peptidique naturelle. L'approche ascendante est, elle, basée sur la recherche *de novo* de foldamères possédant la capacité de s'assembler en faisceaux discrets d'hélices. L'exploitation des données structurales à haute résolution obtenues pour une famille de foldamères donnée adoptant une structuration hélicoïdale, a conduit à la conception d'objets amphiphiles susceptibles de former des assemblages en milieu aqueux organisés autour d'un cœur hydrophobe (à l'image des protéines naturelles).

IX. Approche descendante (top down) à partir d' α/β -peptides

1. Faisceaux d'hélices α/β -peptidiques

Gellman et équipe ont choisi l'approche descendante pour concevoir des faisceaux d'hélices composés d'une alternance régulière d'acides aminés α et β (de 25 à 33% de résidus β), comme cela a été décrit dans le chapitre 1 paragraphe [I.2.a)].

2. Assemblages hétérogènes entre foldamère α/β -peptidique et α -peptides

L'association d'hélices possédant des séquences complémentaires peut également conduire à la formation d'assemblages hétérogènes. En utilisant les séquences complémentaires **Acid-pLL** et **Base-pLL**, décrites par Kim, [28] connues pour s'associer sous forme d'un faisceau hétérotétramérique, Gellman et son équipe ont choisi, de façon analogue au travail réalisé sur les hélices GCN4, de substituer un acide α -aminé sur deux par des résidus d'acides β -aminés spécifiquement dans la séquence **Base-pLL** (**Figure IV.142**).[29] La formation d'une structure quaternaire hétérogène constituée de 4 hélices stabilisées par des interactions hydrophobes entre les chaînes latérales ainsi que par la formation de ponts salins a été caractérisée par deux techniques d'analyses distinctes. En effet, l'étude de la formation de ces structures a été réalisée par dichroïsme circulaire ainsi que par ultracentrifugation analytique sur un mélange d'**Acid-pLL** et de peptide α/β -**Base-pLL** dans une solution de tampon phosphate à pH 7.

| Composé | Séquences |
|----------------------------------|---|
| Base-pLL | A-Q-L-K-K-K-L-Q-A-L-K-K-K-L-A-Q-L-K-W-K-L-Q-A-L-K-K-K-L-A-Q |
| Acid-pLL | A-Q-L-E-K-E-L-Q-A-L-E-K-E-L-A-Q-L-E-W-E-L-Q-A-L-E-K-K-L-A-Q |
| α/β - Base-pLL | β^c -L- β^c -K- β^c -L- β^c -A- β^3 L-K- β^c -K-L-A- β^c -L- β^c -W- β^c -L- β^c -A- β^3 L-K- β^c -K-L-A- β^c |

Figure IV.142 : Séquences des peptides **Acid-pLL**, **Base-pLL** [28] et du mime peptidique α/β -**Base-pLL**. [29]

De la même manière Gellman et son équipe ont mimé la séquence d'un α -peptide dérivé du domaine de répétition d'heptade C-terminal de la protéine gp41 du VIH qui possède une très bonne efficacité antivirale (par inhibition de l'étape de fusion du virus), par un oligomère substitué selon une séquence $\alpha\alpha\beta\alpha\alpha\beta$. Les α/β -peptides correspondant (décrits dans le chapitre 1 paragraphe [II.2.]) ont la capacité de s'associer à un trimère d'hélices peptidique pour former un assemblage à 6 hélices.

Pour conclure, Gellman et son équipe ont donc développé une nouvelle stratégie descendante « *topdown* » efficace pour former des structures artificielles quaternaires discrètes. Cette approche a également conduit au développement d'inhibiteurs de fusion du virus VIH dans les cellules et pourrait être étendue à d'autres virus développant un mécanisme d'entrée similaire. Ces nouveaux peptides montrent des activités biologiques comparables à celles des α -peptides initiaux et présentent l'avantage d'offrir une bonne résistance à la protéolyse. Cette stratégie pourrait donc permettre le développement de nouveaux composés antiviraux à base de séquences hybrides α/β -peptidiques.

X. Approche ascendante (*bottom-up*) à partir de β -peptides

1. Premier design : hétéro-oligomère Acid-1F/Base-1F

Schepartz a utilisé la stratégie ascendante afin de concevoir des foldamères capables de s'assembler en faisceaux d'hélices. Les oligomères constitués d'acides aminés β^3 obtenus par homologation des acides aminés L naturels adoptent une conformation bien définie en hélice-14 gauche pourvue de 3 faces distinctes.[30] Schepartz et son équipe (Université de Yale) se sont servis des propriétés intrinsèques des hélices- β^3 afin de concevoir de petits oligomères amphiphiles capables de s'auto-assembler en milieu aqueux pour conduire à des structures quaternaires. La stratégie développée par le groupe de recherche a consisté à favoriser la formation d'un hétérodimère en positionnant deux résidus β^3 -homoomithine sur le composé **Base-1F** et deux acides β^3 -homoglutamique sur le composé **Acid-1F** au niveau des résidus 1 et 10. Des résidus β^3 -homoleucine (β^3 Leu) ont été introduits pour former une face hydrophobe. Afin de favoriser les interactions intermoléculaires tout en diminuant les phénomènes d'agrégations non-spécifiques, deux résidus β^3 -homophénylalanine (β^3 Phe) ont également été insérés dans la séquence. (**Figure IV.143**).[31] Afin de démontrer la stabilité de la formation de l'hétéro-oligomère, Schepartz et son équipe de recherche ont réalisé un mélange équimolaire des deux espèces **Base-1F** et **Acid-1F** qui a ensuite été mis en jeu dans des expériences en solution de dichroïsme circulaire et d'ultracentrifugation analytique. Ces analyses ont mis en évidence la formation de cet hétéro-oligomère. Néanmoins aucune structure à haute résolution de l'assemblage **Acid-1F/Base-1F** n'a été résolue à l'heure actuelle.

| Composé | Séquence |
|----------------|--|
| Base-1F | β^3 Orn- β^3 Leu- β^3 Orn- β^3 Phe- β^3 Leu- β^3 Asp- β^3 Phe- β^3 Leu- β^3 Orn- β^3 Orn- β^3 Leu- β^3 Asp |
| Acid-1F | β^3 Glu- β^3 Leu- β^3 Orn- β^3 Phe- β^3 Leu- β^3 Asp- β^3 Phe- β^3 Leu- β^3 Orn- β^3 Glu- β^3 Leu- β^3 Asp |

Figure IV.143 : Séquences des Acid-1F et Base-1F.[31]

2. Homo-oligomère Zwit-1F

A partir des séquences des composés **Acid-1F** et **Base-1F**, Schepartz et son équipe de recherche ont conçu un peptide- β dont la séquence a été remaniée : **Zwit-1F**. [32] Ce β -peptide de deuxième génération possède deux charges complémentaires (β^3 Orn et β^3 Glu) localisées sur une même face de l'hélice favorisant la formation d'un homo-oligomère. (**Figure IV.144**)

| Composé | Séquences |
|----------------|---|
| Zwit-1F | $\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}$ |

Figure IV.144 : Séquence de Zwit-1F.[32]

La structure cristallographique de **Zwit-1F** a été résolue mettant en évidence la formation d'une structure quaternaire constituée de huit hélices (Figure IV.145). C'est un assemblage original constitué de deux « mains » chacune pourvue de quatre hélices. Chaque « main » étant constituée de deux dimères parallèles orientés entre eux de manière antiparallèle. De manière analogue au phénomène guidant le repliement des protéines globulaires, ces hélices s'organisent autour d'un cœur hydrophobe. La stabilité thermodynamique de la structure octamérique formée par **Zwit-1F**, déterminée grâce à des études en solution, est comparable à la stabilité de faisceaux d'hélices α -peptidiques.

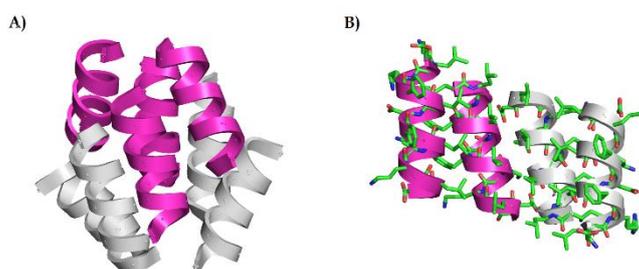


Figure IV.145: (A) Structure cristallographique du faisceau de 8 hélices de **Zwit-1F**, (B) « main » composée de deux dimères parallèles (l'un rose et l'autre gris) orientés de manière antiparallèle.[32]

La structure en faisceau de huit hélices complique de façon non négligeable l'interprétation des relations séquence/structuration étudiées. Afin de diminuer le degré d'oligomérisation du système, Schepartz et son équipe de recherche ont tenté de substituer les dimères parallèles constituant l'assemblage de **Zwit-1F** par une chaîne linéaire de 28 résidus capables de s'assembler en un faisceau constitué de quatre hélices reproduisant la structure de **Zwit-1F**. L'orientation relative des deux monomères a donc été inversée en substituant quatre dimères parallèles non covalents par quatre dimères antiparallèles covalents.[33]

| Composé | Séquences |
|----------------|---|
| Zwit-1F | $\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}$ |
| Z28 | $\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}$ $-\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}$ |

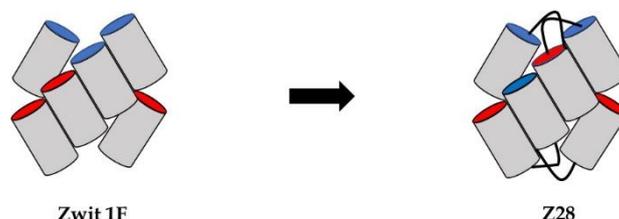


Figure IV.146 : Séquence de **Z28**. [33] Le sens des liaisons amide a été représenté par des flèches noires

Les expériences en solution de dichroïsme circulaire ainsi que l'étude de l'équilibre de sédimentation par ultracentrifugation analytique ont mis en évidence la capacité du composé

Z28 (Figure IV.146) à former un assemblage tétramérique légèrement plus stable que celui formé par son homologue **Zwit-1F**. Les expériences de fluorescence montrent que **Z28** est pourvu d'un cœur hydrophobe moins compact que celui de **Zwit-1F**.

Cependant, l'introduction d'un lien covalent entre les deux dimères antiparallèles diminue la flexibilité de l'assemblage ainsi que la capacité de la séquence à tolérer les mutations ponctuelles.

3. Optimisation du design du faisceau d'hélices

Afin d'optimiser la stabilité des assemblages générés par les séquences **Zwit-1F** et **Acid-1F** et de faire varier leur degré d'oligomérisation, Schepartz et son équipe de recherche ont choisi d'introduire de la diversification au niveau des chaînes latérales de ces composés (Figure IV.147).

| Composé | Séquence |
|------------------|---|
| Base-1F | $\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}$ |
| Acid-1F | $\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}$ |
| Zwit-1F | $\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}-\beta^3\text{Phe}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}$ |
| Acid-1Y | $\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Tyr}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}-\beta^3\text{Tyr}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}$ |
| Zwit-EYYO | $\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Tyr}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}-\beta^3\text{Tyr}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}$ |
| Zwit-EYYK | $\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Tyr}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}-\beta^3\text{Tyr}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Lys}-\beta^3\text{Leu}-\beta^3\text{Asp}$ |
| Zwit-VY | $\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Val}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Tyr}-\beta^3\text{Val}-\beta^3\text{Asp}-\beta^3\text{Tyr}-\beta^3\text{Val}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Val}-\beta^3\text{Asp}$ |
| Acid-VY | $\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Val}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Tyr}-\beta^3\text{Val}-\beta^3\text{Asp}-\beta^3\text{Tyr}-\beta^3\text{Val}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Val}-\beta^3\text{Asp}$ |
| Acid-IY | $\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Ile}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Tyr}-\beta^3\text{Ile}-\beta^3\text{Asp}-\beta^3\text{Tyr}-\beta^3\text{Ile}-\beta^3\text{Orn}-\beta^3\text{Glu}-\beta^3\text{Ile}-\beta^3\text{Asp}$ |

Figure IV.147 : Séquences des différents β -peptides testés [34][35][36][37]

Le complexe a ensuite pu être stabilisé via l'introduction de résidus $\beta^3\text{Tyr}$ (**Acid-1Y** [34] et **Zwit-EYYO** [35]). L'insertion de ces résidus conduit certainement à la formation de liaisons hydrogènes supplémentaires, relayées par des molécules d'eau. Les auteurs ont également souligné la variation des distances entre les atomes impliqués dans les ponts salins intermoléculaires de **Zwit-1F** en comparaison avec celles trouvées généralement dans les protéines naturelles. En effet, la distance mesurée entre l'atome d'azote de la fonction amine du résidu $\beta^3\text{Orn}_{10}$ d'une première hélice et l'atome d'oxygène de la fonction carbonyle du résidu $\beta^3\text{Asp}_{12}$ de l'hélice parallèle est de 5.9 Å (comparaison protéine naturelles : 5.0 Å). Le remplacement du résidu $\beta^3\text{Orn}_{10}$ par une $\beta^3\text{Lys}$ (**Zwit-EYYK** [35]) a conduit à une augmentation de la stabilité de l'assemblage. Schepartz et son équipe ont, en effet, choisi de faire varier la longueur de la chaîne latérale du résidu en position 10 impliqué dans une interaction électrostatique intermoléculaire. La structure cristallographique souligne la réduction de la distance (4.0Å) entre les atomes impliqués dans l'interaction électrostatique. Des études en solution couplées à la résolution de la structure cristallographique de l'assemblage octamérique soulignent la propension de l'objet à former une structure plus stable que celles obtenues précédemment (Figure IV.148).

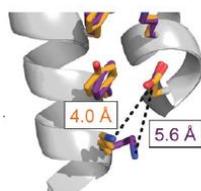


Figure IV.148 : Zoom de l'interface entre les hélices montrant le pont salin entre les résidus β Asp12 sur une hélice et β Lys10 sur l'hélice parallèle de **Zwit-EYYK** (orange), et le pont salin équivalent β Asp12- β Orn10 de **Zwit-1F** (violet).[35]

La stœchiométrie de l'assemblage a également pu être modulée, de la même façon que pour le peptide GCN4,[21] en échangeant les résidus hydrophobes de type leucine par des résidus β^3 Val (**Acid-VY** et **Zwit-VY**) [36] et β^3 Ile (**Acid-IY**).[37] Ces substitutions conduisent à une modification de la surface de contact des chaînes latérales des résidus dans le cœur hydrophobe. En l'absence de structure cristallographique, la caractérisation en solution a permis de montrer que ces oligomères s'assemblaient en faisceaux tétramériques stables et discrets.

4. Activité du faisceau d'hélices

Schepartz et son équipe ont ensuite cherché à développer le côté fonctionnel de ces systèmes et notamment les propriétés de reconnaissance de sucres, ou de métaux mais également de catalyse de réactions (**Figure IV.149**).

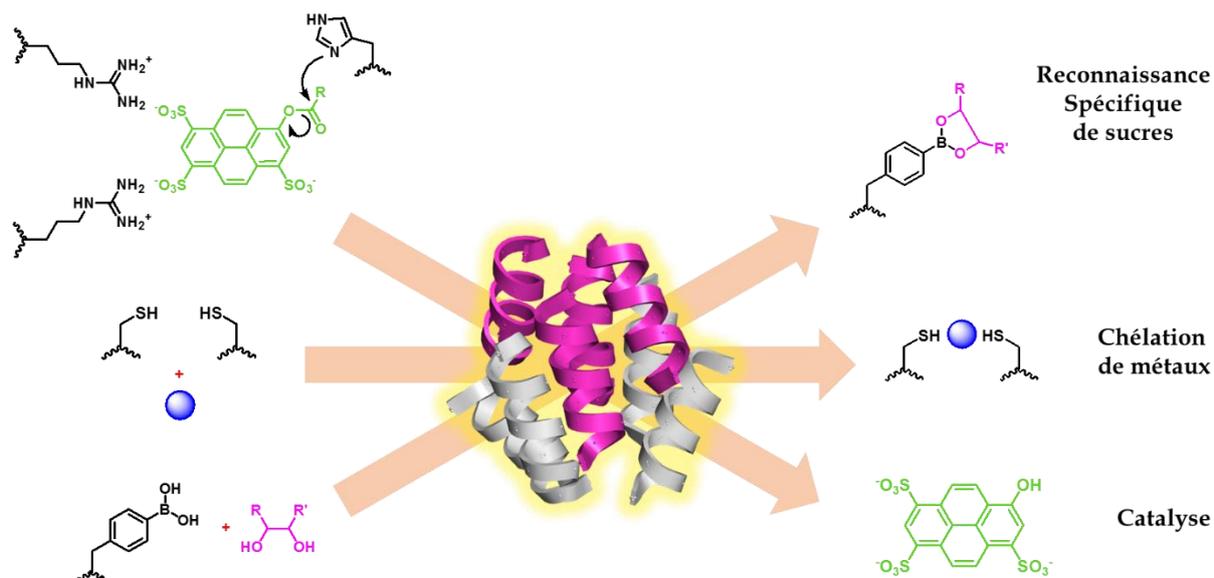


Figure IV.149 : Possibilité de fonctionnalisation d'un faisceau octamérique de β peptides pour lui conférer la capacité de reconnaître spécifiquement des sucres, de se lier aux métaux et d'être pourvu d'une activité catalytique.[38]

Dans les trois approches ce sont des variantes de **Zwit-EYYK** contenant différentes substitutions afin de moduler son potentiel d'interaction qui ont été utilisées.

a. Reconnaissance spécifique de sucres

Shepartz et son équipe ont choisi de substituer un résidu β^3 Tyr7 par un résidu 4-borono- β^3 -homophénylalanine (β^3 B).[39] En effet, en raison de la nature relativement faible des interactions protéine-sucre (constantes d'association dans le millimolaire), de nombreux récepteurs synthétiques de sucres exploitent les acides boroniques pour coordonner les diols et augmenter l'affinité du substrat.[40][41][42] En faisant varier la nature de la chaîne latérale

du résidu β en position 4, à proximité dans la structure tridimensionnelle de la chaîne latérale du résidu en position 7, il est possible de moduler l'affinité pour les molécules invitées testées comme le sorbitol. (Table IV.150).[43]

| Composé | β^3 Tyr4 | β^3 Tyr7 | Ka sorbitol (M ⁻¹) |
|-----------|----------------|----------------|--------------------------------|
| Zwit-EYYK | β^3 Tyr | β^3 Tyr | 77.1 ± 7.5 |
| Zwit-EYBK | β^3 Tyr | β^3 B | 43.8 ± 1.5 |
| Zwit-EOBK | β^3 Orn | β^3 B | 4620 ± 212 |
| Zwit-EKBK | β^3 Lys | β^3 B | 1040 ± 132 |
| Zwit-ERBK | β^3 Arg | β^3 B | 1660 ± 124 |
| Zwit-EQBK | β^3 Gln | β^3 B | 758 ± 68.1 |
| Zwit-EOYK | β^3 Orn | β^3 Orn | Pas détecté |

Table IV.150 : Table descriptive des analogues Zwit-EXBK et de leurs constantes d'association respectives pour le sorbitol.[43]

Cette spécificité d'interaction peut être exploitée pour de futures conceptions de lectines artificielles constituées de β peptides. Les affinités améliorées des β peptides EXBK pour le sorbitol mais aussi le fructose représentent une première étape vers le développement de glycosyl transférases sélectives et d'hydrolases composées entièrement d'acides aminés β ³. [43]

b. Chélation de métaux

La prévalence de sites de coordination de métaux riches en thiolate dans la nature, associée à la prédominance de métalloprotéines artificielles cystéine-dépendantes a inspiré la conception d'un faisceau β peptidique contenant des résidus β^3 -homocystéine (β^3 Cys), qui confèrent une activité de liaison aux ions métalliques.[44] En raison de la nucléophilie unique des cystéines thiols, le résidu β^3 Cys a été inséré à l'extrémité C-terminale de la séquence pour éviter la formation d'une thiolactone à cinq chaînons.[38] Par conséquent, afin de fonctionnaliser le faisceau **Zwit-EYYK** thermodynamiquement stable pour la liaison aux ions métalliques, le β^3 Cys a été ajouté à l'extrémité C-terminale en tant que treizième résidu, générant le composé **Zwit-YK-C**. [44] La propension du composé **Zwit-YK-C** à se lier à un panel de cations divalents, y compris Hg²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ et Cd²⁺, a été évaluée.[44] La coordination métallique n'a été détectée qu'en présence de Cd²⁺, occasionnant une signature spectroscopique UV-visible, caractéristique des complexes de thiolate coordonnées à deux ligands, avec un maximum d'absorbance à 230 nm. La liaison des ions Cd²⁺ améliore également la stabilité thermique du composé **Zwit-YK-C**, dont la température de déstructuration T_m (à 100 mM) est de 41,5 °C en l'absence de Cd²⁺, augmente à plus de 90 °C par addition de 30 mM de Cd²⁺. La préférence du composé **Zwit-YK-C** pour Cd²⁺ par rapport à d'autres ions métalliques met en évidence la sélectivité des faisceaux constitués d'hélices- β peptidiques pouvant être exploitée pour de futures conceptions de matériaux protéomimétiques.

c. Activité catalytique

L'octamère robuste **Zwit-EYYK** a de nouveau été utilisé comme brique de base pour la conception d'un β -peptide capable de catalyser une réaction modèle : l'hydrolyse du 8-acétoxy pyrène-1,3,6-trisulfonate (**1**) qui libère le produit fluorescent pyranine (**2**) lors du clivage de la liaison ester (**Figure IV.151**).[45]

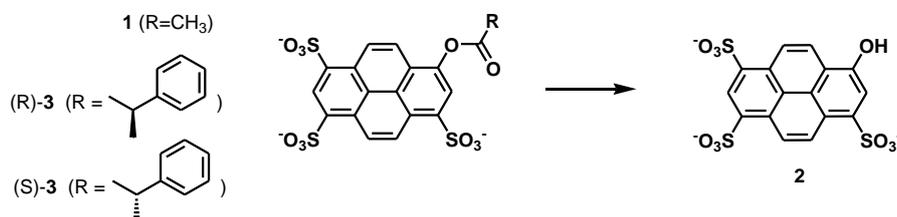


Figure IV.151 : Hydrolyse des esters de pyrène trisulfonate, la réaction modèle utilisée dans l'étude des estérases à base de β peptide.

Pour augmenter l'affinité de **Zwit-EYYK** pour le substrat **1** chargé négativement, les résidus β^3 Orn aux positions 3 et 9 ont été remplacés par β^3 -homoarginine (β^3 Arg). Afin d'instaurer l'activité catalytique d'hydrolase, un résidu α -histidine (α -His) a également été installé à l'extrémité N- ou C-terminale, évitant la rupture du de l'hélice-14. Ces modifications ont conduit à la synthèse de 2 composés : **Zwit- β Est-2** et **Zwit- β Est-2C** (**Figure IV.152**). De la même manière que pour le composé **Z28**, le composé **Zwit- β Est-2** a également été dimérisé par insertion d'un lien covalent poly β^3 -homoglycines avec une inversion de l'orientation des deux monomères, générant le composé **Zwit- β Est-28** (**Figure IV.152**).[45]

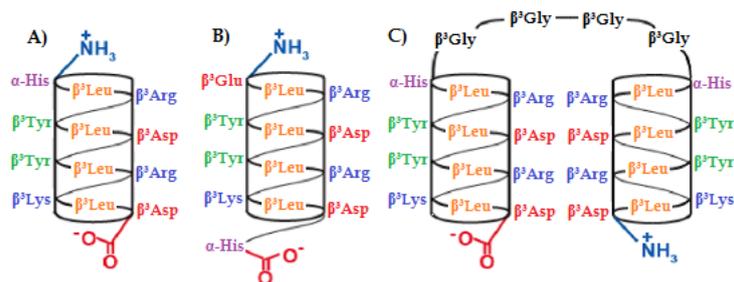


Figure IV.152 : Schéma des séquences : (A) **Zwit- β Est-2**; (B) **Zwit- β Est-2C**; (C) **Zwit- β Est-28**.[45]

En comparaison avec la réaction non catalysée pourvue d'un rapport $k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$ égal à 1, le composé **Zwit- β Est-2** augmente significativement la vitesse d'hydrolyse avec un rapport $k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$ égal à 588 ($k_{\text{cat}}/K_M = 54 \text{ M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), avec K_M représentant la constante de Michaelis-Menten. Globalement, ces constantes cinétiques sont comparables à celles d'un catalyseur dendritique de taille équivalente pour la même réaction ($k_{\text{cat}}/K_M = 120 \text{ M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; $k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}} = 340$).[46] En termes d'activité catalytique, **Zwit- β Est-2C** et **Zwit- β Est-28** sont beaucoup plus efficaces que **Zwit- β Est-2** pour catalyser l'hydrolyse de **1**, atteignant respectivement $k_{\text{cat}}/K_M = 98 \text{ M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ et $k_{\text{cat}}/K_M = 5102 \text{ M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ dans les mêmes conditions expérimentales.[45] L'amélioration des propriétés catalytiques des oligourées **Zwit- β Est-2C** et **Zwit- β Est-28** en comparaison avec **Zwit- β Est-2** résulte directement de la propension de ces composés à interagir avec le substrat **1** ($K_M = 4, 147$ et 345 mM pour **Zwit- β Est-28**, **Zwit- β Est-2C** et **Zwit- β Est-2**, respectivement). Ces résultats soulignent l'avantage d'un catalyseur possédant le faisceau quaternaire stabilisé. L'environnement chimique tridimensionnel complexe sur la surface de **Zwit- β Est-2C** confère un avantage supplémentaire sur ses propriétés catalytiques : l'énantiosélectivité. Entre les substrats énantiomères (R)-**3** et (S)-**3** (**Figure IV.151**), **Zwit- β Est-2C** accélère l'hydrolyse de (R)-**3** quatre fois plus que celle de (S)-**3**. [45] Globalement, la série de β -peptides pourvus d'une activité d'estérase décrite précédemment représentent une étape importante vers le développement de catalyseurs à base de foldamères.

XI. Approche ascendante (bottom-up) à partir d'oligourées

De la même manière, les oligourées adoptent des structures en hélices-2.5 particulièrement stables permettant de contrôler et de prévoir la position des chaînes latérales. C'est une stratégie ascendante qui a été mise en place au sein de notre laboratoire pour développer des hélices d'oligourées amphiphiles capables de former des structures quaternaires en milieu aqueux.[47] Les oligomères **IV.9** et **IV.8** ont été conçus pour permettre un assemblage dirigé par les chaînes latérales hydrophobes et générer des structures pourvues d'un cœur hydrophobe stabilisé par des ponts salins. La différence clé qui existe entre les composés **IV.9** et **IV.8** réside dans la répartition des chaînes latérales chargés/non-chargés des résidus urées (Figure **IV.153**).

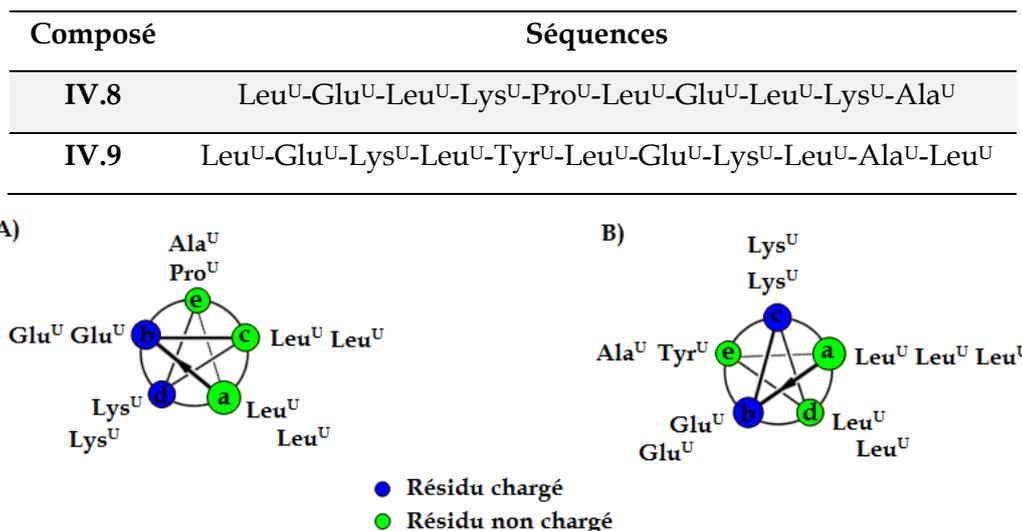


Figure IV.153 : (haut) Tableau descriptif des séquences des oligourées **IV.8** et **IV.9**. (bas) Schéma de la répartition des résidus suivant le motif pentade pour les hélices-2.5 : (A) l'oligourée **IV.8**; (B) oligourée **IV.9**.

Par analogie avec les peptides- α connus pour former des faisceaux d'hélices en milieu aqueux, l'oligomère **IV.9** contient une face hydrophobe constituée de deux positions continues (*a* et *d*) du motif de répétition en pentade, propre aux hélice-2.5 d'oligourée, constituée uniquement de résidus Leu^U. De chaque côté de cette face hydrophobe des résidus chargés ont été insérés ; un résidu Glu^U au niveau du site *b* et un résidu Lys^U au niveau du site *c*. La cinquième et dernière position *e*, située à l'opposé de la face hydrophobe, est composé soit d'un résidu Ala^U soit d'un résidu Tyr^U.

L'oligomère **IV.8** est pourvu d'une face hydrophobe plus étendue comprenant 3 positions continues (*a*, *c* et *e*), composées de Leu^U aux positions *a* et *c*, et des résidus Ala^U ou Pro^U au niveau du site *e*. Contrairement au résidu Pro acide aminé, le résidu Pro^U a été mis en évidence comme étant compatible avec la formation de l'hélice-2.5 d'oligourée.[48] Les positions *b* et *d* sont respectivement constituées de résidus Glu^U et Lys^U.

Des expériences en solution de dichroïsme circulaire faisant varier respectivement la concentration des oligomères **IV.9** et **IV.8** ont mis en évidence une dépendance à la concentration qui suggère la formation d'assemblages.[47] La résolution des structures cristallographiques de ces deux composés abonde également dans le sens des résultats obtenus en solution.

1. Caractérisation structurale de l'assemblage formé par l'oligomère IV.8

Les hélices d'oligourée **IV.8** s'organisent pour créer un assemblage de type canal étendu avec un pore hydrophile chargé pourvu d'un diamètre interne de 17 Å (

Figure IV.155).[47] La surface extérieure est, elle, constituée dans son intégralité de résidus hydrophobes : Leu^U, Ala^U, et Pro^U, qui s'assemblent de manière dense et précise. L'intérieur du pore est lui entièrement tapissé de résidus chargés Glu^U et Lys^U (**Figure IV.154**). La structure de type canal est constituée de deux super-hélices droites entrelacées. Chaque super-hélice est composée d'hélices d'oligourée individuelles interagissant entre elles de manière antiparallèle (avec 12 hélices d'oligourée par tour de super-hélice) via une combinaison d'interactions en chaînes hydrophobes et de ponts salins inter-hélices.

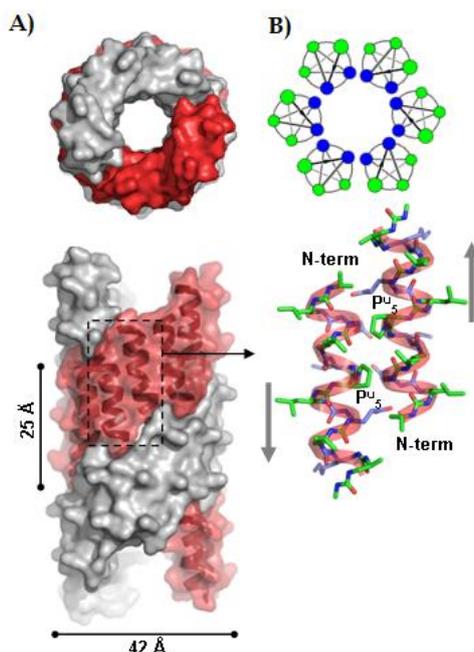


Figure IV.154 : (A) : Structure cristallographique de l'assemblage de type canal généré par les hélices d'oligourée **IV.8** (CCDC ID : 1030456). Les deux super helices qui constituent le canal ont été colorées de manière différentes (gris/rouge). Schéma représentatif de la répartition des résidus dans l'assemblage de type pore généré par les hélices-2.5 d'oligourée **IV.8**. (B) : Les résidus chargés sont représentés par des boules bleues et les résidus non chargés par des boules vertes.[47]

Le pore hydrophile du canal est très hydraté et la structure à l'état cristallin révèle la présence de molécules d'eau impliquées dans des interactions avec l'assemblage et également mobiles (

Figure IV.155). Cette preuve de mobilité moléculaire à l'intérieur du pore soulève la possibilité que de tels canaux puissent potentiellement être utiles dans le contexte de la conductance ionique sous réserve qu'ils puissent être reconstitués dans des membranes.[49]

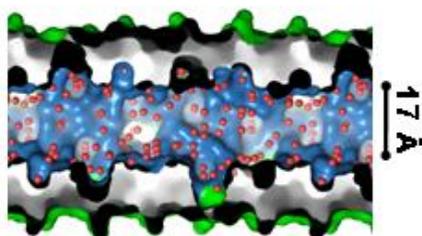


Figure IV.155 : La section transversale du canal généré par l'assemblage des hélice-2.5 d'oligourée IV.8 soulignant les dimensions et la structure globale du pore interne hydrophile. Les molécules d'eau sont représentées par des sphères rouges.[47]

2. Caractérisation structurale de l'assemblage formé par l'oligomère IV.9

La structure cristallographique de IV.9 révèle un faisceau constitué de six hélices d'oligourée canoniques bien définies, avec un cœur hydrophobe constitué de Leu^U ainsi qu'une surface hydrophile chargée (**Figure IV.156**).[47] L'effet hydrophobe joue un rôle clé dans la formation de cette structure quaternaire, avec toutes les chaînes latérales des résidus urées de type leucine, orientées vers le cœur central hydrophobe de l'assemblage, la majorité interagissant d'une manière rappelant fortement les interactions KIH à l'œuvre dans les assemblages peptides naturels, décrites précédemment dans ce chapitre. L'assemblage est formé à partir de trois dimères d'hélices IV.9. Chaque dimère est constitué de deux hélices antiparallèles maintenues ensemble par des interactions entre résidus Leu^U et par une liaison hydrogène entre l'amine de la chaîne latérale du résidu Lys^{U8} et la fonction carbonyle libre de la chaîne principale du résidu Leu^{U11} C-terminal. Les trois dimères interagissent principalement au travers d'interactions entre résidus Leu^U afin de former un faisceau hélicoïdal hexamérique discret complet, une stœchiométrie rare parmi les faisceaux hélicoïdaux α -peptidiques [23] et inédite parmi les faisceaux hélicoïdaux à base de foldamères. Curieusement, aucun pont salin n'a été observé à la surface du faisceau d'hélices d'oligourée, malgré l'insertion de quatre résidus chargés dans l'hélice, ce qui souligne le rôle important joué par l'effet hydrophobes dans l'assemblage du faisceau. La découverte d'une cavité isolée à l'intérieur du coeur hydrophobe du faisceau est également inattendue. La cavité possède un volume de 495,0 Å³ et est donc théoriquement bien adaptée à l'encapsulation de molécules hôtes dans la gamme de taille, par exemple, de composés pharmaceutiques.

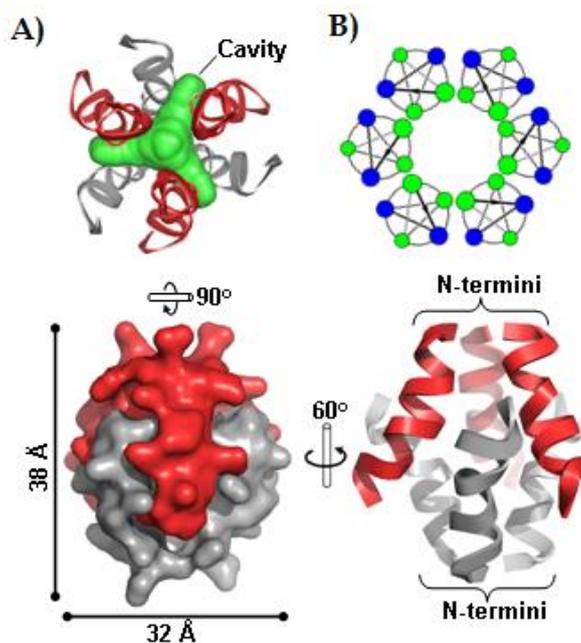


Figure IV.156 : (A) : Structure cristallographique de l'assemblage de type capsule généré par les hélices d'oligourée IV.9 (CCDC ID : 1030455). Les hélices ont été colorées en fonction de l'orientation de la chaîne principale. La cavité interne a été délimitée en vert (volume, 495,0 Å³, calculé en utilisant SURFNET49). (B) : Les résidus chargés ont été représentés par des boules bleues et les résidus non chargés par des boules vertes.[47]

a. Encapsulation de molécules hôtes dans la cavité de IV.9

Comme nous l'avons décrit précédemment dans ce chapitre, la cavité située à l'intérieur du cœur du faisceau hélicoïdal formée par l'oligomère IV.9, est principalement de nature hydrophobe avec un centre sphérique et trois tunnels projetant à 120° les uns des autres. De manière intéressante, l'extrémité de ces trois tunnels est davantage polaire car elle coïncide avec les groupements carbonyles des résidus Leu^{U6}. Des expériences de cristallographie ont été menées au sein du laboratoire par G. Collie visant à évaluer la capacité de la structure quaternaire inédite formée par l'oligomère IV.9 à encapsuler des molécules « invitées » : des alcools aliphatiques : isopropanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 2-éthoxyéthanol, 2-propoxyéthanol et 1,4-butanediol dont la fonction hydroxyle serait capable de s'ancrer par liaison hydrogène au carbonyle de Leu^{U6} à l'extrémité des tunnels (Figure IV.157).[50]

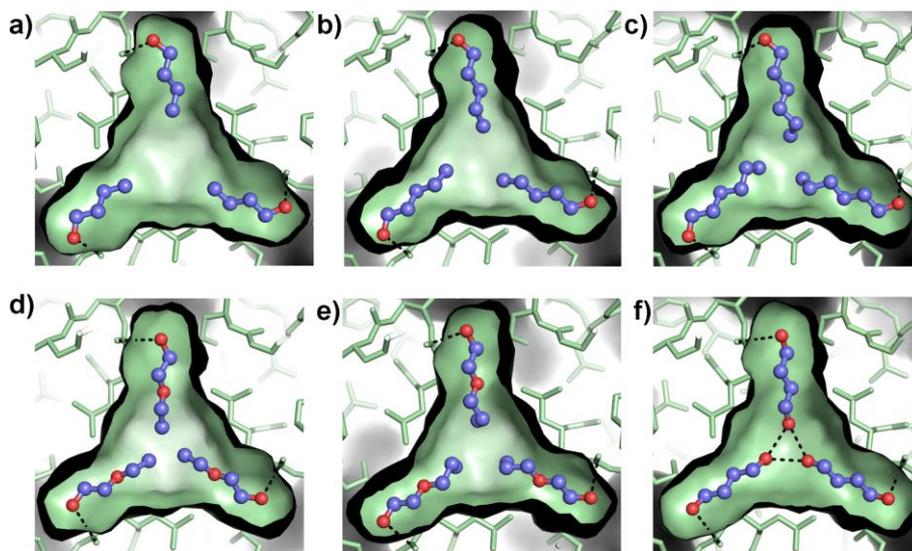


Figure IV.157 : Structures cristallographiques de l'assemblage formé par l'oligomère IV.9 en complexe avec différents alcools aliphatiques encapsulés dans la cavité hydrophobe de la structure : (a) : 1-butanol ; (b) : 1-pentanol ; (c) : 1-hexanol ; (d) : 2-éthoxyéthanol ; (e) : 2-propoxyéthanol ; (f) : 1,4-butanediol. Les liaisons hydrogène aux carbonyles ont été représentées par des tirets noirs.[50]

Ces données soulignent qu'il est possible de remplir la cavité de manière presque optimale. Cette étude montre aussi que le volume de la cavité varie légèrement en réponse à la taille et à la nature chimique des molécules invitées, évoquant l'image d'un faisceau hélicoïdal « respirant », en expansion ou en contraction, en réponse aux stimuli chimiques. Cette flexibilité structurale subtile du faisceau suggère que la cavité peut s'adapter à un certain degré aux molécules invitées.[50] Cette apparente dynamique et adaptabilité du système n'est pas nécessairement un inconvénient pour un système d'encapsulation, étant donné que certaines applications d'un tel système peuvent nécessiter un renouvellement élevé de l'invité (par exemple, dans le contexte de la catalyse) ou une libération d'invités actifs (par exemple, délivrance de principes actifs).

b. « Side Chain Scanning » IV.9

Sur la base de la structure cristalline à haute résolution du faisceau IV.9,[47][51] la majorité des chaînes latérales des résidus de type leucine participent à des interactions d'empilement clés de type KIH, le remplacement de ces résidus par des fragments non hydrophobes pourrait perturber la formation de faisceaux hélicoïdaux. Cependant, les résidus hydrophiles sont fréquemment localisés dans les régions hydrophobes des α -peptides impliqués dans les contacts hélice-hélice dans les faisceaux d'hélice.[52][53][54] Au sein du laboratoire, Caterina Lombardo a mené une étude visant à déterminer la flexibilité de

l'assemblage généré par le composé **IV.9** en synthétisant des mutants **IV.9-Asn^U** (Table **IV.158**).[55]

| Composé | Séquences |
|-------------------------------|---|
| IV.9 | Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U -Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Ala ^U -Leu ^U |
| IV.9-Asn^U1 | Asn^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U -Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Ala ^U -Leu ^U |
| IV.9-Asn^U4 | Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U - Asn^U -Tyr ^U -Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Ala ^U -Leu ^U |
| IV.9-Asn^U6 | Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U - Asn^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Ala ^U -Leu ^U |
| IV.9-Asn^U9 | Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U -Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U - Asn^U -Ala ^U -Leu ^U |
| IV.9-Asn^U11 | Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U -Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Ala ^U - Asn^U |

Table IV.158 : Table récapitulative des composés mutants **IV.9-Val^U**.

La propension des différents mutants **IV.9-Asn^U** à former des structures quaternaires discrètes en milieu aqueux a été évaluée via des expériences de RMN en solution ainsi que par des expériences de spectrométrie de masse native en phase gazeuse. Pour tous les composés mutants on observe que l'altération de la face hydrophobe des hélices perturbe systématiquement la capacité de ces composés à s'auto-assembler.[55]

Elle a ensuite choisi d'effectuer ce même type de substitution avec des résidus de type valine (Leu^U → Val^U) afin d'évaluer si ce type de modifications pouvait impacter le degré d'oligomérisation de l'assemblage formé par l'oligourée **IV.9** (Table **IV.159**).[55]

| Composé | Séquences |
|-------------------------------|---|
| IV.9 | Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U -Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Ala ^U -Leu ^U |
| IV.9-Val^U1 | Val^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U -Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Ala ^U -Leu ^U |
| IV.9-Val^U4 | Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U - Val^U -Tyr ^U -Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Ala ^U -Leu ^U |
| IV.9-Val^U6 | Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U - Val^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Ala ^U -Leu ^U |
| IV.9-Val^U9 | Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U -Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U - Val^U -Ala ^U -Leu ^U |
| IV.9-Val^U11 | Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U -Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Ala ^U - Val^U |

Table IV.159 : Table récapitulative des composés mutants **IV.9-Val^U**.

La plupart de ces mutants **IV.9-Val^U** maintiennent une capacité à former des faisceaux à six hélices et les structures cristallines obtenues dans les cas où le résidu Val^U est situé aux extrémités de la séquence montre que l'assemblage est peu altéré par cette modification.[55]

Compte tenu du nombre relativement limité de rapports décrivant des structures quaternaires assemblées à partir de polymères non naturels, il n'est pas surprenant que les règles régissant le repliement et l'assemblage des foldamères amphiphiles dans des conditions aqueuses soient moins bien comprises que celles régissant le repliement de polypeptides. Pourtant, des progrès vers la compréhension de l'auto-assemblage des foldamères restent nécessaires pour la construction contrôlée et dirigée d'entités précises, fonctionnelles et non naturelles dans des conditions aqueuses.

XII. Premiers designs dans l'objectif de former des architectures inédites à base d'hélices chimères.

Une autre façon de générer des assemblages pouvant conduire à des nanostructures originales en milieu aqueux est de combiner les propriétés de reconnaissance et d'assemblage des peptides et des oligourées au sein d'une même molécule. Les « foldamères à blocs » comme ceux décrits au cours des chapitres précédents sont des candidats intéressants pour créer de nouvelles séquences amphiphiles intégrant la distribution des chaînes latérales en heptade pour la partie peptidique et en pentade pour la partie oligourée. En effet, le motif de répétition en heptade propre à l'hélice α peptidique permet de couvrir une plus grande surface de projection des chaînes latérales en comparaison avec le motif de répétition en pentade caractéristique des hélices-2.5 d'oligourée (**Figure IV.160**). Cette caractéristique pourrait donc nous permettre de créer des positions clés contrôlant le degré d'oligomérisation de ces systèmes hybrides.

Nous avons choisi, dans un premier temps, de nous focaliser sur la conception d'un oligomère hydrosoluble pourvu d'une portion oligourée constituée de 6 résidus positionnée à l'extrémité N-terminale d'un heptapeptide. Nous avons utilisé une partie de la séquence (les six premiers résidus) de l'oligomère **IV.9**, décrite précédemment dans ce chapitre. Nous avons ensuite utilisé l'approche *de novo* et les connaissances sur les « coiled coils » peptidiques pour achever la conception de la portion peptidique de notre oligomère **IV.10** (**Figure IV.160**).

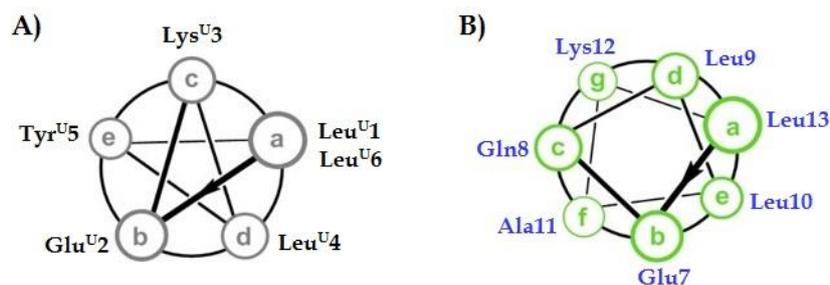


Figure IV.160 : Schémas représentatifs de la disposition des résidus de l'oligomère **IV.10** dans les motifs de répétition : (A) : en pentade caractéristique de l'hélice-2.5 d'oligourée (les résidus urées 1-6 sont représentés en gris), et (B) : en heptade caractéristique de l'hélice α peptidique (les résidus 7-13 acides aminés sont représentés en vert).

Par analogie avec les peptides α connus pour former des faisceaux d'hélices en milieu aqueux décrits précédemment dans ce chapitre, l'oligomère **IV.10** contient une face hydrophobe constituée de deux positions continues (*a* et *d*) du motif de répétition en pentade et de trois positions continues (*a*, *d* et *e*) du motif de répétition en heptade, constituée uniquement de résidus de type Leu (acide aminé et urée). De chaque côté de cette face hydrophobe des résidus chargés ont été insérés : un résidu de type Glu (acide aminé et urée) au niveau des sites *b* et un résidu Lys (acide aminé et urée) au niveau du site *c* (pentade) et *g* (heptade). Les positions *c* et *f* (heptade) ainsi que la position *e* (pentade), situées à l'opposé de la face hydrophobe, sont constituées respectivement d'un résidu Gln et d'un résidu Ala pour la portion peptidique et d'un résidu Tyr^U pour le segment oligourée. Nous avons réalisé une série d'expériences afin de déterminer la propension de l'oligomère **IV.10** à former des structures quaternaires discrètes en milieu aqueux.

1. Synthèse

La séquence ainsi que la masse, le temps de rétention HPLC et le rendement associé à la synthèse du premier « foldamère à bloc » hydrosoluble **IV.10**, évalué pour la formation de structures quaternaires en milieu aqueux, est listé **Figure IV.161**.

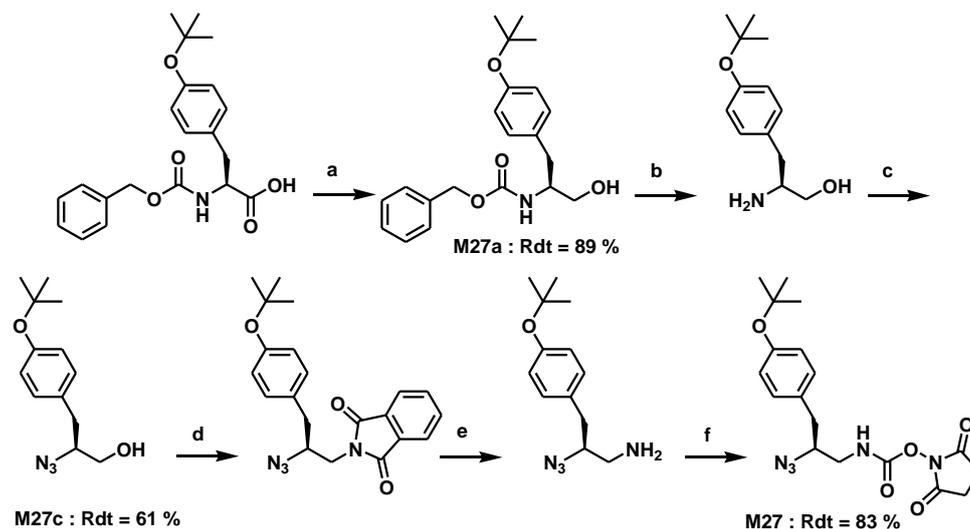
| Composé | Séquence | Rdt ^a | ESI-MS [M+3H] ³⁺ | HPLC t ^R (min) ^b |
|---------|---|------------------|--------------------------------|--|
| IV.10 | H-Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U -Leu ^U -Glu-Gln- Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-NH ₂ | 9 % | 583,00 | 5,98 |

Figure IV.161 : Séquence, masse, temps de rétention HPLC et rendement de la synthèse de l'oligomère **IV.10** issus de l'approche « foldamères à blocs » soluble en milieu aqueux. ^a rendement après purification HPLC ; ^b système RP-HPLC: gradient linéaire 10 à 100% de B en 10 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) and B (0,1% TFA dans CH₃CN), détection UV à 200 nm.

a. Synthèse des monomères d'éthylène diamine : azoture activés

La synthèse des monomères azoture activés **M1** (N₃-Ala^U-OSu), **M3** (N₃-Leu^U-OSu), **M5** (N₃-Lys(Boc)-OSu), et **M6** (N₃-Glu(OtBu)-OSu) a été décrite précédemment dans le chapitre 2.

Le carbamate activé dérivé de la tyrosine a été obtenu à partir de l'acide aminé protégé Z-L-Tyr(tBu-OH) suivant la *voie A* de synthèse des monomères d'azoture activés décrite dans le chapitre 2 [paragraphe II.1.a.i]. Dans ces conditions, le monomère activé **M27** dérivé de la tyrosine a été obtenu avec un rendement de 34% (**Figure IV.162**).



a : 1) EtOCOCl, NMM, THF, -20 °C ; 2) NaBH₄, H₂O ; **b** : H₂, Pd/C, MeOH, 25 °C ; **c** : N₃SO₂IM.HCl, K₂CO₃, CuSO₄.5H₂O, CH₃CN, H₂O, 25 °C ; **d** : PPh₃, DIAD, phthalimide, CH₂Cl₂, 25 °C ; **e** : N₂H₄, MeOH, 70 °C ; **f** : N, N'-Disuccinimide carbonate, CH₂Cl₂, 25 °C.

Figure IV.162 : Schéma de synthèse par la *voie A* du monomère azoture activé sous forme de carbamate de succinimide **M27**

b. Synthèse sur support solide des molécules chimères

La synthèse de l'oligomère chimère **IV.10** a été réalisée selon les conditions précédemment décrites dans le chapitre 2 [paragraphe II.1.b(1)].

Comme nous l'avons préalablement discuté dans les chapitres 2 et 3, l'insertion, à l'extrémité N-terminal d'une séquence peptidique, de monomères azoture activés sous forme de carbamate de succinimide est généralement plus problématique que les séquences chimères dans lesquelles le segment oligomère est situé à l'extrémité C-terminale du peptide. Malgré l'optimisation de la méthode de synthèse, une réduction partielle du résidu Tyr^{U6} est observée dans des proportions non-négligeables (40%).

Le chromatogramme HPLC de l'oligomère **IV.10** (**Figure IV.163**), avant purification par RP-HPLC semi-préparative, met en évidence la présence de deux produits majoritaires dont l'oligomère **IV.10** (temps de rétention : 5,95 minutes) ainsi que le produit issu de la réduction partielle de l'azoture du résidu Tyr^{U6} (temps de rétention : 5,83 minutes). Après purification par RP-HPLC semi préparative, 8,0 mg de l'oligomère **IV.10** ont été isolés et caractérisés.

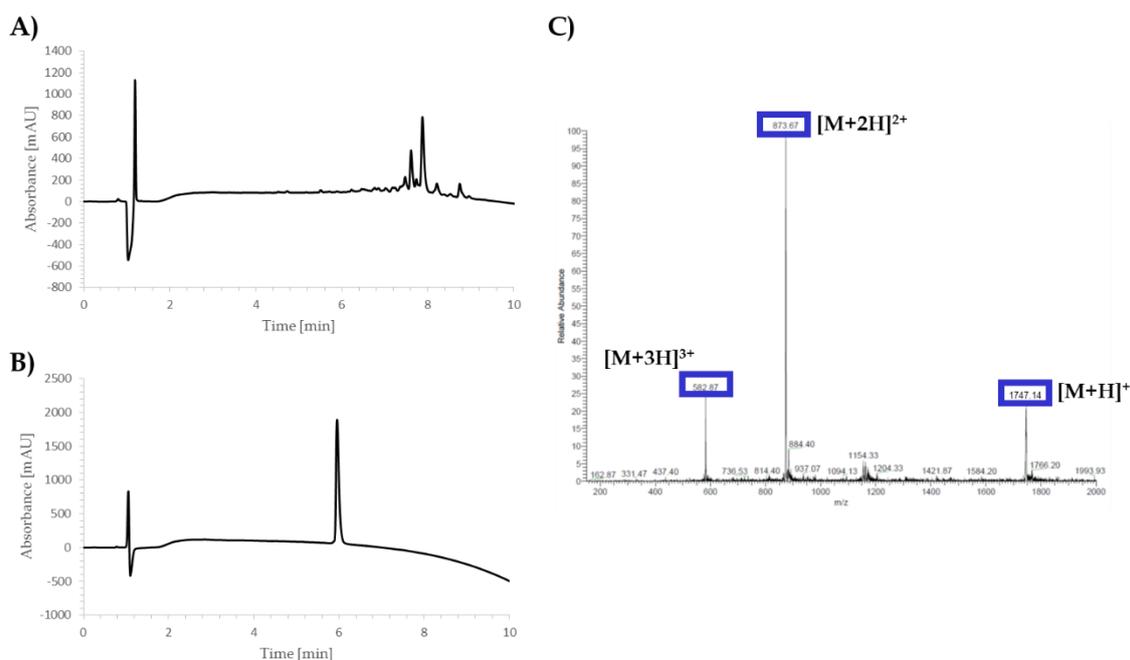


Figure IV.163 : Caractérisation de l'oligomère **IV.10** : A & B) chromatogramme HPLC de l'oligomère **IV.10** avant et après purification par RP-HPLC semi-préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 45 à 60% de B en 20 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans CH₃CN)] ; C) spectre de masse de l'oligomère **IV.10** purifié.

2. Etudes structurales à l'état solide

La molécule **IV.10** a pu être cristallisée par Gavin Collie au sein du groupe en utilisant la méthode de la goutte suspendue. Des monocristaux de qualité suffisante pour permettre une collecte ont été obtenus dans les conditions suivantes : 12% éthanol, 4% PEG400, 100 mM NaOAc, pH : 4,6. La structure a été résolue par remplacement moléculaire avec une résolution d'environ 1,3 Å en utilisant la conformation de l'oligomère chimère aliphatique **II.2** constitué de 13 résidus (6 urées + 7 acides aminés) comme modèle. La molécule **IV.10** a cristallisé dans le groupe d'espace *P* 3.

a. Caractérisation de la structure secondaire

i. Unité asymétrique

Un cristal est constitué par un assemblage de motifs qui se répètent périodiquement dans l'espace. L'ensemble de molécules qui suffit à décrire le cristal dans une maille est appelée l'unité asymétrique. La maille primitive ou simple est le motif géométrique le plus simple qui, en se répétant indéfiniment, constitue un réseau cristallin. Une maille peut contenir plusieurs unités asymétriques. Le groupe d'espace *P* 3, caractéristique des cristaux générés avec le composé **IV.10** signifie que l'unité asymétrique hexagonale se répète 3 fois dans la maille primitive (**Figure IV.164**).

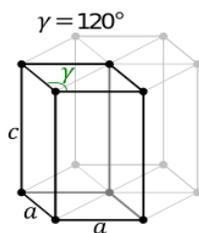


Figure IV.164 : Schéma de l'unité asymétrique hexagonale se répétant 3 fois dans la maille, caractéristique du groupe d'espace $P 3$.

L'unité asymétrique est ici composée de deux hélices parallèles qui s'assemblent via une interface hydrophobe composée de résidus de type leucine (urée et acide aminé). La molécule adopte effectivement une structure en hélice stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène à trois centres dans la portion oligourée, un réseau de liaison hydrogène à deux centres dans la portion peptidique ainsi que dans la zone de jonction entre les deux segments (**Figure IV.165**).

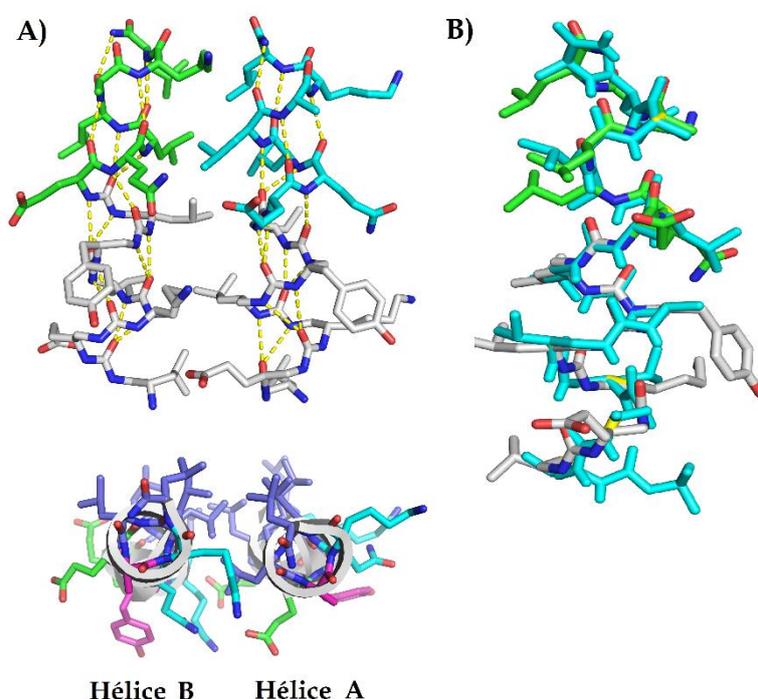


Figure IV.165 : a) Unité de maille cristallographique de la molécule **IV.10** vue de côté et de dessus ; b) Superposition des hélices **II.2** (bleu) et **IV.10** (urée : gris / peptide : vert) (RMSD 0,71 Å).

La structure est très similaire à celle observée pour la molécule **II.2**. Au niveau de la portion oligourée des hélices chimères **A** et **B** du composé **IV.10**, les valeurs d'angles dièdres le long du squelette sont du même ordre de grandeur que celles observées pour l'hélice chimère **II.2** soluble en milieu organique.[56] La portion peptidique de l'hélice **B** du composé **IV.10** adopte des valeurs d'angles dièdres proches de celles d'une hélice- 3_{10} peptidique, tout comme le composé **II.2** (**Table IV.167**). En revanche, la portion peptidique de l'hélice **A** du composé **IV.10** affiche des valeurs d'angles dièdres proches de celles de l'hélice α (**Table IV.167**). La distance moyenne N-O des liaisons hydrogène, au niveau de la portion urée, est légèrement plus petite en milieu aqueux avec une moyenne de 2,91 Å en comparaison avec celle de 3,00 Å du composé **II.2** soluble en milieu organique (**Table IV.166**). Une tendance qui s'inverse lorsqu'on se focalise sur le segment peptidique avec une distance moyenne N-O des liaisons hydrogène de 3,07 Å pour l'oligomère **IV.10** et de 3,00 Å pour l'oligomère **II.2** (**Table IV.166**).

| Liaisons CO-NH | distance des liaisons CO-N Hélice A | | distance des liaisons CO-N Hélice B | | nombre d'atomes/ pseudo-cycles |
|--|-------------------------------------|--------------|-------------------------------------|---------------|-----------------------------------|
| | | | | | |
| CO ₁ ---N'H ₃ CO ₁ ---NH ₄ | 3,0 Å | 3,1 Å | 3,0 Å | 2,8 Å | 12 14 |
| CO ₂ ---N'H ₄ CO ₂ ---NH ₅ | 3,0 Å | 3,0 Å | 2,7 Å | 2,6 Å | 12 14 |
| CO ₃ ---N'H ₅ CO ₃ ---NH ₆ | 2,9 Å | 2,9 Å | 3,1 Å | 2,9 Å | 12 14 |
| CO ₄ ---N'H ₆ CO ₄ ---NH ₇ | 2,8 Å | 3,0 Å | 2,8 Å | 3,0 Å | 12 14 |
| Moyenne portion urées | 2,92 Å | 3,0 Å | 2,9 Å | 2,82 Å | |
| CO ₅ ---NH ₈ | 3,0 Å | | 2,8 Å | | 12 |
| CO ₆ ---NH ₉ CO ₆ ---NH ₁₀ | 2,9 Å | 3,0 Å | 3,0 Å | 3,2 Å | 10 13 |
| CO ₇ ---NH ₁₁ | 2,9 Å | | 3,0 Å | | 13 |
| CO ₈ ---NH ₁₂ | 3,1 Å | | 3,2 Å | | 13 |
| CO ₉ ---NH ₁₃ | 3,1 Å | | 3,1 Å | | 13 |
| CO ₁₀ ---NH _{amide} | 3,1 Å | | 3,1 Å | | 13 |
| Moyenne portion peptide | 3,05 Å | | 3,1 Å | | |

Table IV.166 : Table des longueurs des liaisons hydrogène présentes dans les deux hélices de l'unité asymétrique de IV.10

| Résidus | Angles dièdre : Hélice A | | | | Angles dièdre : Hélice B | | | |
|-------------------|--------------------------|--------------|--------------|----------------|--------------------------|--------------|--------------|----------------|
| | Φ | θ1 | θ2 | Ψ | Φ | θ1 | θ2 | Ψ |
| Leu ^{U1} | - | 49,86 | 84,59 | -177,91 | - | 50,54 | 78,13 | -178,40 |
| Glu ^{U2} | -116,11 | 55,41 | 81,84 | -173,72 | -103,91 | 57,04 | 79,18 | -176,71 |
| Lys ^{U3} | -95,53 | 50,96 | 88,94 | -173,81 | -97,53 | 52,00 | 88,03 | -176,44 |
| Leu ^{U4} | -107,97 | 51,40 | 85,87 | -175,25 | -112,19 | 49,99 | 90,50 | -175,32 |
| Tyr ^{U5} | -107,29 | 57,08 | 76,59 | -174,90 | -101,51 | 51,56 | 89,23 | -172,68 |
| Leu ^{U6} | -83,31 | 50,03 | 92,41 | -174,55 | -104,14 | 51,47 | 82,62 | -171,32 |
| Moyenne | -102,04 | 52,45 | 85,04 | -174,02 | -103,86 | 52,10 | 84,62 | -175,14 |
| Glu ⁷ | -44,57 | - | - | -39,77 | -61,09 | - | - | -34,45 |
| Gln ⁸ | -64,62 | - | - | -38,48 | -63,84 | - | - | -38,59 |
| Leu ⁹ | -68,76 | - | - | -44,80 | -66,63 | - | - | -39,03 |
| Leu ¹⁰ | -60,20 | - | - | -32,03 | -65,49 | - | - | -41,06 |
| Ala ¹¹ | -74,61 | - | - | -42,30 | -57,67 | - | - | -41,72 |
| Lys ¹² | -56,88 | - | - | -43,84 | -68,33 | - | - | -31,15 |
| Leu ¹³ | -73,89 | - | - | -16,96 | -106,60 | - | - | 15,88 |
| Moyenne | -63,36 | - | - | -36,88 | -69,95 | - | - | -30,02 |

Table IV.167 : Table des valeurs d'angles dièdres de chaque résidu dans les deux hélices de l'unité asymétrique de IV.10.

ii. Interactions intermoléculaires dans l'unité asymétrique

D'autres interactions intermoléculaires entrent en jeu dans l'assemblage de ces deux molécules. Le positionnement des chaînes latérales permet notamment la formation d'un pont salin intermoléculaire entre l'azote N-terminal du résidu Leu^{U1} et le carboxylate du résidu Glu^{U2} avec une distance $d(N,O)$ de 3,8 Å (**Figure IV.168**). Le proton amide porté par la chaîne

latérale du résidu Gln8 et le carbonyle porté par la chaîne latérale du résidu Glu7 sont correctement orientés pour former une liaison H mais la distance $d(N,O) \approx 4,0 \text{ \AA}$ est un peu trop élevée (**Figure IV.168**).

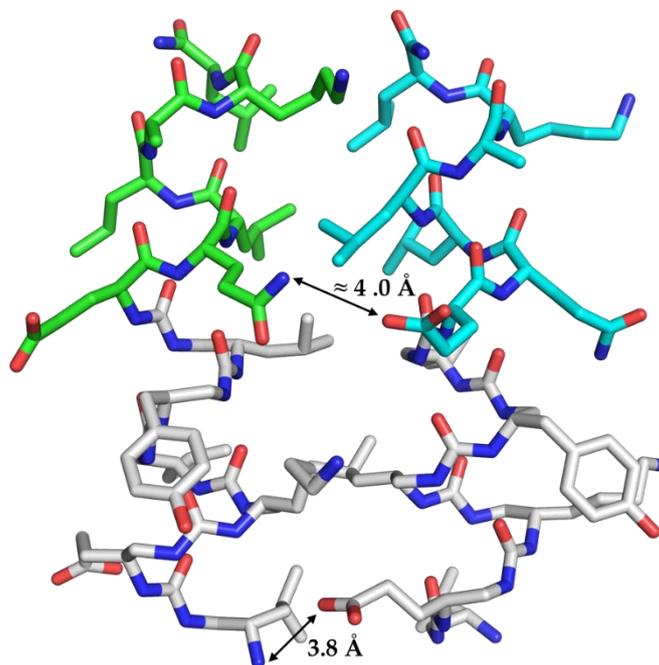


Figure IV.168 : pont salin entre les deux hélices de l'unité asymétrique dans le cristal de **IV.10**

a) Détail de l'assemblage supramoléculaire des hélices dans le cristal **IV.10**

La structure cristallographique de l'oligomère **IV.10** révèle un faisceau d'hélices cylindriques formé à partir de six hélices hybrides bien définies résultant de l'assemblage discret autour de l'axe d'ordre 3, des paires d'hélices (dimères parallèles) décrites précédemment. Cette architecture est principalement dirigée par les interactions entre chaînes latérales hydrophobes et stabilisée par des interactions électrostatiques comme le pont salin évoqué précédemment entre l'azote N-terminal du résidu Leu^{U1} et le carboxylate du résidu Glu^{U2}. Un deuxième pont salin est également présent entre le carboxylate du résidu Glu^{U7} et l'ammonium de Lys^{U3} avec une distance $d(N,O)$ de $3,4 \text{ \AA}$. La face hydrophobe est constituée par les résidus de type leucine aux positions *a* et *e* de la portion peptidique et *a* et *d* de la portion oligourée. L'assemblage conduit à la formation d'une structure en tonneau formée par 6 hélices parallèles. L'intérieur du tonneau est hydrophobe et composé de chaînes latérales dérivées de la leucine (en violet sur la **Figure IV.169**), alors que la surface extérieure est hydrophile et composée de chaînes de type tyrosine, alanine (en rose), glutamine, lysine (bleu) et acide glutamique (en vert).

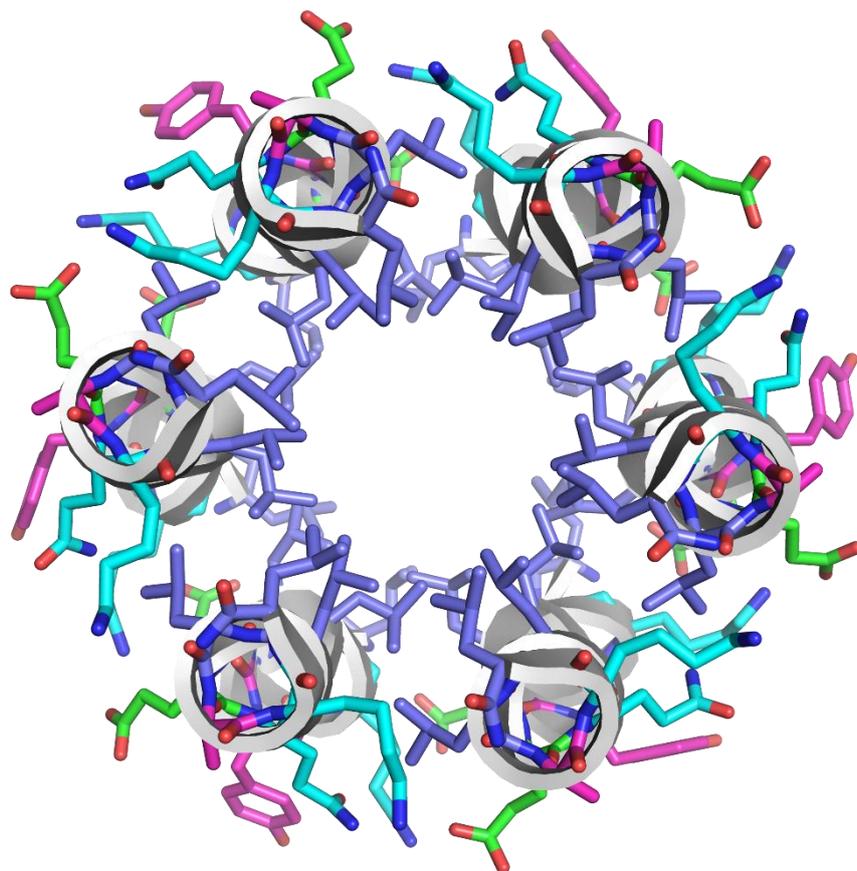


Figure IV.169 : Auto-assemblage des oligomères **IV.10** dans le cristal.

Cet assemblage à six hélices est très similaire aux assemblages peptidiques de type tonneau α obtenus par le groupe de Woolfson en utilisant l'approche *de novo* décrites précédemment dans ce chapitre. Les interactions entre chaînes latérales hydrophobes semblent jouer un rôle déterminant dans l'assemblage des faisceaux hélicoïdaux, la majorité des chaînes latérales de type leucine étant orientées vers le cœur du faisceau hydrophobe et étant imbriquées d'une manière qui rappelle fortement les interactions KIH de faisceaux hélicoïdaux peptidiques.

A la différence des tonneaux peptidiques, le pore généré par l'assemblage des 6 hélices n'est pas parfaitement cylindrique. Cette forme inédite est propre aux « foldamères à blocs ». En effet, le diamètre maximal de la cavité (10,6 Å) correspond à l'extrémité N-terminale de l'oligomère **IV.10** (oligourée) alors qu'à l'extrémité C-terminale de l'oligomère **IV.10** (peptidique) le pore est plus étroit avec un diamètre moyen de 9,1 Å. Compte tenu de cette variation de diamètre, la géométrie du pore semble plus proche d'un cône tronqué que d'un cylindre.

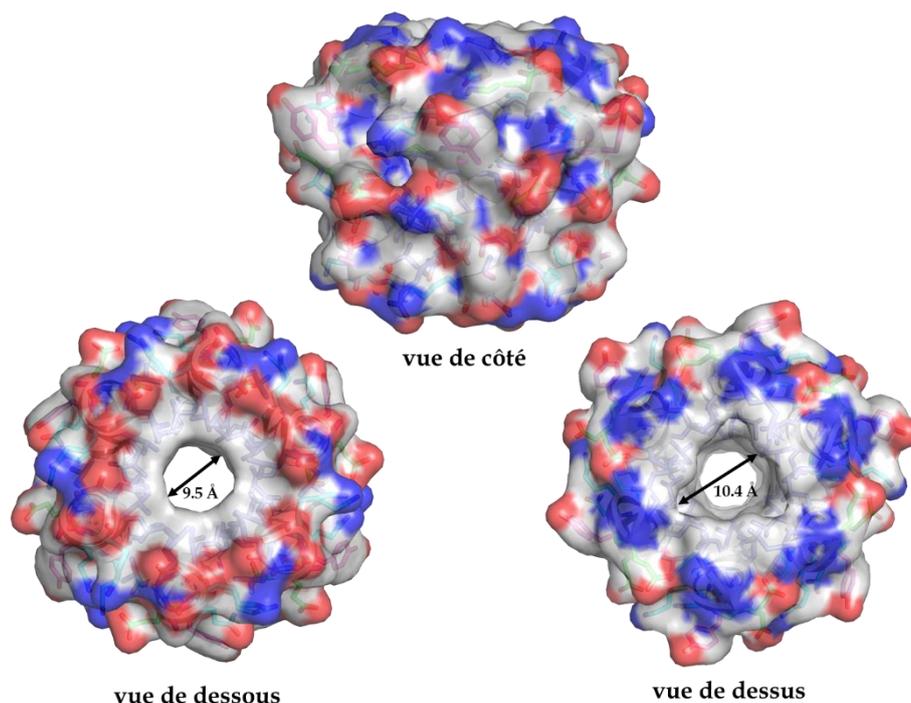


Figure IV.170 : Assemblage quaternaire de type tonneau de l'oligomère IV.10 dans le cristal.

3. Caractérisation des espèces multimériques par spectrométrie de masse en conditions natives

Le degré d'oligomérisation souligné par la structure cristallographique discutée précédemment a également été étudié par des expériences de spectrométrie de masse à ionisation par électrospray natif (ESI-MS), une technique bien adaptée à la détection et l'étude d'assemblages quaternaires.[57][58] L'analyse de MS-ESI native d'une solution d'oligomère IV.10 à 200 μM (dans l'eau) révèle une espèce multimérique prédominante avec un rapport m/z de 2097,50 attribué sans ambiguïté à l'espèce hexamérique $[6\times\text{IV.10}]^{5+}$, et donc en accord avec la structure cristallographique discutée précédemment (Figure IV.171). Cette expérience souligne également la présence de deux autres multimères, dans des proportions moins importantes, avec un rapport m/z de 2039,34 et de 2184,83 attribué respectivement à l'espèce heptamérique $[7\times\text{IV.10}]^{6+}$ et à l'espèce pentamérique $[5\times\text{IV.10}]^{4+}$.

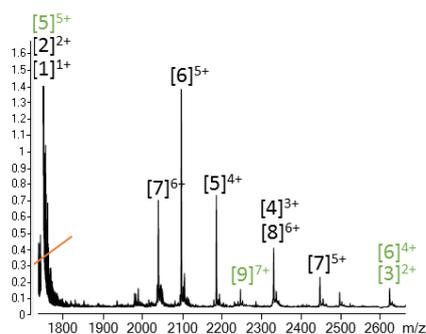


Figure IV.171 : Spectre représentatif des expériences de spectrométrie de masse natives MS-ESI menées sur le composé IV.10.

La structure cristalline de l'oligomère IV.10 ainsi que les expériences de spectrométrie de masse native conduite sur l'oligomère IV.10 semblent confirmer la capacité des « foldamères à blocs » à former des structures quaternaires discrètes en milieu aqueux. La

portion peptidique des « foldamères à blocs » semble donc impacter de façon importante le mode d'assemblage des oligourées et la nature de l'assemblage résultant. En effet, même si la stœchiométrie finale de la structure quaternaire discrète générée par l'assemblage des hélices oligourée **IV.9** est conservée, la géométrie des deux objets diffère fortement. Cette différence s'explique notamment par les modes de stabilisation de ces assemblages. Contrairement au composé **IV.9** dont la formation est très largement dirigée par les chaînes hydrophobes, la structure quaternaire de l'oligomère **IV.10** est conduite par des interactions hydrophobes et stabilisée par la formation d'environ une dizaine de ponts salins. Afin d'affiner notre compréhension des règles de structuration quaternaire en milieu aqueux de cet objet nous avons étudié l'effet des mutations ponctuelles sur la stabilité et la stœchiométrie de l'assemblage.

XIII. Modulation de l'assemblage à 6 hélices parallèles par l'introduction de mutations ponctuelles

Dans cette deuxième partie nous avons souhaité évaluer l'impact de variations de séquences par l'introduction de mutations ponctuelles dans la portion peptidique sur le produit d'assemblage et notamment sur la stabilité et la stœchiométrie du tonneau à 6 hélices parallèles formé par **IV.10**.

L'oligomère **IV.11** a été conçu dans le but de stabiliser la structure quaternaire générée par l'oligomère **IV.10**. La structure cristallographique issue de l'assemblage des hélices de l'oligomère **IV.10** a montré que la distance $d(N,O)$ au niveau des résidus Glu7 et Gln8 ne permettait pas la formation d'une liaison H entre ces résidus. De plus il n'y a pas d'interaction polaire spécifique entre les extrémités C-terminales. Afin de favoriser des interactions entre les résidus 7 et 8 ainsi qu'entre le résidu 12 et l'extrémité carboxamide, les résidus Gln8 et Lys12 ont été intervertis (Figure **IV.172**).

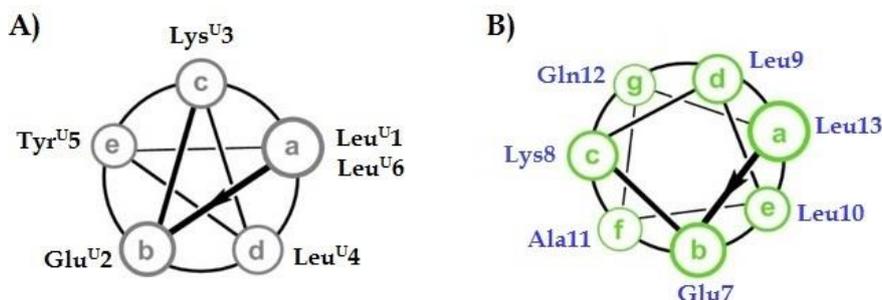


Figure IV.172 : Schémas représentatifs de la disposition des résidus de l'oligomère **IV.11** dans les motifs de répétition : (A) : en pentade caractéristique de l'hélice-2.5 d'oligourée (les résidus urées 1-6 ont été représentés en gris), et (B) : en heptade caractéristique de l'hélice α peptidique (les résidus acides aminés 7-13 ont été représentés en vert).

Nous avons réalisé une série d'expériences afin de déterminer la propension de l'oligomère **IV.11** à former des structures quaternaires discrètes en milieu aqueux.

1. Synthèse

La séquence ainsi que la masse, le temps de rétention HPLC et le rendement associé à la synthèse du « foldamère à bloc » hydrosoluble **IV.11**, formant potentiellement des assemblages d'hélices en milieu aqueux est listé **Figure IV.173**.

| Composé | Séquence | Rdt ^a | ESI-MS [M+3H] ³⁺ | HPLC t ^R (min) ^b |
|---------|--|------------------|--------------------------------|--|
| IV.11 | H-Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U -Leu ^U - <u>Glu-Lys-Leu-Leu-Ala-Gln-Leu</u> -NH ₂ | 7 % | 583,07 | 6,75 |

Figure IV.173 : Séquence, masse, temps de rétention HPLC et rendement de la synthèse du « foldamère à blocs » analogue de la séquence **IV.10** soluble en milieu aqueux. Les résidus mutés ont été soulignés en bleu. ^a Rendement après purification HPLC ; ^b système RP-HPLC: gradient linéaire 10 à 100% de B en 10 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) and B (0,1% TFA dans CH₃CN), détection UV à 200 nm.

a. Synthèse sur support solide des molécules chimères

La synthèse de l'oligomère chimère **IV.11** a été réalisée selon les conditions précédemment décrites dans le chapitre 2 [paragraphe II.1.b)(1)].

La synthèse du composé **IV.11** est similaire à celle de l'oligomère **IV.10** mettant en évidence les mêmes phénomènes de réduction partielle. Plusieurs de ces sous-produits, dans des proportions non-négligeables (60%), ont été observés. Le chromatogramme HPLC de l'oligomère **IV.11** (**Figure IV.174**), avant purification par RP-HPLC semi-préparative, met en évidence la formation du produit attendu **IV.11** comme produit majoritaire (temps de rétention : 6,63 minutes) et plusieurs produits de délétion résultant d'une réduction partielle du résidu Lys^{U3} (temps de rétention : 6,57 minutes) du résidu Tyr^{U5} (temps de rétention : 6,49 minutes) et du résidu Leu^{U6} (temps de rétention : 6,37 minutes). Après purification par RP-HPLC semi-préparative, 10,0 mg de l'oligomère **IV.11** ont été obtenus.

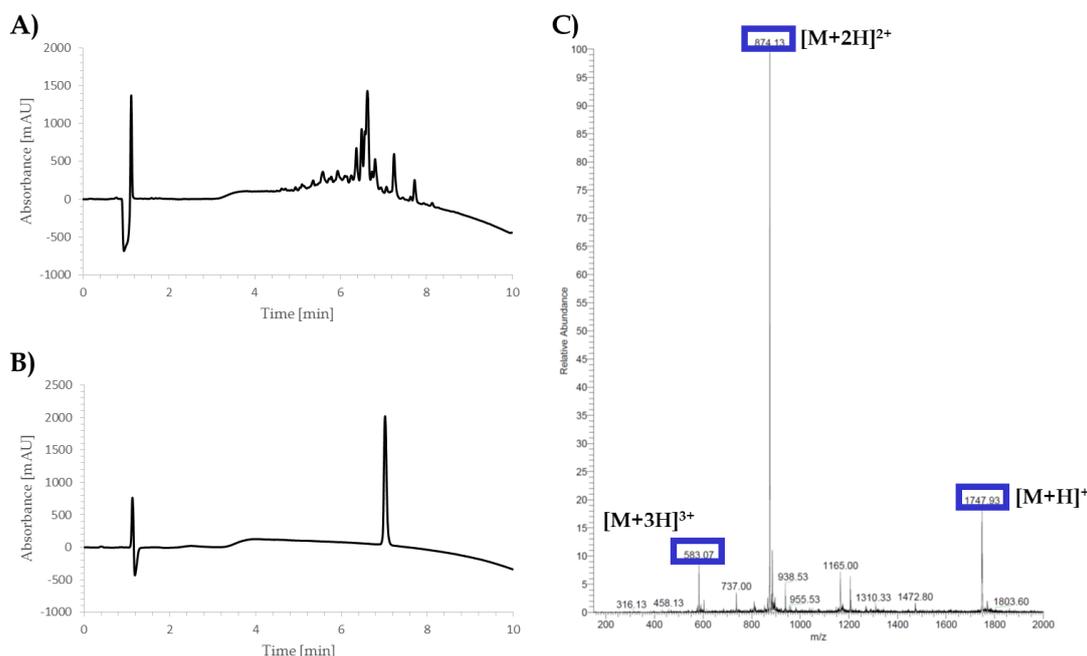


Figure IV.174 : Caractérisation de l'oligomère **IV.11**. Chromatogrammes HPLC de l'oligomère **IV.11** avant (A) et après (B) purification par RP-HPLC semi-préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 40 à 55% de B en 20 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans CH₃CN)] ; C) spectre de masse de l'oligomère **IV.11** après purification.

2. Etudes structurales à l'état solide

La molécule **IV.11** a été cristallisée par G. Collie en utilisant la méthode de la goutte suspendue et des conditions de cristallisation très proches de celles utilisées pour l'oligomère

IV.10 : 5% éthanol, 5% PEG400, 100 mM NaOAc, pH : 4,6. La structure a été résolue par remplacement moléculaire avec une résolution d'environ 1,84 Å en utilisant la conformation de l'oligomère **IV.10**, décrit précédemment dans ce chapitre [paragraphe III.2.], comme modèle. Comme **IV.10**, la molécule **IV.11** a cristallisé dans le groupe d'espace $P 3$.

a. Caractérisation de la structure secondaire

i. Unité asymétrique

On retrouve deux molécules indépendantes dans l'unité asymétrique comme pour l'oligomère **IV.10**, décrit précédemment dans ce chapitre paragraphe [V.2.a.i.] (**Figure IV.175**).

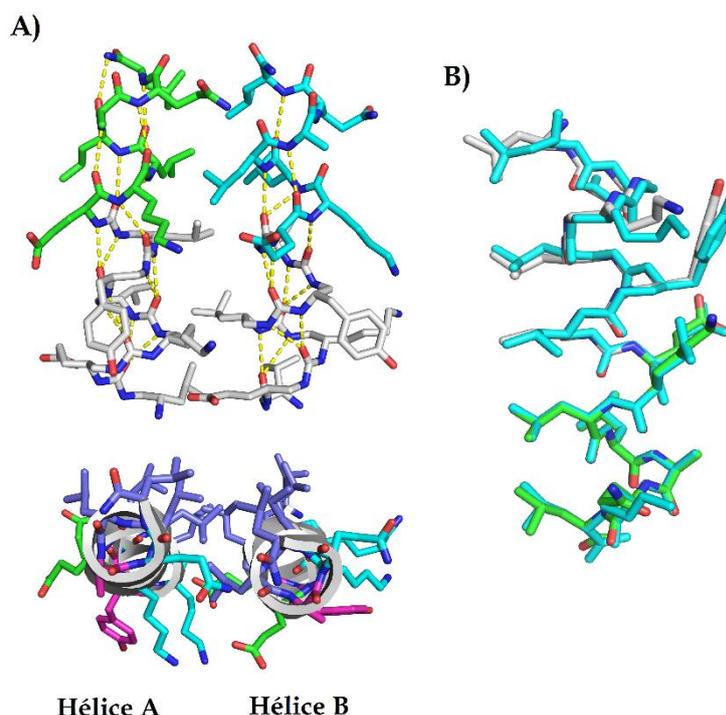


Figure IV.175 : a) Unité de maille cristallographique de la molécule **IV.11** vue de côté et de dessus ; b) Superposition de l'hélice **IV.10** (bleu) et **IV.11** (urée : gris / peptide : vert) (RMSD 0,067 Å).

Les deux molécules adoptent une conformation hélicoïdale très similaire aux hélices *A* et *B* du composé **IV.10**. Les angles dièdres de la chaîne principale des hélices *A* et *B* de l'oligomère **IV.11** adoptent des valeurs similaires à celles décrites dans ce chapitre paragraphe [V.2.a.i.] pour l'oligomère **IV.10** (**Table IV.177**). Les distances moyennes $d(\text{N-O})$ des liaisons hydrogène intramoléculaires, au niveau de la portion urée, sont très proches avec une moyenne de 2,92 Å à celles dans **IV.10**. En revanche, on observe une tendance à la diminution des distances $d(\text{N-O})$ des liaisons hydrogène lorsqu'on se focalise sur le segment peptidique, avec une distance moyenne N-O des liaisons hydrogène de 3,03 Å pour l'oligomère **IV.11** et de 3,07 Å pour l'oligomère **IV.10**.

| Liaisons CO-NH | distance des liaisons CO-NH | | distance des liaisons CO-NH | | nombre d'atomes pseudo-cycles |
|--|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|-------------------------------|
| | Hélice A | | Hélice B | | |
| CO ₁ ---N'H ₃ CO ₁ ---NH ₄ | 3.1 Å | 3.1 Å | 3.0 Å | 3.0 Å | 12 14 |
| CO ₂ ---N'H ₄ CO ₂ ---NH ₅ | 2.7 Å | 2.8 Å | 2.9 Å | 2.7 Å | 12 14 |
| CO ₃ ---N'H ₅ CO ₃ ---NH ₆ | 2.9 Å | 2.9 Å | 3.1 Å | 2.9 Å | 12 14 |
| CO ₄ ---N'H ₆ CO ₄ ---NH ₇ | 2.8 Å | 3.2 Å | 2.8 Å | 2.9 Å | 12 14 |
| Moyenne portion urées | 2.87 Å | 3.00 Å | 2.95 Å | 2.87 Å | |
| CO ₅ ---NH ₈ | 3.0 Å | | 2.9 Å | | 12 |
| CO ₆ ---NH ₉ CO ₆ ---NH ₁₀ | 2.9 Å | 3.0 Å | 3.0 Å | 3.1 Å | 10 13 |
| CO ₇ ---NH ₁₁ | 2.9 Å | | 3.0 Å | | 13 |
| CO ₈ ---NH ₁₂ | 3.2 Å | | 3.1 Å | | 13 |
| CO ₉ ---NH ₁₃ | 3.1 Å | | 3.0 Å | | 13 |
| CO ₁₁ ---NH _{amide} | 3.0 Å | | 3.0 Å | | 10 |
| Moyenne portion peptide | 3.05 Å | | 3.02 Å | | |

Table IV.176 : Table des longueurs des liaisons hydrogène présentes dans les deux hélices de l'unité asymétrique de IV.11

| Résidus | Angles dièdres : Hélice A | | | | Angles dièdres : Hélice B | | | |
|--------------------|---------------------------|--------------|--------------|----------------|---------------------------|--------------|--------------|----------------|
| | Φ | θ1 | θ2 | Ψ | Φ | θ1 | θ2 | Ψ |
| Leu ^U 1 | - | 49.86 | 84.58 | -177.95 | - | 50.54 | 78.13 | -178.40 |
| Glu ^U 2 | -116.13 | 55.41 | 81.84 | -173.73 | -103.91 | 57.04 | 79.18 | -176.71 |
| Lys ^U 3 | -95.50 | 50.94 | 88.98 | -173.82 | -97.53 | 52.00 | 88.03 | -176.44 |
| Leu ^U 4 | -107.99 | 51.42 | 85.83 | -175.23 | -112.19 | 49.99 | 90.50 | -175.32 |
| Tyr ^U 5 | -107.27 | 57.08 | 76.59 | -174.94 | -101.51 | 51.56 | 89.23 | -172.68 |
| Leu ^U 6 | -83.28 | 50.01 | 92.38 | -174.56 | -104.14 | 51.47 | 82.62 | -171.32 |
| Moyenne | -102.03 | 52.45 | 85.03 | -175.04 | -103.85 | 52.10 | 84.24 | -175.14 |
| A7 | -44.56 | - | - | -39.77 | -61.09 | - | - | -34.45 |
| A8 | -64.62 | - | - | -38.45 | -63.84 | - | - | -38.59 |
| A9 | -68.82 | - | - | -44.71 | -66.63 | - | - | -39.03 |
| A10 | -60.22 | - | - | -32.00 | -65.49 | - | - | -41.06 |
| A11 | -74.62 | - | - | -42.28 | -57.67 | - | - | -41.72 |
| A12 | -56.89 | - | - | -43.82 | -68.33 | - | - | -31.15 |
| A13 | -73.93 | - | - | -16.91 | -106.60 | - | - | 15.88 |
| Moyenne | -63.38 | - | - | 36.84 | -69.95 | - | - | -30.01 |

Table IV.177 : Table des angles dièdre de la chaîne principale dans les hélices A et B de l'unité asymétrique de IV.11

ii. Interactions intermoléculaires dans l'unité asymétrique

La permutation des chaînes latérales Gln et Lys aux positions 8 et 12 conduit à un renforcement des interactions inter-hélices impliquant les chaînes latérales polaires pour l'oligomère **IV.11**. En effet, ce nouvel arrangement des chaînes latérales permet la formation de deux ponts salins intermoléculaires et une liaison hydrogène à l'interface des deux hélices, soit deux nouvelles liaisons par rapport à **IV.10** (**Figure IV.178**). Ce renforcement est d'abord marqué par la réduction de la distance dans le pont salin formé entre l'ammonium terminal (Leu^{U1}) et le carboxylate du résidu Glu^{U2} ($d(\text{N-O}) = 3,0 \text{ \AA}$). La présence d'une lysine en position 8 permet la formation d'un deuxième pont salin avec la chaîne latérale du résidu Glu7 ($d(\text{N-O}) = 4,1 \text{ \AA}$ de distance). De plus, l'interface est maintenant stabilisée également à l'extrémité C-terminale par la formation d'une liaison hydrogène intermoléculaire entre le NH₂ amide du résidu Gln12 et le carbonyle de la chaîne principale du résidu Leu10 ($d(\text{N-O}) = 2,3 \text{ \AA}$).

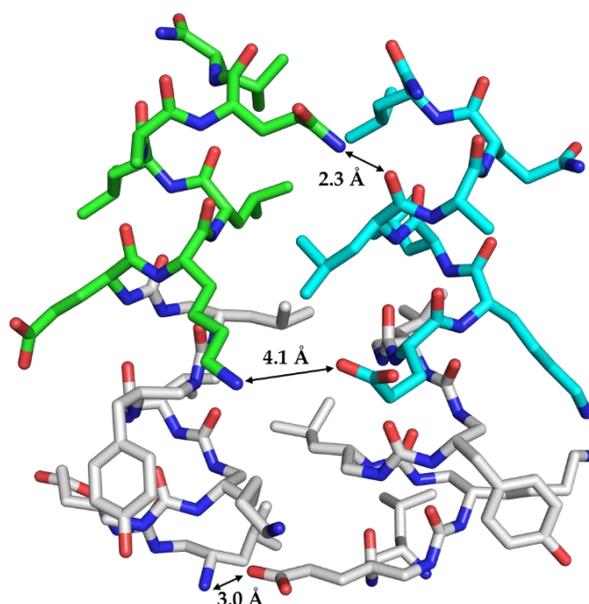


Figure IV.178 : Ponts salins et liaison hydrogène intermoléculaires entre les deux hélices **IV.11** formant l'unité asymétrique.

b. Détail de l'assemblage supramoléculaire des hélices dans le cristal IV.11

La structure cristallographique de l'oligomère **IV.11** (**Figure IV.179**) révèle un faisceau d'hélices cylindriques formé à partir de six hélices hybrides bien définies quasi superposables à celui décrit précédemment dans ce chapitre paragraphe [V.2.b.].

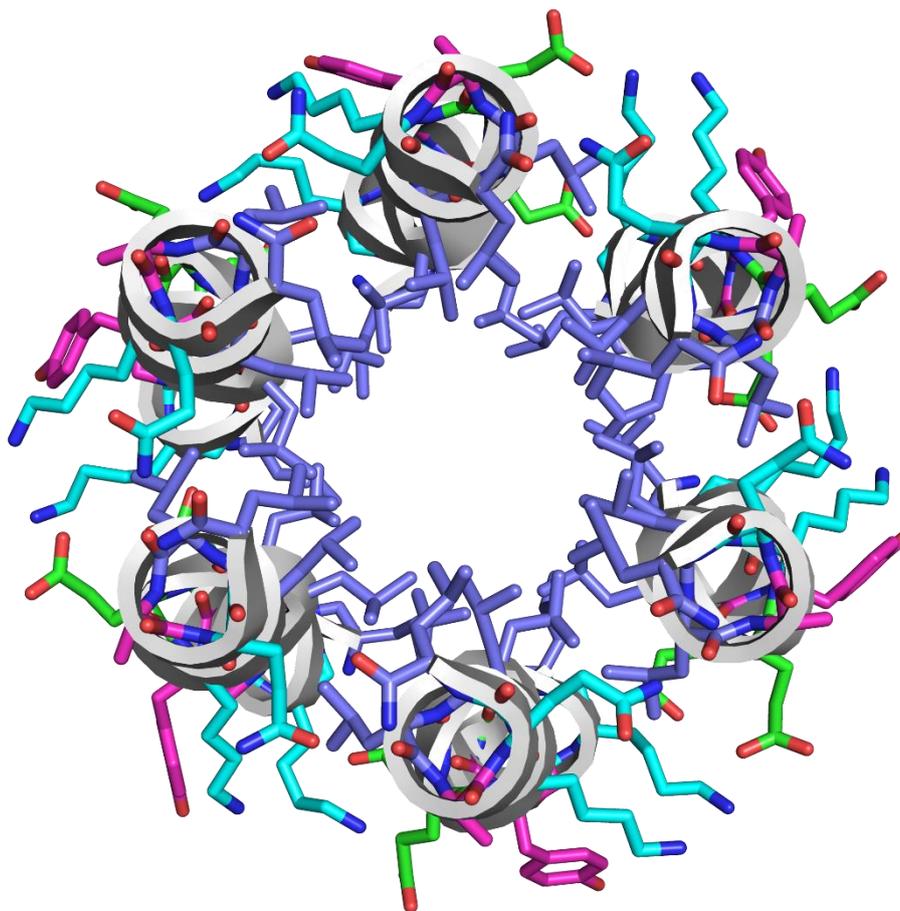


Figure IV.179 : Auto-assemblage de l'oligomère **IV.11** dans le cristal.

Comme pour **IV.10**, le faisceau hélicoïdal est formé de trois dimères **IV.11**, chaque dimère composé de deux hélices parallèles maintenues ensemble par les interactions décrites précédemment. Les trois dimères interagissent entre eux principalement via des interactions hydrophobes et également par des interactions électrostatiques en surfaces similaires à celles stabilisant le dimère d'hélices décrit précédemment : on observe ainsi la formation d'un pont salin entre l'ammonium terminal (Leu^{U1}) et le carboxylate du résidu Glu^{U2} ($d(\text{N-O}) = 3,0 \text{ \AA}$) et entre l'ammonium de la Lys^{U3} et le carboxylate du résidu Glu⁷ ($d(\text{N-O}) = 3,4 \text{ \AA}$ de distance). L'interface est aussi stabilisée par la formation plusieurs liaisons hydrogène à l'extrémité C-terminale impliquant le NH₂ amide du résidu Gln¹².

De façon identique à l'oligomère **IV.10**, le pore de nature hydrophobe généré par l'assemblage des hélices **IV.11** est légèrement conique et de mêmes dimensions à l'entrée et à la sortie que celui décrit pour **IV.10**.

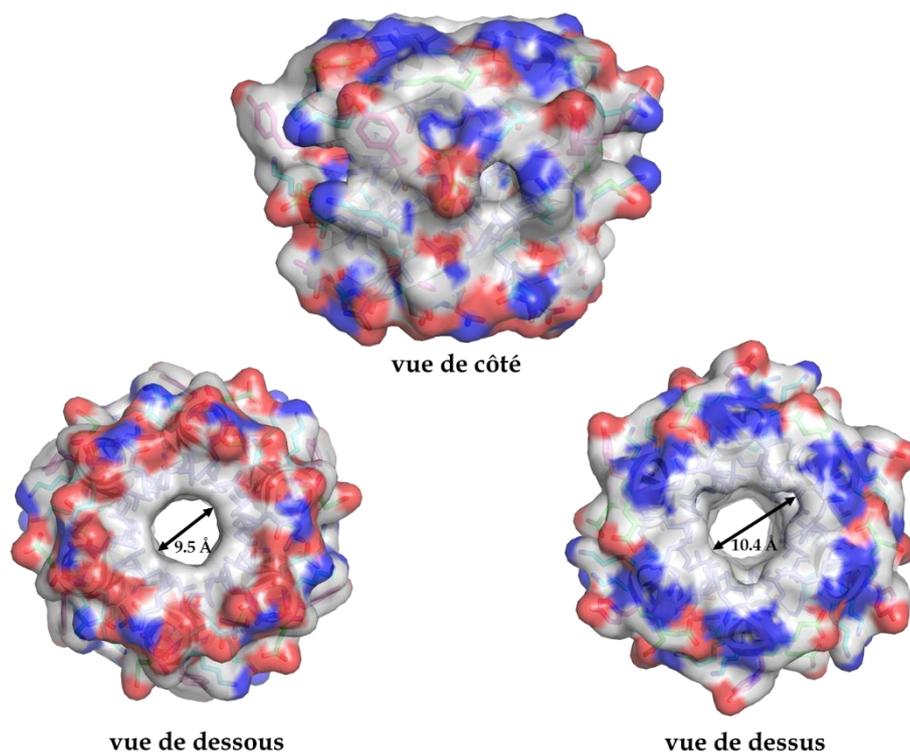


Figure IV.180 : Assemblage quaternaire de type tonneau des oligomères IV.11 dans le cristal.

2. Caractérisation des espèces multimériques par spectrométrie de masse native

L'analyse de MS-ESI native d'une solution d'oligomère IV.11 à 200 μM (dans l'eau) révèle une espèce multimérique prédominante avec un rapport m/z de 2097,49, attribué sans ambiguïté à l'espèce hexamérique $[6\times\text{IV.11}]^{5+}$ et donc en accord avec la structure cristallographique discutée précédemment (Figure IV.181). Cette expérience souligne également la présence de deux autres multimères, dans des proportions moins importantes, avec un rapport m/z de 2039,34 et de 2184,83, attribué respectivement à l'espèce heptamérique $[7\times\text{IV.11}]^{6+}$ et à l'espèce pentamérique $[5\times\text{IV.11}]^{4+}$.

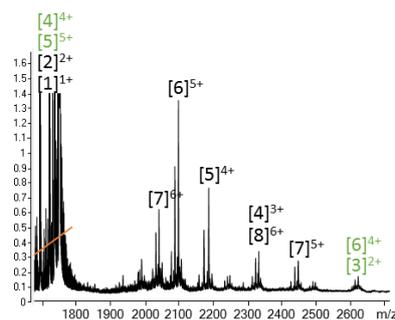


Figure IV.181 : Spectre représentatif des expériences de spectrométrie de masse natives MS-ESI menées sur le composé IV.11.

De manière générale, les premières données obtenues pour les composés IV.10 et IV.11 montrent qu'on peut utiliser les données cristallographiques pour optimiser les contacts inter-hélice à la surface de l'assemblage et éventuellement stabiliser les structures quaternaires obtenues. La similarité de ces assemblages avec les tonneaux α décrits par Woolfson.[26] suggèrent qu'il est peut-être possible de faire varier la stoechiométrie de nos objets de manière similaire en introduisant d'autres modifications dans les séquences.

XIV. Essai de modification de la stœchiométrie de l'assemblage à 6 hélices parallèles formé par l'oligomère chimère IV.11

Dans cette troisième partie nous avons souhaité identifier les positions dans la séquence de **IV.11** qui pourraient permettre de moduler le degré d'oligomérisation du tonneau à 6 hélices parallèles formé par auto-assemblage de **IV.11**. Pour les assemblages en faisceau d'hélices peptidique, il existe une relation entre la diminution de la valeur de l'angle de contact entre les hélices du faisceau et l'augmentation de la stœchiométrie de ce même faisceau d'hélices. En observant la structure cristallographique de l'oligomère **IV.11** (**Figure IV.179**) on constate que la chaîne latérale du résidu Leu10 n'est pas orientée comme les autres chaînes isobutyle en direction du pore, elle est projetée directement vers l'hélice voisine dans la zone de jonction inter-hélices. Nous avons donc réalisé plusieurs types de substitution de ce résidu Leu10 avec l'idée de faire varier le degré d'oligomérisation de l'assemblage résultant.

Nous avons d'abord choisi de remplacer le résidu Leu10 par un résidu Ala10 et le résidu Gln12 par un résidu Asn12 dans la séquence de l'oligomère **IV.11** (**Figure IV.182**). Nous avons ainsi généré l'oligomère **IV.12**.

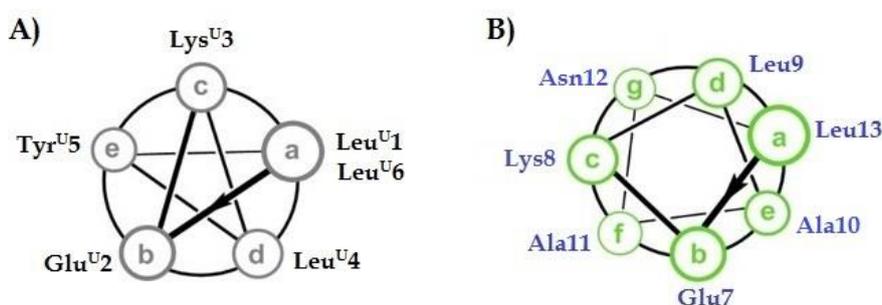


Figure IV.182 : Schémas représentatifs de la disposition des résidus de l'oligomère **IV.12** selon les motifs de répétition : (A) : en pentade caractéristique de l'hélice-2.5 d'oligourée (les résidus urées 1–6 sont représentés en gris), et (B) : en heptade caractéristique de l'hélice α peptidique (les résidus acides aminés 7-13 sont représentés en vert).

Nous avons ensuite choisi, dans la séquence de l'oligomère **IV.11**, de remplacer le résidu Leu10 par un résidu Ser10 (**Figure IV.183**). Nous avons ainsi généré l'oligomère **IV.13**.

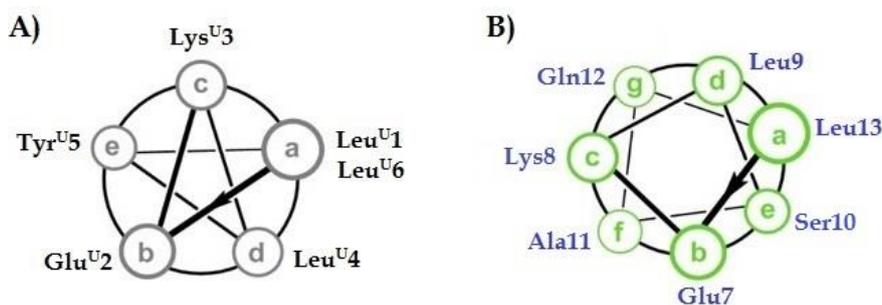


Figure IV.183 : Schémas représentatifs de la disposition des résidus de l'oligomère **IV.13** selon les motifs de répétition : (A) : en pentade caractéristique de l'hélice-2.5 d'oligourée (les résidus urées 1-6 sont représentés en gris), et (B) : en heptade caractéristique de l'hélice α peptidique (les résidus acides aminés 7-13 sont représentés en vert).

Nous avons ensuite choisi, dans la séquence de l'oligomère **IV.11**, de remplacer le résidu Leu10 par un résidu Ile10 (**Figure IV.184**). Nous avons ainsi généré l'oligomère **IV.14**.

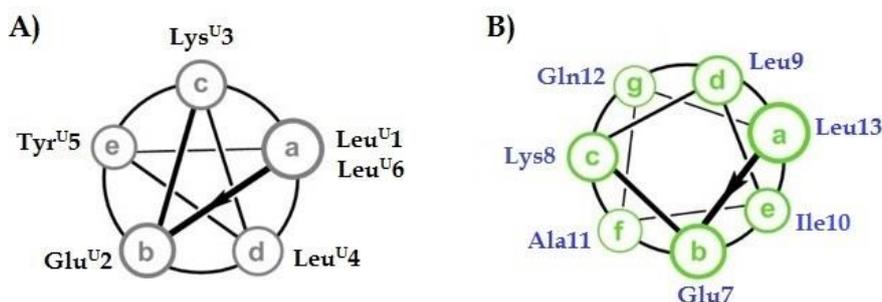


Figure IV.184 : Schémas représentatifs de la disposition des résidus de l'oligomère **IV.14** selon les motifs de répétition : (A) : en pentade caractéristique de l'hélice-2.5 d'oligourée (les résidus urées 1-6 sont représentés en gris), et (B) : en heptade caractéristique de l'hélice α peptidique (les résidus acides aminés 7-13 sont représentés en vert).

Nous avons réalisé une série d'expériences afin de déterminer les propensions respectives des oligomères **IV.12**, **IV.13** et **IV.14** à former des structures quaternaires discrètes en milieu aqueux.

1. Synthèse

Les séquences ainsi que les masses, les temps de rétention, et les rendements associés à la synthèse des « foldamères blocs » hydrosolubles dérivé de la séquence de l'oligomère **IV.11** formant potentiellement des assemblages quaternaires sont listée **Figure IV.185**.

| Composé | Séquence | Rdt ^a | ESI-MS [M+3H] ³⁺ | HPLC t ^R (min) ^b |
|--------------|--|------------------|--------------------------------|---|
| IV.12 | H-Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U -Leu ^U - <u>Glu-Lys-Leu-Ala-Ala-Asn</u> -Leu-NH ₂ | 6 % | 564,38 | 5,94 |
| IV.13 | H-Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U -Leu ^U - <u>Glu-Lys-Leu-Ser-Ala-Gln</u> -Leu-NH ₂ | 7 % | 574,38 | 5,59 |
| IV.14 | H-Leu ^U -Glu ^U -Lys ^U -Leu ^U -Tyr ^U -Leu ^U - <u>Glu-Lys-Leu-Ile-Ala-Gln</u> -Leu-NH ₂ | 5 % | 583,39 | 6,67 |

Figure IV.185 : Séquences, masses, temps de rétention et rendements de la synthèse des oligomères **IV.12-IV.14** analogues de **IV.11**. Les résidus mutés ne comparaison avec la séquence de l'oligomère **IV.11** ont été soulignés en bleu. ^a Rendement après purification HPLC ; ^b système RP-HPLC: gradient linéaire 10 à 100% de B en 10 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) and B (0,1% TFA dans CH₃CN), détection UV à 200 nm.

a. Synthèse sur support solide des molécules chimères

La synthèse des oligomères chimères **IV.12**, **IV.13**, et **IV.14** a été réalisée selon les conditions précédemment décrites dans le chapitre 2 [paragraphe II.1.b.i].

La synthèse des composés **IV.12**, **IV.13**, et **IV.14** sont similaires à celle de l'oligomère **IV.11** mettant en évidence les mêmes phénomènes de réduction partielle. Plusieurs de ces sous-produits, dans des proportions non-négligeables (55-75%), ont été observés.

Le chromatogramme HPLC de l'oligomère **IV.13** (**Figure IV.186**), avant purification par RP-HPLC préparative, met en évidence la présence de plusieurs produits dont l'oligomère

IV.13 (temps de rétention : 5,98 minutes), le produit de réduction partielle du résidu Lys^{U3} (temps de rétention : 5,78 minutes) et le produit de réduction partielle du résidu Tyr^{U5} (temps de rétention : 5,43 minutes). Après purification par RP-HPLC préparative, 6,0 mg de l'oligomère **IV.13** ont été isolés et caractérisés.

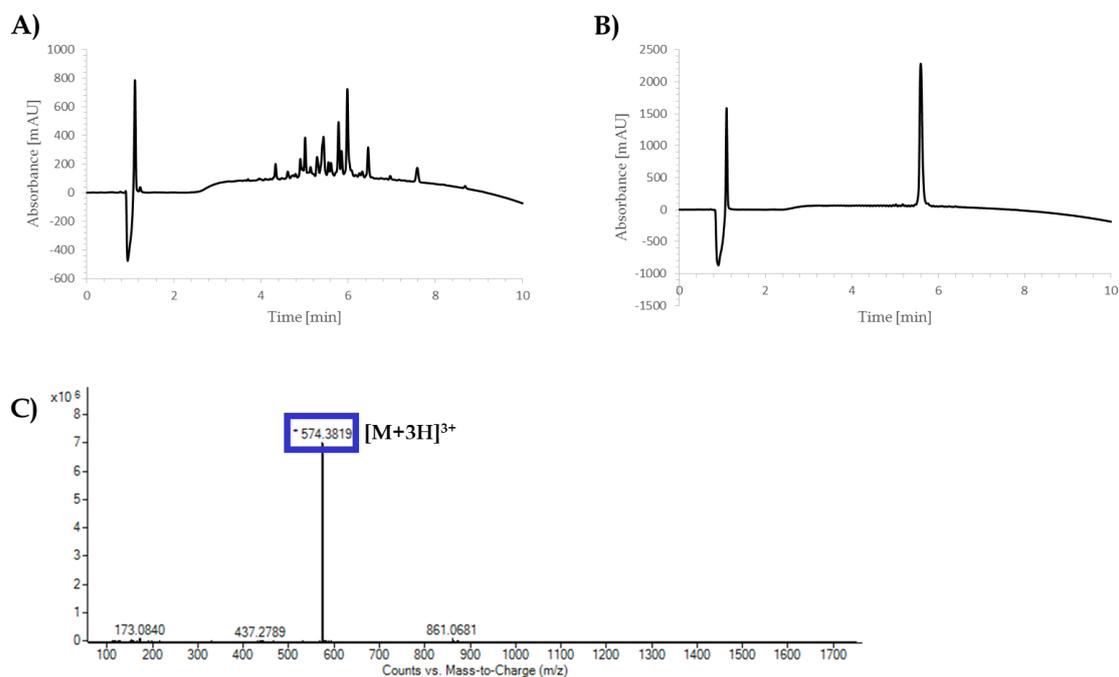


Figure IV.186 : Caractérisation de l'oligomère **IV.13** : Chromatogrammes HPLC de l'oligomère **IV.13** avant (A) et après (B) purification par RP-HPLC préparative sur colonne C18 [gradient linéaire 40 à 60% de B en 20 min avec A (0,1% TFA dans H₂O) et B (0,1% TFA dans CH₃CN)] ; C) spectre de masse de l'oligomère **IV.13** après purification par RP-HPLC semi-préparative.

2. Caractérisation des espèces multimériques par spectrométrie de masse

L'analyse de MS-ESI native d'une solution à 200 μ M (dans l'eau) des oligomères **IV.12-IV.14** révèle dans les trois cas la présence d'une espèce multimérique prédominante avec un rapport m/z de 2029,07 (**Figure IV.187**), attribué sans ambiguïté à l'espèce hexamérique [6x **IV.12**]⁵⁺ et déjà caractérisée pour **IV.11** dans l'état cristallin. Cette expérience souligne également la présence de deux autres multimères, dans des proportions moins importantes, avec un rapport m/z de 1972,66 et de 2113,57, attribué respectivement aux espèces heptamérique [7 x **IV.12**]⁶⁺ et pentamérique [5 x **IV.12**]⁴⁺.

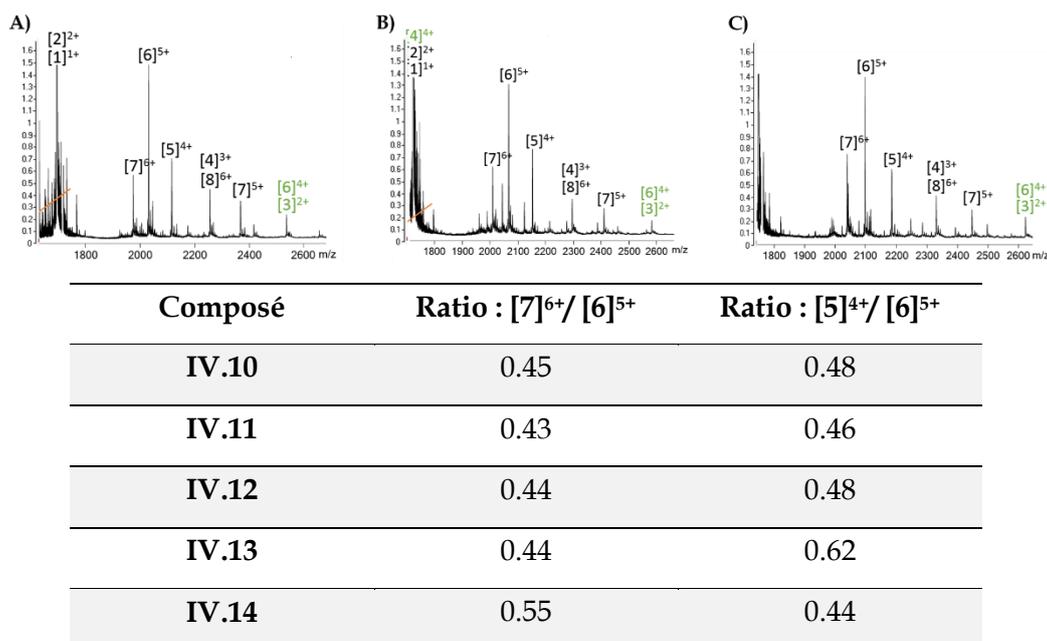


Figure IV.187 : (haut) Spectres représentatifs des expériences de spectrométrie de masse natives MS-ESI menées sur les composés : A) IV.12 ; B) IV.13 ; C) IV.14. (bas) Tableau descriptif des ratios des multimères pour IV.12, IV.13 et IV.14.

Les expériences de spectrométrie de masse native présentées dans ce chapitre ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales. Nous pouvons donc comparer le ratio d'ionisation des multimères pour les différents composés synthétisés (**Figure IV.187**). Les oligomères IV.10, IV.11 et IV.12 possèdent des tendances similaires à former les espèces penta- et heptamériques. En revanche, on remarque une variation de ratio pour les oligomères IV.13 et IV.14. L'oligomère IV.13 est pourvu d'une tendance plus importante à la formation, en phase gazeuse, de l'espèce pentamérique et à l'inverse la formation de l'espèce heptamérique est favorisée dans le cas de l'oligomère IV.14. Cette tendance, bien que modeste tend à suggérer qu'il est possible de manipuler la stœchiométrie des objets assemblés en modifiant finement leurs séquences. En effet, dans les faisceaux d'hélices peptidiques interagissant par des interfaces de type II, l'augmentation du volume occupé par les chaînes latérales des résidus situés à l'interface hélice-hélice conduit à une diminution de la valeur de l'angle de contact entre les hélices et donc à l'augmentation de la stœchiométrie de ce même faisceau d'hélices. Or dans le cadre des expériences décrites ci-dessus, c'est l'oligomère IV.14 dans lequel le résidu Leu10 a été substitué par un résidu Ile10 qui semble être pourvu, en comparaison avec les autres « foldamères à blocs », de la plus grande propension à former l'espèce pentamérique en phase gazeuse. Afin de confirmer ou d'infirmer ce résultat j'ai tenté de cristalliser les oligomères IV.12, IV.13, et IV.14.

Différentes conditions de cristallisation ont conduit à l'obtention de cristaux pour les oligomères IV.13 et IV.14. Cependant, les données de diffraction collectées ne nous ont pas permis, pour le moment, de résoudre la structure de ces composés. Nous continuons à travailler sur l'optimisation des conditions de cristallisation de ces composés.

En perspective, la structure de l'oligomère IV.11 constituée d'un faisceau de six hélices parallèles est certainement une base intéressante pour le développement d'objets pourvus de fonctions à l'image du travail de Schepartz sur les faisceaux de β -peptides. L'intérieur très hydrophobe du canal dans le tonneau à six hélices pourrait servir pour faire de la reconnaissance de molécules à longue chaîne carbonée par exemple. On pourrait également envisager de fonctionnaliser l'intérieur du pore par des résidus présentant une activité catalytique.

Bibliographie

- [1] A. LUPAS, "Coiled coils: new structures and new functions," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 21, no. 10, pp. 375–382, Oct. 1996.
- [2] A. N. Lupas and M. Gruber, "The Structure of α -Helical Coiled Coils," in *Adv. Protein. Chem.*, vol. 70, no. 4, 2005, pp. 37–38.
- [3] L. PAULING and R. B. COREY, "Compound Helical Configurations of Polypeptide Chains: Structure of Proteins of the α -Keratin Type," *Nature*, vol. 171, no. 4341, pp. 59–61, Jan. 1953.
- [4] M. D. Shoulders and R. T. Raines, "Collagen Structure and Stability," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 78, no. 1, pp. 929–958, Jun. 2009.
- [5] D. C. Chan, D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim, "Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein," *Cell*, vol. 89, no. 2, pp. 263–273, 1997.
- [6] M. Lewis *et al.*, "Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer.," *Science (80-.)*, vol. 271, no. 5253, pp. 1247–1254, Mar. 1996.
- [7] I. Pechik, S. Yakovlev, M. W. Mosesson, G. L. Gilliland, and L. Medved, "Structural Basis for Sequential Cleavage of Fibrinopeptides upon Fibrin Assembly † , ‡," *Biochemistry*, vol. 45, no. 11, pp. 3588–3597, Mar. 2006.
- [8] K. K.-S. Ng, S. Park-Snyder, and W. I. Weis, "Ca²⁺-Dependent Structural Changes in C-type Mannose-Binding Proteins † , ‡," *Biochemistry*, vol. 37, no. 51, pp. 17965–17976, Dec. 1998.
- [9] K. Oxenoid and J. J. Chou, "The structure of phospholamban pentamer reveals a channel-like architecture in membranes," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 31, pp. 10870–10875, Aug. 2005.
- [10] M. St. Maurice, P. E. Mera, M. P. Taranto, F. Sesma, J. C. Escalante-Semerena, and I. Rayment, "Structural Characterization of the Active Site of the PduO-Type ATP:Co(I)rrinoid Adenosyltransferase from *Lactobacillus reuteri*," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 4, pp. 2596–2605, Jan. 2007.
- [11] E. Santelli and T. J. Richmond, "Crystal structure of MEF2A core bound to DNA at 1.5 Å resolution," *J. Mol. Biol.*, vol. 297, no. 2, pp. 437–449, Mar. 2000.
- [12] J. Stetefeld, R. A. Kammerer, M. Jenny, T. Schulthess, R. Landwehr, and J. Engel, "Crystal structure of a naturally occurring parallel right-handed coiled coil tetramer," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 7, no. 9, pp. 772–776, Sep. 2000.
- [13] E. Moutevelis and D. N. Woolfson, "A Periodic Table of Coiled-Coil Protein Structures," *J. Mol. Biol.*, vol. 385, no. 3, pp. 726–732, Jan. 2009.
- [14] F. H. C. Crick, "The packing of α -helices: simple coiled-coils," *Acta Crystallogr.*, vol. 6, no. 8, pp. 689–697, Sep. 1953.
- [15] J. Walshaw and D. N. Woolfson, "SOCKET: a program for identifying and analysing coiled-coil motifs within protein structures¹Edited by J. Thornton," *J. Mol. Biol.*, vol. 307, no. 5, pp. 1427–1450, Apr. 2001.
- [16] C. Chothia, M. Levitt, and D. Richardson, "Helix to helix packing in proteins," *J. Mol. Biol.*, vol. 145, no. 1, pp. 215–250, Jan. 1981.

- [17] D. Walther, F. Eisenhaber, and P. Argos, "Principles of Helix-Helix Packing in Proteins: The Helical Lattice Superposition Model," *J. Mol. Biol.*, vol. 255, no. 3, pp. 536–553, Jan. 1996.
- [18] D. N. Woolfson, "Coiled-Coil Design: Updated and Upgraded," vol. 82, D. A. D. Parry and J. M. Squire, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 35–61.
- [19] D. N. Woolfson, "The Design of Coiled-Coil Structures and Assemblies," vol. 70, no. 4, 2005, pp. 79–112.
- [20] G. GRIGORYAN and A. KEATING, "Structural specificity in coiled-coil interactions," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 18, no. 4, pp. 477–483, Aug. 2008.
- [21] P. Harbury, T. Zhang, P. Kim, and T. Alber, "A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants," *Science (80-.)*, vol. 262, no. 5138, pp. 1401–1407, Nov. 1993.
- [22] J. M. Fletcher *et al.*, "A Basis Set of de Novo Coiled-Coil Peptide Oligomers for Rational Protein Design and Synthetic Biology," *ACS Synth. Biol.*, vol. 1, no. 6, pp. 240–250, Jun. 2012.
- [23] N. R. Zaccai *et al.*, "A de novo peptide hexamer with a mutable channel," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 12, pp. 935–941, Oct. 2011.
- [24] D. N. Woolfson, G. J. Bartlett, M. Bruning, and A. R. Thomson, "New currency for old rope: from coiled-coil assemblies to α -helical barrels," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 22, no. 4, pp. 432–441, Aug. 2012.
- [25] J. Walshaw and D. N. Woolfson, "Open-and-shut cases in coiled-coil assembly: α -sheets and α -cylinders," *Protein Sci.*, vol. 10, no. 3, pp. 668–673, Mar. 2001.
- [26] A. R. Thomson *et al.*, "Computational design of water-soluble α -helical barrels," *Science (80-.)*, vol. 346, no. 6208, pp. 485–488, Oct. 2014.
- [27] A. J. Burton *et al.*, "Accessibility, Reactivity, and Selectivity of Side Chains within a Channel of de Novo Peptide Assembly," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 34, pp. 12524–12527, Aug. 2013.
- [28] K. J. Lumb and P. S. Kim, "A Buried Polar Interaction Imparts Structural Uniqueness in a Designed Heterodimeric Coiled Coil," *Biochemistry*, vol. 34, no. 27, pp. 8642–8648, Jul. 1995.
- [29] J. L. Price, W. S. Horne, and S. H. Gellman, "Discrete Heterogeneous Quaternary Structure Formed by α/β -Peptide Foldamers and α -Peptides," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 20, pp. 6376–6377, May 2007.
- [30] R. P. Cheng, S. H. Gellman, and W. F. DeGrado, " β -Peptides: From Structure to Function," *Chem. Rev.*, vol. 101, no. 10, pp. 3219–3232, Oct. 2001.
- [31] J. X. Qiu, E. J. Petersson, E. E. Matthews, and A. Schepartz, "Toward β -amino acid proteins: A cooperatively folded β -peptide quaternary structure," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 35, pp. 11338–11339, 2006.
- [32] D. S. Daniels, E. J. Petersson, J. X. Qiu, and A. Schepartz, "High-Resolution Structure of a β -Peptide Bundle," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 6, pp. 1532–1533, Feb. 2007.
- [33] E. J. Petersson and A. Schepartz, "Toward β -Amino Acid Proteins: Design, Synthesis, and Characterization of a Fifteen Kilodalton β -Peptide Tetramer," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 3, pp. 821–823, Jan. 2008.

- [34] J. L. Goodman, E. J. Petersson, D. S. Daniels, J. X. Qiu, and A. Schepartz, "Biophysical and Structural Characterization of a Robust Octameric β -Peptide Bundle," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 47, pp. 14746–14751, Nov. 2007.
- [35] C. J. Craig, J. L. Goodman, and A. Schepartz, "Enhancing β 3-Peptide Bundle Stability by Design," *ChemBioChem*, vol. 12, no. 7, pp. 1035–1038, May 2011.
- [36] J. L. Goodman, M. A. Molski, J. Qiu, and A. Schepartz, "Tetrameric β 3 -Peptide Bundles," *ChemBioChem*, vol. 9, no. 10, pp. 1576–1578, Jul. 2008.
- [37] P. S.-P. Wang, C. J. Craig, and A. Schepartz, "Relationship between side-chain branching and stoichiometry in β 3-peptide bundles," *Tetrahedron*, vol. 68, no. 23, pp. 4342–4345, Jun. 2012.
- [38] P. S. P. Wang and A. Schepartz, " β -Peptide bundles: Design. Build. Analyze. Biosynthesize.," *Chem. Commun.*, vol. 52, pp. 7420–7432, 2016.
- [39] M. S. Melicher, J. Chu, A. S. Walker, S. J. Miller, R. H. G. Baxter, and A. Schepartz, "A β -Borono-peptide Bundle of Known Structure As a Vehicle for Polyol Recognition," *Org. Lett.*, vol. 15, no. 19, pp. 5048–5051, Oct. 2013.
- [40] M. Mazik, "Molecular recognition of carbohydrates by acyclic receptors employing noncovalent interactions," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 4, p. 935, 2009.
- [41] T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, and S. Shinkai, "Saccharide Sensing with Molecular Receptors Based on Boronic Acid," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 35, no. 17, pp. 1910–1922, Sep. 1996.
- [42] S. Striegler, "Selective Carbohydrate Recognition by Synthetic Receptors in Aqueous Solution," *Curr. Org. Chem.*, vol. 7, no. 1, pp. 81–102, Jan. 2003.
- [43] M. S. Melicher, A. S. Walker, J. Shen, S. J. Miller, and A. Schepartz, "Improved Carbohydrate Recognition in Water with an Electrostatically Enhanced β -Peptide Bundle," *Org. Lett.*, vol. 17, no. 19, pp. 4718–4721, Oct. 2015.
- [44] J. P. Miller, M. S. Melicher, and A. Schepartz, "Positive Allostery in Metal Ion Binding by a Cooperatively Folded β -Peptide Bundle," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 42, pp. 14726–14729, Oct. 2014.
- [45] P. S. P. Wang, J. B. Nguyen, and A. Schepartz, "Design and High-Resolution Structure of a β 3 -Peptide Bundle Catalyst," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 19, pp. 6810–6813, May 2014.
- [46] S. Javor, E. Delort, T. Darbre, and J. Reymond, "A Peptide Dendrimer Enzyme Model with a Single Catalytic Site at the Core," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 43, pp. 13238–13246, Oct. 2007.
- [47] G. W. Collie *et al.*, "Shaping quaternary assemblies of water-soluble non-peptide helical foldamers by sequence manipulation," *Nat. Chem.*, vol. 7, no. 11, pp. 871–878, Sep. 2015.
- [48] J. Fremaux, L. Fischer, T. Arbogast, B. Kauffmann, and G. Guichard, "Condensation approach to aliphatic oligoureia foldamers: Helices with N-(Pyrrolidin-2-ylmethyl)ureido junctions," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 50, no. 48, pp. 11382–11385, 2011.
- [49] J. Lear, Z. Wasserman, and W. DeGrado, "Synthetic amphiphilic peptide models for protein ion channels," *Science (80-.)*, vol. 240, no. 4856, pp. 1177–1181, May 1988.
- [50] G. W. Collie *et al.*, "Molecular Recognition within the Cavity of a Foldamer Helix Bundle: Encapsulation of Primary Alcohols in Aqueous Conditions," *J. Am. Chem. Soc.*,

- vol. 139, no. 17, pp. 6128–6137, May 2017.
- [51] G. W. Collie, K. Pulka-Ziach, and G. Guichard, "In situ iodination and X-ray crystal structure of a foldamer helix bundle," *Chem. Commun.*, vol. 52, no. 6, pp. 1202–1205, 2016.
- [52] L. Gonzalez, D. N. Woolfson, and T. Alber, "Buried polar residues and structural specificity in the GCN4 leucine zipper," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 3, no. 12, pp. 1011–1018, Dec. 1996.
- [53] M. G. Oakley and P. S. Kim, "A Buried Polar Interaction Can Direct the Relative Orientation of Helices in a Coiled Coil †," *Biochemistry*, vol. 37, no. 36, pp. 12603–12610, Sep. 1998.
- [54] D. L. Akey, V. N. Malashkevich, and P. S. Kim, "Buried Polar Residues in Coiled-Coil Interfaces †, ‡," *Biochemistry*, vol. 40, no. 21, pp. 6352–6360, May 2001.
- [55] C. M. Lombardo *et al.*, "Anatomy of an Oligourea Six-Helix Bundle," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 138, no. 33, pp. 10522–10530, Aug. 2016.
- [56] J. Fremaux, L. Mauran, K. Pulka-Ziach, B. Kauffmann, B. Odaert, and G. Guichard, "α-Peptide-Oligourea Chimeras: Stabilization of Short α-Helices by Non-Peptide Helical Foldamers," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 54, no. 34, pp. 9816–9820, Aug. 2015.
- [57] Y.-T. Lai *et al.*, "Structure of a designed protein cage that self-assembles into a highly porous cube," *Nat. Chem.*, vol. 6, no. 12, pp. 1065–1071, Nov. 2014.
- [58] H. Hernández and C. V. Robinson, "Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 3, pp. 715–726, Mar. 2007.

Conclusion et perspectives

Les hélices α sont impliquées dans de nombreux processus biologiques. Ce sont notamment des éléments clés de la reconnaissance des protéines. De nombreux chercheurs à travers le monde se sont passionnés pour la synthèse d'outils permettant de stabiliser et/ou mimer les hélices α pour générer de nouveaux outils thérapeutiques. L'utilisation d'un court fragment foldamère pour stabiliser les segments peptidique en tant que « cap » n'avait que très peu été exploré à l'exception des travaux de Gellman.[1] Au laboratoire, nous nous intéressons particulièrement à une famille de foldamères peptidomimétiques à base d'urées capables d'adopter des structures en hélice de type 2.5 stabilisées par un réseau de liaisons hydrogène à trois centres. Des travaux menés au sein de l'équipe ont mis en évidence la possibilité de générer des « foldamères à blocs », constitués de deux portions distinctes peptide et oligourée, organosolubles adoptant une structure en hélice continue. Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes, dans un premier temps, attachés à déterminer le nombre minimum de résidus urées conduisant à une stabilisation de la structure en hélice d'un segment peptidique. Nous nous sommes ensuite penchés sur le développement d'inhibiteurs de l'interaction protéine/protéine p53/MDM2. En parallèle, pour accéder rapidement à des structures à haute résolution de nos « foldamères à bloc », nous avons conçu des oligomères amphiphiles capables de s'assembler sous forme de faisceau d'hélices en milieu aqueux.

Nous avons tout d'abord étudié l'influence, en milieu organique, de l'introduction de courts fragments di-urées ou tri-urées aux extrémités N- ou C-terminales d'un segment peptidique constitué de 7 résidus. Les études réalisées en solution et à l'état solide montrent que l'insertion de fragments tri-urées à l'extrémité N-terminale (II.6) ou C-terminale (II.4) conduit à la formation d'une hélice hybride stable et continue (Figure 188). Les deux segments peptide/oligourée ont conservé leurs paramètres d'hélices (α et 2.5, respectivement). La zone de jonction entre les deux hélices assure la communication entre les deux systèmes. C'est une zone hybride qui possède son propre réseau de liaison hydrogène. Nos résultats soulignent la capacité de courts segments tri-urées à stabiliser la formation d'une structure en hélice dans le segment peptidique des oligomères chimères II.4 et II.6.

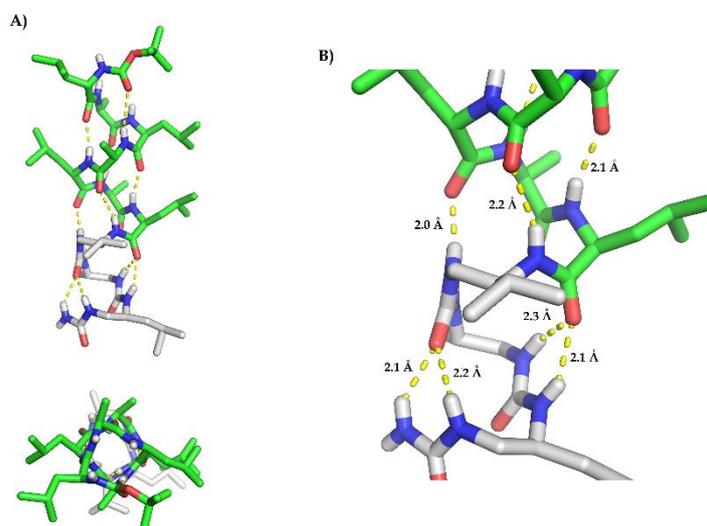


Figure 188 : Structure cristallographique de la molécule II.4 : (A) vu de côté et de dessus ; (B) réseau de liaisons hydrogène à la jonction entre les deux parties oligourée et peptidique

Ces résultats nous ont encouragés à effectuer des études en milieu aqueux dans la perspective de stabiliser et mimer des hélices peptidiques bioactives. Nous nous sommes penchés sur l'étude de la stabilisation d'hélices peptidiques modèles hydrosolubles constituées de 17 résidus par insertion de différents « caps » uréido (tri-urées ou tétra-urées). D'après les analyses par dichroïsme circulaire, il existe une tendance plus marquée à la stabilisation du segment peptidique lorsque le « cap » uréido est positionné à l'extrémité N-terminale en milieu aqueux (**Table 189**). Cependant la stabilisation induite par l'insertion à l'extrémité C-terminale de « caps » oligourée en milieu aqueux est loin d'être négligeable. Cette observation est intéressante compte tenu des rares exemples de « caps » C-terminaux de synthèse décrits dans la littérature. Ces résultats ont, dans l'ensemble, été confirmés par des expériences RMN obtenues sur la série **II.15**, **II.20** et **II.21**. Nous proposons d'appeler cette approche la « foldamer capping box ».

| Composé | Abréviation | $-\theta_{\text{obs}222}$ | taux d'hélicité |
|--------------|---|---------------------------|-----------------|
| II.15 | Ac-(peptide 3Ile)-NH ₂ | 13638 | 40% |
| II.16 | Ac-(peptide 3Ile)-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U --NH ₂ | 18702 | 54% |
| II.17 | Ac-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 16200 | 48% |
| II.18 | Ac-(peptide 3Ile)-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -NH ₂ | 22430 | 66% |
| II.19 | Ac-Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -Ala ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 22358 | 64% |
| II.20 | Ac-(peptide 3Ile)-Val ^U -Val ^U -Val ^U --NH ₂ | 21285 | 61% |
| II.21 | Ac-Val ^U -Val ^U -Val ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 23951 | 68% |
| II.22 | Ac-(peptide 3Ile)-Glu ^U -Ala ^U -Lys ^U --NH ₂ | 19913 | 58% |
| II.23 | Ac-Glu ^U -Ala ^U -Lys ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 23966 | 69% |
| II.24 | Ac-(peptide 3Ile)-Lys ^U -Ala ^U -Glu ^U --NH ₂ | 19534 | 57% |
| II.25 | Ac-Lys ^U -Ala ^U -Glu ^U -(peptide 3Ile)-NH ₂ | 21886 | 63% |

Table 189 : Table des valeurs mesurées d'ellipticité molaire à 222 nm (0,05 mM dans un tampon PBS à pH 7,0 (1mM de phosphate de sodium et 1 M de NaCl) enregistrés à 0 °C dans une cuve de 5 mm) et des pourcentages d'hélicité calculés.[2][3]

Nous avons cherché à utiliser cette approche sur un peptide bioactif et avons sélectionné l'interaction protéine/protéine p53/MDM2 et p53/MDMX comme modèle. Dans un premier temps nous avons réalisé une série de remplacements systématiques (1 α /1^U) et (3 α /2^U), le long de la séquence de peptide **III.1** (un très bon inhibiteur peptidique de l'interaction p53/MDM2). Cette série de remplacement nous a permis de déterminer, grâce à un criblage HTRF, les régions du peptide **III.1** qui tolèrent les modifications du squelette. L'insertion de résidus urées pose globalement peu de difficultés lorsque la substitution est effectuée à l'extrémité C-terminale de la séquence peptidique (résidu Leu9 à Pro12). Les remplacements les moins tolérés pour la liaison à MDM2 et également à MDMX sont localisés sans surprise au niveau des résidus Phe3, Trp7 et Tyr6 impliqués dans l'interaction avec la surface des protéines cibles MDM2 et MDMX. Au vu des résultats, nous avons choisi de développer une série de « caps » uréido substitués de la portion C-terminale du peptide **III.1** qui stabilisent mais également miment jusqu'à deux des trois interactions clés avec la poche hydrophobe à la surface de la protéine cible (MDM2 ou MDMX). La détermination des valeurs d'IC₅₀ pour ces différents oligomères souligne la difficulté de concevoir ce type d'objets (**Figure 190**). En effet, en fonction de la localisation du « cap » uréido un ajustement fin de la taille et de la projection des chaînes latérales est nécessaire pour concevoir des objets affins. L'utilisation de résidus avec une chaîne latérale positionnée sur le second carbone qui n'altère pas l'hélicité des molécules (ex. Leu^{INVU}) s'est avérée particulièrement utile pour optimiser les inhibiteurs comme **III.37**.

| Composé | Séquence | IC ₅₀ p53/MDM2 | IC ₅₀ p53/MDMX |
|---------------|--|------------------------------|------------------------------|
| III.30 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala ^U -Ala ^U -Val ^U -NH ₂ | 6,2 nM | 33,0 nM |
| III.37 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 11,0 nM | 2000 nM |

Figure 190 : Séquences des oligomères **III.30** et **III.37** et valeurs d'IC₅₀ associées pour les interactions p53/MDM2 et p53/MDMX.

Les expériences de dégradation enzymatiques conduites en présence de chymotrypsine sur l'oligomère **III.30** soulignent la diminution de la vitesse d'hydrolyse, en référence au peptide **III.1**, sans néanmoins la stopper. Cette même expérience a été réalisée sur l'oligomère **III.37** qui possède une résistance accrue à l'activité de la chymotrypsine. En effet, aucun phénomène d'hydrolyse n'a été observé au bout de 4 heures de réaction. Au vu des expériences de dégradation enzymatique, nous avons choisi de réaliser une série de modifications à l'extrémité N-terminale de la séquence de l'oligomère **III.37** dans le but d'améliorer encore l'affinité pour la surface de MDM2 et de moduler la biodisponibilité du composé (pénétration cellulaire notamment). Nous avons notamment cherché à stabiliser la « *capping box* » entre les résidus Ser2 et Glu5 tout en supprimant le résidu Thr1 qui pourrait induire une gêne stérique avec la surface de la protéine cible. La détermination des IC₅₀ pour les différents composés souligne l'impact de la « *capping box* » (**Figure 191**).

| Composé | Séquence | IC ₅₀ p53/MDM2 | IC ₅₀ p53/MDMX |
|---------------|--|------------------------------|------------------------------|
| III.37 | H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 11,0 nM | 2000 nM |
| III.45 | H-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 288 nM | >10000 nM |
| III.47 | H ₂ N-CO-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 16,0 nM | 6000 nM |
| III.49 | (dé-N)Ser ^U -Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp ^U -Ala ^U -Leu ^{INVU} -Ala ^U -NH ₂ | 36,0 nM | 5400 nM |

Figure 191 : Séquences des oligomères **III.37**, **III.45**, **III.47** et **III.49** et détermination des valeurs d'IC₅₀ associées pour les interactions p53/MDM2 et p53/MDMX.

Dans la continuité de ces expériences un stagiaire post-doctoral, J. Burrato, a été recruté pour diriger la production de la protéine MDM2 ainsi que les expériences de co-cristallisation de nos oligomères les plus prometteurs (**III.30**, **III.37**, **III.47**, et **III.49**) avec la protéine MDM2. Nous espérons rapidement pouvoir accéder à des données structurales à haute résolution qui nous permettront de mieux décrire le mode de liaison de nos oligomères à la surface de la protéine cible et certainement de concevoir une nouvelle génération d'inhibiteurs plus affins. Nous pourrions également mieux comprendre la perte d'affinité pour la surface de la protéine MDMX et ainsi concevoir un double inhibiteur des interactions p53/MDM2 et p53/MDMX. En parallèle, nous sommes en train d'amorcer une collaboration avec l'équipe de Martin Teichmann dans le laboratoire régulations naturelles et artificielles (ANRA/INSERM U 1212) (à Bordeaux) pour évaluer la perméabilité cellulaire des oligomères **III.30**, **III.37**, **III.47**, et **III.49** et leur activité *in cellulo*.

Parallèlement au travail réalisé sur les « *caps* » oligomères, nous avons conçu des « *foldamères à blocs* » capables de former des assemblages discrets en milieu aqueux. C'est un projet que nous avons développé en premier lieu pour accéder rapidement à des structures cristallographiques à haute résolution des oligomères chimères hydrosolubles. Nous avons utilisé l'expertise présente dans le laboratoire sur l'assemblage des oligomères en faisceaux d'hélices pour concevoir un premier oligomère chimère **IV.10** présentant une séquence

amphiphile. Les études réalisées en phase gazeuse et à l'état solide montrent la formation d'une structure quaternaire en faisceau de 6 hélices parallèles (**Figure 192**), proche des assemblages peptidiques décrits par Woolfson.[4]

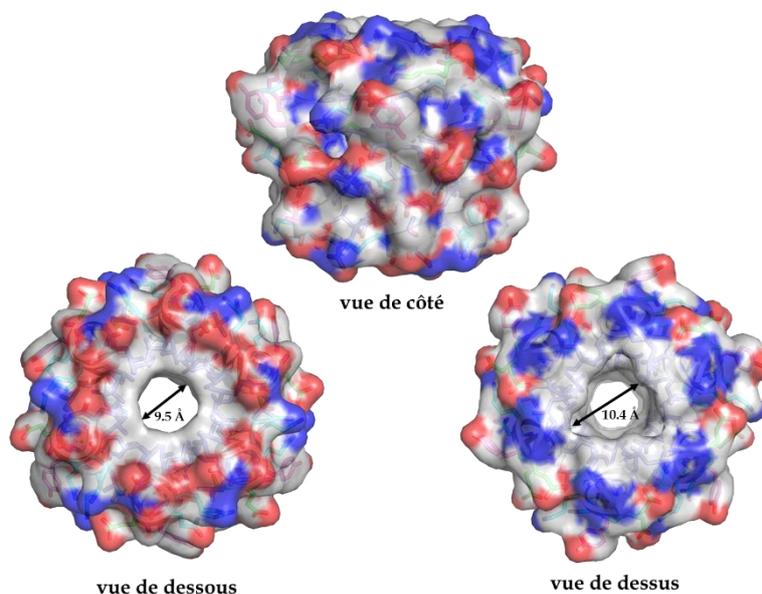


Figure 192 : Structure quaternaire de type tonneau des oligomères **IV.10** dans le cristal

Nous avons ensuite réalisé différentes modifications dans la séquence de la portion peptidique de l'oligomère **IV.10** visant à stabiliser (oligomère **IV.11**) la formation de l'assemblage. L'idée était d'optimiser les interactions électrostatiques inter-hélice à la surface de l'assemblage. Les expériences en phase gazeuse et à l'état solide montrent la formation d'un assemblage de type tonneau à 6 hélices parallèles pour l'oligomère **IV.11**, très similaire à celui obtenu pour l'oligomère **IV.10**. Une différence notable entre les deux structures est le réseau d'interactions stabilisantes entre deux hélices du faisceau, plus important dans le cas de l'oligomère **IV.11** qui se traduit par une légère diminution des diamètres aux extrémités du pore. Ces résultats confirment la possibilité d'utiliser la portion peptidique des « foldamères à blocs » pour optimiser les assemblages d'hélices. Les structures à résolution atomique des chimères **IV.10** et **IV.11** se sont également révélées utiles pour concevoir les inhibiteurs **III.30** et **III.37** décrits précédemment.

Enfin, nous avons tenté, sur la base des travaux de Woolfson,[4] de faire varier la stoechiométrie de nos objets en réalisant une série de substitutions du résidu Leu10, à l'interface d'interaction hélice-hélice, sur la séquence de l'oligomère **IV.11**. Des expériences de spectrométrie de masse native soulignent la présence majoritaire du multimère à 6 hélices. Néanmoins en comparant le ratio d'ionisation des différentes espèces multimériques, deux oligomères semblent être pourvus d'une tendance non-négligeable à former respectivement l'espèce pentamérique ou heptamérique. C'est une tendance modeste qui nécessite d'être confirmée ou infirmée par des données cristallographiques, d'autres techniques biophysiques et d'autres variations de la séquence.

En perspective, la structure de l'oligomère **IV.11** constitué d'un faisceau de 6 hélices parallèles est une base intéressante pour le développement d'objets pourvus fonctions, à l'image du travail de Schepartz sur les faisceaux de β -peptides.[5] L'intérieur très hydrophobe du canal dans le tonneau à six hélices pourrait servir de cavité pour la reconnaissance de molécules à longue chaîne carbonée. Nous envisageons également de fonctionnaliser l'intérieur du canal par des résidus présentant une activité catalytique.

Bibliographie

- [1] J. D. Sadowsky *et al.*, “($\alpha/\beta+\alpha$)-peptide antagonists of BH3 domain/Bcl-x L recognition: Toward general strategies for foldamer-based inhibition of protein-protein interactions,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 1, pp. 139–154, 2007.
- [2] A. CHAKRABARTTY and R. BALDWIN, “Stability of α -Helices,” in *Advances in Protein Chemistry Volume 46*, vol. 46, Elsevier, 1995, pp. 141–176.
- [3] P. Luo and R. L. Baldwin, “Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: A framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water,” *Biochemistry*, vol. 36, no. 27, pp. 8413–8421, 1997.
- [4] A. R. Thomson *et al.*, “Computational design of water-soluble α -helical barrels,” *Science (80-.)*, vol. 346, no. 6208, pp. 485–488, Oct. 2014.
- [5] P. S. P. Wang, J. B. Nguyen, and A. Schepartz, “Design and High-Resolution Structure of a β 3 -Peptide Bundle Catalyst,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 19, pp. 6810–6813, May 2014.

Partie expérimentale

I. General methods

Commercially available reagents were used throughout without purification. The solvents were purchased from Sigma-Aldrich. THF, DCM and Toluene were preliminary dried by passing through solvent drying system (SPS 800 Manual from MBraun). TFA was purchased from Sigma-Aldrich. DMF and DCM for solid phase synthesis were purchased from Carlo ERBA. RP-HPLC-quality acetonitrile (CH₃CN) and MilliQ water were used for RP-HPLC analyses and purification. *N*-protected amino acids were purchased from Iris Biotech. Seiber resin PolyPeptide laboratories and Rink amide resin was purchased from Novabiochem laboratories.

Thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F254 (Merk) with detection by UV light and charring with 1% w/w ninhydrin in ethanol followed by heating. Flash Column chromatographies were carried out on silica gel (40-63 μm, Merck).

Solid phase peptide synthesis with microwave irradiation were carried out on the LibertyBlue system, from CEM (CEM μWaves S.A.S., Orsay, France).

Solid phase oligourea synthesis with microwave irradiation were carried out on DiscoverR System, or when notified on the DiscoverBio system, from CEM (CEM μWaves S.A.S., Orsay, France).

Analytical RP-HPLC analyses were performed on a Dionex ultimate U3000 using a Macherey-Nagel Nucleodur column (4.6 × 100 mm, 3 μm) at a flow rate of 1 mL/min. Semi-preparative purifications of oligoureas were performed on a Dionex ultimate U3000 using a Macherey-Nagel Nucleodur VP250/10 100-16 C18ec column (10 × 250 mm, 16 μm) at a flow rate of 4 mL/min. Preparative purifications of oligoureas were performed on a Gilson GX-281 using a Macherey-Nagel Nucleodur VP250/21 100-5 C18ec column (21 × 250 mm, 5 μm) at a flow rate of 20 mL/min.

¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded on three different NMR spectrometers: (1) an Avance II NMR spectrometer (Bruker Biospin) with a vertical 7.05T narrowbore/ultrashield magnet operating at 300 MHz for ¹H observation and 75 MHz for ¹³C observation by means of a 5-mm direct BBO 1H/19F_XBB_H probe with Z gradient capabilities; (2) a DPX-400 NMR spectrometer (Bruker Biospin) with a vertical 9.4T narrowbore/ultrashield magnet operating at 400 MHz for ¹H observation by means of a 5-mm direct QNP ¹H/¹³C/³¹P/¹⁹F probe with gradient capabilities; (3) an Avance III NMR spectrometer (Bruker Biospin) with a vertical 16.45T narrowbore/ultrashield magnet operating at 700 MHz for ¹H observation by means of a 5-mm TXI ¹H/¹³C/¹⁵N probe with Z gradient capabilities. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm, δ) relative to the ¹H or ¹³C residual signal of the deuterated solvent used. ¹H NMR splitting patterns with observed first-order coupling are designated as singlet (s), broad singlet (brs), doublet (d), triplet (t), or quartet (q). Not defined ¹H NMR splitting patterns are designated as multiplet (m). Coupling constants (J) are reported in hertz (Hz).

ESI-HRMS analyses were carried out on a Thermo Exactive with an ion trap mass analyzer from the Mass Spectrometry Laboratory at the European Institute of Chemistry and Biology (UMS 3033 - IECB), Pessac, France. ESI-MS analyses were carried out on a ThermoElectron LCQ Advantage spectrometer equipped with an ion trap mass or on a Tof Agilent 6230 with a time of flight analyser with an UHPLC Agilent 1290 Infinity [agilent Eclipse Plus C18 RRHD 1.8 μm 2.1*50 mm] from the Mass Spectrometry Laboratory at the European Institute of Chemistry and Biology (UMS 3033 - IECB).

All Circular dichroism (CD) spectra were recorded on a J-815 Jasco dichrographe (Jasco France, Nantes, France) using a quartz cell with a path length of 1 mm or 2mm (Hellma, Paris, France). Samples temperature was regulated at 25 °C. Data were collected in continuous scan mode with a data pitch of 0.1 nm, a scanning speed of 50 nm/min, 2 nm bandwidth and two accumulations per sample. Samples Data were collected as raw ellipticity (ψ in mdeg) and converted to pear residue mean ellipticity (PRME with $[\theta]$ = ellipticity) in deg.cm².dmol⁻¹.residue⁻¹ using the following equation:

$$[\theta] = \frac{\Psi \times 10^{-3}}{res \times l \times c}$$

Where *res* is the number of residues in the oligomer, *l* is the pathlength in cm, and *c* is the oligourea concentration in dmol.cm⁻³.

For X-Ray diffractions studies, collections were performed at the IECB X-ray facility (UMS3033) on two different high flux microfocus Rigaku rotating anodes at the copper $\kappa\alpha$ wavelength. Data were collected on a micromax MM07 (800W) equipped with osmic Varimax mirrors and semi-cylindrical R-Axis spider IP detector or on a FRX (2.7 kW) equipped with osmic Varimax mirrors and a Dectris Pilatus 200 K hybrid detector. The crystals were mounted on cryo-loops after quick soaking on Paratone-N oil from Hampton research and flash-frozen. Both diffractometers have partial chi geometry goniometer allowing omegascan data collections. The data were processed with the CrystalClear suite version 1.36 and 2.1b25 (CrystalClear (Rigaku/MS), 2006). All crystal structures were solved using direct methods implemented in SHELXD [1] and were refined using SHELXL 2013 version. Fullmatrix least-squares refinement were performed on F₂ for all unique reflections, minimizing $w(F_o - F_c)^2$, with anisotropic displacement parameters for non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were positioned in idealized positions and refined with a riding model, with U_{iso} constrained to 1.2 U_{eq} value of the parent atom (1.5 U_{eq} when CH₃). The positions and isotropic displacement parameters of the remaining hydrogen atoms were refined freely. SIMU and DELU commands were used to restrain some side chains as rigid groups and restrain their displacement parameters.

1. General procedure A for solid phase oligomers synthesis under microwave irradiation using azide strategy.

Oligomers were prepared on a 100 μ mol scale. Sieber resin [1] (loading 0.62mmol/g) was placed in a polypropylene SPE tube (CEM), and preswelled with DMF. All steps were performed under microwave irradiation on the Discover system (CEM). The temperature was maintained by modulation of power and controlled with a fiber optic sensor. The vessel was then placed inside the microwave reactor (CEM Discover). Fmoc- α -Xaa-OH (5eq relative to the resin loading), HBTU (5eq relative to the resin loading), HOBT (5eq relative to the resin loading) were dissolved in DMF. The mixture was added into the reaction vessel (CEM Discover). The vessel was then irradiated (50W, 50°C, 10 min). After that, the resin was filtered and washed with DMF. Fmoc was deprotected with 20% of piperidine in DMF, under microwave irradiation (50W, 50°C, 8 min). the azide protected succinimidyl carbamate monomer (1.5eq relative to the resin loading) were dissolved in DMF (1.5ml) and were added to the reaction vessel (CEM), followed by DIEA (3 eq relative to the loading resin). The vessel was then placed inside the microwave reactor (CEM Discover) and irradiated (50°C, 50W, 15 min). A double coupling was performed systematically. The resin was filtered and washed with DMF (4 \times 2ml). The reduction of azide group was performed in a mixture of 1,4-dioxane:H₂O (7:3 v/v), so before the reaction, the resin was washed with this solvents' mixture. Then the Staudinger reaction was performed under the microwave irradiation (50°C, 50W, 15 min) in 1,4-dioxane:H₂O (1.5ml) and with 1M PMe₃ solution in THF (10 eq relative to

the resin loading) as the reducing agent. The reaction was repeated once. After the reaction, the resin was filtered and washed with 1,4-dioxane:H₂O (1×2ml) and DMF (4×2ml). The coupling and reduction efficiency was monitored with the chloranil test.[2] Resin was filtered off, washed with DMF (2 × 2 mL) and DCM (2 × 2mL) and dried. The resin was finally swelled in a mixture TFA/CH₂Cl₂ (1 : 99, v/v) and left to react for 2 min. The reaction was repeated ten times. The filtrate was quenched with a mixture of pyridine/MeOH (20 : 80, v/v) and then evaporated under reduced pressure. After precipitation with cold Et₂O, the crude oligomers were finally purified by preparative or semi-preparative RP-HPLC using the appropriate gradient to a final purity ≥ 95% and lyophilized.

2. General procedure B for solid phase oligomers synthesis under microwave irradiation using azide strategy.

Oligomers were prepared on a 50 to 100 μmol scale. Polystyrene rink amide resin (loading 0.45mmol/g) was placed in a polypropylene SPE tube (CEM), and preswelled with DMF. All steps were performed under inert atmosphere and microwave irradiation on the Liberty Blue system (CEM). The temperature was maintained by modulation of power and controlled with a fiber optic sensor. The vessel was then placed inside the microwave reactor (CEM Liberty Blue). Fmoc-α-Xaa-OH (5eq relative to the resin loading), DIC (5eq relative to the resin loading), oxyma (5eq relative to the resin loading) were dissolved in DMF. The mixture was added into the reaction vessel (CEM Liberty Blue). The vessel was then irradiated (170W, 75°C, 15sec) + (35W, 90°C, 110sec). After that, the resin was filtered and washed with DMF. Fmoc was deprotected with 20% of piperidine in DMF, under microwave irradiation (155W, 75°C, 15sec) + (35W, 90°C, 50sec). The azide protected succinimidyl carbamate monomer (1.5eq relative to the resin loading) were dissolved in DMF (1.5ml) and were added to the reaction vessel (CEM), followed by DIEA (3 eq relative to the loading resin). The vessel was then placed inside the microwave reactor (CEM Discover Bio) and irradiated (50°C, 50W, 15 min). A double coupling was performed systematically. The resin was filtered and washed with DMF (4×2ml). The reduction of azide group was performed in a mixture of 1,4-dioxane:H₂O (7:3 v/v), so before the reaction, the resin was washed with this solvents' mixture. Then the Staudinger reaction was performed under the microwave irradiation (50°C, 50W, 15 min) in 1,4-dioxane:H₂O (1.5ml) and with 1M PMe₃ solution in THF (10 eq relative to the resin loading) as the reducing agent. The reaction was repeated once. After the reaction, the resin was filtered and washed with 1,4-dioxane:H₂O (1×2ml) and DMF (4×2ml). The coupling and reduction efficiency was monitored with the chloranil test. [2] Resin was filtered off, washed with DMF (2 × 2 mL) and DCM (2 × 2mL) and dried. The resin was finally swelled in a mixture TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v) and left to react for 120 min. After that time, the resin was filtered off, washed with TFA (2 x 2mL), DCM (2 x 2 mL) and the filtrate was evaporated under reduced pressure. After precipitation with cold Et₂O, the crude oligomers were finally purified by preparative or semi-preparative RP-HPLC using the appropriate gradient to a final purity ≥ 95% and lyophilized.

3. General procedure C for solid phase oligomers synthesis using N-Fmoc strategy.

Oligomers were prepared on a 50 to 100 μmol scale. Polystyrene rink amide resin (loading 0.45mmol/g) was placed in a polypropylene SPE tube (CEM), and preswelled with DMF. All steps were performed under inert atmosphere on the Liberty Blue system (CEM). The temperature was maintained by modulation of power and controlled with a fiber optic sensor. The vessel was then placed inside the microwave reactor (CEM Liberty Blue). Fmoc-α-Xaa-OH (5eq relative to the resin loading), DIC (5eq relative to the resin loading), oxyma (5eq

relative to the resin loading) were dissolved in DMF. The mixture was added into the reaction vessel (CEM Liberty Blue). The vessel was then irradiated (170W, 75°C, 15sec) + (35W, 90°C, 110sec). After that, the resin was filtered and washed with DMF. Fmoc was deprotected with 20% of piperidine in DMF, under microwave irradiation (155W, 75°C, 15sec) + (35W, 90°C, 50sec). the N-Fmoc protected succinimidyl carbamate monomer (5eq relative to the resin loading) were dissolved in DMF (2.5ml) and were added to the reaction vessel (CEM), followed by DIEA (5 eq relative to the loading resin). The mixture was added into the reaction vessel (CEM Liberty Blue) for 2 hours without microwave irradiation. The reaction was repeated once. Fmoc was deprotected with 20% of piperidine in DMF, under microwave irradiation (155W, 75°C, 15sec) + (35W, 90°C, 50sec). Resin was filtered off, washed with DMF (2 × 2 mL) and DCM (2 × 2mL) and dried. The resin was finally swelled in a mixture TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v) and left to react for 120 min. After that time, the resin was filtered off, washed with TFA (2 x 2mL), DCM (2 x 2 mL) and the filtrate was evaporated under reduced pressure. After precipitation with cold Et₂O, the crude oligomers were finally purified by preparative or semi-preparative RP-HPLC using the appropriate gradient to a final purity ≥ 95% and lyophilized.

II. Compounds described in Chapter 2

1. Part I : Oligomers soluble in organic solvents.

a. Preparation of O-succinimidyl carbamates M1, M2, M3.

Activated monomers **M1**, **M2**, and **M3** [3] was prepared using a previously described procedure.[3]

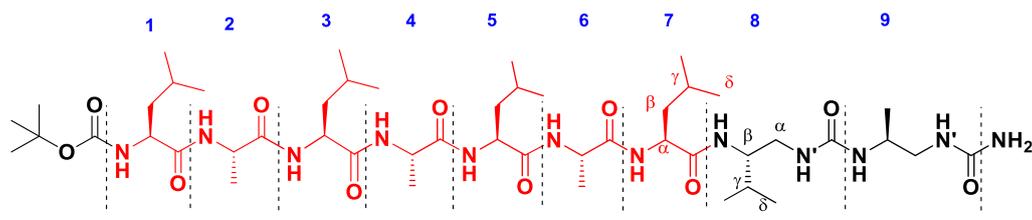
b. Preparation of O-succinimidyl carbamates M4.

Activated monomers **M4** [4] was prepared using a previously described procedure.[4]

c. Synthesis of oligomers

Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Val^U-Ala^U-NH₂ (**II.3**)

II.3 was synthesized on 100 μmol scale with the use of monomers **M1** and **M2** following the *general procedure A*. The last amino acid added to the support was Boc-Leu-OH following the *general procedure A*. The product was purified by semi-prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), MeOH (0.1% TFA); gradient 50-100%, 10 min; 100%, 10 min), flow = 4 ml/min. 7mg was obtained with total yield 11%. ¹H NMR (CD₃OH, 700 MHz) See **Figure 193** ; ESI-MS (Mw 1010.69) m/z 1011.60 [M + H]⁺, 1033.67 [M + Na]⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA),MeOH (0.1% TFA); gradient 50-100%, 5 min; 100%, 5min) t_R = 7.06 min.

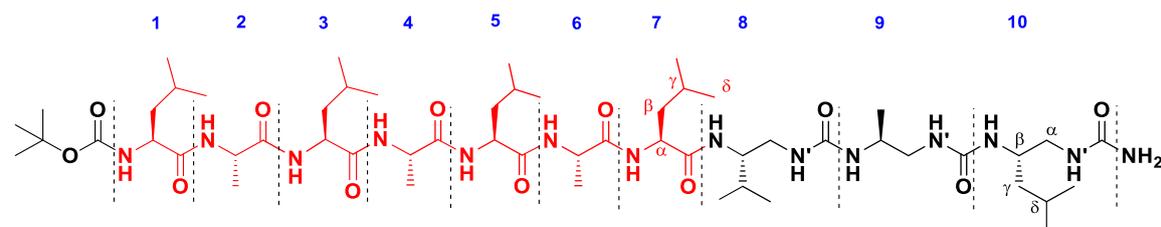


| Residue | HN | HN' | Hα | Hβ | Hγ | Hδ1 | Hδ2 |
|----------------------|-------|------|-----------|-----------|-------|------|------|
| | N | N' | Cα | Cβ | Cγ | Cδ1 | Cδ2 |
| Leu (1) | 7,22 | | 3,94 | 1,58/1,58 | 1,69 | 0,94 | 0,98 |
| | 123,8 | | 58,9 | 43,5 | 27,9 | 24,9 | 24,5 |
| Ala (2) | 8,74 | | 4,02 | 1,44 | | | |
| | 119,7 | | 56,1 | 18,8 | | | |
| Leu (3) | 7,66 | | 4,20 | 1,64/1,81 | 1,69 | 0,92 | 0,98 |
| | 116,1 | | 57,9 | 43,1 | 27,9 | 25,6 | 24,5 |
| Ala (4) | 7,55 | | 4,04 | 1,51 | | | |
| | 121,4 | | 56,1 | 18,5 | | | |
| Leu (5) | 8,05 | | 4,02 | 1,53/1,84 | 1,82 | 0,90 | 0,89 |
| | 116,0 | | 58,1 | 42,5 | 27,7 | 23,3 | 23,3 |
| Ala (6) | 7,73 | | 4,15 | 1,53 | | | |
| | 120,8 | | 55,4 | 18,9 | | | |
| Leu (7) | 7,85 | | 4,19 | 1,53/1,87 | 1,88 | 0,89 | 0,89 |
| | 117,2 | | 57,9 | 44,0 | 27,8 | 25,6 | 23,4 |
| Val ^u (8) | 7,28 | 5,77 | 2,90/3,57 | 3,94 | 1,76 | 0,94 | 0,94 |
| | 120,4 | nd | 44,4 | 57,5 | 33,9 | 21,8 | 21,4 |
| Ala ^u (9) | 5,7 | 6,24 | 2,88/3,39 | 3,9 | 1,08 | | |
| | nd | nd | 48,01 | 49,22 | 21,20 | | |

Figure 193 : ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shifts (in ppm) of **IL3** in CD_3OH (700 MHz) at 4mM

Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Val^U-Ala^U-Leu^U-NH₂ (II.4)

II.4 was synthesized on 100 μ mol scale with the use of monomers M1, M2, and M3 following the *general procedure A*. The last amino acid added to the support was Boc-Leu-OH following the *general procedure A*. The product was purified by semi-prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), MeOH (0.1% TFA); gradient 50-100%, 10 min; 100%, 10 min), flow = 4 ml/min. 7mg was obtained with total yield 10%. ¹H NMR (CD₃OH, 700 MHz) See **Figure 194** ; ESI-MS (Mw 1152.80) m/z 1153.53 [M + H]⁺, 1175.73 [M + Na]⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), MeOH (0.1% TFA); gradient 50-100%, 5 min; 100%, 5min) t_R = 7.26 min.

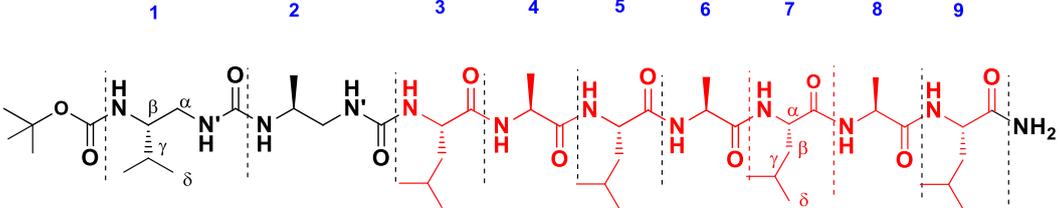


| Residue | HN | HN' | H α | H β | H γ | H δ | H δ 1 | H δ 2 | He1 | He2 |
|-----------------------|-------|------|------------|-----------|------------|------------|--------------|--------------|----------------|----------------|
| | N | N' | C α | C β | C γ | C δ | C δ 1 | C δ 2 | C ϵ 1 | C ϵ 2 |
| Leu (1) | 7,23 | | 3,94 | 1,57/1,57 | 1,68 | | 0,92 | 0,98 | | |
| | 123,9 | | 59,0 | 43,5 | 27,9 | | 24,9 | 24,4 | | |
| Ala (2) | 8,75 | | 4,01 | 1,44 | | | | | | |
| | 119,6 | | 56,1 | 18,8 | | | | | | |
| Leu (3) | 7,64 | | 4,19 | 1,64/1,82 | 1,68 | | 0,91 | 0,98 | | |
| | 116,2 | | 58,0 | 43,2 | 27,9 | | 25,5 | 24,4 | | |
| Ala (4) | 7,53 | | 4,04 | 1,50 | | | | | | |
| | 121,7 | | 56,3 | 18,6 | | | | | | |
| Leu (5) | 8,07 | | 3,99 | 1,51/1,85 | 1,81 | | 0,88 | 0,88 | | |
| | 116,2 | | 58,3 | 42,3 | 27,7 | | 23,3 | 23,3 | | |
| Ala (6) | 7,71 | | 4,16 | 1,53 | | | | | | |
| | 121,0 | | 55,6 | 18,9 | | | | | | |
| Leu (7) | 7,96 | | 4,15 | 1,54/1,84 | 1,90 | | 0,89 | 0,89 | | |
| | 117,0 | | 58,6 | 43,8 | 27,8 | | 21,2 | 21,2 | | |
| Val ^U (8) | 7,38 | 5,94 | 2,83/3,58 | 3,96 | 1,70 | | 0,89 | 0,89 | | |
| | 120,3 | nd | 44,4 | 57,3 | 34,3 | | 25,5 | 23,3 | | |
| Ala ^U (9) | 5,48 | 5,80 | 2,53/3,49 | 4,04 | 1,03 | | | | | |
| | nd | nd | 50,0 | 47,9 | 20,9 | | | | | |
| Leu ^U (10) | 6,13 | 6,71 | 2,77/3,56 | 3,91 | 1,21/1,31 | 1,72 | | | 0,91 | 0,91 |
| | 123,9 | nd | 47,7 | 51,6 | 45,9 | 27,9 | | | 22,2 | 22,2 |

Figure 194 : ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shifts (in ppm) of II.4 in CD₃OH (700 MHz) at 4mM

Boc-Val^U-Ala^U-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-NH₂ (**II.5**)

II.5 was synthesized on 100 μ mol scale with the use of monomers **M1** and **M4** following the *general procedure A*. The product was purified by semi-prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), MeOH (0.1% TFA); gradient 50-100%, 10 min; 100%, 10 min), flow = 4 ml/min. 2 mg was obtained with total yield 2 %. ¹H NMR (CD₃OH, 700 MHz) See **Figure 195** ; ESI-MS (Mw 1010.69) m/z 1033.73 [M + Na]⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), MeOH (0.1% TFA); gradient 50-100%, 5 min; 100%, 5min) t_R = 6.98 min.



| Residue | HN | HN' | H α | H β | H γ | H δ | H δ 1 | H δ 2 | H ϵ 1 | H ϵ 2 |
|----------------------|-------|------|------------|-----------|------------|------------|--------------|--------------|----------------|----------------|
| | N | N' | C α | C β | C γ | C δ | C δ 1 | C δ 2 | C ϵ 1 | C ϵ 2 |
| Val ^U (1) | 6,67 | 5,88 | 3,56/2,43 | 3,56 | 1,55 | | | | | |
| | 124,2 | nd | 46,9 | 59,6 | 34,1 | | 22,7 | 21,5 | | |
| Ala ^U (2) | 5,76 | 5,91 | 3,49/2,19 | 3,96 | 0,96 | | | | | |
| | nd | nd | 50,8 | 46,8 | 20,0 | | | | | |
| Leu (3) | 6,96 | | 3,85 | 1,48/1,53 | 1,71 | | | | | |
| | 120,5 | | 58,1 | 44,3 | 28,1 | | 25,5 | 25,3 | | |
| Ala (4) | 8,93 | | 4,06 | 1,45 | | | | | | |
| | 119,4 | | 55,8 | 18,9 | | | | | | |
| Leu (5) | 7,77 | | 4,13 | 1,51/1,81 | 1,61 | | | | | |
| | 118,3 | | 57,8 | 42,9 | 28,0 | | 25,3 | 24,4 | | |
| Ala (6) | 7,86 | | 3,91 | 1,40 | | | | | | |
| | 120,8 | | 55,9 | 18,6 | | | | | | |
| Leu (7) | 7,88 | | 4,02 | 1,47/1,79 | 1,78 | | | | | |
| | 116,3 | | 57,6 | 42,6 | 27,7 | | 26,1 | 23,8 | | |
| Ala (8) | 7,55 | | 4,07 | 1,44 | | | | | | |
| | 120,3 | | 54,6 | 18,9 | | | | | | |
| Leu (9) | 7,50 | | 4,19 | 1,52/1,74 | 1,78 | | | | | |
| | 117,0 | | 55,7 | 43,5 | 27,7 | | 23,0 | 23,0 | | |

Figure 195 : ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shifts (in ppm) of **II.5** in CD₃OH (700 MHz) at 4mM

Boc-Val^U-Ala^U-Leu^U-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-NH₂ (II.6)

II.6 was synthesized on 100 μ mol scale with the use of monomers M1, M3, and M4 following the *general procedure A*. The product was purified by semi-prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), MeOH (0.1% TFA); gradient 50-100%, 10 min; 100%, 10 min), flow = 4 ml/min. 4 mg was obtained with total yield 3 %. ¹H NMR (CD₃OH, 700 MHz) See **Figure 196** ; ESI-MS (Mw 1152.80) m/z 1175.87 [M + Na]⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), MeOH (0.1% TFA); gradient 50-100%, 5 min; 100%, 5min) t_R = 7.27 min.

| Residue | HN | HN' | H α | H β | H γ | H δ | H δ 1 | H δ 2 | He1 | He2 |
|----------------------|-------|------|------------|-----------|------------|------------|--------------|--------------|----------------|----------------|
| | N | N' | C α | C β | C γ | C δ | C δ 1 | C δ 2 | C ϵ 1 | C ϵ 2 |
| Val ^U (1) | 6,63 | 5,98 | 2,46/3,56 | 3,37 | 1,55 | | 0,83 | 0,87 | | |
| | 123,8 | nd | 46,2 | 60,1 | 34,1 | | 21,3 | 22,2 | | |
| Ala ^U (2) | 5,82 | 5,69 | 3,53/2,22 | 4,03 | 0,99 | | | | | |
| | 125,4 | nd | 50,6 | 48,7 | 20,4 | | | | | |
| Leu ^U (3) | 5,91 | 6,63 | 2,27/3,55 | 3,90 | 1,09/1,09 | 1,66 | | | 0,80 | 0,79 |
| | 121,4 | nd | 49,7 | 50,3 | 44,3 | 28,1 | | | 23,3 | 23,3 |
| Leu (4) | 7,24 | | 3,83 | 1,45/1,43 | 1,67 | | 0,87 | 0,83 | | |
| | 122,2 | | 58,2 | 44,6 | 28,1 | | 25,1 | 25,9 | | |
| Ala (5) | 9,07 | | 4,02 | 1,45 | | | | | | |
| | 119,1 | | 56,0 | 18,9 | | | | | | |
| Leu (6) | 7,99 | | 4,10 | 1,61/1,81 | 1,61 | | 0,86 | 0,92 | | |
| | 118,0 | | 57,9 | 42,8 | 27,8 | | 25,1 | 24,8 | | |
| Ala (7) | 7,79 | | 3,93 | 1,40 | | | | | | |
| | 120,8 | | 55,8 | 18,5 | | | | | | |
| Leu (8) | 7,90 | | 4,01 | 1,45/1,78 | 1,78 | | 0,83 | 0,82 | | |
| | 116,2 | | 57,6 | 42,7 | 27,7 | | 25,9 | 25,9 | | |
| Ala (9) | 7,54 | | 4,07 | 1,44 | | | | | | |
| | 120,3 | | 54,5 | 18,9 | | | | | | |
| Leu (10) | 7,48 | | 4,19 | 1,52/1,74 | 1,78 | | 0,80 | 0,80 | | |
| | 117,0 | | 55,7 | 43,5 | 27,7 | | 23,3 | 23,3 | | |

Figure 196 : ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shifts (in ppm) of II.6 in CD₃OH (700 MHz) at 4mM

Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-NH₂ (**II.7**)

II.7 was synthesized on 100 μmol scale following the *general procedure A*. The last amino acid added to the support was Boc-Leu-OH following the *general procedure A*. The final product **II.7** was purified by precipitation first in water and then in MeOH. 54 mg were obtained with total yield of 69%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ = 7.97 (m, 3H, NH), 7.87 (m, 2H, NH), 7.66 (s, 1H, NH), 7.22 (s, 1H, NH), 6.98 (m, 2H, NH), 4.24 (m, 6H, CHN), 3.93 (s, 1H, CHN), 1.59 (m, 4H, CH), 1.44 (m, 8H, CH₂), 1.37 (s, 9H, CH₃), 1.19 (m, 9H, CH₃), 0.85 (m, 24H, CH₃); ESI-MS (Mw 782.53) m/z : 783.20 [M + H]⁺, 805.40 [M + Na]⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), MeOH (0.1% TFA); gradient 50-100%, 5 min; 100%, 5min) t_R = 5.42 min.

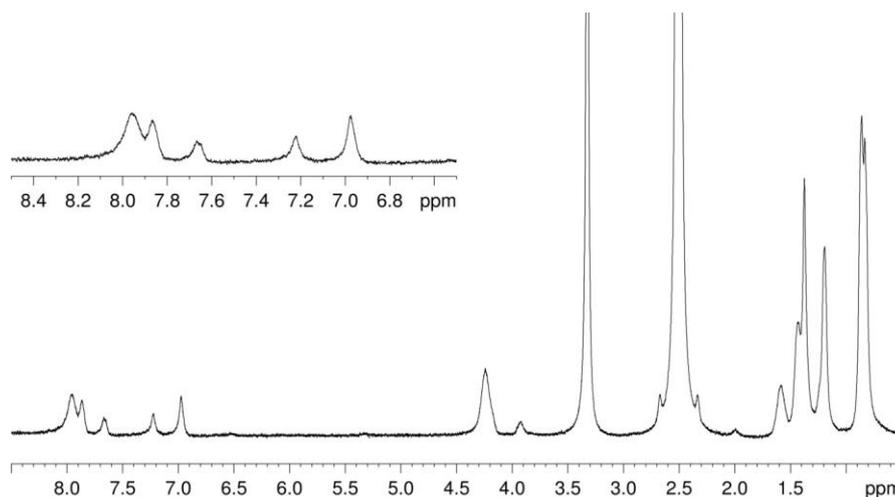


Figure 197 : ¹H NMR spectra of **II.7** in DMSO_d₆ (400 MHz) at 2mM

Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-NH₂ (**II.8**)

II.8 was synthesized on 100 μmol scale following the *general procedure A*. The last amino acid added to the support was Boc-Leu-OH following the *general procedure A*. The final product **II.8** was purified by precipitation first in water and then in MeOH. 70 mg were obtained with total yield of 72%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ = 7.93 (m, 7H, NH), 7.65 (m, 1H, NH), 7.20 (m, 1H, NH), 6.98 (m, 2H, NH), 4.23 (m, 8H, CHN), 3.89 (m, 1H, CHN), 1.59 (m, 5H, CH), 1.44 (m, 10H, CH₂), 1.37 (s, 9H, CH₃), 1.19 (m, 12H, CH₃), 0.83 (m, 30H, CH₃); ¹H NMR (TFE-*d*₂, 700 MHz) See Figure 199 ; ESI-MS (Mw 966.65) m/z 989.60 [M + Na]⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), MeOH (0.1% TFA); gradient 50-100%, 5 min; 100%, 5min) t_R = 5.37 min.

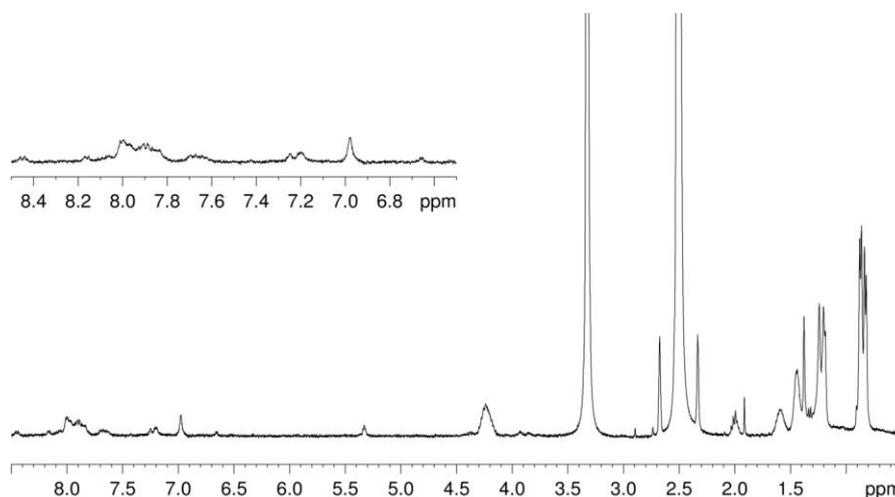
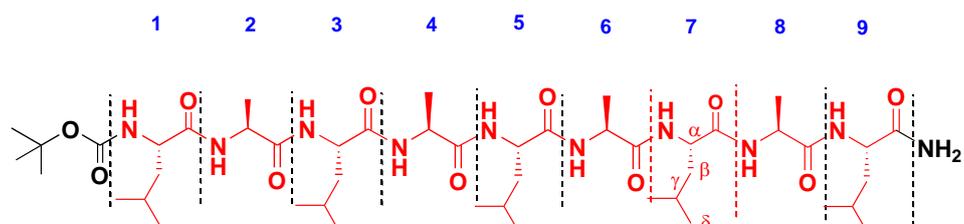


Figure 198 : ¹H NMR spectra of **II.8** in DMSO_d₆ (400 MHz) at 2mM



| Residue | HN N | H α | H β | H γ | H δ 1 | H δ 2 |
|---------|---------------|------------|-----------|------------|--------------|--------------|
| Leu (1) | 5,82 nd | 3,98 | 1,54/1,63 | 1,70 | 0,94/1,00 | |
| Ala (2) | 7,33 116,1 | 4,09 | 1,45 | | | |
| Leu (3) | 7,34 116,9 | 4,35 | 1,63/1,92 | 1,67 | 0,94/1,00 | |
| Ala (4) | 7,48 121,6 | 4,07 | 1,53 | | | |
| Leu (5) | 8,29 117,5 | 4,18 | 1,60/1,80 | nd | 0,98/0,91 | |
| Ala (6) | 7,57 121,5 | 4,07 | 1,60 | | | |
| Leu (7) | 8,18 118,0 | 4,18 | 1,51/1,95 | nd | 0,91/0,91 | |
| Ala (8) | 7,95 121,8 | 4,20 | 1,57 | | | |
| Leu (9) | 7,05 117,4 | 4,35 | 1,60/1,88 | nd | 0,94/1,00 | |

Figure 199 : ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shifts (in ppm) of **II.8** in TFE- d_2 (700 MHz) at 2mM

d. Circular Dichroism

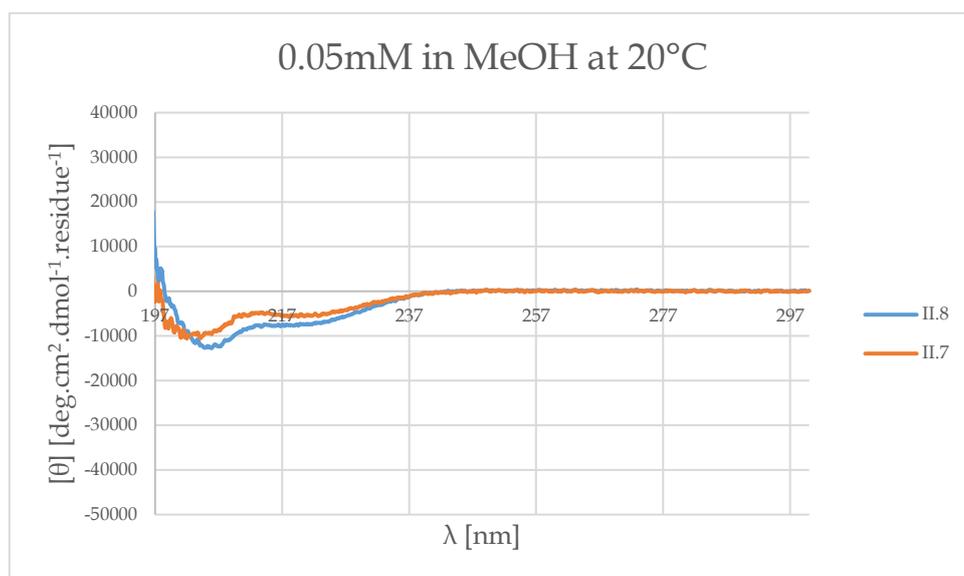


Figure 200 : CD spectra of peptides **II.7** and **II.8** recorded at 20°C in MeOH at 0.05mM

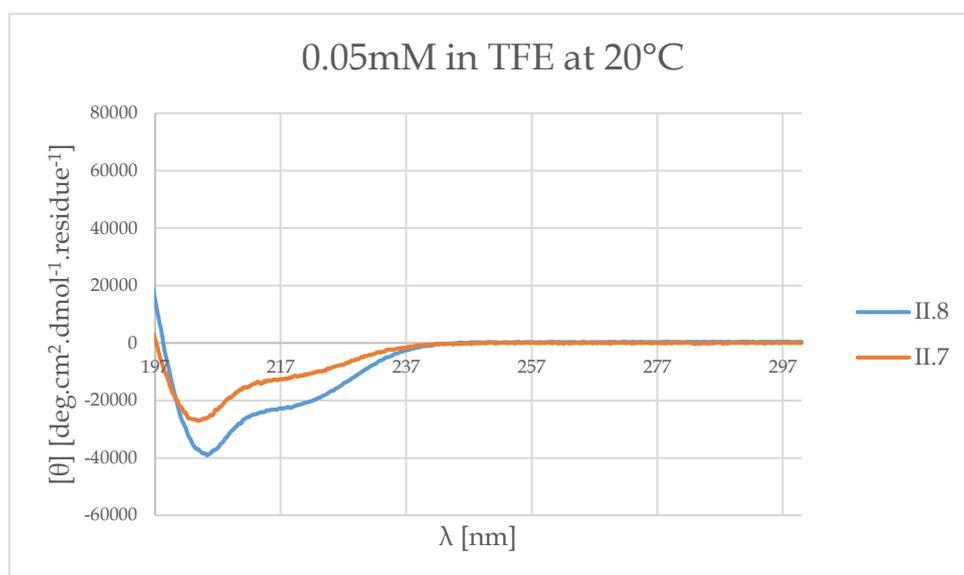


Figure 201 : CD spectra of peptides **II.7** and **II.8** recorded at 20°C in TFE at 0.05mM

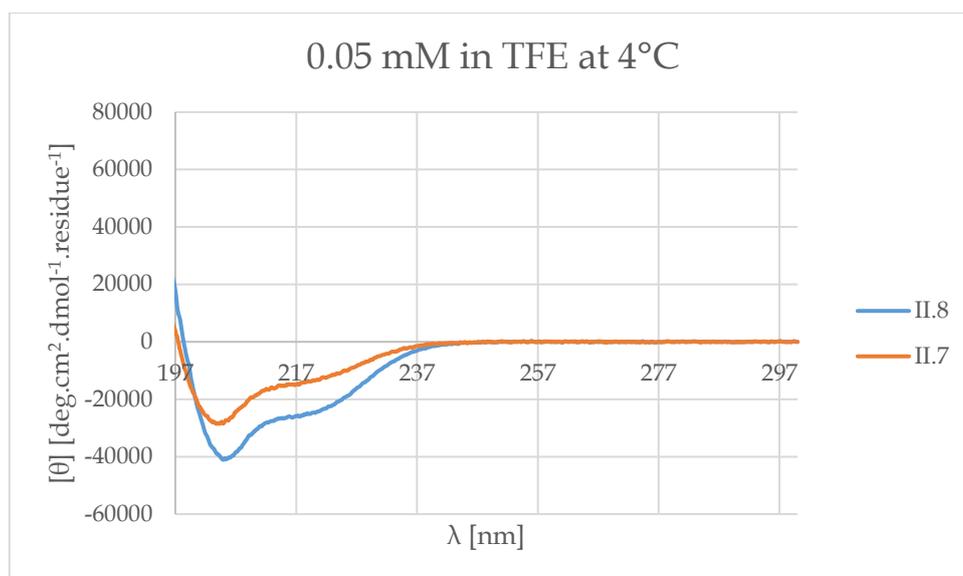


Figure 202 : CD spectra of peptides **II.7** and **II.8** recorded at 4°C in TFE at 0.05mM

| Solvent | Temp | II.7 | | II.8^a | |
|---------|------|--|-------------------|--|-------------------|
| | | [θ] (deg.cm ² .dmol ⁻¹ .res ⁻¹) | Helix content (%) | [θ] (deg.cm ² .dmol ⁻¹ .res ⁻¹) | Helix content (%) |
| MeOH | 20°C | -5284 | 28 | -7192 | 31 |
| TFE | 20°C | -10470 | 50 | -20177 | 79 |
| TFE | 4°C | -12476 | 55 | -23134 | 82 |

Figure 203 : mean residue molar ellipticity values at 222 nm for peptides **II.7**, **II.8**. (0.05mM) and calculated Helix content. ^aAlternatively, by assuming a 100% helix content for **II.8**. in TFE at 4°C, one can approximate the helix content of 11b in TFE and MeOH at 20°C to 87 % and 37 % respectively

e. X-ray crystallography

| | |
|---|---|
| Compound | II.4 |
| Formula | C58 H109 N15 O13 |
| Crystal System | Orthorhombic |
| Space Group | P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ |
| Z | 8 |
| Unit Cell Parameters | |
| a, Å | 10.175(6) |
| b, Å | 18.526(10) |
| c, Å | 37.81(2) |
| α , ° | 90 |
| β , ° | 90 |
| γ , ° | 90 |
| Temperature, K | 120(2) |
| Volume, Å ³ | 7127(7) |
| FW, g.mol ⁻¹ | 1224.60 |
| ρ , g.cm ⁻³ | 1.141 |
| λ , E | 1.54187 |
| θ min/ θ max | 4.5/52.628 |
| Radiation source | Rotating anode |
| Reflections Measured | 14185 |
| Reflections Unique ([$F_o > 2\sigma(F_o)$]) | 7260 |
| Parameters/restraints | 784/68 |
| GOF | 1.050 |
| R1 ($I > 2\sigma(I)$) | 0.0886 |
| wR2 (all data) | 0.2245 |
| CCDC# | CCDC 1058821 |

Figure 204 : X-ray crystallographic parameters for Oligomer **II.4**.

2. Part II : Oligomers soluble in water.

a. Preparation of O-succinimidyl carbamates M5, and M6.

Activated monomers **M5**, and **M6** [5] was prepared using a previously described procedure.[3]

b. Synthesis of oligomers

Ac-Tyr-Lys-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-NH₂ (**II.9**)

II.9 was synthesized on 50 μmol scale following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 42.5 mg was obtained with total yield 50 %. ESI-MS (*Mw* 1713.07) : m/z 572.03 [M+3H]³⁺, 429.52 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) t_R = 5.63 min.

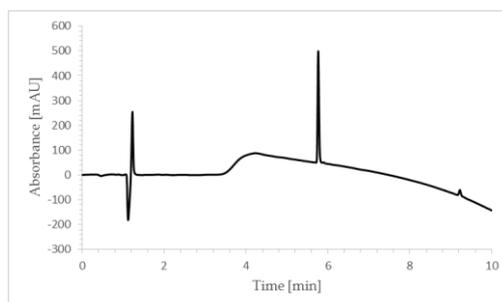


Figure 205 : RP-HPLC chromatogram of **II.9** after purification

Ac-(peptide 3Leu)-Ala^U-Ala^U-Ala^U-NH₂ (**II.10**)

II.10 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 31.0 mg was obtained with total yield 31 %. ESI-MS (*Mw* 2013.26) : m/z 1008.13 [M+2H]²⁺, 672.42 [M+3H]³⁺, 504.57 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) t_R = 6.05 min.

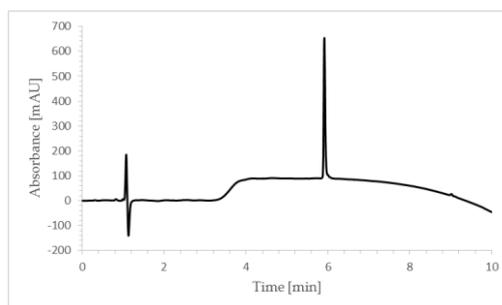


Figure 206 : RP-HPLC chromatogram of **II.10** after purification

Ac-Ala^U-Ala^U-Ala^U-(peptide 3Leu)-NH₂ (II.11)

II.11 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC: H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 12.0 mg was obtained with total yield 12 %. ESI-MS (*Mw* 2013.26) : *m/z* 672.42 [M+3H]³⁺, 504.57 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.16 min.

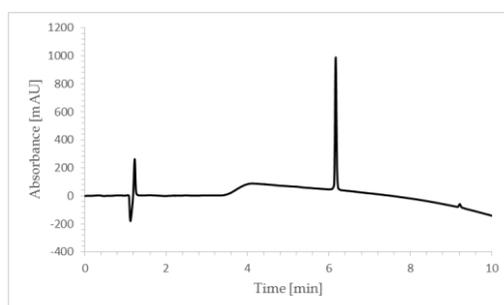


Figure 207 : RP-HPLC chromatogram of **II.11** after purification

Ac-Tyr-Lys-Ala-Ala-Phe-Ala-Lys-Ala-Ala-Phe-Ala-Lys-Ala-Ala-Phe-Ala-Lys-NH₂ (II.12)

II.12 was synthesized on 50 μmol scale following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 21.0 mg was obtained with total yield 23 %. ESI-MS (*Mw* 1816.15) : *m/z* 606.35 [M+3H]³⁺, 455.01 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.73 min.

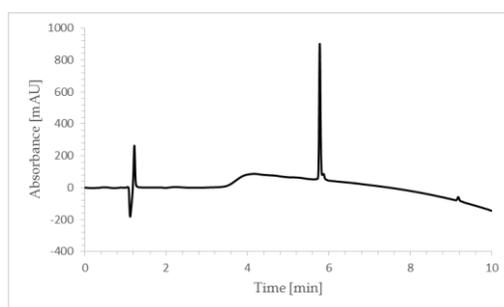


Figure 208 : RP-HPLC chromatogram of **II.12** after purification

Ac-(peptide 3Phe)-Ala^U-Ala^U-Ala^U-NH₂ (II.13)

II.13 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 32.0 mg was obtained with total yield 30 %. ESI-MS (*Mw* 2116.51) : *m/z* 706.41 [M+3H]³⁺, 530.06 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.94 min.

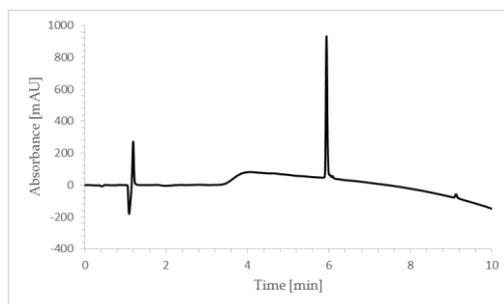


Figure 209 : RP-HPLC chromatogram of **II.13** after purification

Ac-Ala^U-Ala^U-Ala^U-(peptide 3Phe)-NH₂ (II.14)

II.14 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 11.4 mg was obtained with total yield 11 %. ESI-MS (*Mw* 2116.51) : *m/z* 706.41 [M+3H]³⁺, 530.06 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.12 min.

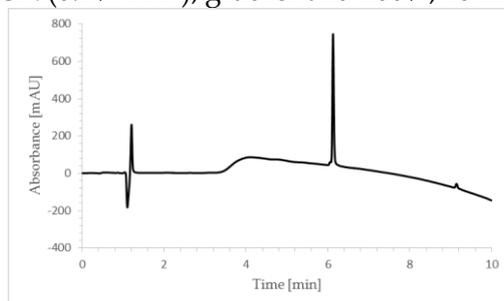


Figure 210 : RP-HPLC chromatogram of **II.14** after purification

Ac-Tyr-Lys-Ala-Ala-Ile-Ala-Lys-Ala-Ala-Ile-Ala-Lys-Ala-Ala-Ile-Ala-Lys-NH₂ (II.15)

II.15 was synthesized on 50 μ mol scale following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 10.3 mg was obtained with total yield 12 %. ESI-MS (*Mw* 1712.90) : *m/z* 1713.87 [M+H]⁺, 857.93 [M+2H]²⁺, 572.27 [M+3H]³⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.80 min.

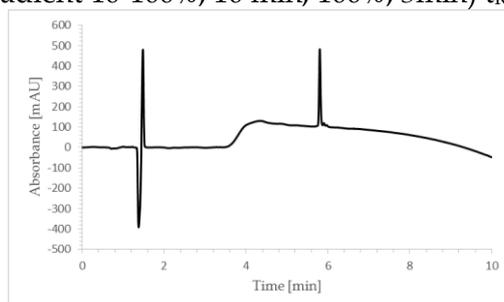


Figure 211 : RP-HPLC chromatogram of **II.15** after purification

Ac-(peptide 3Ile)-Ala^U-Ala^U-Ala^U-NH₂ (II.16)

II.16 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20min; 40-100%, 2min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 12.1 mg was obtained with total yield 12 %. ESI-MS (*Mw* 2014.46) : *m/z* 672.43 [M+3H]³⁺, 504.58 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10min; 100%, 3min)*t_R*=5.60min.

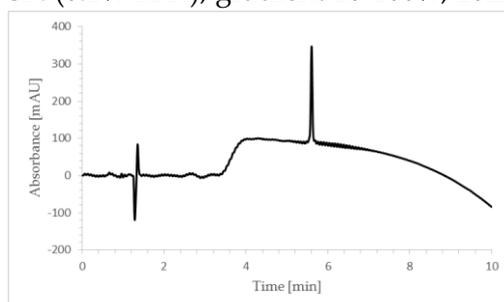


Figure 212 : RP-HPLC chromatogram of **II.16** after purification

Ac-Ala^U-Ala^U-Ala^U-(peptide 3Ile)-NH₂ (II.17)

II.17 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 5.7 mg was obtained with total yield 6 %. ESI-MS (*Mw* 2014.46) : *m/z* 1008.00 [M+2H]²⁺, 672.33 [M+3H]³⁺, 504.73 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 6.24 min.

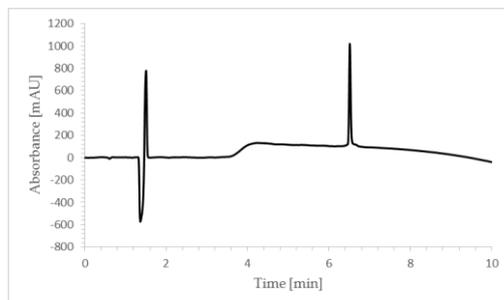


Figure 213 : RP-HPLC chromatogram of **II.17** after purification

Ac-(peptide 3Ile)-Ala^U-Ala^U-Ala^U-Ala^U-NH₂ (II.18)

II.18 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 26.6 mg was obtained with total yield 25 %. ESI-MS (*Mw* 2114.58) : *m/z* 705.61 [M+3H]³⁺, 529.43 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 5.83 min.

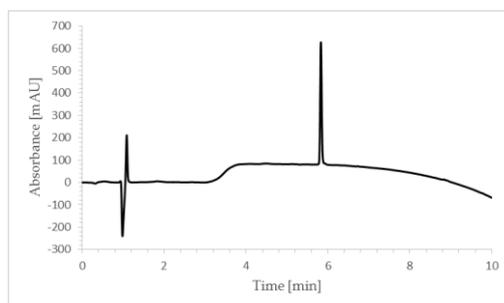


Figure 214 : RP-HPLC chromatogram of **II.18** after purification

Ac-Ala^U-Ala^U-Ala^U-Ala^U-(peptide 3Ile)-NH₂ (II.19)

II.19 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 14.5 mg was obtained with total yield 14 %. ESI-MS (*Mw* 2114.58) : *m/z* 705.67 [M+3H]³⁺, 529.49 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 5.88 min.

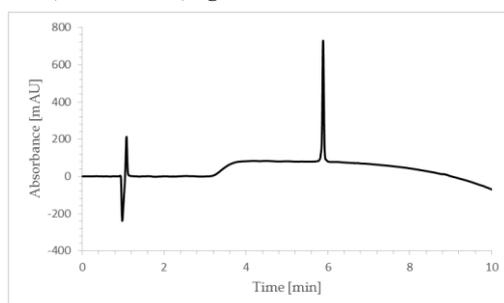


Figure 215 : RP-HPLC chromatogram of **II.19** after purification

Ac-(peptide 3Ile)-Val^U-Val^U-Val^U-NH₂ (II.20)

II.20 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M2** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 22.5 mg was obtained with total yield 21 %. ESI-MS (*Mw* 2098.62) : *m/z* 700.46 [M+3H]³⁺, 525.60 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.39 min.

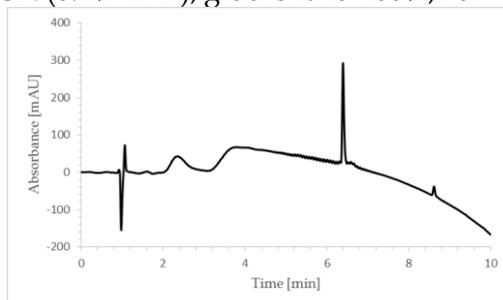


Figure 216 : RP-HPLC chromatogram of II.20 after purification

Ac-Val^U-Val^U-Val^U-(peptide 3Ile)-NH₂ (II.21)

II.21 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M2** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 5.1 mg was obtained with total yield 5 %. ESI-MS (*Mw* 2098.62) : *m/z* 700.46 [M+3H]³⁺, 525.60 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.64 min.

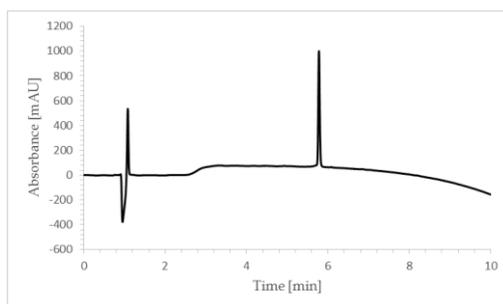


Figure 217 : RP-HPLC chromatogram of II.21 after purification

Ac-(peptide 3Ile)-Glu^U-Ala^U-Lys^U-NH₂ (II.22)

II.22 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M1**, **M5**, and **M6** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 42.0 mg was obtained with total yield 39 %. ESI-MS (*Mw* 2129.59) : *m/z* 710.66 [M+3H]³⁺, 533.25 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3 min) *t_R* = 5.69 min.

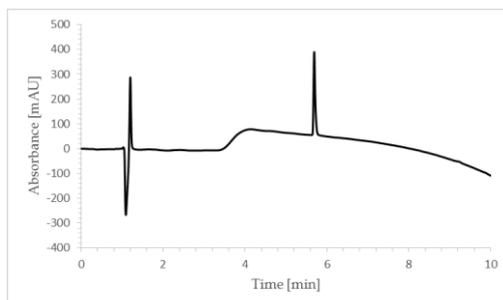


Figure 218 : RP-HPLC chromatogram of II.22 after purification

Ac-Glu^U-Ala^U-Lys^U-(peptide 3Ile)-NH₂ (II.23)

II.23 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer M1, M5, and M6 following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 14.5 mg was obtained with total yield 14 %. ESI-MS (*Mw* 2129.59) : *m/z* 710.67 [M+3H]³⁺, 533.25 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.27 min.

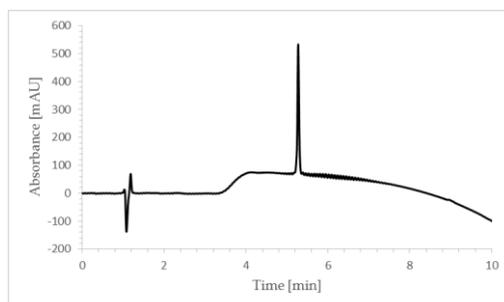


Figure 219 : RP-HPLC chromatogram of II.23 after purification

Ac-(peptide 3Ile)-Lys^U-Ala^U-Glu^U-NH₂ (II.24)

II.24 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer M1, M5, and M6 following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 31.0 mg was obtained with total yield 29 %. ESI-MS (*Mw* 2129.59) : *m/z* 710.60 [M+3H]³⁺, 533.18 [M+4H]⁴⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.62 min.

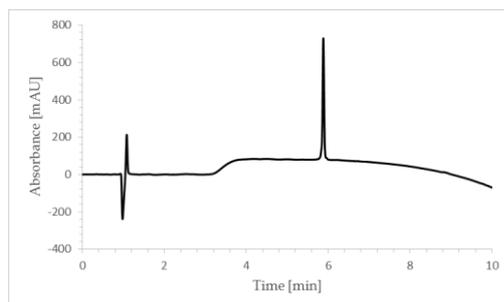


Figure 220 : RP-HPLC chromatogram of II.24 after purification

Ac-Lys^U-Ala^U-Glu^U-(peptide 3Ile)-NH₂ (II.25)

II.25 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer M1, M5, and M6 following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 20-40%, 20 min; 40-100%, 2 min; 100%, 4min), flow = 20 ml/min. 20.0 mg was obtained with total yield 19 %. ESI-MS (*Mw* 2129.59) : *m/z* 710.60 [M+3H]³⁺, 533.21 [M+4H]⁴⁺, 426.73 [M+5H]⁵⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.54 min.

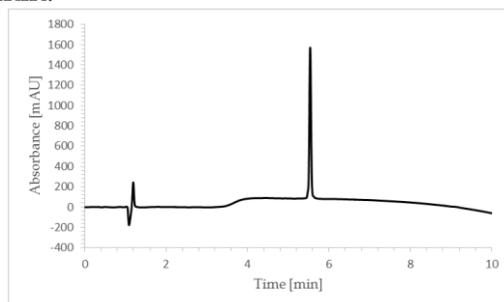


Figure 221 : RP-HPLC chromatogram of II.25 after purification

c. Circular Dichroism

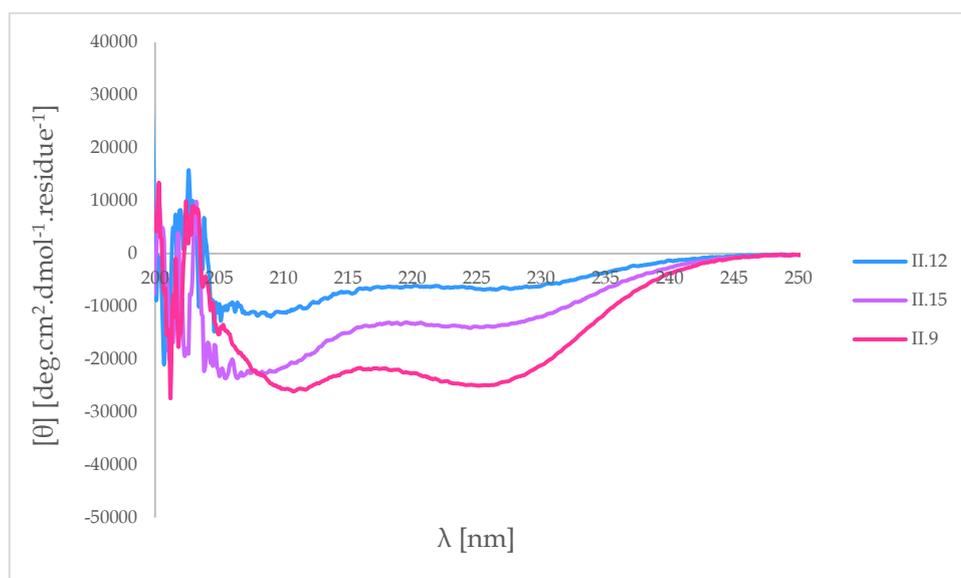


Figure 222 : CD spectra of peptides **II.9**, **II.12** and **II.15** recorded at 0°C in H₂O (pH 7.0) with 1mM de sodium phosphate and 1 M of NaCl at 0.05 mM

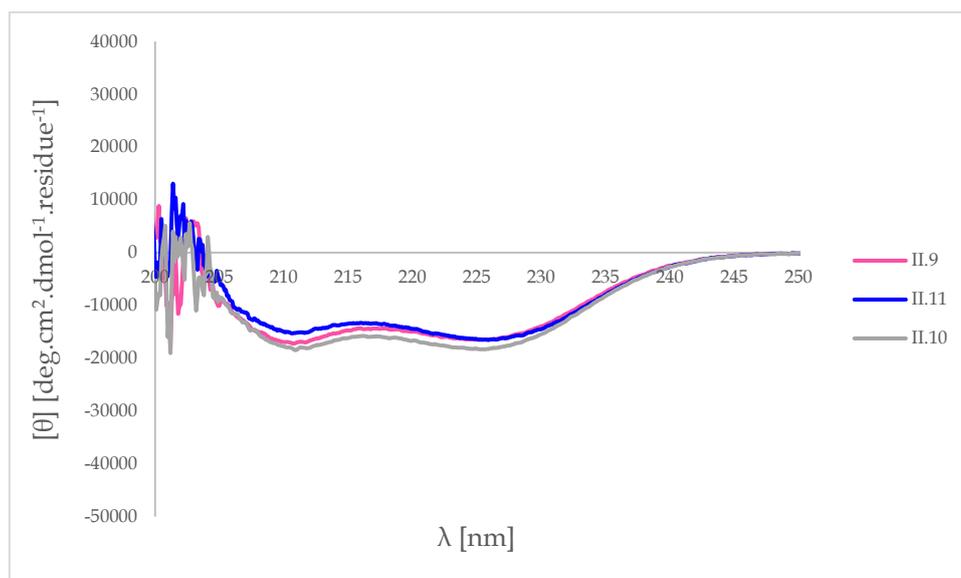


Figure 223 : CD spectra of oligomers **II.9**, **II.10** and **II.11** recorded at 0°C in H₂O (pH 7.0) with 1mM de sodium phosphate and 1 M of NaCl at 0.05 mM

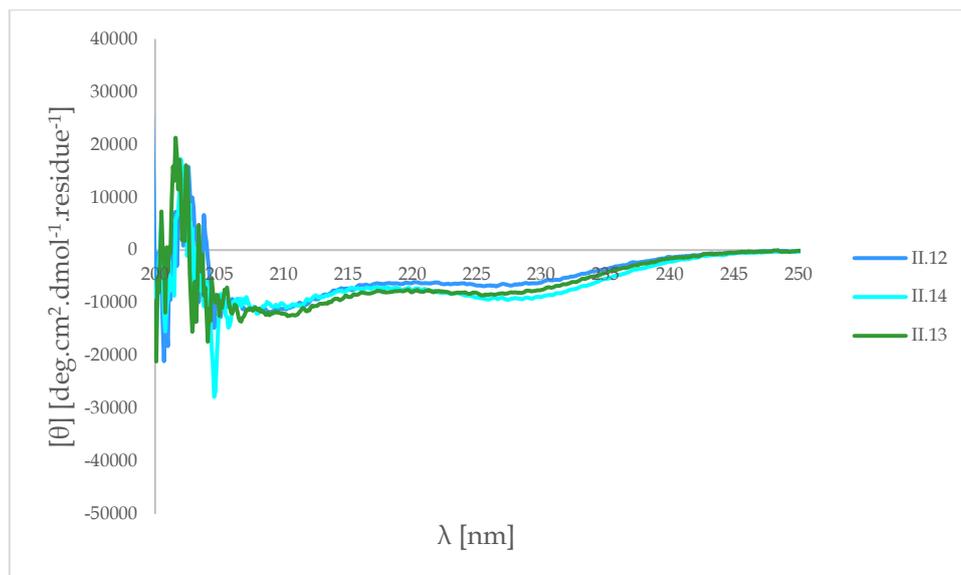


Figure 224 : CD spectra of oligomers **II.12**, **II.13** and **II.14** recorded at 0°C in H₂O (pH 7.0) with 1mM de sodium phosphate and 1 M of NaCl at 0.05 mM

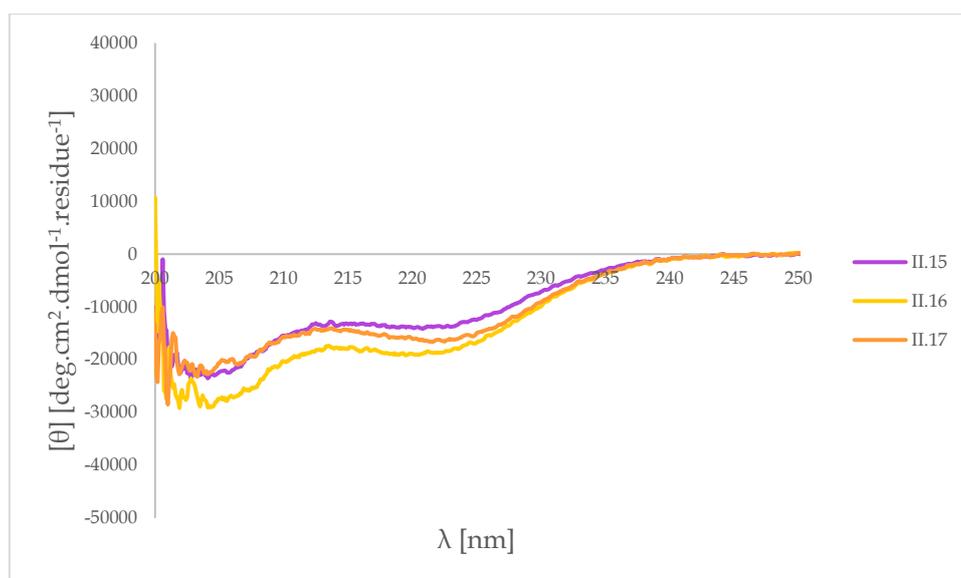


Figure 225 : CD spectra of oligomers **II.15**, **II.16** and **II.17** recorded at 0°C in H₂O (pH 7.0) with 1mM de sodium phosphate and 1 M of NaCl at 0.05 mM

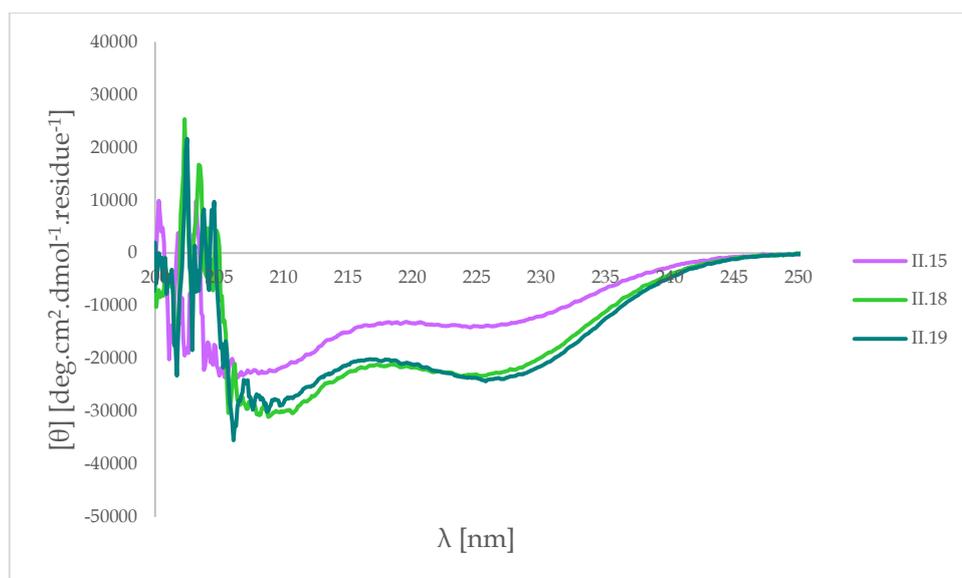


Figure 226 : CD spectra of oligomers **II.15**, **II.18** and **II.19** recorded at 0°C in H₂O (pH 7.0) with 1mM de sodium phosphate and 1 M of NaCl at 0.05 mM

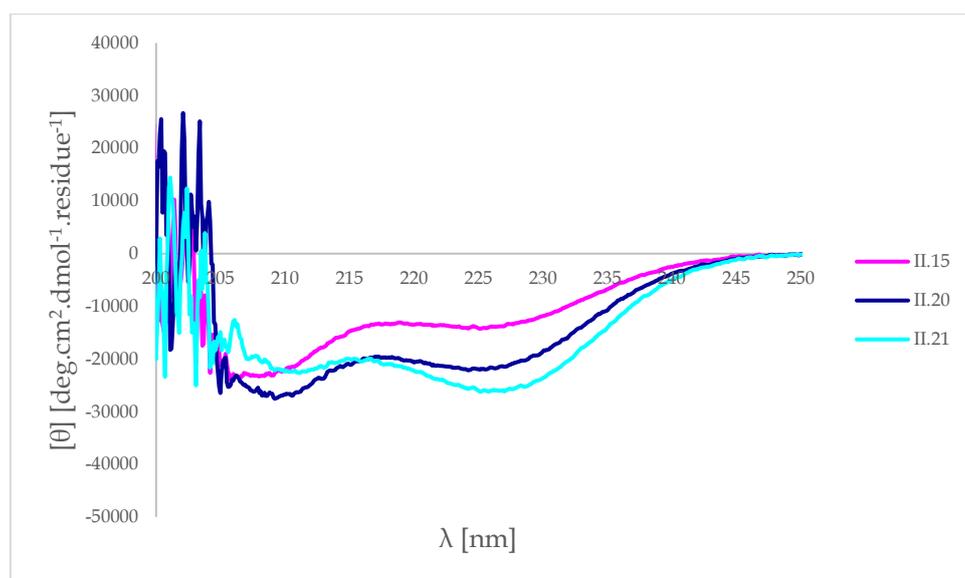


Figure 227 : CD spectra of oligomers **II.15**, **II.20** and **II.21** recorded at 0°C in H₂O (pH 7.0) with 1mM de sodium phosphate and 1 M of NaCl at 0.05 mM

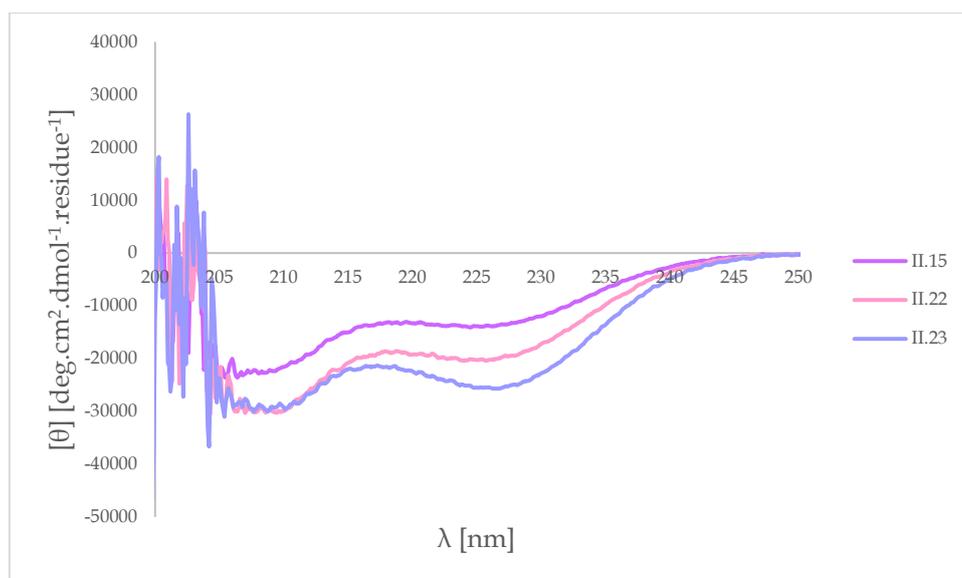


Figure 228 : CD spectra of oligomers **II.15**, **II.22** and **II.23** recorded at 0°C in H₂O (pH 7.0) with 1mM de sodium phosphate and 1 M of NaCl at 0.05 mM

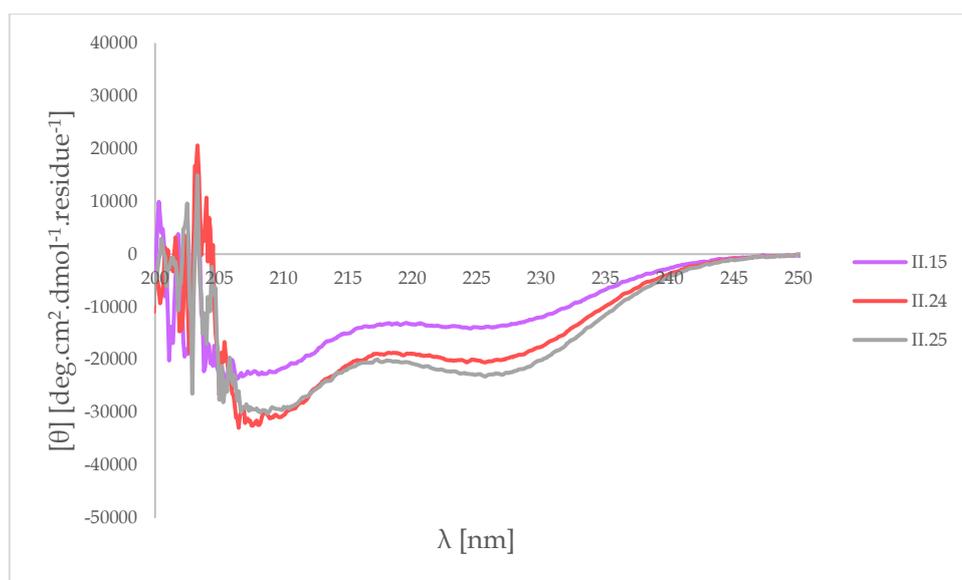


Figure 229 : CD spectra of oligomers **II.15**, **II.24** and **II.25** recorded at 0°C in H₂O (pH 7.0) with 1mM de sodium phosphate and 1 M of NaCl at 0.05 mM

III. Compounds described in Chapter 3

1. Screen 1: Substitution of 1 α - 1^U.

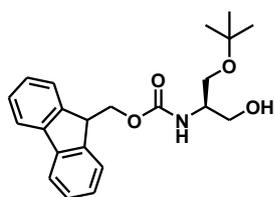
a. Preparation of O-succinimidyl carbamates M7, M8, M9, and M10.

Activated monomers M7, M8, M10 [6] and M9 [7] was prepared using a previously described procedure.[6]

b. Preparation of O-succinimidyl carbamates M11, M12, M13, and M14.

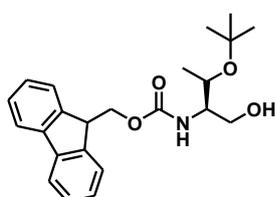
i. General procedure for N-Fmoc protected amino alcohol formation

The N-Fmoc protected α -amino acid (1 eq) was dissolved in anhydrous THF under N₂ atmosphere and cooled to -20 °C. After addition of isobutyl chloroformate (1.2 eq) and NMM (1.2 eq), the mixture was stirred at -20 °C for 30 min. The resulting white suspension was then filtered off and the filtrate was added at 0°C to a solution of NaBH₄ (2 eq) in water. The reaction mixture was left to react 10 min and then concentrated under reduced pressure. A 1M solution of KHSO₄ was added. The resulting aqueous solution was extracted two times with EtOAc. The organic layers were combined, washed two times with saturated solution of NaHCO₃, one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. Silica gel flash chromatography was performed in cyclohexane/EtOAc (7 : 3, v/v) in order to purify N-Fmoc protected amino alcohol derivatives : M11a, M12a, M13a, or M14a.



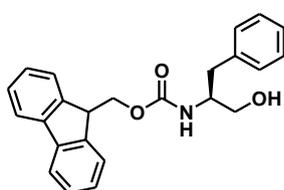
(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-hydroxy-3-tert-butoxypropan-2-yl)carbamate **M11a** :

Solid ; yield 93% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.77 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 5.52 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 4.40 (d, $J=6.8$ Hz, 2H), 4.23 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.76 (m, 2H), (3.62 (d, $J=2.25$, 2H), 1.20 (s, 9H).



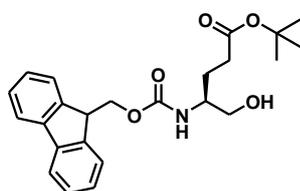
(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-hydroxy-3-tert-butoxybutan-2-yl)carbamate **M12a** :

Solid ; yield 97% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.77 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 5.24 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.23 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.96 (m, 1H), 3.70 (m, 2H), 3.63 (m, 1H), 1.22 (s, 9H), 1.17 (d, $J=6.2$ Hz, 3H).



(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-hydroxy-3-phenylpropan-2-yl)carbamate **M13a** :

Solid ; yield 51% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.77 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=7.5$ Hz, 4H), 7.21 (m, 3H), 4.96 (bs, 1H), 4.39 (m, 2H), 4.19 (t, $J=6.7$ Hz, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.64 (m, 2H), 2.87 (d, $J=6.6$ Hz, 2H).

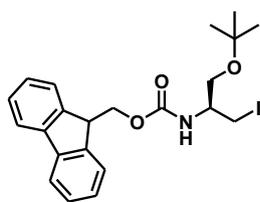


(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-hydroxy-4-tert-butoxycarbonylbutan-2-yl)carbamate **M14a** :

Solid ; yield 93% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.76 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.32 (t, $J=7.3$ Hz, 2H), 5.18 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.20 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.64 (m, 3H), 2.32 (m, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.45 (s, 9H).

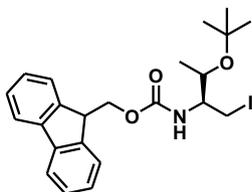
ii. General procedure for conversion of alcohol into iodine

To a solution of triphenylphosphine (3eq) in anhydrous CH_2Cl_2 at 0°C and under N_2 atmosphere, were successively added I_2 (3eq) and imidazole (3eq). *N*-Fmoc protected amino alcohol derivate : **M11a**, **M12a**, **M13a**, or **M14a**, (1eq) dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 , was next added dropwise and the reaction mixture was stirred and allowed to reach the room temperature. After 12 hours the reaction was completed. CH_2Cl_2 was evaporated under reduced pressure. The crude was dissolved in EtOAc and washed three times with 0.5M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, two times with a 1M solution of KHSO_4 , one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. Silica gel flash chromatography was performed in cyclohexane/EtOAc (9 : 1, v/v) in order to purify *N*-Fmoc protected amino iodine derivatives : **M11b**, **M12b**, **M13b**, or **M14b**.



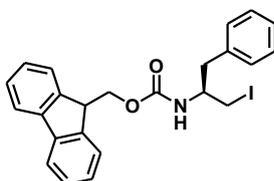
(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-iodo-3-tert-butoxypropan-2-yl)carbamate
M11b :

Oil ; yield 86% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.77 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 5.52 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.23 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 3.77 (bs, 1H), 3.62 (dd, $J=3.3$ Hz, $J=8.9$ Hz, 2H), 3.37 (m, 2H), 1.20 (s, 9H).



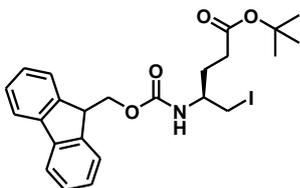
(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-iodo-3-tert-butoxybutan-2-yl)carbamate
M12b :

Oil ; yield 82% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.77 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 5.26 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 4.42 (m, 2H), 4.25 (t, $J=7.0$ Hz, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.20 (m, 2H), 1.22 (s, 9H), 1.15 (d, $J=6.2$ Hz, 3H).



(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-iodo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate
M13b :

Solid ; yield 85% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.77 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.57 (dd, $J=7.4$ Hz, $J=3.3$ Hz, 2H), 7.41 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.31 (m, 6H), 7.24 (m, 1H), 4.91 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 4.40 (d, $J=6.8$ Hz, 2H), 4.22 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.69 (m, 1H), 3.42 (m, 1H), 3.19 (m, 1H), 2.89 (m, 2H).

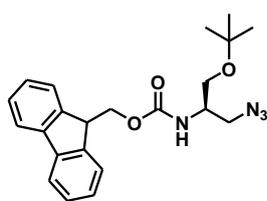


(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-iodo-4-tert-butoxycarbonylbutan-2-yl)carbamate
M14b :

Solid ; yield 91% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.77 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.41 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.32 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 5.04 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.22 (t, $J=6.9$ Hz, 1H), 3.43 (m, 2H), 3.30 (m, 1H), 2.31 (m, 2H), 1.87 (m, 2H), 1.45 (s, 9H).

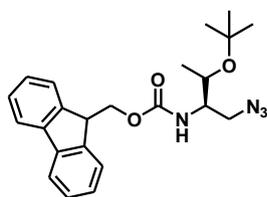
iii. General procedure for conversion of iodine into azide

N-Fmoc protected amino iodine derivate : **M11b**, **M12b**, **M13b**, or **M14b**, (1eq) was dissolved in DMF, then NaN_3 (3eq) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature. After 24 hours the reaction was completed. EtOAc was added. The crude was washed five times with H_2O , two times with a 1M solution of HCl, one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. Silica gel flash chromatography was performed in cyclohexane/EtOAc (9 : 1, v/v) in order to purify *N*-Fmoc protected amino azide derivatives : **M11c**, **M12c**, **M13c**, or **M14c**.



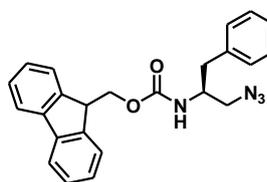
(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-azido-3-tertbutoxypropan-2-yl)carbamate **M11c** :

Oil ; yield 61% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.77 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 5.13 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.23 (t, $J=7.1$ Hz, 1H), 3.90 (bs, 1H), 3.50 (m, 2H), 3.44 (m, 1H), 3.39 (m, 2H), 1.20 (s, 9H).



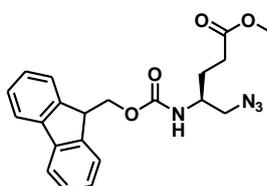
(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-azido-3-tert-Butoxybutan-2-yl)carbamate **M12c** :

Oil ; yield 56% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.77 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 5.11 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 4.44 (d, $J=6.9$ Hz, 2H), 4.25 (t, $J=6.7$ Hz, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.37 (m, 2H), 1.21 (s, 9H), 1.15 (d, $J=6.3$ Hz, 3H).



(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-azido-3-phenylpropan-2-yl)carbamate **M13c** :

Oil ; yield 61% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.77 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.56 (dd, $J=7.5$ Hz, $J=3.4$ Hz, 2H), 7.41 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 7.27 (m, 1H), 7.20 (m, 2H), 4.89 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.20 (t, $J=6.7$ Hz, 1H), 4.05 (m, 1H), 3.45 (m, 1H), 3.34 (m, 1H), 2.86 (m, 2H).



(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-azido-4-tert-Butoxycarbonylbutan-2-yl)carbamate **M14c** :

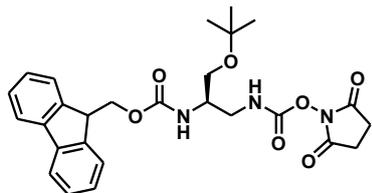
Oil ; yield 68% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.76 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.32 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 5.02 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 4.42 (m, 2H), 4.21 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.78 (m, 1H), 3.43 (m, 2H), 2.30 (m, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.44 (s, 9H).

iv. General procedure for conversion of azide into amine

To a solution of *N*-Fmoc protected amino azide derivate : **M11c**, **M12c**, **M13c**, or **M14c**, in a mixture of MeOH and CHCl_3 (7 :3, v/v) was gently added 10% of Pd/C and the reaction mixture was stirred overnight under 1 bar H_2 atmosphere (balloon). After filtration over Millipore paper filter, the filtrate was concentrated under reduced pressure to quantitatively furnish corresponding amino derivatives as pale oils. *N*-Fmoc monoprotected diamine derivatives were not isolated and were directly engaged in the next step.

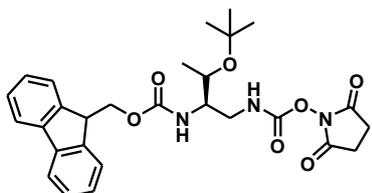
v. General procedure for the preparation of N-Fmoc protected activated carbamates monomers

To a stirred suspension of disuccinimidyl carbonate (1 eq) in freshly distilled CH_2Cl_2 was added drop by drop a solution of *N*-Fmoc monoprotected diamine derivate, with NMM (1.2 eq) in distilled CH_2Cl_2 . The reaction mixture was left to react 4 hours and then a 1M solution of KHSO_4 was added. The organic layer was extracted, washed one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum to furnish activated carbamates **M11**, **M12**, **M13**, **M14** as white solids.



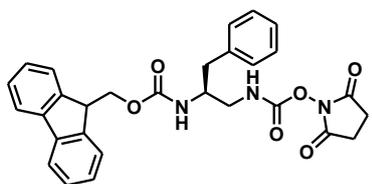
(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-3-tert-butoxypropan-2-yl)-1,2-carbamate **M11**:

Solid ; yield 76% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.77 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 6.19 (bs, 1H), 5.38 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.23 (t, $J=6.9$ Hz, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.51 (m, 2H), 3.45 (m, 2H), 2.79 (s, 4H), 1.20 (s, 9H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) : 169.88, 156.67, 151.94, 144.15, 143.99, 141.45, 127.83, 127.21, 125.35, 125.25, 120.09, 73.96, 67.20, 62.72, 50.23, 47.35, 45.17, 27.47, 25.59 ; HRMS (ESI) : m/z calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 532.20542 found 532.20511.



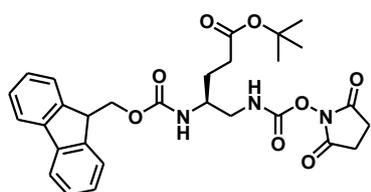
(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-3-tert-butoxybutan-2-yl)-1,2-carbamate **M12**:

Solid ; yield 80% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.77 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 6.14 (s, 1H), 5.22 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 4.45 (m, 2H), 4.26 (t, $J=6.7$ Hz, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.76 (m, 1H), 3.39 (m, 2H), 2.76 (s, 4H), 1.21 (s, 9H), 1.16 (d, $J=6.1$ Hz, 3H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) : 169.82, 157.39, 151.99, 144.23, 143.97, 141.48, 127.82, 127.21, 125.34, 125.26, 120.08, 74.53, 67.32, 67.19, 55.75, 47.42, 45.39, 28.80, 25.57, 20.16 ; HRMS (ESI) : m/z calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 546.22107 found 546.22071.



(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-3-phenylpropan-2-yl)-1,2-carbamate **M13**:

Solid ; yield 80% ; $^1\text{H NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 300 MHz) δ (ppm) : 8.25 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.23 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.14 (m, 2H), 7.04 (m, 6H), 3.99 (m, 3H), 3.58 (m, 1H), 2.97 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 2.57 (s, 4H), 2.32 (m, 2H) ; $^{13}\text{C NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) δ (ppm) : 170.94, 155.64, 152.21, 143.95, 143.84, 140.74, 138.60, 129.17, 128.20, 127.66, 127.11, 126.15, 125.27, 120.15, 65.37, 52.31, 46.72, 44.85, 37.26, 25.3357 ; HRMS (ESI) : m/z calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 514.19726 found 514.19738.



(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-4-tert-butoxycarbonylbutan-2-yl)-1,2-carbamate **M14**:

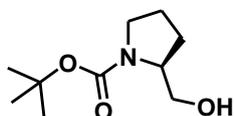
Solid ; yield 81% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.75 (d, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.39 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 6.18 (s, 1H), 5.27 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 4.48 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 4.20 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.34 (m, 2H), 2.75 (s, 4H), 2.32 (m, 2H), 1.80 (m, 2H), 1.43 (s, 9H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) : 172.93, 169.92, 156.89, 152.26, 144.18, 143.96, 141.45, 127.81, 127.21, 125.38, 125.28, 120.07, 81.18, 67.00, 51.61, 47.38, 46.40, 32.01, 28.19, 26.90, 25.57 ; HRMS (ESI) : m/z calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 552.23404 found 552.23389.

c. Preparation of O-succinimidyl carbamates M15.

i. General procedure for N-Boc protected amino alcohol formation

The N-Boc protected α -proline (1 eq; 16.27 mmol; 3.5g) was dissolved in anhydrous THF (40 mL) under N_2 atmosphere and cooled to $-20\text{ }^\circ\text{C}$. After addition of isobutyl chloroformate (1.2 eq; 19.53 mmol; 2.54 mL) and NMM (1.2 eq; 19.53 mmol; 2.14 mL), the mixture was stirred at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min. The resulting white suspension was then filtered off and the filtrate was added at 0°C to a solution of NaBH_4 (2 eq; 32.54 mmol; 1.23g) in water. The reaction mixture was left to react 10 min and then concentrated under reduced pressure. A 1M solution of KHSO_4 was added. The resulting aqueous solution was extracted two times with EtOAc. The organic layers were combined, washed two times with saturated solution of NaHCO_3 , one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum to furnish N-Boc protected amino alcohol (**M15a**).

(S)-2-hydroxymethyl-pyrrolidine-1-carboxy acid *tert*-Butyl ester **M15a** :



Oil ; yield 94% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 4.76 (s, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.61 (m, 2H), 3.48 (m, 1H), 3.34 (m, 1H), 2.03 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.55 (m, 1H), 1.51 (s, 9H).

ii. General procedure for conversion of alcohol into phthalimide – the Mitsunobu reaction

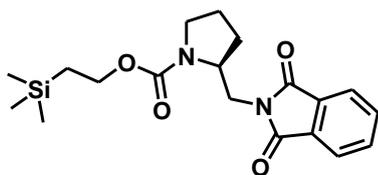
N-Boc protected amino alcohol **M15a** (1 eq; 15.21 mmol; 3.06 g) was dissolved in anhydrous THF (40 mL) under N_2 atmosphere. Triphenylphosphine (1.2 eq; 18.25 mmol; 4.79 g) and phthalimide (1.2 eq; 18.25 mmol; 2.68 g) were added, followed by dropwise addition of DIAD (1.2 eq; 18.25 mmol; 3.59 mL). The reaction mixture was stirred for 30 min, at 0°C and was then allowed to reach room temperature. The reaction was completed after 12h stirring. THF was evaporated under reduced pressure and the crude material was used in the next step without any further purification.

iii. General procedure for Boc removal

N-Boc protected amino phthalimide derivative was dissolved in pure TFA (10 mL) and left to react without stirring for 30 min. The TFA was removed under reduced pressure. The resulting TFA salt was precipitated with Et_2O , filtered, dried overnight on vacuum line. No purification and no isolation of the TFA salt was done. It was directly engaged in the next step.

iv. General procedure for Teoc insertion

The resulting TFA salt (1eq; 11.91 mmol; 4.1g) was dissolved in CH_3CN (35 mL), then TEA (1 eq; 11.91 mmol; 1.65 mL) was added followed by dropwise addition of 4-nitrophenyl 2-(trimethylsilyl)ethyl carbonate (1eq; 11.91 mmol; 3.4g) dissolved in CH_3CN (35 mL). The reaction mixture was stirred 12 hours at room temperature. CH_3CN was evaporated under reduced pressure. EtOAc was added. The crude was washed two times with a 1M solution of KHSO_4 , five times with saturated solution of NaHCO_3 , one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. Silica gel flash chromatography was performed in cyclohexane/EtOAc (9 : 1, v/v) in order to purify N-Teoc protected amino phthalimide derivative (**M15b**).



(S)- 2-[(1,3-dioxoisindolin-2-ylamino)-methyl]-pyrrolidine-1-carboxylic acid (trimethylsilyl)ethyl ester **M15b** :

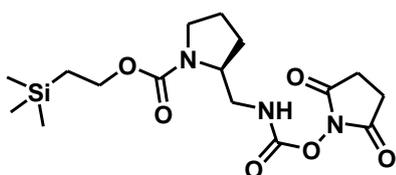
Solid ; yield 35% ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.87 (d, 2H, $J=3$ Hz, 2H), 7.73 (d, $J=3$ Hz, 2H), 4.35 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.85 (m, 2H), 3.67 (m, 1H), 3.47 (m, 2H), 1.96 (m, 3H) 1.85 (m, 1H), 0.90 (m, 1H), 0.76 (m, 1H), 0.001 (s, 9H).

v. General procedure to generate the amine from the phthalimide - the hydrazinolysis reaction

To a solution of N-Teoc protected amino phthalimide derivate (**M15b**) (1 eq ; 4.5 mmol ; 1.7g) in MeOH (10 mL) was added hydrazine hydrate 64% (2.5 eq, 17.35 mmol, 0.84 mL). The reaction mixture was heated to reflux and heating was maintained for 4 hours with apparition of a white precipitate. The reaction mixture was filtered off, washed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude material was dissolved in EtOAc (30 mL). The organic layer was washed with 1M HCl aqueous solution (2×15 mL). The combined aqueous phases were again washed with EtOAc (2×20 mL) and were neutralized by addition of solid NaHCO_3 until pH 8. The aqueous phase was finally extracted with DCM (3×20 mL) and the combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried on Na_2SO_4 , concentrated under reduced pressure. The crude was used as such for the final step.

vi. General procedure for the preparation of N-Teoc protected activated carbamates monomers

To a stirred suspension of disuccinimidyl carbonate (1.2 eq; 5.4 mmol; 1.38 g) in freshly distilled CH_2Cl_2 (10 mL) was added drop by drop a solution of N-Teoc monoprotected diamine derivate (1 eq ; 4.5mmol) in distilled CH_2Cl_2 (10 mL). The reaction mixture was left to react 4 hours and then a 1M solution of KHSO_4 was added. The organic layer was extracted, washed one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The resulting crude was purified by precipitation in Et_2O to furnish activated carbamates **M15** as white solid.



(S)- 2-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxycarbonylamino]-methyl]-pyrrolidine-1-carboxylic acid (trimethylsilyl)ethyl ester **M15**:

Solid ; yield 58% ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 4.23 (t, $J=9$ Hz, 2H), 4.09 (m, 1H), 3.44 (m, 3H), 3.26 (m, 1H), 2.84 (s, 4H), 2.07 (m, 1H), 1.89 (m, 2H), 1.73 (m, 1H), 1.06 (t, $J=9$ Hz, 2H), 0.08 (s, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) : 169.96, 151.85, 64.11, 57.14, 47.70, 47.19, 29.70, 25.60, 24.10, 17.92, -1.33 ; HRMS (ESI) : m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_6\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 386.17419 found 386.17447.

d. Synthesis of oligomers

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.1)

III.1 was synthesized on 50 μ mol scale following the *general procedure C*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-39%, 20 min; 39-100%, 2 min; 100%, 1min), flow = 4 ml/min. 26.9 mg was obtained with total yield 39 %. ESI-MS (*M_w* 1383.55) : *m/z* 1384.54 [M+H]⁺, 692.80 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.50 min.

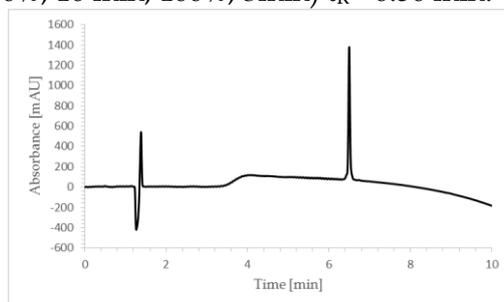


Figure 230 : RP-HPLC chromatogram of III.1 after purification

H-Thr^U-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.2)

III.2 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer M12 following the *general procedure C*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-39%, 20 min; 39-100%, 2 min; 100%, 1min), flow = 4 ml/min. 4.5 mg was obtained with total yield 6 %. ESI-MS (*M_w* 1412.59) : *m/z* 1413.60 [M+H]⁺, 706.87 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.49 min.

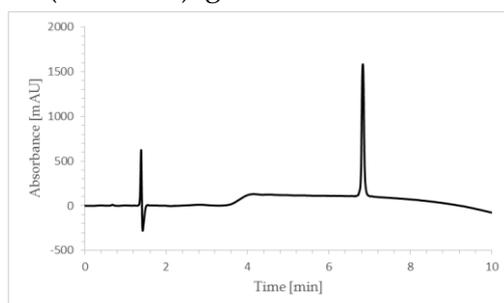


Figure 231 : RP-HPLC chromatogram of III.2 after purification

H-Thr-Ser^U-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.3)

III.3 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer M11 following the *general procedure C*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-39%, 20 min; 39-100%, 2 min; 100%, 1min), flow = 4 ml/min. 5.7 mg was obtained with total yield 8 %. ESI-MS (*M_w* 1412.59) : *m/z* 1413.60 [M+H]⁺, 706.80 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.52 min.

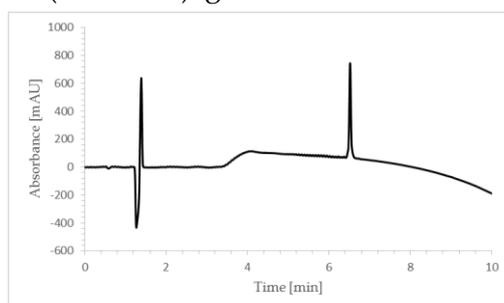


Figure 232 : RP-HPLC chromatogram of III.3 after purification

H-Thr-Ser-Phe^U-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.4)

III.4 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer **M13** following the *general procedure C*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-39%, 20 min; 39-100%, 2 min; 100%, 1min), flow = 4 ml/min. 18.8 mg was obtained with total yield 27 %. ESI-MS (*Mw* 1412.59) : *m/z* 1413.60 [M+H]⁺, 707.27 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.75 min.

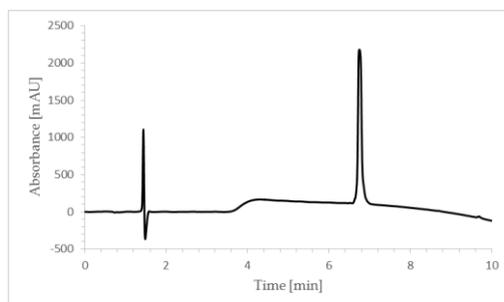


Figure 233 : RP-HPLC chromatogram of **III.4** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala^U-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.5)

III.5 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer **M13** following the *general procedure C*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-39%, 20 min; 39-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 6.8 mg was obtained with total yield 10 %. ESI-MS (*Mw* 1412.59) : *m/z* 1413.67 [M+H]⁺, 706.80 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.41 min.

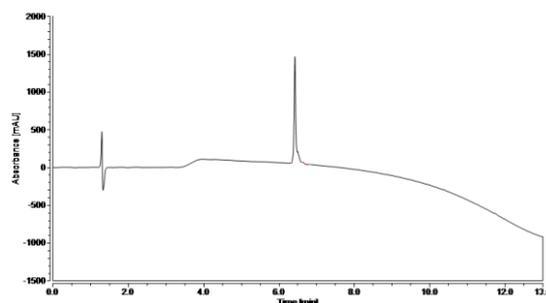


Figure 234 : RP-HPLC chromatogram of **III.5** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu^U-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.6)

III.6 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer **M14** following the *general procedure C*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-39%, 20 min; 39-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 11.9 mg was obtained with total yield 17 %. ESI-MS (*Mw* 1412.59) : *m/z* 1413.60 [M+H]⁺, 706.80 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.96 min.

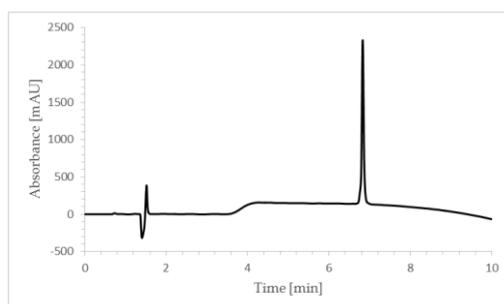


Figure 235 : RP-HPLC chromatogram of **III.6** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr^U-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.7)

III.7 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M8** following the *general procedure C*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-50%, 20 min; 50-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 12.5 mg was obtained with total yield 18 %. ESI-MS (*Mw* 1412.59) : *m/z* 1413.60 [M+H]⁺, 707.27 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.71 min.

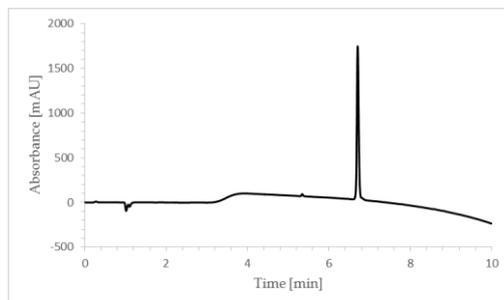


Figure 236 : RP-HPLC chromatogram of **III.7** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.8)

III.8 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M9** following the *general procedure C*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-42%, 12 min; 42-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 8.7 mg was obtained with total yield 12 %. ESI-MS (*Mw* 1412.59) : *m/z* 1413.47 [M+H]⁺, 706.87 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.10 min.

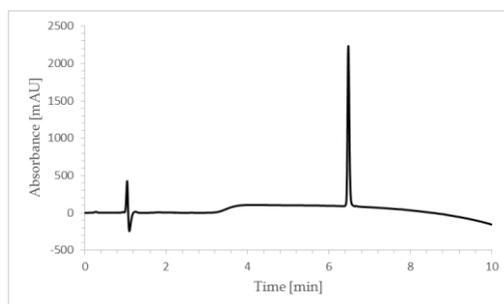


Figure 237 : RP-HPLC chromatogram of **III.8** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala^U-Leu-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.9)

III.9 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M7** following the *general procedure C*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 15 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 12.0 mg was obtained with total yield 17 %. ESI-MS (*Mw* 1412.59) : *m/z* 1413.60 [M+H]⁺, 706.80 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.79 min.

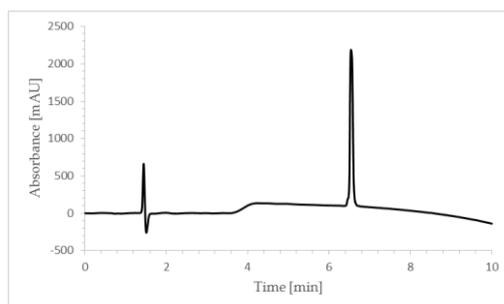


Figure 238 : RP-HPLC chromatogram of **III.9** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu^U-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.10)

III.10 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer **M10** following the *general procedure C*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 15 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 13.2 mg was obtained with total yield 19 %. ESI-MS (*Mw* 1412.59) : *m/z* 1413.40 [M+H]⁺, 706.80 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.99 min.

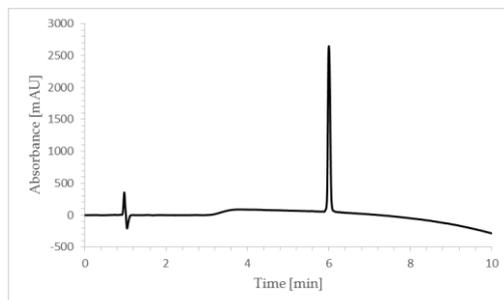


Figure 239 : RP-HPLC chromatogram of **III.10** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu^U-Ser-Pro-NH₂ (III.11)

III.11 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer **M10** following the *general procedure C*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-42%, 12 min; 42-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 14.3 mg was obtained with total yield 20 %. ESI-MS (*Mw* 1412.59) : *m/z* 1413.53 [M+H]⁺, 707.20 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.01 min.

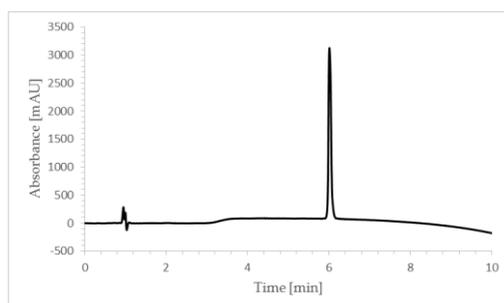


Figure 240 : RP-HPLC chromatogram of **III.11** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser^U-Pro-NH₂ (III.12)

III.12 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomer **M11** following the *general procedure C*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-39%, 20 min; 39-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 19.7 mg was obtained with total yield 28 %. ESI-MS (*Mw* 1412.59) : *m/z* 1413.53 [M+H]⁺, 706.80 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.45 min.

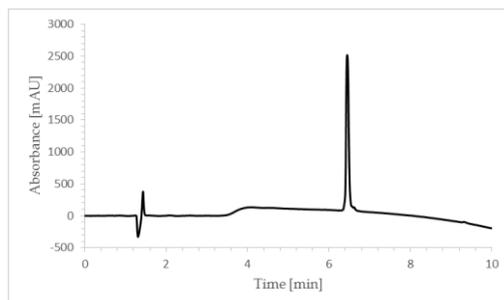


Figure 241 : RP-HPLC chromatogram of **III.12** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro^U-NH₂ (III.13)

III.13 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M15** following the *general procedure B*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 15 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 21.8 mg was obtained with total yield 31 %. ESI-MS (*M_w* 1412.59) : *m/z* 1413.53 [M+H]⁺, 706.87 [M+2H]²⁺; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.86 min.

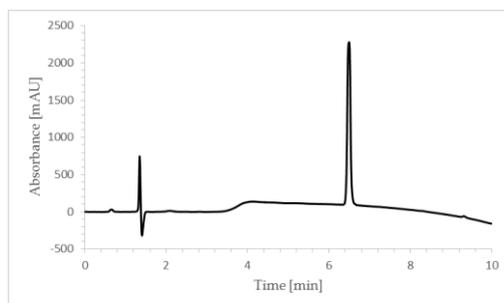


Figure 242 : RP-HPLC chromatogram of **III.13** after purification

e. Inhibition curves.

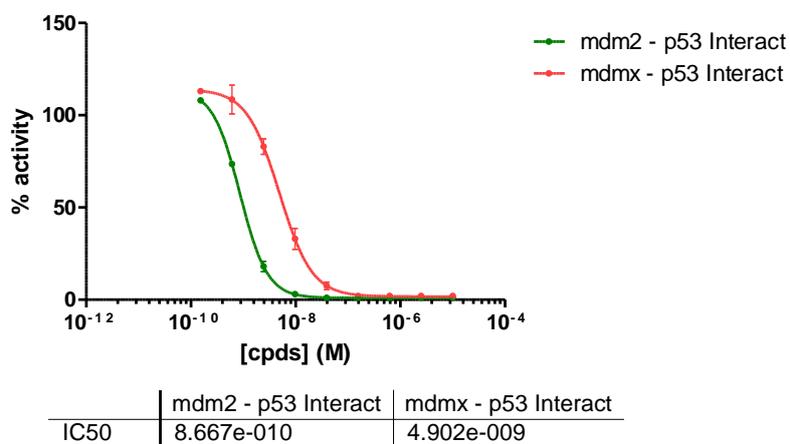


Figure 243 : Inhibition curve of the peptide III.1 on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

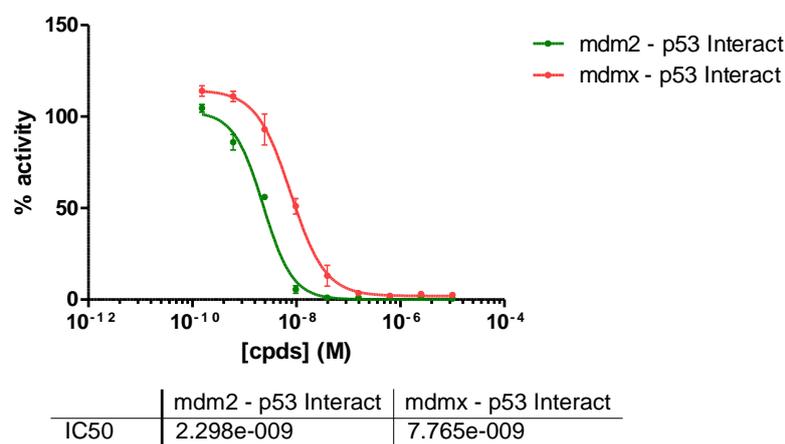


Figure 244 : Inhibition curve of the peptide III.2 on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

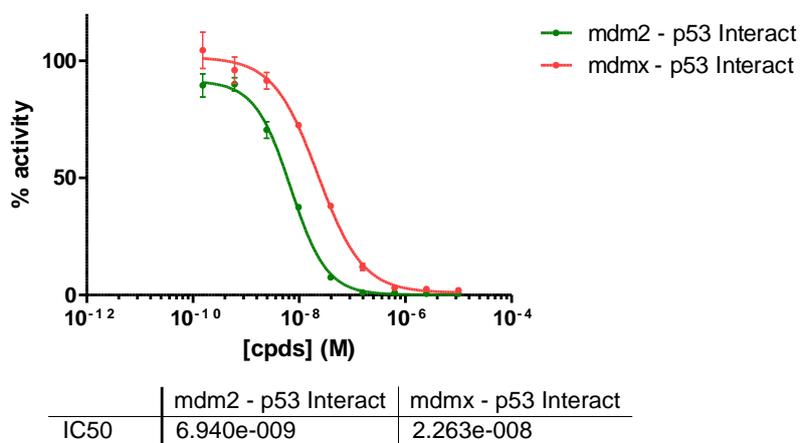
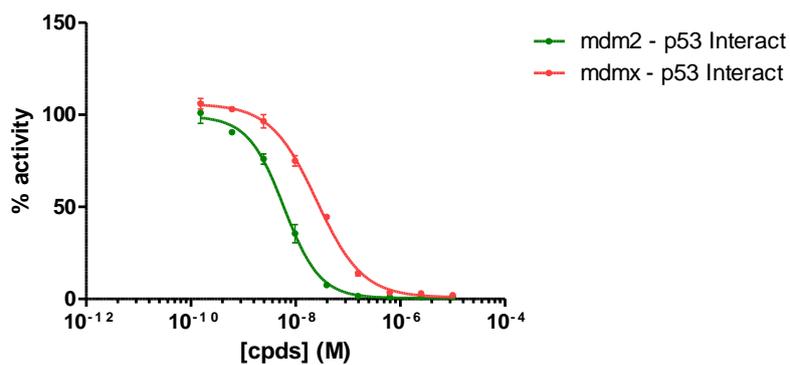
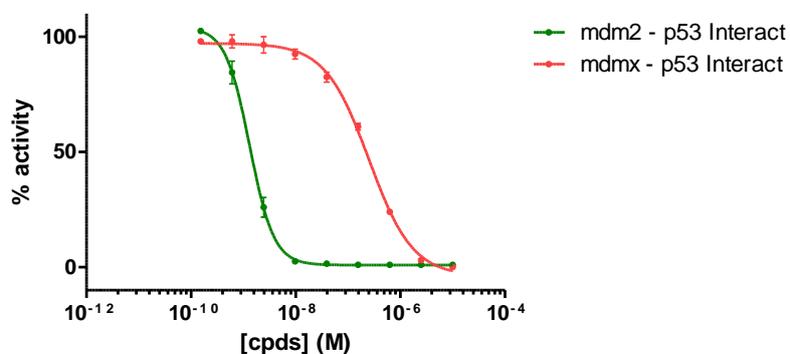


Figure 245 : Inhibition curve of the peptide III.3 on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction



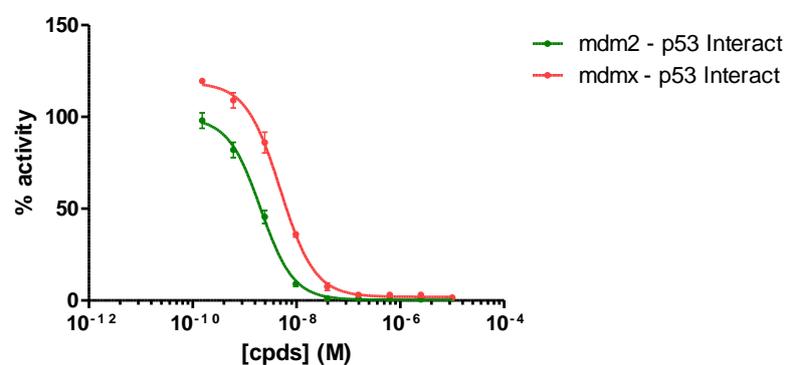
| | mdm2 - p53 Interact | mdmx - p53 Interact |
|------|---------------------|---------------------|
| IC50 | 5.979e-009 | 2.528e-008 |

Figure 246 : Inhibition curve of the peptide **III.9** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction



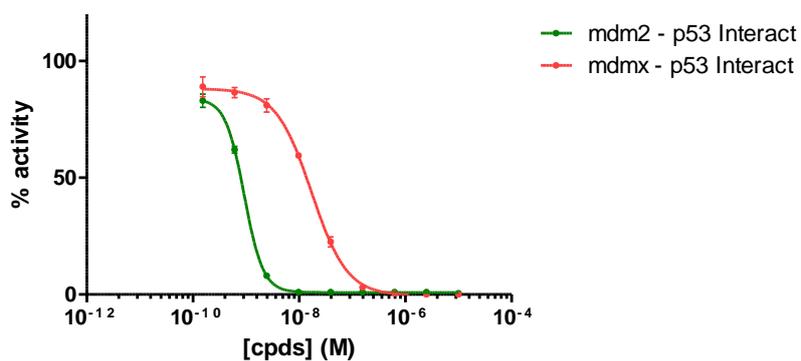
| | mdm2 - p53 Interact | mdmx - p53 Interact |
|------|---------------------|---------------------|
| IC50 | 1.324e-009 | 2.522e-007 |

Figure 247 : Inhibition curve of the peptide **III.10** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction



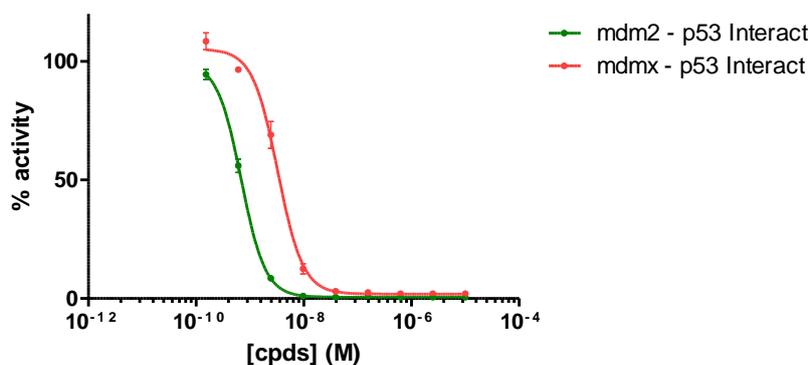
| | mdm2 - p53 Interact | mdmx - p53 Interact |
|------|---------------------|---------------------|
| IC50 | 2.041e-009 | 4.896e-009 |

Figure 248 : Inhibition curve of the peptide **III.11** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction



| | mdm2 - p53 Interact | mdmx - p53 Interact |
|------|---------------------|---------------------|
| IC50 | 9.271e-010 | 1.710e-008 |

Figure 249 : Inhibition curve of the peptide **III.12** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction



| | mdm2 - p53 Interact | mdmx - p53 Interact |
|------|---------------------|---------------------|
| IC50 | 6.916e-010 | 3.295e-009 |

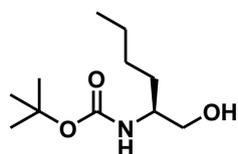
Figure 250 : Inhibition curve of the peptide **III.13** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

2. Screen 2: Substitution of 3 α - 2^U.**a. Preparation of O-succinimidyl carbamates M16**

Activated monomer **M16** [3] was prepared using a previously described procedure.[3]

b. Preparation of O-succinimidyl carbamates M17.*i. General procedure for N-Boc protected amino alcohol formation*

The N-Boc protected α -norleucine (1 eq; 22.31 mmol; 5g) was dissolved in anhydrous THF (40 mL) under N₂ atmosphere and cooled to -20 °C. After addition of isobutyl chloroformate (1.2 eq; 26.77 mmol; 3.47 mL) and NMM (1.2 eq; 26.77 mmol; 2.94 mL), the mixture was stirred at -20 °C for 30 min. The resulting white suspension was then filtered off and the filtrate was added at 0°C to a solution of NaBH₄ (2 eq; 44.62 mmol; 1.69 g) in water (10 mL). The reaction mixture was left to react overnight and then concentrated under reduced pressure. A 1M solution of KHSO₄ was added. The resulting aqueous solution was extracted two times with EtOAc. The organic layers were combined, washed two times with saturated solution of NaHCO₃, one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum to furnish N-Boc protected amino alcohol **M17a**.



(S)-tert-butyl (1-hydroxyhex-2-yl)carbamate M17a :

Oil ; yield quant ; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 4.68 (s, 1H), 3.48-3.68 (m, 3H), 2.95 (bs, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.27-1.31 (m, 5H), 0.85-0.92 (m, 4H).

ii. General procedure for conversion of alcohol into phtalimide – the Mitsunobu reaction

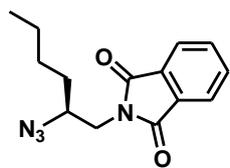
N-Boc protected amino alcohol **M17a** (1 eq; 22.31 mmol) was dissolved in anhydrous THF (40 mL) under N₂ atmosphere. Triphenylphosphine (1.2 eq; 26.77 mmol; 7.02 g) and phthalimide (1.2 eq; 26.77 mmol; 3.94 g) were added, followed by dropwise addition of DIAD (1.2 eq; 26.77 mmol; 5.27 mL). The reaction mixture was stirred for 30 min, at 0°C and was then allowed to reach room temperature. The reaction was completed after 12h stirring. THF was evaporated under reduced pressure and the crude material was used in the next step without any further purification.

iii. General procedure for Boc removal

N-Boc protected amino phtalimide derivate was dissolved in pure TFA (10 mL) and left to react without stirring for 30 min. The TFA was removed under reduced pressure. The resulting TFA salt was precipitated with Et₂O, filtered dried overnight on vacuum line. No purification and no isolation of the TFA salt was done. It was directly engaged in the next step.

iv. General procedure for amine to azide conversion

To a solution of the corresponding TFA ammonium salt of in a mixture of CH₃CN/H₂O (1:1, 40 mL) were successively added K₂CO₃ (2.5 0.5 mmol), CuSO₄ · 5H₂O (0.02 g, 0.08 mmol) and imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride (2.012 g, 9.6 mmol). After 10 min, pH was controlled and if necessary some amount of K₂CO₃ was added to adjust the pH to 8-9. After 4 hours, the reaction was complete and CH₃CN was evaporated. To the remaining aqueous layer was added EtOAc (20mL). The layers were separated and the aqueous one was extracted four times with EtOAc (20mL). Combined organic layers were washed three times with a 1M solution of KHSO₄ (30mL), one time with brine (20 mL), dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure to furnish after silica gel flash chromatography in cyclohexane/EtOAc mixture (9:1, v/v), the azido phtalimide derivate **M17b**.



(S)- 2-(2-azidohexyl)isoindolin-1,3-dione **M17b** :

Solid ; yield 52% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.87 (dd, $J=5.4$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2H), 7.73 (dd, $J=5.5$ Hz, $J=3.1$ Hz, 2H), 3.85-3.65 (m, 3H), 1.61-1.33 (m, 6H), 0.92 (t, $J=7.1$ Hz, 3H).

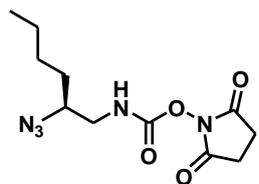
v. General procedure to generate the amine from the phthalimide - the hydrazinolysis reaction

To a solution of azido phthalimide derivate **M17-b** (1 eq ; 11.49 mmol) in MeOH (30 mL) was added hydrazine hydrate 64% (2.5 eq, 28.77 mmol, 1.39 mL). The reaction mixture was heated to reflux and heating was maintained for 4 hours with apparition of a white precipitate. The reaction mixture was filtered off, washed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude material was dissolved in EtOAc (30 mL). The organic layer was washed with a 1M solution of HCl aqueous solution (2×15 mL). The combined aqueous phases were again washed with EtOAc (2×20 mL) and were neutralized by addition of solid NaHCO_3 until pH 8. The aqueous phase was finally extracted with DCM (3×20 mL) and the combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over sodium sulfate, and the resulting azido amine was directly engaged for activation step without further purification.

vi. General procedure for the preparation of succinimidyl azido-2-substituted-ethyl-carbamates

To a stirred suspension of disuccinimidyl carbonate (1.2 eq; 13.79 mmol; 3.53 g) in EtOAc (20 mL) was added drop by drop a solution of azido amine derivate. The reaction mixture was left to react 4 hours and then a 1M solution of KHSO_4 was added. The organic layer was extracted, washed one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The resulting crude was purified by precipitation in Et_2O to furnish activated carbamate **M17** as white solid.

(S)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (2-azidohexyl) carbamate **M17**:

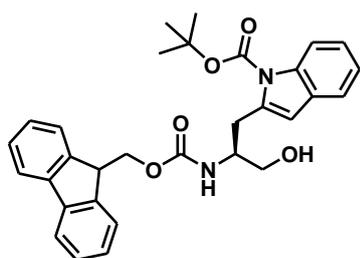


Solid ; yield 47% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 5.76 (bs, 1H), 3.54 (m, 1H), 3.44 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 2.82 (s, 4H), 1.56 (m, 2H), 1.36 (m, 4H), 0.92 (t, $J=7.0$ Hz, 3H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) : 169.90, 151.75, 62.02, 57.52, 45.41, 31.65, 28.01, 25.58, 22.55, 13.98 ; HRMS (ESI) : m/z calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4\text{NH}_4$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$: 301.16188 found 301.16191.

c. Preparation of O-succinimidyl carbamates **M18.**

i. General procedure for N-Fmoc protected amino alcohol formation

The Fmoc-Trp(Boc)-OH (1 eq; 18.99 mmol; 10.0 g) was dissolved in anhydrous THF (30 mL) under N_2 atmosphere and cooled to -20 °C. After addition of isobutyl chloroformate (1.2 eq; 22.79 mmol; 2.95 mL) and NMM (1.2 eq; 22.79 mmol; 2.50 mL), the mixture was stirred at -20 °C for 30 min. The resulting white suspension was then filtered off and the filtrate was added at 0 °C to a solution of NaBH_4 (2 eq; 37.98 mmol; 1.44g) in water. The reaction mixture was left to react 10 min and then concentrated under reduced pressure. A 1M solution of KHSO_4 was added. The resulting aqueous solution was extracted two times with EtOAc. The organic layers were combined, washed two times with saturated solution of NaHCO_3 , one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The product was purified by silica gel flash chromatography cyclohexane/EtOAc (8:2, v/v) in order to to furnished N-Fmoc protected amino alcohol **M18a**.



(S)-tert-butyl 2-(2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-hydroxypropyl)-1H-indole-1-carboxylate **M18a** :

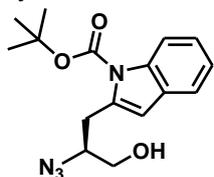
Solid ; yield 76% ; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 8.17 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.69-7.26 (m, 10H), 5.19 (d, $J=6.4$ Hz, 1H), 4.45 (d, $J=6.9$ Hz, 2H), 4.23 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 4.10 (brs, 1H), 3.70-3.72 (d, $J=4.7$ Hz, 2H), 3.02 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 2.05 (brs, 1H), 1.69 (s, 9H).

ii. General procedure for Fmoc removal

N-Fmoc protected amino alcohol **M18a** was dissolved in THF (20 mL) in presence of DBU (1.0 eq, 14.43 mmol, 2.15 mL) and left to react for 30 min. THF was removed under reduced pressure and the amine was dried overnight under high vacuum. The amine was directly engaged in the next step without further purification.

iii. General procedure for amine to azide conversion

To a solution of amine in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ mixture (30 mL) were successively added K_2CO_3 (2.5 eq, 36.075 mmol, 4.98 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.01 eq, 0.14 mmol, 35 mg) and imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride (1.2 eq, 17.31 mmol, 3.61 g). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h, then concentrated under reduced pressure. EtOAc (50 mL) was added to the mixture. The organic layer was then washed two times with a 1M solution of HCl (25 mL), one time with brine (25 mL), dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The product was purified by silica gel flash chromatography cyclohexane/EtOAc (8 :2, v/v) in order to furnish azido alcohol derivate **M18b**.



(S)-tert-butyl 2-(2-azido-3-hydroxypropyl)-1H-indole-1-carboxylate **M18b** :

Oil ; yield 83% ; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 8.18 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.63-7.24 (m, 4H); 3.95-3.61 (m, 3H), 3.00 (m, 2H), 1.71 (s, 9H).

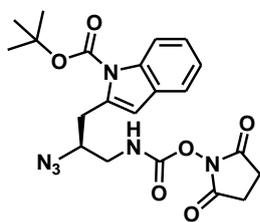
iv. General procedure for conversion of alcohol into amine – the Mitsunobu reaction

To a solution of triphenylphosphine (1.2 eq, 14.37 mmol, 3.73 g) and phthalimide (1.2 eq, 14.37 mmol, 2.09 g,) in anhydrous THF (30 mL) at 0°C and under positive N_2 atmosphere pressure, was added DIAD (1.2 eq, 14.37 mmol, 2.8 mL). A solution of **M18b** in anhydrous THF (20 mL) was next added dropwise and the reaction mixture was stirred for 4 h and allowed to reach room temperature. THF was evaporated under reduced pressure and the crude material was directly engaged in the following step. To a solution of azido phthalimide derivative in MeOH (30 mL) was added hydrazine hydrate 64% (2.5 eq, 46.70 mmol, 2.3 mL). The reaction mixture was heated to reflux and heating was maintained for 4 h with apparition of a white precipitate. The reaction mixture was filtered off, washed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude material was dissolved in EtOAc (30 mL). The organic layer was washed with 1M HCl aqueous solution (2×15 mL). The combined aqueous phases were again washed with EtOAc (2×20 mL) and were neutralized by addition of solid NaHCO_3 until pH 8. The aqueous phase was finally extracted with DCM (3×20 mL) and the combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried on Na_2SO_4 , concentrated under reduced pressure. The crude was used as such for the final step.

v. General procedure for the preparation of succinimidyl azido-2-substituted-ethyl-carbamates

To a stirred suspension of disuccinimidyl carbonate (1.2 eq; 14.37; 3.68 g) in freshly distilled DCM was added drop by drop a solution of azido amine derivate in distilled DCM.

The reaction mixture was left to react 4 hours and then a 1M solution of KHSO_4 was added. The organic layer was extracted, one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by precipitation in Et_2O to furnish activated carbamate **M18** as a yellow solid.



(S)-tert-butyl 2-(2-azido-3-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)amino)propyl)-1H-indole-1-carboxylate **M18** :

Solid ; yield 74% ; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 8.17 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.51 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 5.75 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.50-3.58 (m, 1H), 3.23-3.28 (m, 1H), 3.01 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 2.80 (s, 4H), 1.70 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 170.06, 151.82, 149.63, 135.47, 130.10, 124.67, 124.48, 122.75, 118.70, 115.43, 115.18, 83.86, 61.35, 45.16, 28.22, 27.72, 25.47; HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 479.16495, found 479.16434.

d. Synthesis of oligomers

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu^U-Ala^U-NH₂ (**III.14**)

III.14 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomers **M1** and **M3** following the *general procedure B*. The product was purified by semi prep HPLC : H_2O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 36-42%, 15 min; 42-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 29.0 mg was obtained with total yield 44 %. ESI-MS (M_w 1327.91) : m/z 1328.90 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 664.99 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$; HPLC (H_2O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) t_R = 6.39 min.

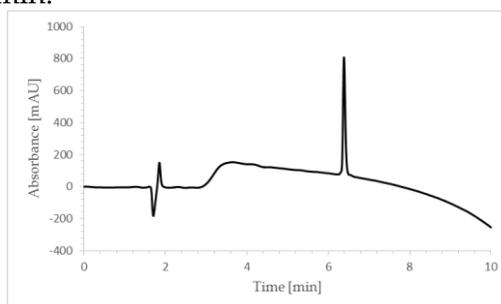


Figure 251 : RP-HPLC chromatogram of **III.14** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu^U-Nle^U-Ala^U-NH₂ (**III.15**)

III.15 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomers **M1** and **M17** following the *general procedure B*. The product was purified by semi prep HPLC : H_2O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-50%, 15 min; 50-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 12.0 mg was obtained with total yield 18 %. ESI-MS (M_w 1327.51) : m/z 1328.55 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 664.75 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$; HPLC (H_2O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) t_R = 5.08 min.

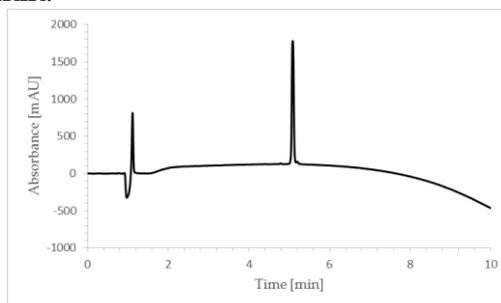


Figure 252 : RP-HPLC chromatogram of **III.15** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala^U-Leu^U-Ala^U-Pro-NH₂ (III.16)

III.16 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M1** and **M3** following the *general procedure B*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 31-34%, 15 min; 34-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 34.0 mg was obtained with total yield 52 %. ESI-MS (*Mw* 1311.87) : *m/z* 1312.87 [M+H]⁺, 656.97 [M+2H]²⁺; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.41 min.

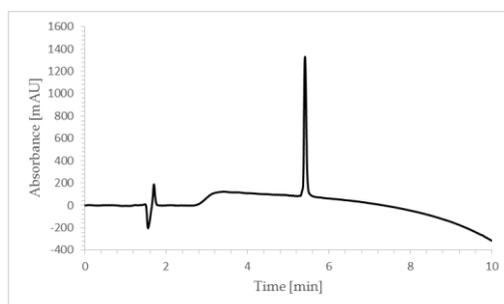


Figure 253 : RP-HPLC chromatogram of **III.16** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala^U-Leu^U-Ser-Pro-NH₂ (III.17)

III.17 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M1** and **M3** following the *general procedure B*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-33%, 15 min; 33-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 25.0 mg was obtained with total yield 38 %. ESI-MS (*Mw* 1327.87) : *m/z* 1328.86 [M+H]⁺, 664.97 [M+2H]²⁺; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.20 min.

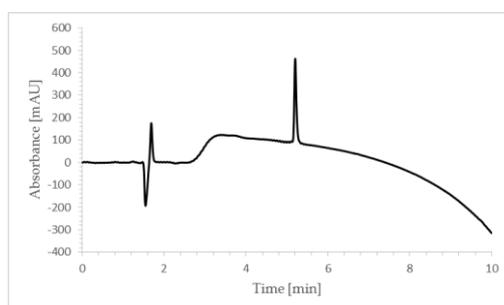


Figure 254 : RP-HPLC chromatogram of **III.17** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala^U-Val^U-Ser-Pro-NH₂ (III.18)

III.18 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M1** and **M2** following the *general procedure B*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 28-32%, 15 min; 32-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 30.0 mg was obtained with total yield 46 %. ESI-MS (*Mw* 1313.84) : *m/z* 1314.82 [M+H]⁺, 657.95 [M+2H]²⁺, 446.97 [M+3H]³⁺; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.66 min.

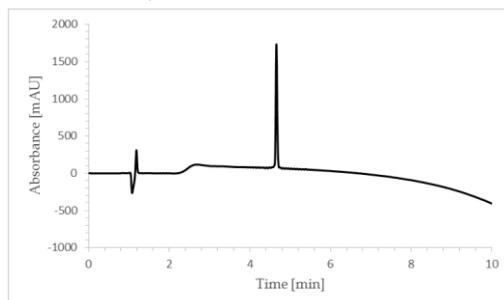


Figure 255 : RP-HPLC chromatogram of **III.18** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala^U-Ala^U-Ser-Pro-NH₂ (III.19)

III.19 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 25-30%, 15 min; 30-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 24.0 mg was obtained with total yield 37 %. ESI-MS (*M_w* 1285.79) : *m/z* 1286.79 [M+H]⁺, 643.93 [M+2H]²⁺, 437.63 [M+3H]³⁺; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 4.63 min.

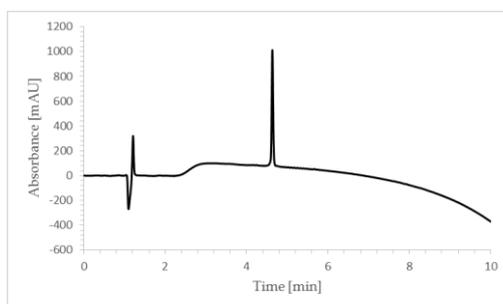


Figure 256 : RP-HPLC chromatogram of **III.19** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.20)

III.20 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M1**, and **M18** following the *general procedure B*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-33%, 15 min; 33-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 22.0 mg was obtained with total yield 33 %. ESI-MS (*M_w* 1327.87) : *m/z* 1328.84 [M+H]⁺, 664.96 [M+2H]²⁺, 451.65 [M+3H]³⁺; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 5.25 min.

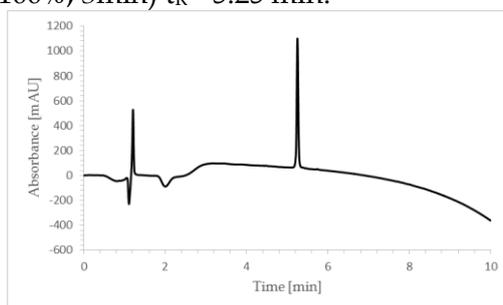


Figure 257 : RP-HPLC chromatogram of **III.20** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala^U-Ala^U-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.21)

III.21 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 34-39%, 15 min; 39-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 22.0 mg was obtained with total yield 36 %. ESI-MS (*M_w* 1219.67) : *m/z* 1220.61 [M+H]⁺, 610.79 [M+2H]²⁺; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 5.59 min.

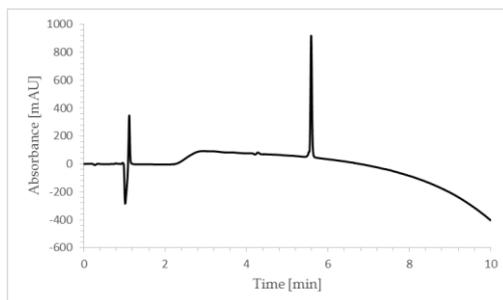


Figure 258 : RP-HPLC chromatogram of **III.21** after purification

H-Thr-Ser-Phe^U-Ala^U-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.22)

III.22 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M1**, and **M16** following the *general procedure B*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 34-40%, 15 min; 40-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 29.0 mg was obtained with total yield 44 %. ESI-MS (*Mw* 1311.91) : *m/z* 1312.91 [M+H]⁺, 656.99 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 5.94 min.

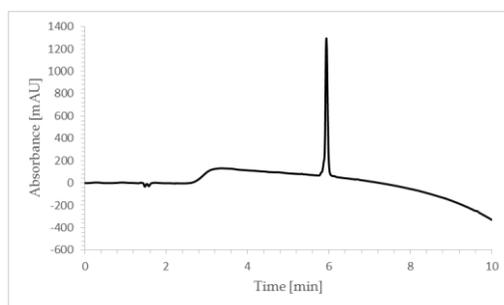


Figure 259 : RP-HPLC chromatogram of **III.22** after purification

H-Thr-Ala^U-Ala^U-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.23)

III.23 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 32-36%, 15 min; 36-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 19.0 mg was obtained with total yield 30 %. ESI-MS (*Mw* 1277.56) : *m/z* 1278.53 [M+H]⁺, 639.74 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 6.11 min.

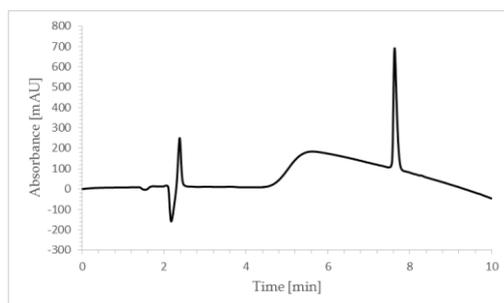


Figure 260 : RP-HPLC chromatogram of **III.23** after purification

H-Ala^U-Ala^U-Ala^U-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu-Leu-Ser-Pro-NH₂ (III.24)

III.24 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by semi prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 32-36%, 15 min; 36-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 26.0 mg was obtained with total yield 42 %. ESI-MS (*Mw* 1247.53) : *m/z* 1248.53 [M+H]⁺, 624.73 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 7.68 min.

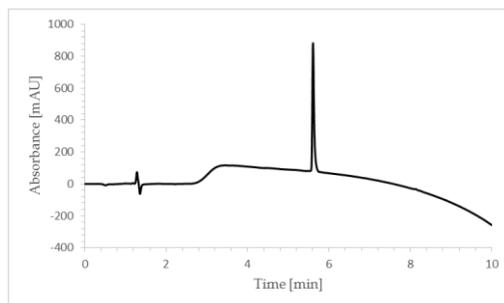
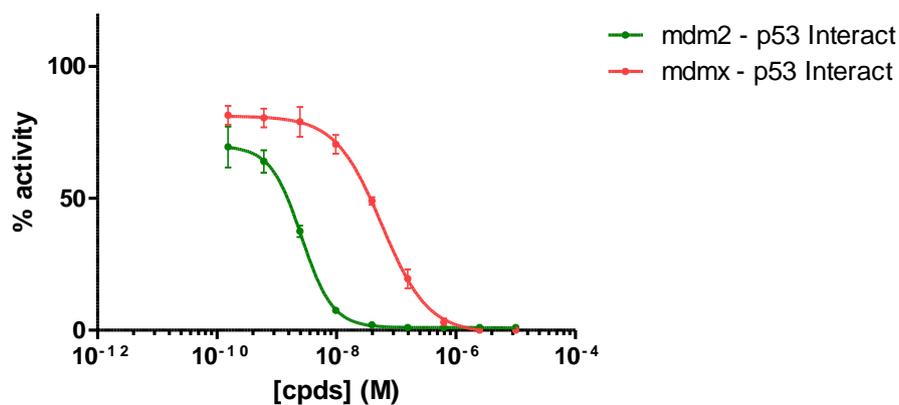


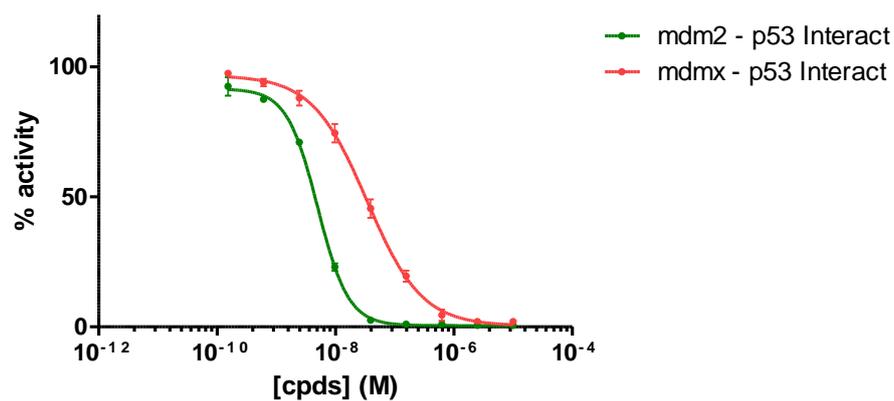
Figure 261 : RP-HPLC chromatogram of **III.24** after purification

e. Inhibition curves



| | mdm2 - p53 Interact | mdmx - p53 Interact |
|------|---------------------|---------------------|
| IC50 | 2.607e-009 | 5.732e-008 |

Figure 262 : Inhibition curve of the oligomer **III.14** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction



| | mdm2 - p53 Interact | mdmx - p53 Interact |
|------|---------------------|---------------------|
| IC50 | 5.003e-009 | 3.406e-008 |

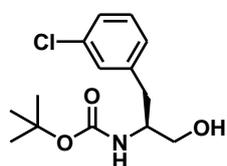
Figure 263 : Inhibition curve of the oligomer **III.15** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

3. Screen 3: Insertion of C-terminal caps.

a. Preparation of O-succinimidyl carbamates **M19**.

i. General procedure for N-Boc protected amino alcohol formation

The N-Boc protected α -(3-Cl)phenylalanine (1 eq; 3.34 mmol; 1g) was dissolved in anhydrous THF (10 mL) under N₂ atmosphere and cooled to -20 °C. After addition of isobutyl chloroformate (1.03 eq; 3.44 mmol; 0.45 mL) and NMM (1.06 eq; 3.54 mmol; 0.39 mL), the mixture was stirred at -20 °C for 30 min. The resulting white suspension was then filtered off and the filtrate was added at 0°C to a solution of NaBH₄ (2 eq; 6.68 mmol; 0.25 g) in water (5 mL). The reaction mixture was left to react overnight and then concentrated under reduced pressure. A 1M solution of KHSO₄ was added. The resulting aqueous solution was extracted two times with EtOAc. The organic layers were combined, washed two times with saturated solution of NaHCO₃, one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum to furnish N-Boc protected amino alcohol **M19a**.



(S)-tert-butyl (1-hydroxy-3-(3-chloro)phenylpropyl-2-yl)carbamate **M19a** :

Oil ; yield quant ; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) : 7.26 (m, 3H), 7.14 (m, 1H), 4.67 (s, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.59 (m, 1H), 2.88 (d, *J*= 7.3, 2H), 1.45 (s, 9H).

ii. General procedure for conversion of alcohol into phthalimide – the Mitsunobu reaction

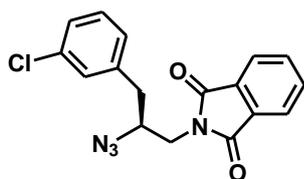
N-Boc protected amino alcohol **M19a** (1 eq; 3.34 mmol) was dissolved in anhydrous THF (6 mL) under N₂ atmosphere. Triphenylphosphine (1.2 eq; 3.98 mmol; 1.04 g) and phthalimide (1.2 eq; 3.98 mmol; 0.59 g) were added, followed by dropwise addition of DIAD (1.2 eq; 3.98 mmol; 0.78 mL). The reaction mixture was stirred for 30 min, at 0°C and was then allowed to reach room temperature. The reaction was completed after 12h stirring. THF was evaporated under reduced pressure and the crude material was used in the next step without any further purification.

iii. General procedure for Boc removal

N-Boc protected amino phthalimide derivative was dissolved in pure TFA (6 mL) and left to react without stirring for 30 min. The TFA was removed under reduced pressure. The resulting TFA salt was precipitated with Et₂O, filtered dried overnight on vacuum line. No purification and no isolation of the TFA salt was done. It was directly engaged in the next step.

iv. General procedure for amine to azide conversion

To a solution of the corresponding TFA ammonium salt of in a mixture of CH₃CN/H₂O (1:1, 10 mL) were successively added K₂CO₃ (2.5 eq; 8.35 mmol ; 1.15 g), CuSO₄·5H₂O (0.01 eq ; 0.034 mmol ; 8.5 mg) and imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride (1.2 eq ; 4.01 mmol ; 0.84 g). After 10 min, pH was controlled and if necessary some amount of K₂CO₃ was added to adjust the pH to 8-9. After 4 hour, the reaction was complete and CH₃CN was evaporated. To the remaining aqueous layer was added EtOAc (20mL). The layers were separated and the aqueous one was extracted four times with EtOAc (20mL). Combined organic layers were washed three times with a 1M solution of KHSO₄ (30mL), one time with brine (20 mL), dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure to furnish after silica gel flash chromatography in cyclohexane/EtOAc mixture (9:1, v/v), azido phthalimide derivative **M19b** as pure compound.



(S)- 2-(1-azido-3-(3-chloro)phenylpropyl)isoindolin-1,3-dione
M19b :

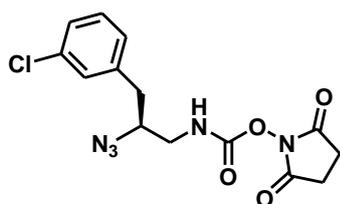
Solid ; yield 52% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.87 (dd, $J=5.4$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2H), 7.74 (dd, $J=5.5$ Hz, $J=3.1$ Hz, 2H), 7.22 (m, 2H), 7.16 (m, 1H), 4.05 (m, 1H), 3.80 (m, 2H), 2.88 (m, 2H).

v. General procedure to generate the amine from the phthalimide - the hydrazinolysis reaction

To a solution of azido phthalimide derivate **M19b** (1 eq ; 1.72 mmol) in MeOH (10 mL) was added hydrazine hydrate 64% (2.5 eq, 6.64 mmol, 0.32 mL). The reaction mixture was heated to reflux and heating was maintained for 4 hours with apparition of a white precipitate. The reaction mixture was filtered off, washed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude material was dissolved in EtOAc (30 mL). The organic layer was washed with a 1M solution of HCl aqueous solution (2×15 mL). The combined aqueous phases were again washed with EtOAc (2×20 mL) and were neutralized by addition of solid NaHCO_3 until pH 8. The aqueous phase was finally extracted with CH_2Cl_2 (3×20 mL) and the combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried on Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The resulting azido amine derivate was directly engaged for activation step without further purification.

vi. General procedure for the preparation of succinimidyl azido-2-substituted-ethyl-carbamates

To a stirred suspension of disuccinimidyl carbonate (1.2 eq; 2.06 mmol; 0.53 g) in freshly distilled CH_2Cl_2 (10 mL) was added drop by drop a solution of azido amine derivate in distilled CH_2Cl_2 . The reaction mixture was left to react 4 hours and then a 1M solution of KHSO_4 was added. The organic layer was extracted, washed one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The resulting crude was purified by precipitation in Et_2O to furnish activated carbamate **M19** as white solid.



(S)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (2-azido-3-(3-chloro)phenylpropyl)
carbamate M19:

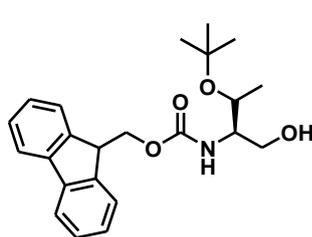
Solid ; yield 66% ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.25 (m, 3H), 7.13 (m, 1H), 5.78 (bs, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.19 (m, 1H), 2.85 (d, $J=4$ Hz, 2H), 2.83 (s, 4H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) : 169.82, 151.77, 138.35, 134.73, 130.23, 129.55, 127.64, 127.62, 62.83, 45.02, 38.12, 25.60 ; HRMS (ESI) : m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_5\text{O}_4\text{NH}_4$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$: 369.10726 found 369.10747.

b. Preparation of O-succinimidyl carbamates M20.

i. General procedure for N-Fmoc protected amino alcohol formation

The Fmoc-Thr(OtBu)-OH (1 eq; 40.00 mmol; 15.9 g) was dissolved in anhydrous THF (80 mL) under N_2 atmosphere and cooled to -20 °C. After addition of isobutyl chloroformate (1.03 eq; 42.40 mmol; 5.54 mL) and NMM (1.06 eq; 41.20 mmol; 4.48 mL), the mixture was stirred at -20 °C for 30 min. The resulting white suspension was then filtered off and the filtrate was added at 0 °C to a solution of NaBH_4 (2 eq; 80.00 mmol; 3.01 g) in water. The reaction mixture was left to react 10 min and then concentrated under reduced pressure. A 1M solution of KHSO_4 was added. The resulting aqueous solution was extracted two times with EtOAc. The organic layers were combined, washed two times with saturated solution of NaHCO_3 , one

time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The product was purified by silica gel flash chromatography cyclohexane/EtOAc (8:2, v/v) in order to furnish *N*-Fmoc protected amino alcohol **M20a**.



(S)-(9H-fluoren-9-yl)methyl (1-hydroxy-3-tert-butoxybutan-2-yl)carbamate **M20a** :

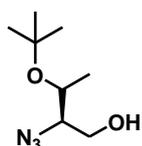
Solid ; yield quant ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 7.77 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.40 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 5.24 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.23 (t, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.96 (m, 1H), 3.70 (m, 2H), 3.63 (m, 1H), 1.22 (s, 9H), 1.17 (d, $J=6.2$ Hz, 3H).

ii. *General procedure for Fmoc removal*

N-Fmoc protected amino alcohol **M20a** was dissolved in 100 mL of THF in presence of DBU (1.2 eq, 48.00 mmol, 7.20 mL) and left to react for 30 min. THF was removed under reduced pressure and the amine was dried overnight under high vacuum. The amine was directly engaged in the next step without further purification.

iii. *General procedure for amine to azide conversion*

To a solution of amine in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ mixture (100 mL) were successively added K_2CO_3 (2.5 eq, 96.00 mmol, 13.26 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.01 eq, 0.4 mmol, 100 mg) and imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride (1.2 eq, 48.00 mmol, 10.0 g). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h, then concentrated under reduced pressure. EtOAc (100 mL) was added to the mixture. The organic layer was washed two times with a 1M solution of HCl (50 mL), one time with brine (50 mL), dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The product was purified by silica gel flash chromatography cyclohexane/EtOAc (8 :2, v/v) in order to furnish azido alcohol derivate **M20b**.



(S)-2-azido-3-tert-butoxybutan-1-ol **M20b** :

Oil ; yield 58% ; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 3.82 (m, 2H), 3.59 (m, 1H), 3.42 (m, 1H), 1.24 (s, 9H), 1.18 (d, $J=6.3$ Hz, 3H).

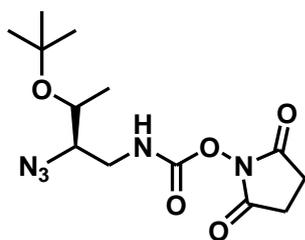
iv. *General procedure for conversion of alcohol into amine – the Mitsunobu reaction*

To a solution of triphenylphosphine (1.2 eq, 27.68 mmol, 7.26 g) and phthalimide (1.2 eq, 27.68 mmol, 4.07 g) in anhydrous THF (50 mL) at 0°C and under N_2 atmosphere, was added DIAD (1.2 eq, 27.68 mmol, 5.45 mL). A solution of **M20b** in anhydrous THF (30 mL) was next added dropwise and the reaction mixture was stirred for 4 h and allowed to reach room temperature. THF was evaporated under reduced pressure and the crude material was directly engaged in the following step. To a solution of azido phthalimide derivative in MeOH (50 mL) was added hydrazine hydrate 64% (2.5 eq, 90.12 mmol, 4.37 mL). The reaction mixture was heated to reflux and heating was maintained for 4 h with apparition of a white precipitate. The reaction mixture was filtered off, washed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude material was dissolved in EtOAc (50 mL). The organic layer was washed with a 1M solution of HCl (2×30 mL). The combined aqueous phases were again washed with EtOAc (2×20 mL) and were neutralized by addition of solid NaHCO_3 until pH 8. The aqueous phase was finally extracted with DCM (3×30 mL) and the combined

organic layers were washed one time with brine (40 mL), dried over sodium sulfate, concentrated under reduced pressure. The crude was used as such for the final step.

v. General procedure for the preparation of succinimidyl azido-2-substituted-ethyl-carbamates

To a stirred suspension of disuccinimidyl carbonate (1.2 eq; 27.68; 7.09 g) in freshly distilled CH_2Cl_2 was added drop by drop a solution of azido amine in distilled DCM. The reaction mixture was left to react 4 hours and then a 1M solution of KHSO_4 was added. The organic layer was extracted, washed one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by precipitation in Et_2O to furnish activated carbamate **M20** as a white solid.



(S)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl(2-azido-3-tert-butoxybutyl)carbamate **M20** :

Solid ; yield 51 % ; ^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 5.86 (s, 1H), 3.82-3.70 (m, 1H), 3.53-3.38 (m, 2H), 3.30-3.16 (m, 1H), 2.82 (s, 4H), 1.24 (s, 9H), 1.19 (d, $J=6.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR: (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 169.82, 151.60, 75.11, 68.65, 65.45, 42.24, 28.39, 25.99, 19.36; HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_5\text{NH}_4$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$ 345.18809, found 345.18811.

c. Preparation of O-succinimidyl carbamate **M21**.

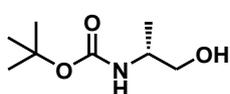
Activated monomer **M21** [5] was prepared using a previously described procedure.[3]

d. Preparation of O-succinimidyl carbamates **M22**, **M23**, **M24**.

Activated monomer **M22** [8] was prepared using a previously described procedure.[8]

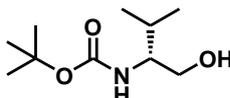
i. General procedure for N-Boc protected amino alcohol formation

The (R)-N-Boc protected α -amino acids (1 eq) was dissolved in anhydrous THF under N_2 atmosphere and cooled to -20 °C. After addition of isobutyl chloroformate (1.03 eq) and NMM (1.06 eq), the mixture was stirred at -20 °C for 30 min. The resulting white suspension was then filtered off and the filtrate was added at 0 °C to a solution of NaBH_4 (2 eq) in water. The reaction mixture was left to react overnight. The reaction mixture was concentrated and then a 1M solution of KHSO_4 was added. The resulting aqueous solution was extracted two times with EtOAc . The organic layers were combined, washed two times with saturated solution of NaHCO_3 , one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum to furnished (R)-N-Boc protected amino alcohol derivatives : **M22a**, **M23a**, and **M24a**.



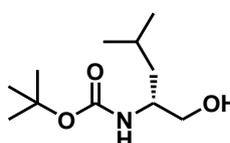
(R)-tert-butyl (1-hydroxy-3prop-2-yl)carbamate **M22a** :

Solid ; yield 43 % ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 4.65 (bs, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.54 (m, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.19 (d, $J = 6.8$, 3H)



(R)-tert-butyl (1-hydroxy-3methylbut-2-yl)carbamate **M23a** :

Solid ; yield 56 % ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 4.64 (bs, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 3.44 (m, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 0.95 (d, $J=6.5$ Hz, 6H).

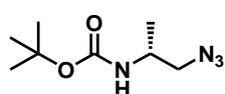


(R)-tert-butyl (1-hydroxy-4methylpent-2-yl)carbamate **M24a** :

Solid ; yield 53 % ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 4.54 (bs, 1H), 3.67 (m, 2H), 3.49 (m, 1H), 1.65 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.30 (m, 2H), 0.92 (d, $J=6.5$ Hz, 6H).

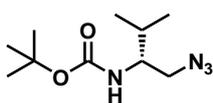
ii. General procedure for conversion of alcohol into azide

To a solution of (R)-*N*-Boc protected α -amino alcohol derivatives : **M22a**, **M23a**, or **M24a** (1 eq), in freshly distilled CH_2Cl_2 at 0°C and under N_2 atmosphere, EtN_3 was added (2 eq). After 5 minutes, methanesulfonyl chloride (1.1 eq) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 4 h and allowed to reach room temperature. A 1M solution of KHSO_4 was added. The organic layer was extracted, washed one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude was precipitated in pentane to furnish a white solid. This product was directly dissolved in DMF then, NaN_3 (3 eq) was added to the reaction mixture and the reaction was stirred overnight. The reaction mixture was then diluted with EtOAc , washed five times with H_2O , two times with a 1M solution of KHSO_4 , two times with a saturated solution of NaHCO_3 , one time with a solution of brine, dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The resulting (R)-amino azide derivatives : **M22b**, **M23b** or **M24b**, were purified by silica gel flash chromatography cyclohexane/ EtOAc (9 :1, v/v).



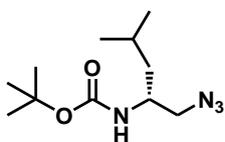
(R)-tert-butyl (1-azido-3prop-2-yl)carbamate **M22b** :

Solid ; yield 35 % ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 4.58 (bs, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.36 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.19 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).



(R)-tert-butyl (1-azido-3methylbut-2-yl)carbamate **M23b** :

Solid ; yield 30 % ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 4.60 (bs, 1H), 3.49 (m, 1H), 3.38 (m, 2H), 1.76 (m, 1H), 1.42 (s, 9H), 0.92 (d, $J=6.7$ Hz, 6H).

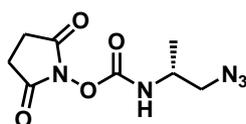


(R)-tert-butyl (1-azido-4methylpent-2-yl)carbamate **M24b** :

Solid ; yield 70 % ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) : 4.47 (bs, 1H), 3.79 (m, 1H), 3.44 (m, 1H), 3.31 (m, 1H), 1.64 (m, 1H), 1.45 (s, 9H), 1.28 (m, 2H), 0.92 (d, $J=6.8$ Hz, 6H).

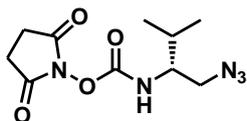
iii. General procedure for the preparation of succinimidyl azido-1-substituted-ethyl-carbamates

(R)-amino azide derivatives : **M22b**, **M23b** and **M24b**, were treated with TFA at 0°C for 30 min. TFA was then removed under reduced pressure by successive coevaporations with cyclohexane and diethyl ether. Then the resulting TFA salts were dissolved in distilled CH_2Cl_2 and DIPEA (1 eq) was added drop wise at 0°C . After 5 min, disuccinimidyl carbonate (1.2 eq) was added and the reaction mixture was stirred for 2 hours. The reaction mixture was then washed two times with a 1M solution of KHSO_4 , one time with a brine solution, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by precipitation in Et_2O to furnish activated carbamates : **M22**, **M23**, and **M24**, as white solids.



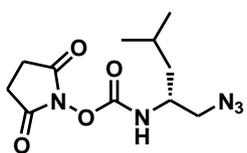
(R)-2,5-dioxopyrrolidin-2-yl (1-azido-3-propyl) carbamate **M22**

Solid ; yield 83 % ; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 5.34 (m, 1NH), 3.94 (m, 1H), 3.50 (m, 2H), 2.85 (s, 4H), 1.32 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 170.07, 150.85, 55.48, 48.10, 25.58, 18.05 ; HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 259.11493, found 259.11530.



(R)-2,5-dioxopyrrolidin-2-yl (1-azido-3-methylbutyl) carbamate M23

Solid ; yield 70 % ; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 5.60 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 3.53 (m, 3H), 2.82 (s, 4H), 1.89 (m, 1H), 0.98 (d, $J=6.7$ Hz, 6H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 170.02, 151.54, 57.63, 52.53, 30.02, 25.59, 19.44, 18.48 ; HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4\text{NH}_4$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$ 287.14623, found 287.14660.



(R)-2,5-dioxopyrrolidin-2-yl (1-azido-4-methylpentyl) carbamate M24

Solid ; yield quant % ; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 5.60 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.48 (m, 2H), 2.82 (s, 4H), 1.68 (m, 1H), 1.50 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 0.94 (d, $J=1.9$ Hz, 3H) , 0.92 (d, $J=1.9$ Hz, 3H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 170.04, 151.16, 54.65, 50.51, 41.15, 25.58, 24.68, 22.94, 22.16 ; HRMS (ESI): m/z calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 306.11728, found 306.11797.

e. Synthesis of oligomers

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu^U-Ala^U-Pro^U-NH₂ (III.25)

III.25 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomers **M1**, **M3** and **M15** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H_2O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-38%, 15 min; 38-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 18.0 mg was obtained with total yield 27 %. ESI-MS (M_w 1340.51) : m/z 1341.55 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 671.25 [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$, 447.82 [$\text{M}+3\text{H}$] $^{3+}$; HPLC (H_2O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) t_R = 5.19 min.

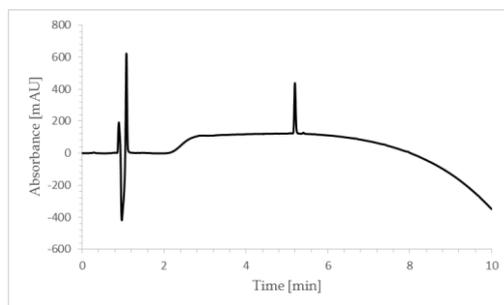


Figure 264 : RP-HPLC chromatogram of **III.25** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala-Leu^U-Ser^U-Pro^U-NH₂ (III.26)

III.26 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomers **M1**, **M21** and **M15** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H_2O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-50%, 15 min; 50-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 13.0 mg was obtained with total yield 19 %. ESI-MS (M_w 1356.51) : m/z 1357.55 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 679.24 [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$, 435.15 [$\text{M}+3\text{H}$] $^{3+}$; HPLC (H_2O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) t_R = 4.91 min.

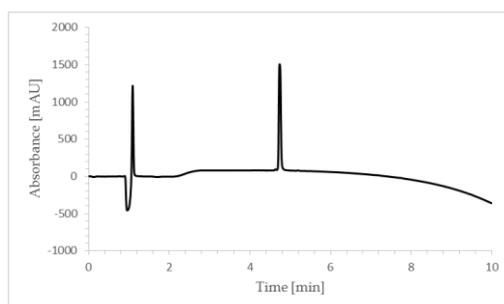


Figure 265 : RP-HPLC chromatogram of **III.26** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala^U-Ala^U-Leu^{INVU}-NH₂ (III.27)

III.27 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomers **M1** and **M24** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-50%, 15 min; 50-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 16.0 mg was obtained with total yield 27 %. ESI-MS (*Mw* 1214.46) : m/z 1215.48 [M+H]⁺, 608.21 [M+2H]²⁺ ; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) t_R = 5.20 min.

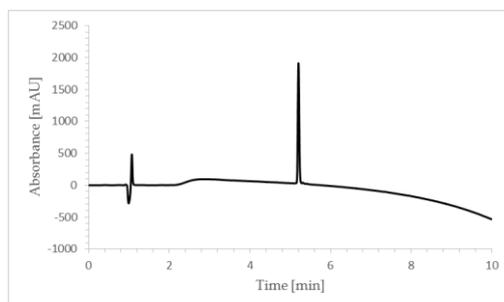


Figure 266 : RP-HPLC chromatogram of **III.27** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala^U-Ala^U-Nle^U-NH₂ (III.28)

III.28 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomers **M1** and **M17** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-50%, 15 min; 50-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 4.0 mg was obtained with total yield 6 %. ESI-MS (*Mw* 1243.53) : m/z 1244.50 [M+H]⁺, 622.72 [M+2H]²⁺ ; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) t_R = 5.33 min.

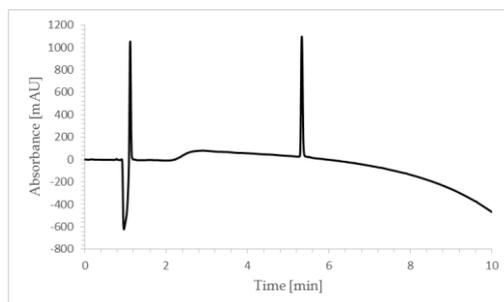


Figure 267 : RP-HPLC chromatogram of **III.28** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala^U-Ala^U-Leu^U-NH₂ (III.29)

III.29 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomers **M1** and **M3** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-50%, 15 min; 50-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 22.0 mg was obtained with total yield 35 %. ESI-MS (*Mw* 1243.53) : m/z 1244.51 [M+H]⁺, 622.73 [M+2H]²⁺ ; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) t_R = 5.26 min.

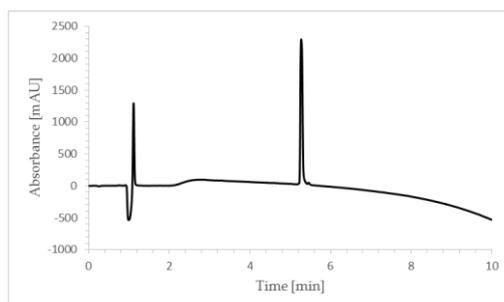


Figure 268 : RP-HPLC chromatogram of **III.29** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala^U-Ala^U-Val^U-NH₂ (III.30)

III.30 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M1** and **M2** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-50%, 15 min; 50-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 22.0 mg was obtained with total yield 36 %. ESI-MS (*Mw* 1229.47) : *m/z* 1230.49 [M+H]⁺, 615.72 [M+2H]²⁺ ; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.12 min.

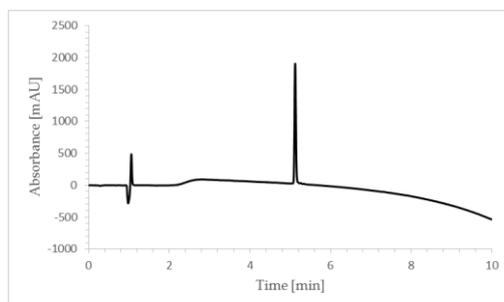


Figure 269 : RP-HPLC chromatogram of **III.30** after purification

H-Thr^U-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala^U-Ala^U-Val^U-NH₂ (III.31)

III.31 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M1**, **M2** and **M20** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 20 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 21.0 mg was obtained with total yield 34 %. ESI-MS (*Mw* 1258.41) : *m/z* 1259.43 [M+H]⁺, 630.17 [M+2H]²⁺ ; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.50 min.

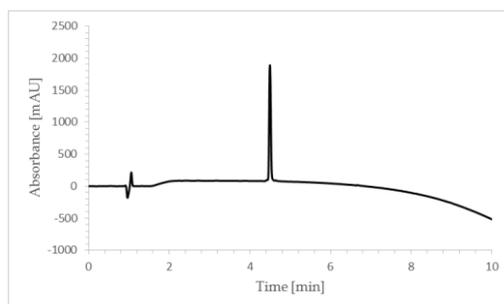


Figure 270 : RP-HPLC chromatogram of **III.31** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Ala^U-Ala^U-Ala^U-NH₂ (III.32)

III.32 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomer **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-50%, 15 min; 50-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 25.0 mg was obtained with total yield 41 %. ESI-MS (*Mw* 1201.32) : *m/z* 1202.38 [M+H]⁺, 601.65 [M+2H]²⁺ ; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.06 min.

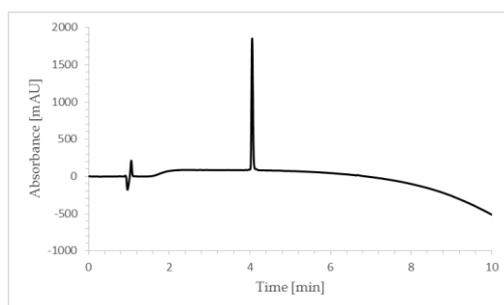


Figure 271 : RP-HPLC chromatogram of **III.32** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Val^{INVU}-Ala^U-NH₂ (III.33)

III.33 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M18**, **M1** and **M23** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 20 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 18.0 mg was obtained with total yield 29 %. ESI-MS (*Mw* 1258.41) : *m/z* 1259.43 [M+H]⁺, 630.17 [M+2H]²⁺, 420.42 [M+3H]³⁺ ; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 4.43 min.

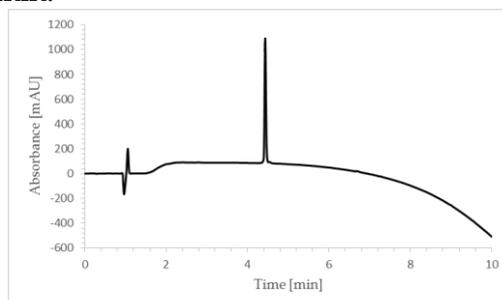


Figure 272 : RP-HPLC chromatogram of **III.33** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Val^{INVU}-NH₂ (III.34)

III.34 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M18**, **M1** and **M23** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 20 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 15.0 mg was obtained with total yield 26 %. ESI-MS (*Mw* 1158.39) : *m/z* 1159.38 [M+H]⁺, 580.14 [M+2H]²⁺, 387.07 [M+3H]³⁺ ; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 4.27 min.

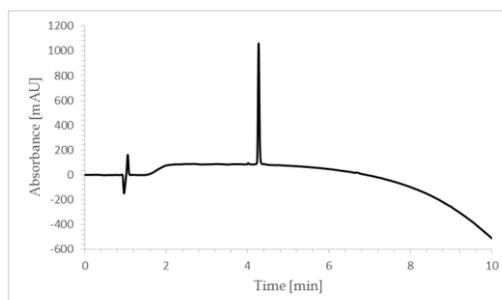


Figure 273 : RP-HPLC chromatogram of **III.34** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-(3-Cl)Phe^U-Ala^U-Val^{INVU}-NH₂ (III.35)

III.35 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M19**, **M1** and **M23** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 20 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 14.0 mg was obtained with total yield 24 %. ESI-MS (*Mw* 1153.33) : *m/z* 1154.33 [M+H]⁺, 577.62 [M+2H]²⁺ ; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 4.68 min.

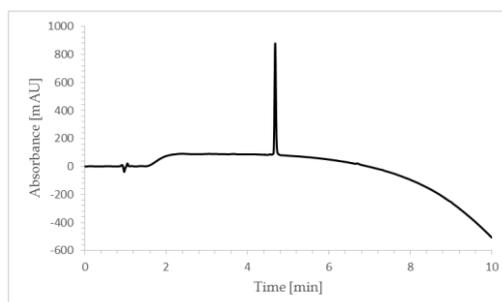


Figure 274 : RP-HPLC chromatogram of **III.35** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Phe^U-Ala^U-Val^{INVU}-NH₂ (III.36)

III.36 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M16**, **M1** and **M23** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 20 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 19.0 mg was obtained with total yield 34 %. ESI-MS (*Mw* 1119.36) : *m/z* 1120.37 [M+H]⁺, 560.64 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.36 min.

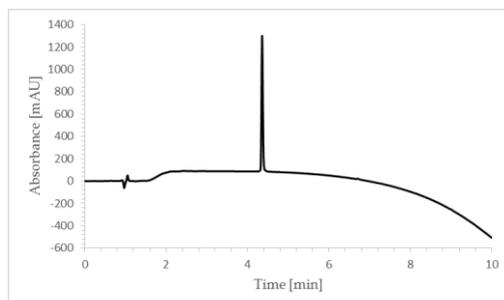


Figure 275 : RP-HPLC chromatogram of **III.36** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Leu^{INVU}-Ala^U-NH₂ (III.37)

III.37 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M18**, **M1**, and **M24** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 20 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 8.0 mg was obtained with total yield 13 %. ESI-MS (*Mw* 1272.64) : *m/z* 1273.62 [M+H]⁺, 637.29 [M+2H]²⁺, 425.19 [M+3H]³⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.67 min.

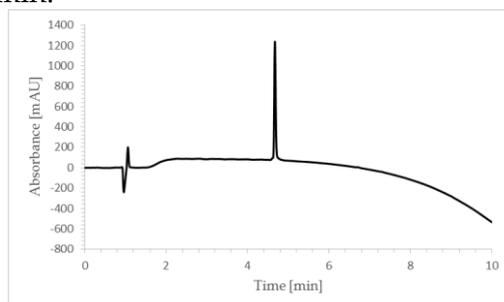


Figure 276 : RP-HPLC chromatogram of **III.37** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Leu^U-Ala^U-NH₂ (III.38)

III.38 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M18**, **M1** and **M3** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-60%, 15 min; 60-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 38.0 mg was obtained with total yield 60 %. ESI-MS (*Mw* 1272.74) : *m/z* 1273.70 [M+H]⁺, 637.36 [M+2H]²⁺, 425.24 [M+3H]³⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.64 min.

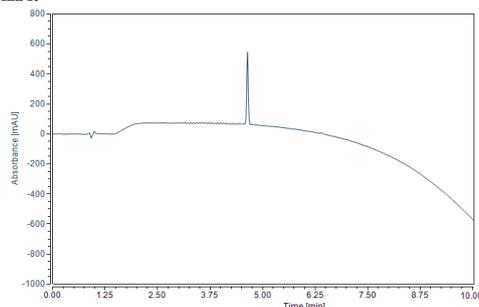


Figure 277 : RP-HPLC chromatogram of **III.38** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Leu^{INVU}-NH₂ (III.39)

III.39 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M18**, **M1** and **M24** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 20 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 16.0 mg was obtained with total yield 27 %. ESI-MS (*Mw* 1172.52) : *m/z* 1173.55 [M+H]⁺, 587.26 [M+2H]²⁺, 391.84 [M+3H]³⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.48 min.

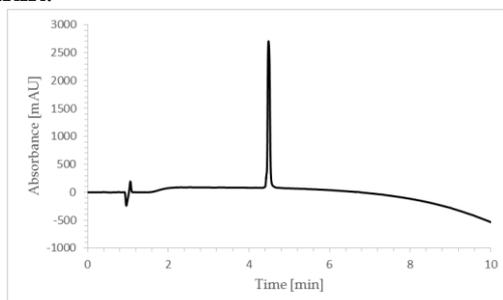


Figure 278 : RP-HPLC chromatogram of **III.39** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-(3-Cl)Phe^U-Ala^U-Leu^{INVU}-NH₂ (III.40)

III.40 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M19**, **M1** and **M24** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 20 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 12.0 mg was obtained with total yield 20 %. ESI-MS (*Mw* 1167.53) : *m/z* 1168.50 [M+H]⁺, 584.74 [M+2H]²⁺, 390.15 [M+3H]³⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.89 min.

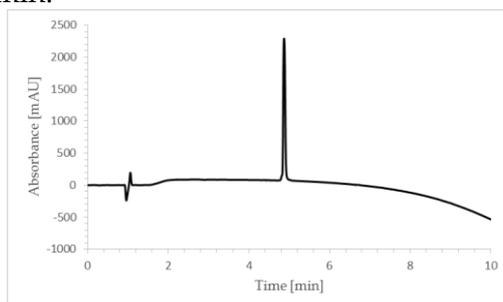


Figure 279 : RP-HPLC chromatogram of **III.40** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Phe^U-Ala^U-Leu^{INVU}-NH₂ (III.41)

III.41 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M16**, **M1** and **M24** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 20 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 14.0 mg was obtained with total yield 25 %. ESI-MS (*Mw* 1133.58) : *m/z* 1134.54 [M+H]⁺, 567.76 [M+2H]²⁺, 378.83 [M+3H]³⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.57 min.

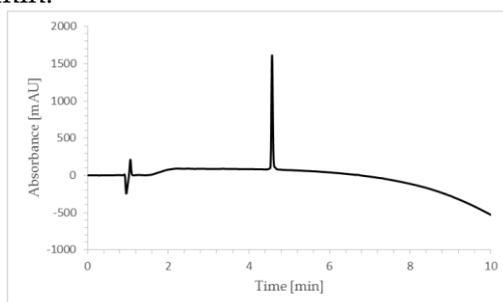


Figure 280 : RP-HPLC chromatogram of **III.41** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Ala^{INVU}-Ala^U-NH₂ (III.42)

III.42 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M18**, **M1** and **M22** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 20 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 20.0 mg was obtained with total yield 33 %. ESI-MS (*Mw* 1230.56) : *m/z* 1231.56 [M+H]⁺, 616.27 [M+2H]²⁺, 411.17 [M+3H]³⁺; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.15 min.

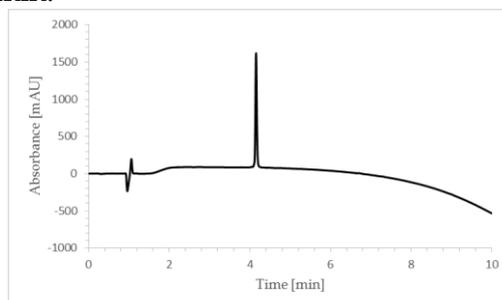


Figure 281 : RP-HPLC chromatogram of **III.42** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Ala^{INVU}-NH₂ (III.43)

III.43 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M18**, **M1** and **M22** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 25-35%, 20 min; 35-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 23.0 mg was obtained with total yield 41 %. ESI-MS (*Mw* 1130.54) : *m/z* 1131.51 [M+H]⁺, 566.24 [M+2H]²⁺, 377.82 [M+3H]³⁺; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.00 min.

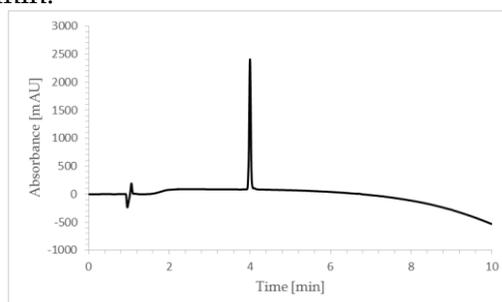


Figure 282 : RP-HPLC chromatogram of **III.43** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Ala^U-NH₂ (III.44)

III.44 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M18** and **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 20 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 21.0 mg was obtained with total yield 37 %. ESI-MS (*Mw* 1130.54) : *m/z* 1131.51 [M+H]⁺, 566.24 [M+2H]²⁺, 377.82 [M+3H]³⁺; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.12 min.

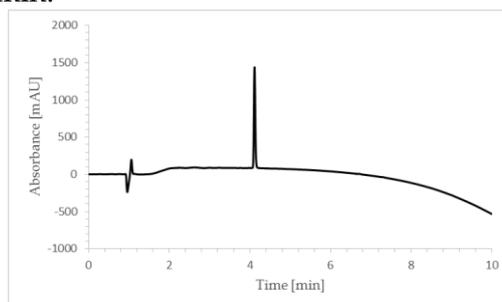


Figure 283 : RP-HPLC chromatogram of **III.44** after purification

f. Inhibition curves

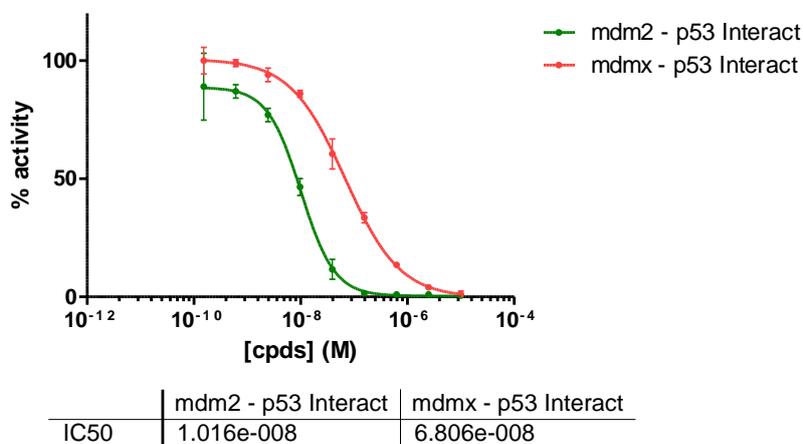


Figure 284 : Inhibition curve of the oligomer **III.25** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

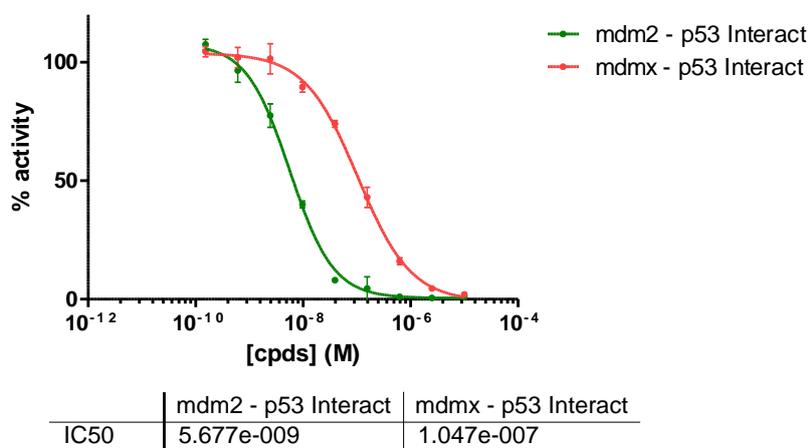


Figure 285 : Inhibition curve of the oligomer **III.27** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

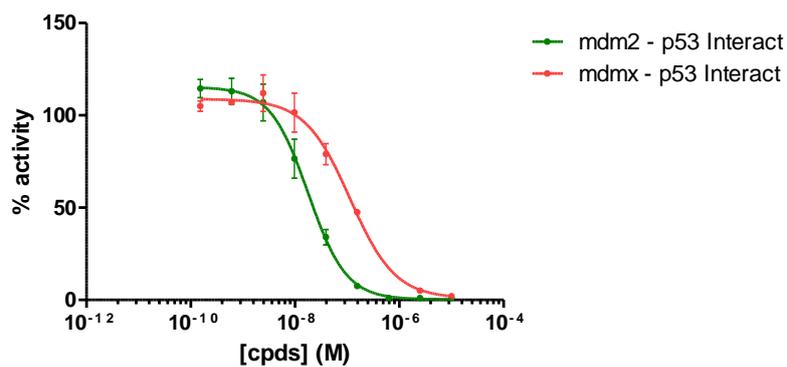


Figure 286 : Inhibition curve of the oligomer **III.28** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

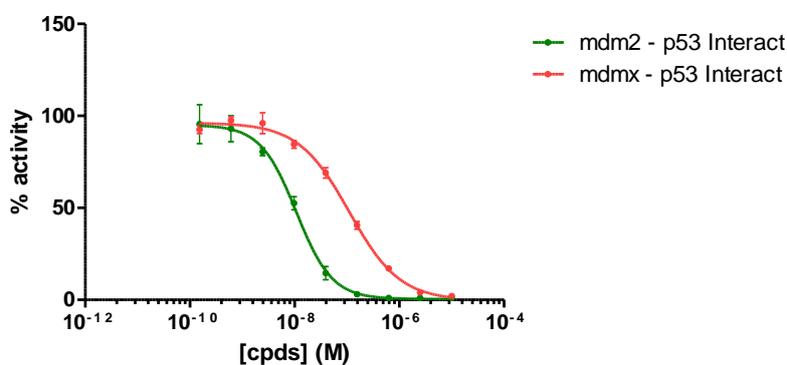


Figure 287 : Inhibition curve of the oligomer **III.29** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

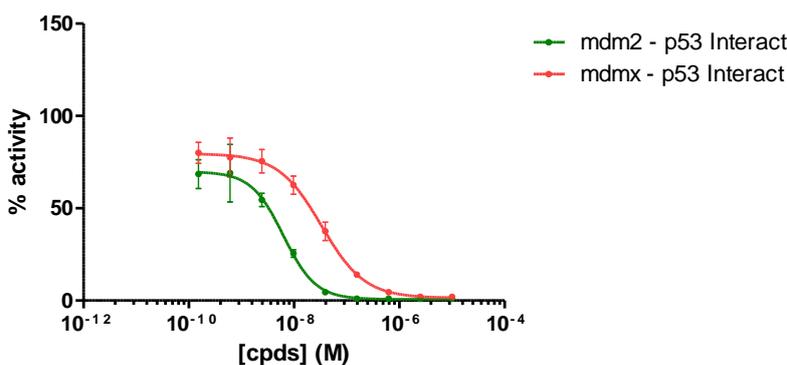


Figure 288 : Inhibition curve of the oligomer **III.30** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

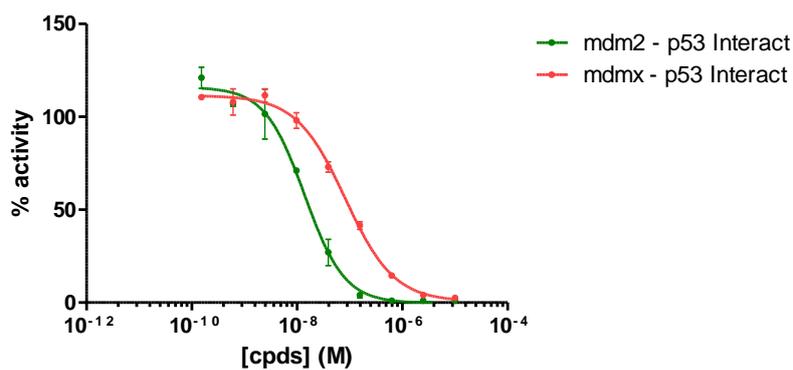


Figure 289 : Inhibition curve of the oligomer **III.31** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

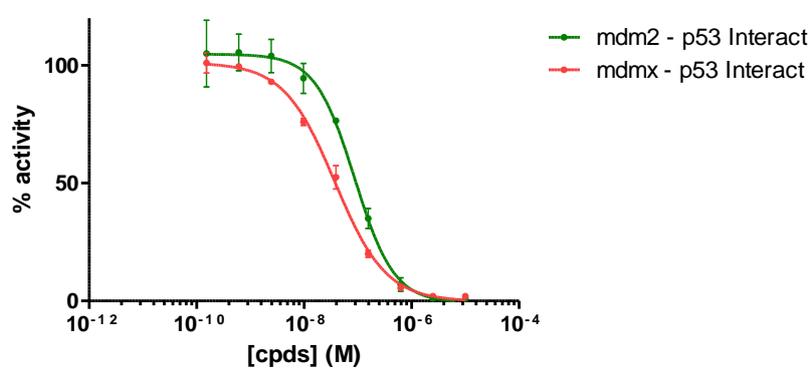


Figure 290 : Inhibition curve of the oligomer **III.32** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

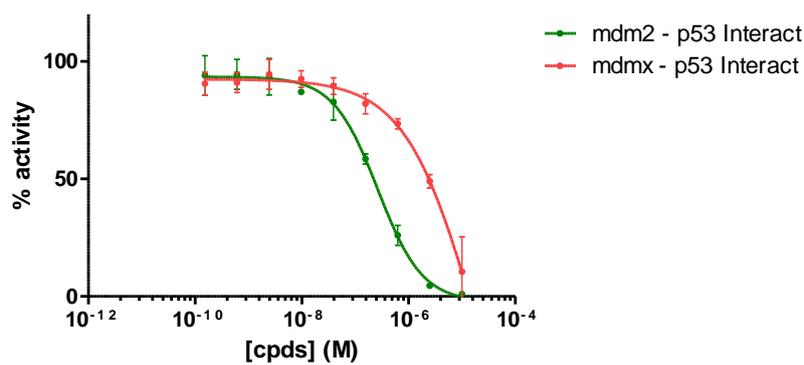


Figure 291 : Inhibition curve of the oligomer **III.33** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

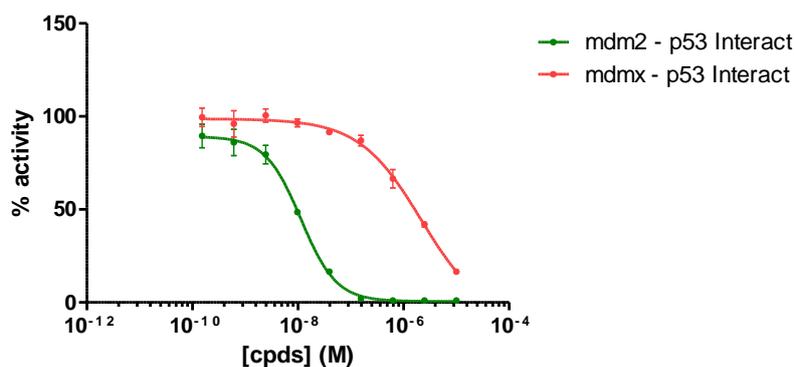


Figure 292 : Inhibition curve of the oligomer III.37 on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

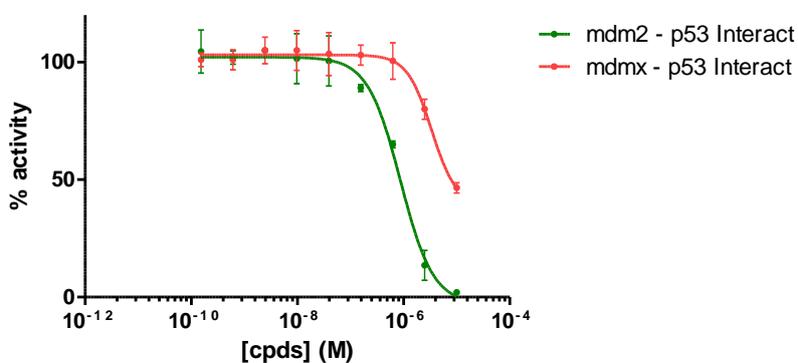


Figure 293 : Inhibition curve of the oligomer III.38 on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

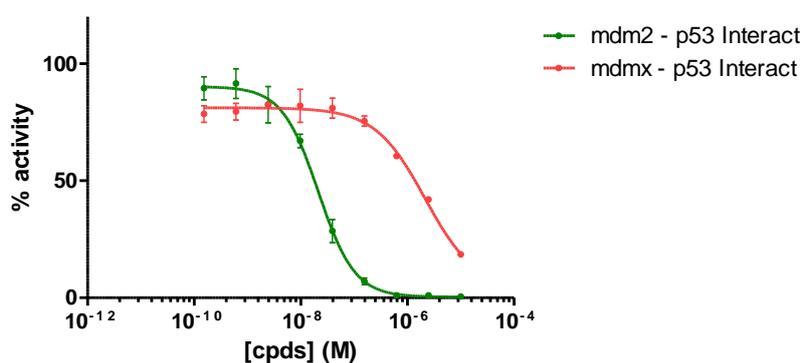


Figure 294 : Inhibition curve of the oligomer III.39 on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

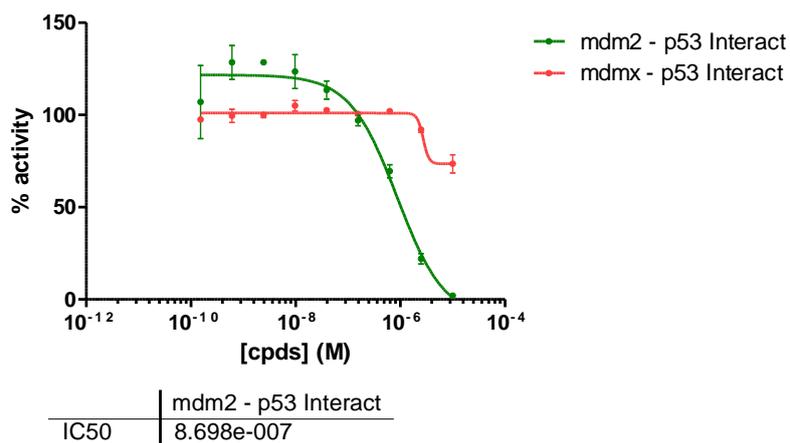


Figure 295 : Inhibition curve of the oligomer **III.40** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

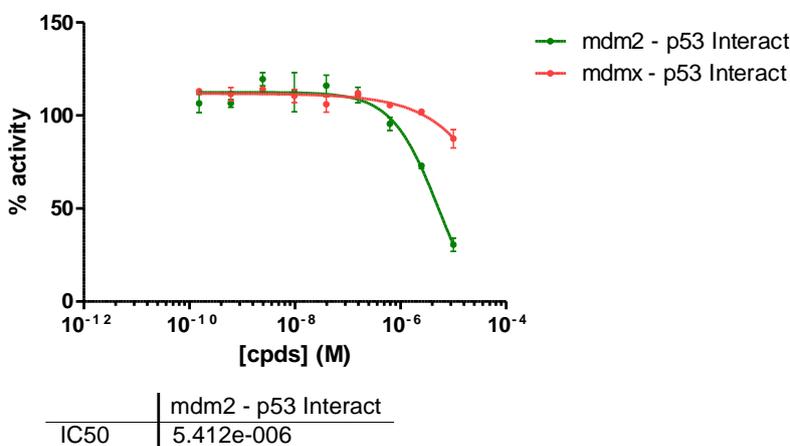


Figure 296 : Inhibition curve of the oligomer **III.41** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

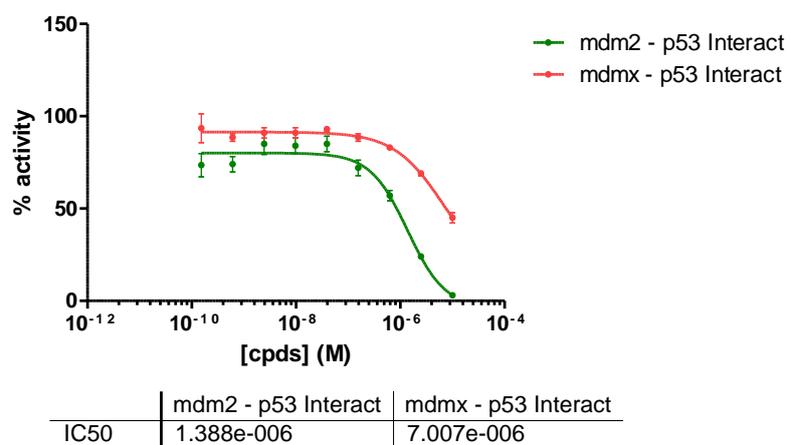


Figure 297 : Inhibition curve of the oligomer **III.42** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

4. Screen 4: N-terminal modifications on the oligomers III.37.

a. Preparation of O-succinimidyl carbamates M25.

i. Monoprotection of ethylene glycol

Ethylene glycol (1 eq ; 32.2 mmol ; 1.80 mL) was dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (30 mL). N-methyl imidazole (0.6 eq ; 19.32 mmol, 1.53 mL) and I_2 (0.6 eq, 19.32 mmol, 4.90 g) were added. TBDMS-Cl (0.3 eq ; 9.66 mmol ; 1.45 g) dissolved in distilled CH_2Cl_2 (15 mL) was added to the mixture at 0°C under N_2 atmosphere. The reaction was stirred at room temperature for 1h. A precipitate was formed. The mixture was concentrated under reduced pressure. EtOAc (40 mL) was added to the mixture. The organic layer was washed three times with a 0.5M solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20 mL), two times with a 1M solution of KHSO_4 (20 mL), one time with brine (20 mL), dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure to furnish the O-TBDMS monoprotected ethylene glycol derivate **M25a**.

2-tert-butyltrimethylsilyloxy ethan-1-ol M25a :

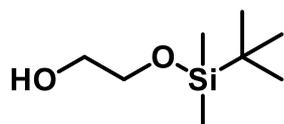
Oil ; yield 53% ; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 3.75 (m, 2H), 3.68 (m, 2H), 0.93 (s, 9H), 0.10 (s, 9H).

ii. General procedure for conversion of alcohol into amine – the Mitsunobu reaction

To a solution of triphenylphosphine (1.2 eq, 6.14 mmol, 1.61 g) and phthalimide (1.2 eq, 6.14 mmol, 0.90 g,) in anhydrous THF (20 mL) at 0°C and under N_2 atmosphere, was added DIAD (1.2 eq, 6.14 mmol, 1.21 mL). A solution of **M25a** in anhydrous THF (10 mL) was next added dropwise and the reaction mixture was stirred for 4 h and allowed to reach room temperature. THF was evaporated under reduced pressure. The product was purified by silica gel flash chromatography cyclohexane/EtOAc (9 :1, v/v) in order to furnish the phthalimide derivate **M25b**.

M25b : 2-(1-tert-butyltrimethylsilyloxy ethanyl)isoindolin-1,3-dione

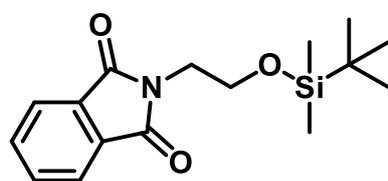
Oil ; yield 40% ; $^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7.85 (dd, $J=5.5$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2H), 7.71 (dd, $J=5.5$ Hz, $J=3.0$ Hz, 2H), 3.84 (m, 4H), 0.82 (s, 9H), 0.01 (s, 6H).



iii. General procedure to generate the amine from the phthalimide - the hydrazinolysis reaction

To a solution of phthalimide derivate **M25b** (1 eq ; 2.05 mmol) in MeOH (10 mL) was added hydrazine hydrate 64% (2.5 eq, 19.97 mmol, 0.97 mL). The reaction mixture was heated to reflux and heating was maintained for 4 hours with apparition of a white precipitate. The reaction mixture was filtered off, washed with MeOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude material was dissolved in EtOAc (20 mL). The organic layer was washed one time with H_2O (5 mL), one time with brine (5 mL), dried over sodium sulfate, and the resulting amine was directly engaged for activation step without further purification.

iv. General procedure for the preparation of activated carbamates monomers



To a stirred suspension of disuccinimidyl carbonate (1.2 eq; 2.46 mmol; 0.63 g) in EtOAc (10 mL) was added drop by drop a solution of amine derivate. The reaction mixture was left to react 4 hours and then a 1M solution of KHSO_4 was added. The organic layer was extracted, washed one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under

vacuum. The resulting crude was purified by precipitation in Et₂O to furnish activated carbamate **M25** as white solid.

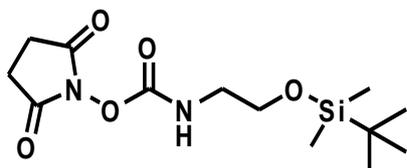
2,5-dioxopyrrolidin-2-yl (1-tert-butyldimethylsiloxy ethanyl) carbamate **M25**

Solid ; yield quant % ; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 3.74 (m, 2H), 3.37 (m, 2H), 2.82 (s, 4H), 0.90 (s, 9H), 0.09 (s, 6H) ; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 169.84, 151.41, 61.33, 44.08, 25.87, 25.47, 5.40 ; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₃H₂₅N₂O₄Si [M+H]⁺ 317.1527, found 317.1529.

b. Preparation of O-succinimidyl carbamates **M26.**

i. Monoprotection of 1,3-diaminopropane

1,3-diaminopropane (1 eq ; 30.00 mmol ; 2.53 mL) was dissolved in anhydrous CH₂Cl₂ (30 mL). DIEA (2.2 eq ; 66.00 mmol, 11.5 mL) was added (checking pH 10). Then allyl chloroformate (0.3 eq ; 10.00 mmol ; 1.20 g) dissolved in distilled CH₂Cl₂ (15 mL) was added to the mixture at 0°C under N₂ atmosphere. The reaction was stirred at room temperature for 1h. A precipitate was formed. The reaction mixture was filtrated in order to remove the



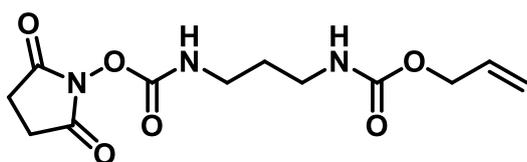
precipitate, concentrated under reduced pressure. The crude was used as such for the final step.

ii. General procedure for the preparation of activated carbamates monomers

To a stirred suspension of disuccinimidyl carbonate (1.2 eq ; 36.00 mmol; 9.22 g) in CH₂Cl₂ (50 mL) was added drop by drop a solution of amine derivate. The reaction mixture was left to react 4 hours and then a 1M solution of KHSO₄ was added. The organic layer was extracted, washed one time with brine, dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum. The resulting crude was purified by precipitation in Et₂O to furnish activated carbamate **M26** as white solid.

Allyl (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) (propan-1,3-diyl) dicarbamate **M26**

Solid ; yield 40 % ; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 6.03 (s, 1H), 5.91 (m, 1H), 5.26 (dd, J=24.6 Hz, J=13.6 Hz, 2H), 4.98 (s, 1H), 4.56 (d, J=4.8 Hz, 2H), 3.30 (m, 2H), 2.82 (s, 4H), 1.71 (m, 2H) ; ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 170.09, 157.03, 151.89, 132.79, 117.79, 65.73, 38.58, 37.46, 29.89, 25.49 ; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₁₂H₁₈N₃O₆ [M+H]⁺ 300.1190, found 300.1190.



c. Synthesis of oligomers

H-Ser^U-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Leu^{INVU}-Ala^U-NH₂ (III.45)

III.45 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M18**, **M24** and **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 20 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 20.0 mg was obtained with total yield 34 %. ESI-MS (*Mw* 1171.61) : *m/z* 1172.65 [M+H]⁺, 586.83 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.27 min.

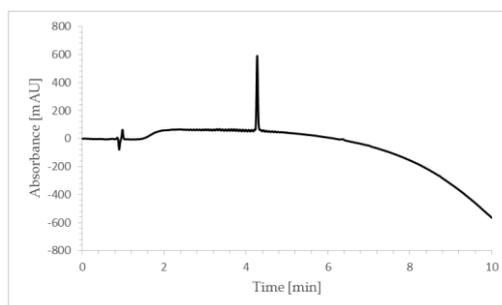


Figure 298 : RP-HPLC chromatogram of III.45 after purification

H-Ser^U-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Leu^{INVU}-Ala^U-NH₂ (III.46)

III.46 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M18**, **M21**, **M24** and **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-45%, 20 min; 45-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 20.0 mg was obtained with total yield 34 %. ESI-MS (*Mw* 1200.64) : *m/z* 1201.68 [M+H]⁺, 601.35 [M+2H]²⁺, 401.23 [M+3H]³⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.38 min.

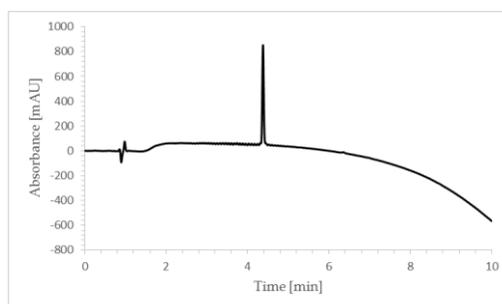


Figure 299 : RP-HPLC chromatogram of III.46 after purification

H₂N-CO-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Leu^{INVU}-Ala^U-NH₂ (III.47)

III.47 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M18**, **M24** and **M1** following the *general procedure B*. Fmoc-isocyanate (75 μ mol, 1.5 eq relative to the resin loading) was dissolved in DMF (1.5 mL) and was added to the reaction vessel (CEM), followed by DIEA (28 μ L, 150 μ mol, 3 eq relative to the loading resin). The vessel was then placed inside the microwave reactor (CEM Discover) and stirred (**20 °C, 0 W, 20 min**). After 20 minutes, the resin was filtered and washed with DMF (4 \times 2 mL). Fmoc was deprotected with 20% of piperidine in DMF (**20 °C, 0 W, 20 min**). The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-50%, 15 min; 50-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 11.0 mg was obtained with total yield 18 %. ESI-MS (*Mw* 1214.62) : *m/z* 1215.66 [M+H]⁺, 608.33 [M+2H]²⁺ ; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 5.24 min.

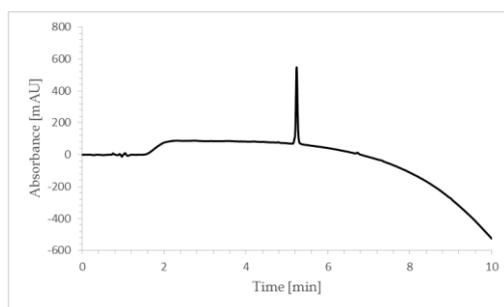


Figure 300 : RP-HPLC chromatogram of **III.47** after purification

H-Ser-Phe-(N-Me)Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Leu^{INVU}-Ala^U-NH₂ (III.48)

III.48 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M18**, **M24** and **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-50%, 15 min; 50-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 25.0 mg was obtained with total yield 42 %. ESI-MS (*Mw* 1185.63) : *m/z* 1186.66 [M+H]⁺, 593.84 [M+2H]²⁺ ; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R*= 4.36 min.

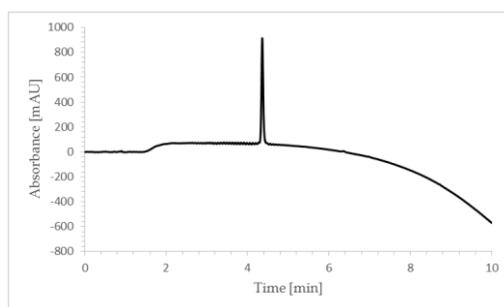


Figure 301 : RP-HPLC chromatogram of **III.48** after purification

(dé-N)Ser^U-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Leu^{INVU}-Ala^U-NH₂ (III.49)

III.49 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomers **M25**, **M18**, **M24** and **M1** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-70%, 20 min; 70-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 18.0 mg was obtained with total yield 31 %. ESI-MS (*Mw* 1171.61) : *m/z* 1172.65 [M+H]⁺, 586.83 [M+2H]²⁺ ; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.16 min.

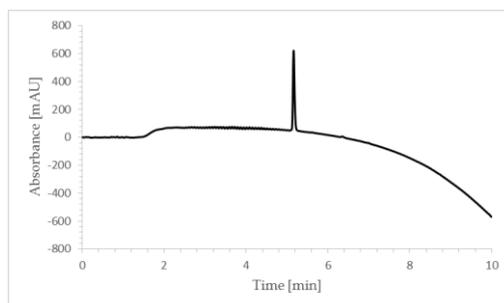


Figure 302 : RP-HPLC chromatogram of **III.49** after purification

(dé-N)Orn^U-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Leu^{INVU}-Ala^U-NH₂ (III.50)

III.50 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomers **M26**, **M18**, **M24** and **M1** following the *general procedure B*. Alloc was deprotected with Pd-tetrakis (0.1 eq relative to the resin loading), Phenylsilane (20 eq relative to the resin loading) in solution in dry DCM (2 mL), without microwave irradiation (**0 W, 25 °C, 20 min**). The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-70%, 20 min; 70-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 8.0 mg was obtained with total yield 13 %. ESI-MS (*Mw* 1184.65) : *m/z* 1185.68 [M+H]⁺, 593.35 [M+2H]²⁺ ; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.50 min.

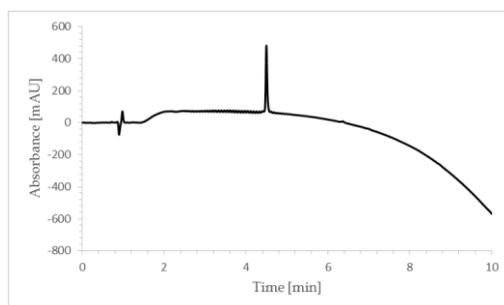


Figure 303 : RP-HPLC chromatogram of **III.50** after purification

(dé-N)Orn^U-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp^U-Ala^U-Leu^{INVU}-Ala^U-NH₂ (**III.51**)

III.51 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomers **M26**, **M18**, **M24** and **M1** following the *general procedure B*. Alloc was deprotected with Pd-tetrakis (0.1 eq relative to the resin loading), Phenylsilane (20 eq relative to the resin loading) in solution in dry DCM (2 mL), without microwave irradiation (**0 W, 25 °C, 20 min**). After that, the resin was filtered and washed with dry DCM than with DMF. DIC (3 eq relative to the resin loading) and oxyma (3 eq relative to the resin loading) were dissolved in DMF. The mixture was added into the reaction vessel (CEM Discover Bio). The vessel was then irradiated (**50 W, 50 °C, 10 min**). After that, the resin was filtered and washed with DMF. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-70%, 20 min; 70-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 4.0 mg was obtained with total yield 7 %. ESI-MS (*Mw* 1166.63) : *m/z* 1167.67 [M+H]⁺, 584.34 [M+2H]²⁺; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.50 min.

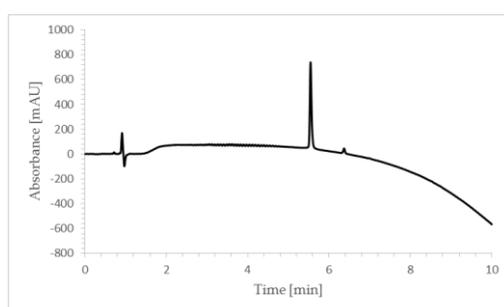


Figure 304 : RP-HPLC chromatogram of **III.51** after purification

H-Thr-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Asn-Leu-Leu-NH₂ (**III.52**)

III.52 was synthesized on 50 μmol scale following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-70%, 20 min; 70-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 22.0 mg was obtained with total yield 50 %. ESI-MS (*Mw* 1241.61) : *m/z* 1242.61 [M+H]⁺, 621.81 [M+2H]²⁺; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 4.69 min.

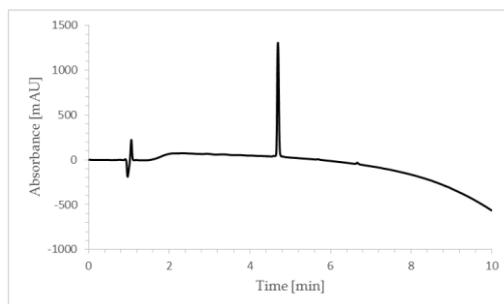


Figure 305 : RP-HPLC chromatogram of **III.52** after purification

H-Ser-Phe-Ala-Glu-Tyr-Trp-Asn-Leu-Leu-NH₂ (**III.53**)

III.53 was synthesized on 50 μmol scale following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 30-70%, 20 min; 70-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 12.0 mg was obtained with total yield 21 %. ESI-MS (*Mw* 1140.56) : m/z 1141.57 [M+H]⁺, 571.78 [M+2H]²⁺; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) t_R = 4.71 min.

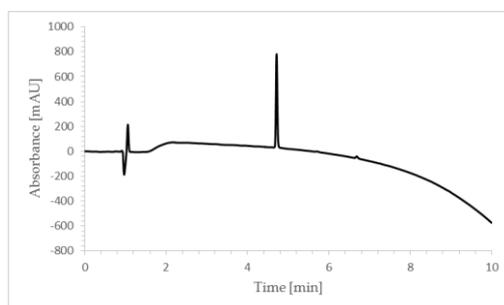


Figure 306 : RP-HPLC chromatogram of **III.53** after purification

d. Inhibition curves

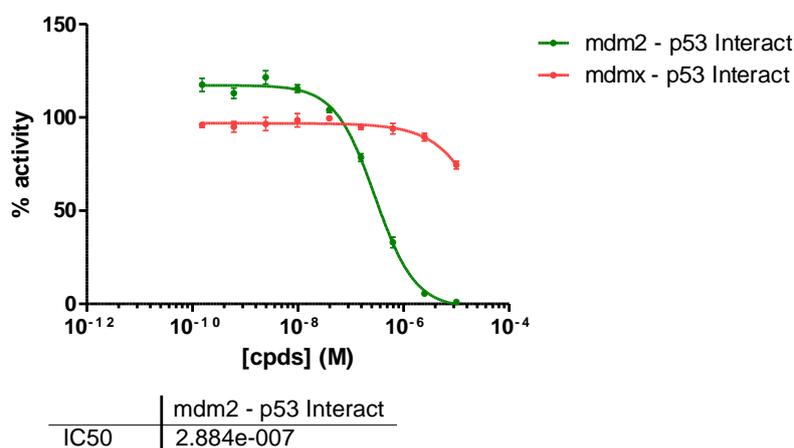


Figure 307 : Inhibition curve of the oligomer **III.45** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

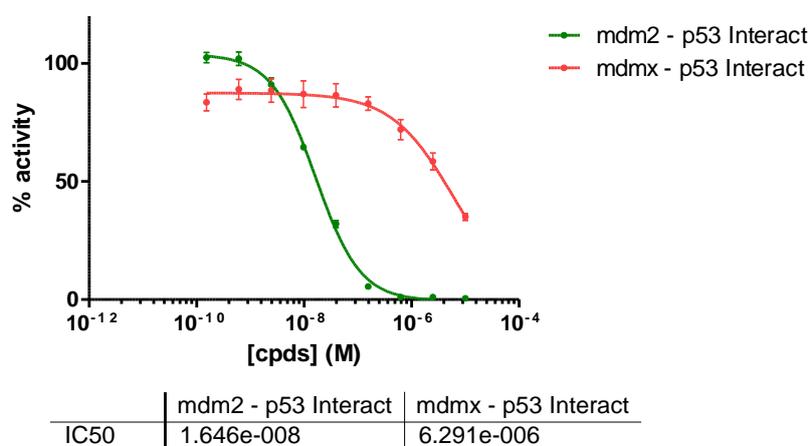


Figure 308 : Inhibition curve of the oligomer **III.47** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

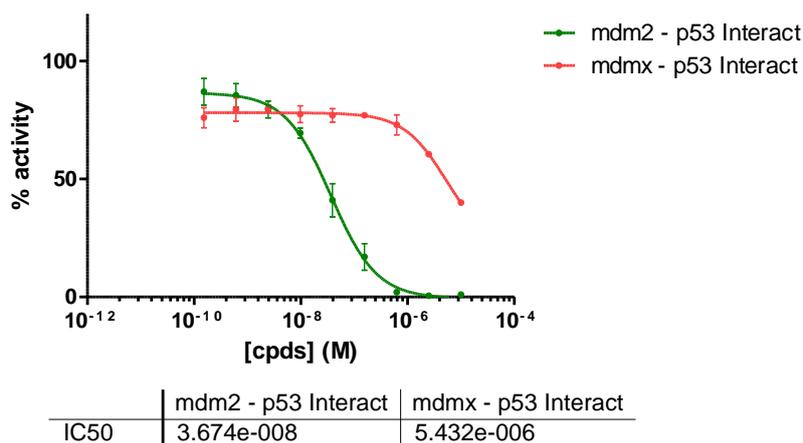


Figure 309 : Inhibition curve of the oligomer **III.49** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

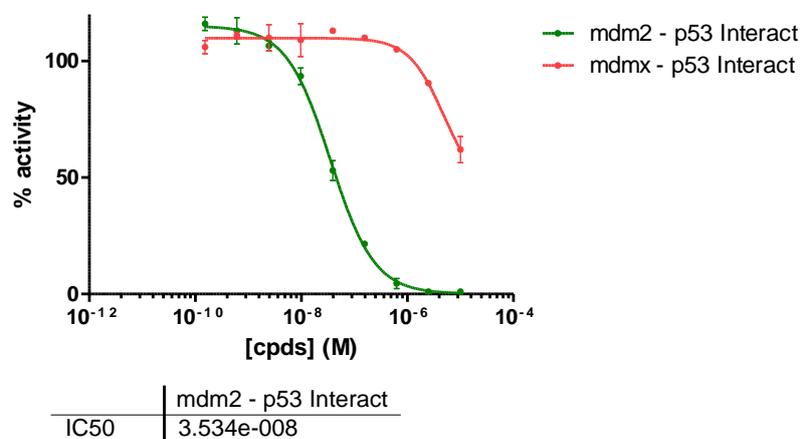


Figure 310 : Inhibition curve of the oligomer **III.50** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

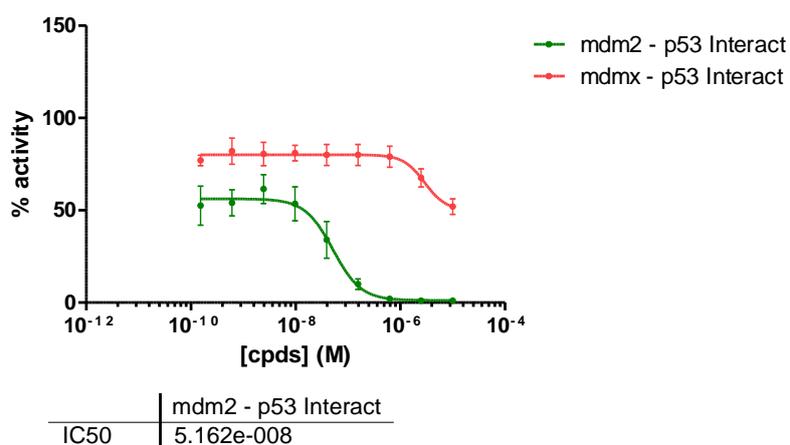


Figure 311 : Inhibition curve of the oligomer **III.51** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

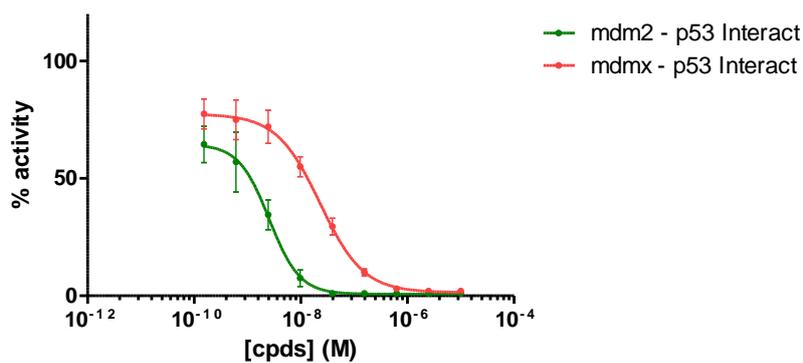


Figure 312 : Inhibition curve of the oligomer **III.52** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

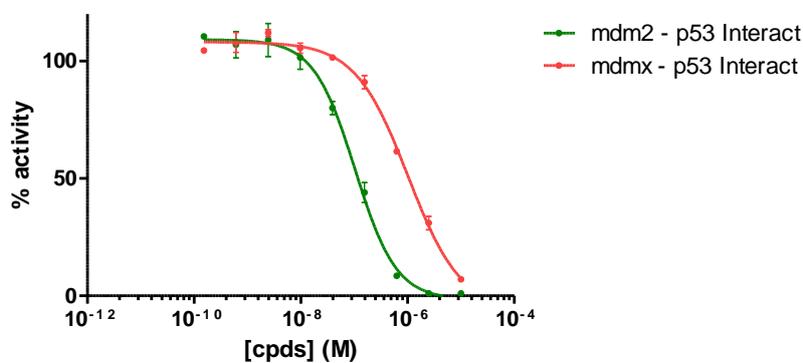


Figure 313 : Inhibition curve of the oligomer **III.53** on the p53/MDM2 interaction and on the p53/MDMX interaction

IV. Compounds described in Chapter 4

a. Preparation of O-succinimidyl carbamates **M27**.

Activated monomers **M27** [3] was prepared using a previously described procedure.[3]

b. Oligomers synthesis.

H-Leu^U-Glu^U-Lys^U-Leu^U-Tyr^U-Leu^U-Glu-Gln-Leu-Leu-Ala-Lys-Leu-NH₂ (**IV.10**)

IV.10 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomers **M3**, **M5**, **M6** and **M27** following the *general procedure B*. The product was purified by semi-prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 45-60%, 20 min; 60-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 8.0 mg was obtained with total yield 9 %. ESI-MS (*M_w* 1746.12) : *m/z* 1747.14 [M+H]⁺, 874.13 [M+2H]²⁺, 583.00 [M+3H]³⁺ ; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.98 min.

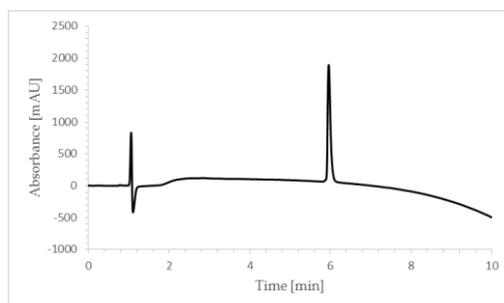


Figure 314 : RP-HPLC chromatogram of **IV.10** after purification

H-Leu^U-Glu^U-Lys^U-Leu^U-Tyr^U-Leu^U-Glu-Lys-Leu-Leu-Ala-Gln-Leu-NH₂ (**IV.11**)

IV.11 was synthesized on 50 μmol scale with the use of monomers **M3**, **M5**, **M6** and **M27** following the *general procedure B*. The product was purified by semi-prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 40-55%, 20 min; 55-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 4 ml/min. 10.0 mg was obtained with total yield 7 %. ESI-MS (*M_w* 1746.12) : *m/z* 1747.14 [M+H]⁺, 874.13 [M+2H]²⁺, 583.07 [M+3H]³⁺ ; **HPLC** (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.75 min.

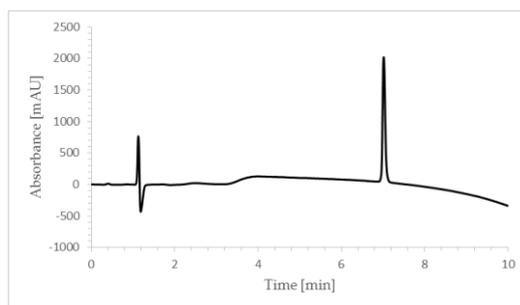


Figure 315 : RP-HPLC chromatogram of **IV.11** after purification

H-Leu^U-Glu^U-Lys^U-Leu^U-Tyr^U-Leu^U-Glu-Lys-Leu-Ala-Ala-Asn-Leu-NH₂ (IV.12)

IV.12 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M3**, **M5**, **M6** and **M27** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 40-60%, 20 min; 60-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 5.0 mg was obtained with total yield 6 %. ESI-MS (*Mw* 1690.06) : *m/z* 564.38 [M+3H]³⁺ ; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.94 min.

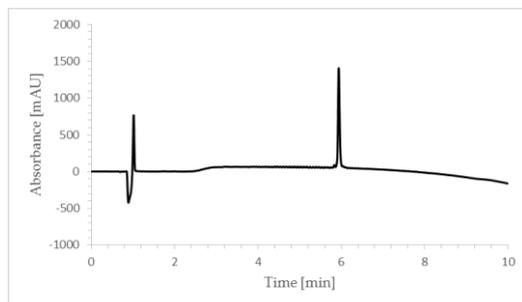


Figure 316 : RP-HPLC chromatogram of IV.12 after purification

H-Leu^U-Glu^U-Lys^U-Leu^U-Tyr^U-Leu^U-Glu-Lys-Leu-Ser-Ala-Gln-Leu-NH₂ (IV.13)

IV.13 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M3**, **M5**, **M6** and **M27** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 40-60%, 20 min; 60-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 6.0 mg was obtained with total yield 7 %. ESI-MS (*Mw* 1720.07) : *m/z* 574.38 [M+3H]³⁺ ; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 5.59 min.

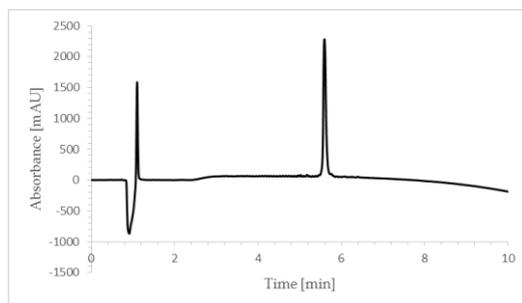


Figure 317 : RP-HPLC chromatogram of IV.13 after purification

H-Leu^U-Glu^U-Lys^U-Leu^U-Tyr^U-Leu^U-Glu-Lys-Leu-Ile-Ala-Gln-Leu-NH₂ (IV.14)

IV.14 was synthesized on 50 μ mol scale with the use of monomers **M3**, **M5**, **M6** and **M27** following the *general procedure B*. The product was purified by prep HPLC : H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 40-60%, 20 min; 60-100%, 2 min; 100%, 1 min), flow = 20 ml/min. 4.0 mg was obtained with total yield 5 %. ESI-MS (*Mw* 1760.14) : *m/z* 583.39 [M+3H]³⁺ ; HPLC (H₂O (0.1% TFA), ACN (0.1% TFA); gradient 10-100%, 10 min; 100%, 3min) *t_R* = 6.67 min.

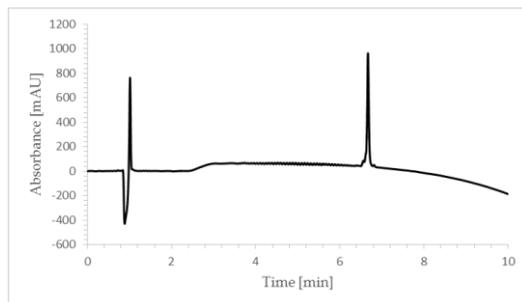


Figure 318 : RP-HPLC chromatogram of IV.14 after purification

c. X-ray crystallography

For crystallisation trials, lyophilized powders of oligomers **IV.10** and **IV.11** were dissolved to final concentrations of 20 mg/ml in ddH₂O. Crystallisation trials were performed at 20 °C in standard aqueous hanging drops composed of 0.5 µL of oligourea solution plus 0.5 µL of crystallisation reagent. Crystals were obtained for oligomers **IV.10** and **IV.11**.

| | |
|--|--|
| Molecule | IV.10 |
| Sequence | L ^U E ^U K ^U L ^U Y ^U L ^U -EQLLAKL |
| 4° structure | Parallel hexamer |
| Synch. ref. | 398-p2 |
| Beamline | ID23-2 |
| Tray ref. | T241_C2_Dr.1 |
| Space group | <i>P</i> 3 |
| No. of helices in ASU | 6 |
| a, b, c (Å) | 56.13, 56.13, 25.07 |
| α, β, γ (°) | 90.0, 90.0, 120.0 |
| Resolution (Å) | 1.83 |
| Reflections | 7361 |
| R_{work} / R_{free} (%) | 20.2 / 27.7 |
| Crystallisation conditions | 11.05 mg/ml 12 % Ethanol 4 % PEG400 100 mM Na OAc (pH 4.6) |

Figure 319 : X-ray crystallographic parameters for Oligomer **IV.10**

| | |
|---|--|
| Molecule | IV.11 |
| Sequence | L ^U E ^U K ^U L ^U Y ^U L ^U -EKLLAQL |
| 4^o structure | Parallel hexamer |
| Synch. ref. | 132-p9 |
| Beamline | PX1 |
| Tray ref. | T271_B1_Dr1 |
| Space group | <i>P</i> 3 |
| No. of helices in ASU | 6 |
| a, b, c (Å) | 56.318, 56.318, 24.916 |
| α, β, γ (°) | 90.0, 90.0, 120.0 |
| Resolution (Å) | 1.84 |
| Reflections | 7171 |
| R_{work} / R_{free} (%) | 21.9 / 27.7 |
| Crystallisation conditions | 14.5 mg/ml 5 % Ethanol 5 % PEG400 100 mM Na OAc (pH 4.6) |

Figure 320 : X-ray crystallographic parameters for Oligomer **IV.11**

d. Native electrospray ionization mass spectrometry

Native electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) experiments were performed on an Agilent 6560 DTIMS-Q-TOF spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), with the dual-ESI source operated in positive ion mode. Oligomers **IV.10-IV.14** were analyzed at a concentration 200 μ M in H₂O, with a syringe pump flow rate of 180 μ L/h. The trapping funnel RF amplitude was set to 150 V to improve softness. The data were analyzed using the Agilent MassHunter software (version B.07).

Bibliographie

- [1] P. Sieber, "A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method," *Tetrahedron Lett.*, vol. 28, no. 19, pp. 2107-2110, 1987.
- [2] T. Vojkovsky, "Detection of secondary amines on solid phase," *Pept. Res.*, vol. 8, no. 4, pp. 236-7, 1995.
- [3] C. Douat-Casassus, K. Pulka, P. Claudon, and G. Guichard, "Microwave-Enhanced Solid-Phase Synthesis of N , N' -Linked Aliphatic Oligoureas and Related Hybrids," *Org. Lett.*, vol. 14, no. 12, pp. 3130-3133, Jun. 2012.
- [4] Y.-R. Nelli, C. Douat-Casassus, P. Claudon, B. Kauffmann, C. Didierjean, and G. Guichard, "An activated building block for the introduction of the histidine side chain in aliphatic oligourea foldamers," *Tetrahedron*, vol. 68, no. 23, pp. 4492-4500, Jun. 2012.
- [5] G. W. Collie *et al.*, "Shaping quaternary assemblies of water-soluble non-peptide helical foldamers by sequence manipulation," *Nat. Chem.*, vol. 7, no. 11, pp. 871-878, Sep. 2015.
- [6] G. Guichard, V. Semetey, M. Rodriguez, and J.-P. Briand, "Solid phase synthesis of oligoureas using O-succinimidyl-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)ethylcarbamate derivatives as activated monomers," *Tetrahedron Lett.*, vol. 41, no. 10, pp. 1553-1557, Mar. 2000.
- [7] A. Violette *et al.*, "Mimicking Helical Antibacterial Peptides with Nonpeptidic Folding Oligomers," *Chem. Biol.*, vol. 13, no. 5, pp. 531-538, May 2006.
- [8] N. Pendem *et al.*, "Helix-Forming Propensity of Aliphatic Urea Oligomers Incorporating Noncanonical Residue Substitution Patterns," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 12, pp. 4884-4892, Mar. 2013.

Foldamères stabilisateurs d'hélices peptidiques : Applications à l'inhibition d'interactions protéine/protéine

Les hélices α sont des éléments clés de la reconnaissance biomoléculaire, comme en témoigne le fait qu'une quantité significative de complexes protéine/protéine, dans la banque de données protéiques (PDB), présentent des interfaces inter-hélices. Cependant, de courtes hélices peptidiques isolées dans le but de bloquer ces interactions ne sont généralement que faiblement présentes en milieu aqueux et sont sensibles à la dégradation protéolytique, limitant ainsi leur potentiel thérapeutique. Diverses approches chimiques ont été proposées pour augmenter la propension au repliement en hélice des peptides- α . Une stratégie consiste à pré-organiser les premières liaisons amides à l'aide d'une « capping box » ou d'un substitut de liaison hydrogène. Récemment, nous nous sommes intéressés à la possibilité d'interfacer des peptides- α et des foldamères afin d'élaborer des « foldamères à blocs » générant ainsi un nouveau type d'architecture mime de l'hélice α . Dans notre laboratoire, nous avons développé des foldamères à base d'urées qui s'organisent pour former des structures hélicoïdales. Les similitudes du sens d'enroulement, du pas et de la polarité entre l'hélice α peptidique et l'hélice-2.5 d'oligourée suggéraient qu'il serait possible de combiner ces deux squelettes. Au cours de cette thèse, nous avons montré que les chimères : oligourée/peptide- α , forment des structures hélicoïdales bien définies dans les solvants organiques polaires avec la propagation d'un réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires continu couvrant la totalité de la séquence. Ces études ont suggéré que le squelette de l'oligourée qui possède une forte propension à adopter une structuration en hélice pourrait conduire au développement d'un « cap » permettant la pré-organisation des quatre premiers NHs ainsi que des quatre derniers groupements carbonyles d'une hélice α peptidique. Nous avons étudié l'influence de courts fragments oligourées sur la stabilisation de séquences peptidiques modèles solubles dans l'eau en hélices α , conduisant au développement de la « foldamer capping box ». Grâce à cette nouvelle stratégie de stabilisation des hélices peptidiques, nous avons conçu des inhibiteurs de l'interaction protéine/protéine p53/MDM2.

Mots clés : Foldamères, Peptides, Hélices, Stabilisation, Mimétisme, Cancer

Foldamers as peptide helix stabilizers: applications to the inhibition of protein-protein interactions

α -Helices are key elements of biomolecular recognition, as reflected by the fact that a large fraction of the protein-protein complexes in the Protein Data Bank (PDB) feature helical interfaces. However, short isolated peptide helices are generally only weakly populated in aqueous environment and are sensitive to proteolytic degradation, thus limiting their therapeutic potential. Various chemical approaches have been proposed to increase the helix folding propensity of α -peptides. One strategy is to pre-organize the first amide bonds through the use of a "capping box" or a hydrogen bond surrogate. Recently we became interested by the possibility to interface peptide and foldamer helical backbones in order to develop "block co-foldamers", to generate new generations of α -helix mimics. In our laboratory, we have developed oligourea foldamers which are organized to form helical structures. The similarities in helix screw sense, pitch, and polarity between the peptide α -helix and the oligourea 2.5-helix suggested that it would be feasible to combine these two backbones. In this thesis, we have shown that the resulting oligourea/ α -peptide chimeras form well-defined helical structures in polar organic solvents with the propagation of a continuous intramolecular hydrogen bonding network spanning the entire sequence. These studies provided a rationale for the use of the oligourea backbone which is strongly biased towards helix formation could lead to the development of pre-organized caps for the initial four amide NHs and the final four carbonyl groups of a peptide α -helix. We have therefore studied the influence of short oligourea fragments on the stabilization of model water-soluble peptide sequences in α -helices, leading to the development of the foldamer capping box. This strategy was applied for the first time to the design of potent inhibitors of protein/protein interactions (e.g. p53/MDM2).

Keywords: Foldamers, Peptides, Helices, Stabilization, Mimicry, Cancer

Unité de recherche

CNRS - UMR 5248 - Laboratoire de chimie et biologie des membranes et des nanoobjets (CBMN), Allée Geoffroy Saint-Hilaire - 33600 PESSAC