



HAL
open science

Mise au point et industrialisation de la synthèse de peptides complexes

Claude Zoukimian

► **To cite this version:**

Claude Zoukimian. Mise au point et industrialisation de la synthèse de peptides complexes. Chimie organique. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV054 . tel-03283377

HAL Id: tel-03283377

<https://theses.hal.science/tel-03283377v1>

Submitted on 10 Jul 2021

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L' UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie organique**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Claude ZOUKIMIAN

Thèse dirigée par **Didier BOTURYN**, Directeur de recherche,
CNRS, et

Co-encadrée par **Rémy BEROU**D, CEO, **Smartox Biotechnology**

préparée au sein du **Département de Chimie Moléculaire**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Mise au point et industrialisation de la synthèse de peptides complexes

Thèse soutenue publiquement le **9 Juillet 2020**,
devant le jury composé de :

M. Vincent AUCAGNE - Rapporteur

Directeur de Recherche CNRS, Orléans, Rapporteur

Mme. Muriel AMBLARD _ Rapporteur

Directrice de Recherche CNRS, Montpellier, Rapporteur

M. Michel DE WAARD - Examineur

Directeur de Recherche, INSERM, Examineur

M. Jean-François POISSON – Président du jury

Professeur des Universités, Université Grenoble Alpes, Examineur

M. Didier BOTURYN – Directeur de thèse

Directeur de Recherche, CNRS, Grenoble, Examineur

M. Rémy BEROUD – Co-encadrant de thèse

CEO Smartox Biotechnology, Saint-Egrève, Invité



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le D^r Didier Boturyn, mon directeur de thèse, et Rémy Bérout, mon co-encadrant, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces travaux. Chacun à leur manière, ils ont su m'aider à avancer dans mes projets et à mener cette thèse dans un cadre et un état d'esprit positif et encourageant.

Je tiens également à remercier les membres du jury ayant évalué mes travaux de thèse : le D^r Muriel Amblard, le D^r Vincent Aucagne, tous deux rapporteurs, le D^r Michel De Waard, examinateur, et le P^r Jean-François Poisson, président du jury. Merci d'avoir apporté vos différentes expertises pour l'évaluation de mes travaux, de plus dans un esprit constructif et avec une certaine bienveillance.

J'aimerais par la suite remercier l'ensemble de mes collègues de travail qui m'ont épaulé lors de ces années de thèse : Mathieu, Cécile, Baptiste, Cathy, Laure, Lucie, Mathilde, Stéphanie, Séverine et Aurélien du côté de Smartox Biotechnology, mais également Carlo, Benjamin, David, Fabien, Eugénie et Claire du côté du DCM. Avec vous à mes côtés, cette thèse n'en a été que plus appréciable, et j'espère que les amitiés qui en sont nées dureront encore longtemps. Je remercie également les techniciennes et stagiaires de Smartox Biotechnology pour leur aide précieuse au quotidien : Coline, Andréa, Flore, Anaïs, Flora, Daniella, Renaud, Victor, Thomas.

Et c'est avec beaucoup d'émotion et la plus grande sincérité que j'écrirai les lignes suivantes.

Un grand merci à tous mes amis d'enfance, mais également à ceux rencontrés au cours de mes études : Totio, Nicow, Boulette, Max, Guen, Thibaut, Fofu et Klaasjan. Nos amitiés dépassent de loin le cadre de cette thèse. Vous avez toujours été là quand il fallait, pour tous les bons moments, mais aussi et surtout pour les moins bons. Merci pour votre présence. Merci pour tout. Tous les souvenirs avec vous n'ont pas de prix.

Le plus grand des mercis va à ma famille : mes parents Fabienne et Michel, merci pour votre soutien infaillible, je n'en serais pas là sans vous ; ma sœur Hélène et son mari Jean-Yves, merci pour tous les bons moments passés ensemble, vous êtes au top ; mon frère Pierre, la distance rend nos retrouvailles trop rares mais aussi et surtout plus précieuses ; mes grands-parents, je regrette que vous soyez partis trop tôt pour célébrer avec moi cette étape importante. Un immense merci à ma compagne Ratanak, avec moi au quotidien depuis bien avant le début de cette thèse. Il me faudrait largement plus que quelques lignes ici pour te dire à quel point tu as compté et compteras toujours dans ma vie.

Enfin, je dédie ces travaux à ma fille Elsa. Je te souhaite le meilleur pour cette vie tout juste débutée, et je ferai de ton bonheur et de ton épanouissement ma priorité.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	5
LISTE DES ACIDES AMINES NATURELS	7
INTRODUCTION	9
Introduction générale	11
I. Les peptides thérapeutiques.....	12
A. Marché des peptides thérapeutiques	12
1. Essor des peptides thérapeutiques	12
2. Marché actuel.....	14
B. Activités biologiques des peptides.....	16
1. Les familles de peptides et leurs cibles	16
2. Elaboration d'un médicament peptidique	22
II. Les toxines : des candidats au potentiel thérapeutique important	26
A. Organismes d'origine et identification des toxines d'intérêt	26
B. Structures chimiques et familles de toxines	29
1. Structure ICK.....	30
2. Structure CS- $\alpha\beta$	31
3. Structure trois-doigts.....	32
C. Exemples de toxines sur le marché.....	34
III. Obtention de peptides et protéines.....	39
A. Synthèse de peptides par SPPS	39
1. Principe de la SPPS en stratégie Fmoc.....	41
2. Optimisations de la SPPS en stratégie Fmoc	44
B. Native Chemical Ligation.....	48
1. Mécanisme et extensions de la NCL.....	49
2. Obtention de précurseurs de thioesters en stratégie Fmoc	53
C. Formation de ponts disulfures	61
1. Repliement oxydatif direct	62
2. Formation dirigée de ponts disulfures	66
IV. Objectifs et contexte des travaux	74
RESULTATS ET DISCUSSIONS	77
I. <i>Native Chemical Ligation</i>	79
A. NCL à deux fragments : cas de l'AmmTx3	79

B.	NCL successives à trois fragments.....	83
C.	Applications.....	92
1.	Notexine	92
2.	U1-Cyrtautoxine-As1c.....	98
3.	Progastrine.....	103
4.	Dimère d'un fragment d'immunoglobuline E.....	107
II.	Formation dirigée de ponts disulfures.....	114
A.	Stratégie à deux ponts disulfures.....	114
B.	Stratégie à trois ponts disulfures	120
1.	SGTx1	120
2.	Phlotoxine-1.....	125
C.	Applications.....	131
1.	δ -theraphotoxine-Hm1a.....	132
2.	Hanatoxine-1	137
D.	Utilisation du groupement protecteur Hmb ^{off/on}	140
1.	Mise au point de la stratégie Trt/Hmb ^{off/on}	143
2.	Evaluation de l'orthogonalité du groupement Hmb ^{off/on}	148
3.	Mise au point des stratégies Trt/Hmb ^{off/on} /Acm et Trt/Hmb ^{off/on} /Mob	150
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	155
	PARTIE EXPERIMENTALE.....	161
I.	Instrumentation	163
II.	Procédures générales de synthèse	165
A.	Chargement de la résine 2-chlorotriyl chloride pour les peptides carboxylés à l'extrémité C-terminale	165
B.	Chargement de la résine 2-chlorotriyl chloride pour les peptides amidés à l'extrémité C-terminale	165
C.	Chargement de la résine 2-chlorotriyl chloride pour les peptides hydrazide à l'extrémité C-terminale	166
D.	Synthèse de peptides linéaires par SPPS.....	166
E.	Protocole de <i>Native Chemical Ligation</i> avec un fragment hydrazide.....	167
III.	Protocoles de synthèses des composés.....	169
A.	AmmTx3.....	169
B.	α -Bungarotoxine.....	171
C.	Notexine	175

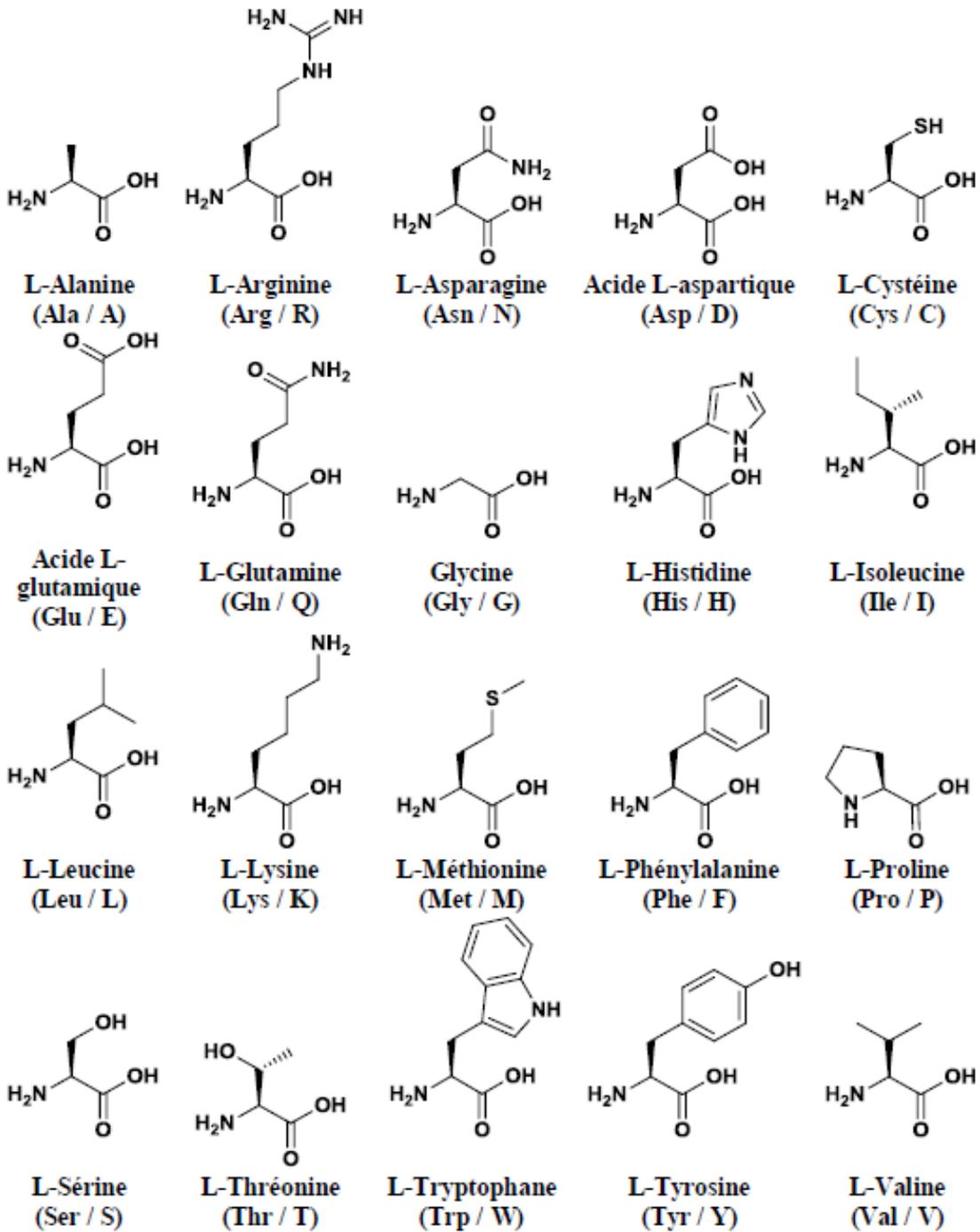
D. U1-Cyrtautoxine-As1c	178
E. Progastrine	181
F. Fragment d'immunoglobuline E.....	184
G. Formation dirigée de ponts disulfures	189
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	203

LISTE DES ABREVIATIONS

% v/v	pourcentage volumique	GPCR	récepteurs couplés aux protéines G
ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine	GSH	glutathion réduit
AChR	récepteur de l'acétylcholine	GSSH	glutathion oxydé
AcM	acétamidométhyle	HaTx1	Hanatoxine-1
ACTH	hormone adrénocorticotrope	HBTU	hexafluorophosphate de 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
Aha	4-azido-L-homoalanine	HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Alloc	allyloxy-carbonyl	Hm1a	δ-theraphotoxine-Hm1a
AMP	peptide antimicrobien	Hmb	N-(2-hydroxy-4-méthoxybenzyle)
BM(PEG)₃	1,11-bismaléimido-triéthylène-glycol	HPLC	chromatographie en phase liquide à haute performance
BMOE	bis-maléimidoéthane	IC₅₀	concentration inhibitrice médiane
Boc	tert-butyloxy-carbonyl	ICK	<i>inhibitor cystine knot</i>
Ca_v	canal voltage-dépendant calcique	IgE	immunoglobuline E
CDI	carbonyldiimidazole	IPP	interaction protéine-protéine
Cl_v	canal voltage-dépendant chlorique	KTx	toxine de scorpion ciblant les canaux potassiques
CuAAC	cycloaddition azoture/alcyne catalysée au cuivre I	K_v	canal voltage-dépendant potassique
CUTX	U1-Cyrtautoxin-As1c	MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>
Cy5	cyanine 5	Meb	méthylbenzyle
Dbz	acide 3,4-diaminobenzoïque	M_{mono}	masse moléculaire monoisotopique
DCM	dichlorométhane	Mmt	4-méthoxytrytile
Ddae	1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)-3-[2-(2-aminoéthoxy)éthoxy]-propan-1-ol	Mob	méthoxybenzyle
Dde	1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthyle	MPAA	acide mercaptophénylacétique
DIC	diisopropylcarbodiimide	MS	spectrométrie de masse
DIPEA	N,N-diisopropyléthylamine	Msbh	4,4'-diméthylsulfanylbenzhydryle
Dmb	diméthoxybenzyle	N₃-Esoc	2-[2-(2-azido-éthoxy)éthylsulfonyl]-2-éthoxycarbonyl
DMF	diméthylformamide	Na_v	canal voltage-dépendant sodique
DMSO	diméthylsulfoxyde	Nbz	N-acyl-benzimidazolone
DTNP	2,2'-dithiobis(5-nitropyridine)	NCL	<i>Native Chemical Ligation</i>
DTP	dithiodipyridine	N-Hnb-Cys	N-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)cystéine
DTT	dithiothréitol	NMP	N-méthyl-2-pyrrolidinone
EC₅₀	concentration efficace médiane	NTX	Notexine
ED₅₀	dose efficace médiane	PDI	protéine disulfure isomérase
éq.	équivalent molaire	PEGA	polyéthylène glycol diméthyle acrylamide
ESI	ionisation par électronébuliseur	PhITx1	Phlotoxine-1
FDA	<i>food and drug administration</i>	ProG	progastrine
Fmoc	fluorénylméthoxy-carbonyl	PTM	modification post-translationnelle
Gn.HCl	chlorure de guanidinium		

PyBOP	l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytri(pyrrolidino)- phosphonium	TFA	acide trifluoroacétique
PyBroP	hexafluorophosphate de bromotri(pyrrolidino)phosphonium	TFMSA	acide trifluorométhanesulfonique
RAM	Rink amide	THPTA	tris(3-hydroxypropyl triazolylmethyl) amine
RMN	résonance magnétique nucléaire	Thz	thiazolidine
RP	phase inverse	Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
SPPS	synthèse de peptide en phase solide	Trt	trityle
SPS	synthèse de peptides en solution	VA-044	2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2- yl)propane]dihydrochloride
tBu	<i>tert</i> -butyle	α-BgTx	α -Bungarotoxine
TCEP	tris(2-carboxyéthyl)phosphine	τ	taux de substitution

LISTE DES ACIDES AMINES NATURELS



INTRODUCTION

Introduction générale

Les peptides et les protéines jouent un rôle majeur dans la quasi-totalité des processus biologiques dans le monde du vivant, depuis les plantes jusqu'à l'Homme en passant par toutes les familles d'organismes vivants. Ces biomolécules sont impliquées dans des mécanismes biologiques très complexes qui dépendent d'un nombre incalculable de facteurs internes et externes. A titre d'exemple, un simple organisme unicellulaire telle que la levure *Saccharomyces cerevisiae* impliquée dans la fermentation de la bière présente un protéome de plus de 5800 peptides et protéines différents, avec plusieurs milliers de copies de chaque par cellule.¹ Chez l'Homme, les peptides et protéines remplissent de multiples tâches. Parmi elles, les protéines enzymatiques sont les catalyseurs des différentes réactions chimiques impliquées dans notre métabolisme, tandis que les peptides agissent de concert avec les protéines transmembranaires présentes à la surface des cellules pour délivrer des messages entre les milieux intra et extracellulaires.

Au vu du rôle crucial qu'ont les peptides et protéines dans la majorité des phénomènes physiologiques impliqués dans le fonctionnement du corps humain, un dérèglement mineur de cette mécanique peut mener à d'importantes pathologies. Laboratoires et entreprises pharmaceutiques se sont donc tournés vers l'exploitation de ces biomolécules à des fins thérapeutiques.

Ce manuscrit débutera ainsi avec une première partie décrivant le marché des peptides thérapeutiques et les grandes familles de molécules d'intérêt dans ce domaine. Les toxines peptidiques d'animaux, macromolécules au fort potentiel thérapeutique, seront plus particulièrement abordées. Cette première partie se terminera par une description de la synthèse chimique des peptides et des toxines et des difficultés associées, et dressera un état de l'art de deux techniques sur lesquelles se sont basées les travaux effectués : la *native chemical ligation* et la formation dirigée de ponts disulfures. La seconde partie sera dédiée à la description des développements réalisés au cours de cette thèse. Dans un premier temps, les travaux en lien avec la ligation de fragments peptidiques seront décrits, avec la synthèse de plusieurs peptides et toxines longs. Les recherches effectuées sur le repliement régiosélectif de toxines seront abordées dans un second temps, avec l'évaluation d'une première stratégie de repliement, puis avec la mise au point d'une nouvelle stratégie employant un schéma de synthèse innovant. Enfin, une conclusion sur les travaux effectués et les perspectives envisageables clôtureront ce manuscrit.

I. Les peptides thérapeutiques

Les peptides se différencient des protéines par leur taille inférieure (moins d'une centaine de résidus) et donc plus accessible synthétiquement. Leur composition élémentaire, les acides aminés, étant la même que celle des protéines, les peptides peuvent efficacement se substituer aux protéines dans certains processus biologiques. Malgré ce potentiel thérapeutique important, ils restent à ce jour encore relativement peu exploités. Ce potentiel provient de la capacité des peptides d'être à la fois très sélectifs vis-à-vis de leur cible et d'agir à une concentration relativement faible. Enfin, ils sont facilement et rapidement assimilés par l'organisme et dégradés en acides aminés, d'où un risque de toxicité moindre. Cette dernière caractéristique peut aussi être un point faible en termes de durée d'action. D'autres limitations peuvent expliquer l'exploitation encore limitée de ces médicaments potentiels. Tout d'abord, leur coût de production reste relativement élevé par rapport aux médicaments traditionnels. De plus, leur faible stabilité au sein de l'organisme impose une formulation et un mode d'administration contraignant pour le patient. Malgré tout, leurs atouts et leur caractère innovant en font des molécules d'intérêt pour les laboratoires et les entreprises pharmaceutiques.

A. Marché des peptides thérapeutiques

Les peptides à usage médical constituent un marché en pleine expansion. La mise en place de ce marché a commencé il y a maintenant un siècle avec les découvertes et commercialisations de quelques molécules peptidiques ayant des bénéfices sur la santé humaine. La concurrence des petites molécules, plus facile à produire et à administrer, a initialement été un frein notable au développement des peptides thérapeutiques. Son essor a été jalonné par la mise au point de différentes technologies, permettant une caractérisation plus aisée de ce type de molécules, les rendant plus accessibles synthétiquement et diminuant donc leurs coûts au fil du temps. Ces nouvelles technologies ont alors participé à une synergie où les peptides apportaient un mode d'action innovant là où les médicaments classiquement utilisés peinaient à se renouveler.

1. Essor des peptides thérapeutiques

L'utilisation de peptides à des fins thérapeutiques a débuté dès les années 1920 avec l'isolation et la caractérisation pharmacologique de l'insuline par Banting et Macleod.² La constatation de son efficacité pour traiter les patients atteints de diabète a été rapidement suivie de sa commercialisation. Cette découverte a marqué le début de l'ère des peptides en mettant en avant leur pouvoir thérapeutique, et constituait de ce fait une révolution dans le domaine médical. L'insuline commerciale sera ainsi produite à partir d'extraits de pancréas de porc ou de bœuf pendant plus de 80 années. Ce type d'isolation de peptides à partir d'organes a inspiré plusieurs autres études, menant par exemple à l'exploitation de l'hormone adrénocorticotrope, ou ACTH (*adrenocorticotrophic hormone*). Ce peptide de 39 acides

aminés, extrait pour la première fois par Collip *et coll.* à partir d'hypophyses de porc et de bœuf,³ permet de traiter certaines pathologies dues à des désordres endocriniens.

Par la suite, trois découvertes majeures dans les années 1950 et 1960 ont grandement participé à l'essor des peptides thérapeutiques. La première est la mise au point en 1950 d'une technique de séquençage des peptides par Edman, qui donnera son nom à cette méthode.⁴ Ce type de séquençage sera ensuite automatisé en 1967, devenant ainsi l'outil de référence pour déterminer la séquence d'acides aminés des peptides. La seconde découverte est la première description en 1953 de la synthèse de peptides en solution (SPS) par Du Vigneaud.⁵ La SPS fut alors utilisée pour la commercialisation de plusieurs peptides thérapeutiques synthétiques tels que l'ocytocine et la calcitonine. Dix ans plus tard, une troisième grande avancée réalisée par Merrifield est la mise au point de la désormais bien connue synthèse de peptide en phase solide (SPPS, décrite dans la partie III.A.1).⁶ Sa simplicité, sa rapidité et son automatisation deux ans après sa mise au point⁷ en font rapidement une méthode de choix par rapport à la SPS pour le domaine de la recherche. Pour le domaine industriel en revanche, l'utilisation de large excès de réactifs à chaque étape rend le processus relativement coûteux comparé à la SPS, et il faudra attendre plusieurs décennies avant de voir cette méthode de synthèse utilisée par les entreprises pharmaceutiques.

Deux des pionnières en la matière sont les entreprises Trimeris et Roche avec le développement de la synthèse du peptide anti-VIH enfurvitide (ou peptide T-20) à la fin des années 1990.⁸ La production à grande échelle de ce peptide repose en effet sur la synthèse par SPPS de trois fragments peptidiques qui sont ensuite condensés en solution.⁹ L'utilisation de la SPPS pour la production de l'enfurvitide à l'échelle de la centaine de kilogrammes a d'ailleurs largement participé à la diminution des coûts des matières premières, que ce soit les acides aminés protégés, les réactifs de couplage ou les supports solides. Cela a ainsi ouvert la porte à la production industrielle par SPPS de nouveaux peptides thérapeutiques, tels que le ziconotide, l'exenatide ou le degarelix.¹⁰ En parallèle de ces découvertes majeures, la mise au point de nouvelles technologies et leur application aux peptides ont également participé à la croissance du domaine des peptides. Parmi elles, on peut citer l'analyse et la purification par chromatographie en phase liquide à haute performance (*high performance liquide chromatography*, HPLC) développée dans les années 1970, les différentes techniques de spectrométrie de masse (*mass spectrometry*, MS) adaptées aux peptides, ou la production de peptides par des organismes génétiquement modifiés.

Plus récemment, les difficultés rencontrées avec les petites molécules organiques classiquement utilisées ont poussé les entreprises pharmaceutiques à se tourner vers l'utilisation médicale des peptides. En effet, le durcissement des critères d'autorisation de mise sur le marché, en particulier en ce qui concerne la toxicologie, l'efficacité et le caractère innovant, a provoqué une augmentation significative du coût de R&D et du nombre de médicaments non-peptidiques abandonnés en phase clinique ou pré-clinique.¹¹ Avec le développement de méthodes palliant leurs points faibles (décrites dans la partie I.B.2), les peptides se sont ainsi imposés comme une alternative innovante aux petites molécules.

2. Marché actuel

En 2017, le marché des peptides thérapeutiques compte un total de 60 molécules approuvées et vendues aux Etats-Unis, en Europe et au Japon.¹² Le chiffre d'affaires total des ventes est estimé à environ 50 milliards de dollars pour l'année 2015, soit 5% des ventes globales de produits pharmaceutiques.¹³ Parmi ces ventes, les peptides dérivés de l'insuline comptent pour plus de la moitié, avec des ventes s'élevant à environ 28 milliards de dollars. Concernant les peptides non dérivés de l'insuline, quatre ou cinq peptides représentent plus de la moitié des ventes de cette catégorie, avec en tête le glatiramère, utilisé pour traiter la sclérose en plaque, et l'antidiabétique liraglutide, qui représentent respectivement 4 et 2,4 milliards de dollars de ventes (Figure 1).

Classement des peptides non dérivés de l'insuline par chiffre d'affaires

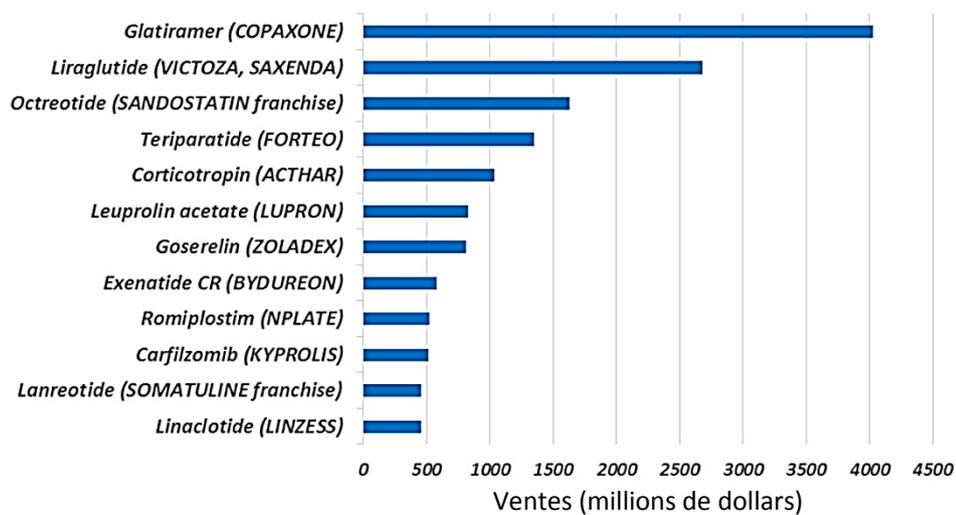


Figure 1 : classement des peptides non dérivés de l'insuline¹³

En 2017, 155 peptides étaient en développement clinique, dont quasiment deux tiers en phases II et III. On comptait également plus de 200 peptides en développement préclinique.¹³ Bien que ces peptides couvrent une vingtaine de domaines thérapeutiques différents, une majorité est destinée aux domaines des maladies métaboliques et de l'oncologie, avec plus de 70 peptides en phases cliniques ou déjà sur le marché. Les domaines de l'allergologie et de l'immunologie, de la gastroentérologie, des maladies cardiovasculaires ainsi que les peptides antimicrobiens et antiviraux sont également majoritairement représentés, avec plus de 60 peptides en développement ou approuvés pour ces quatre secteurs confondus.

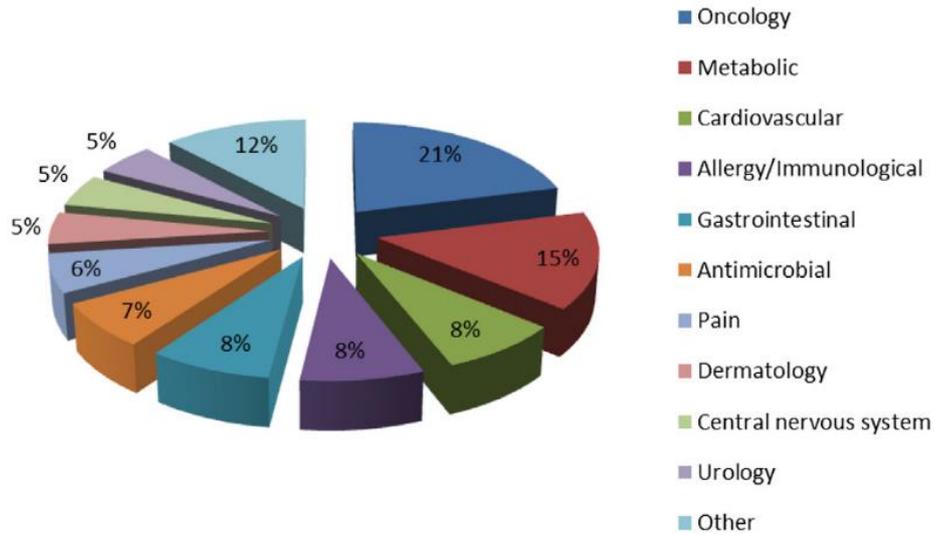


Figure 2 : distribution des peptides thérapeutiques par domaine d'application médicale¹⁴

Parmi la soixantaine de peptides disponibles commercialement, quasiment la moitié ont été approuvés depuis l'année 2000. Cela témoigne d'une croissance certaine du marché des peptides thérapeutiques, qui devrait se maintenir au vu du nombre de molécules actuellement en phase clinique avancée. En effet, les taux de succès des principes actifs peptidiques sont meilleurs que leurs homologues chimiques, toutes phases confondues, comme le montre la Figure 3. Cela assure ainsi un renouvellement constant des peptides à usages thérapeutiques pour les années à venir, et laisse donc présager une croissance de ce marché.

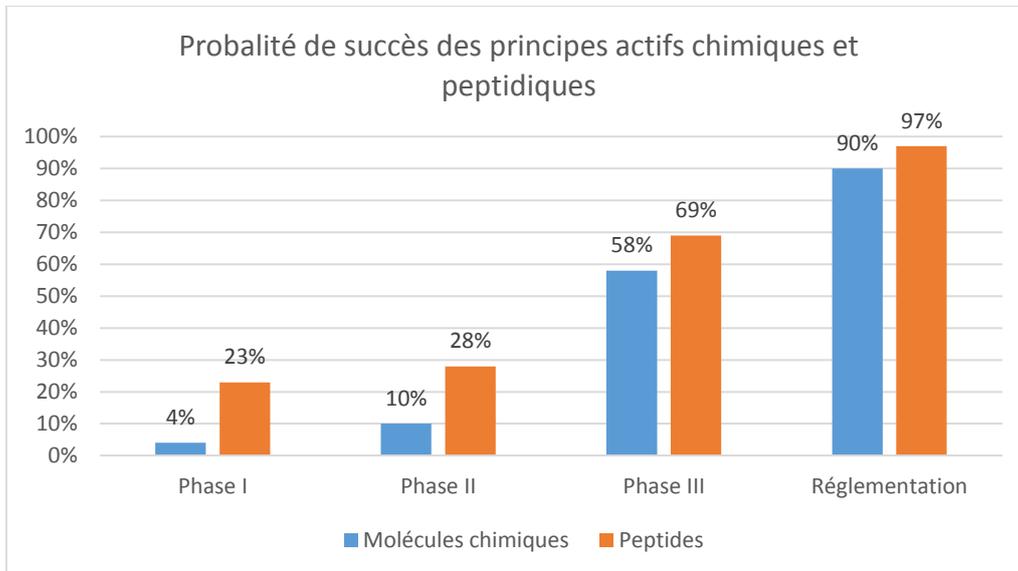


Figure 3 : Probabilité d'approbation des principes actifs chimiques et peptidiques en fonction de leur phase de développement clinique. « Molécules chimiques » fait référence aux principes actifs chimiques autres que les peptides et protéines. « Réglementation » fait référence à la phase d'autorisation de mise sur le marché (un à trois ans). Données issues de la référence 12

Le caractère thérapeutique de l'ensemble de ces peptides repose sur diverses activités biologiques. Ces molécules tirent leur pouvoir d'interactions ciblées avec un ou plusieurs récepteurs au sein de l'organisme. Ainsi, la grande diversité de peptides naturels ou synthétiques permet de répondre à la multitude de récepteurs existants. La compréhension du mode de fonctionnement de ces récepteurs est alors essentielle au développement de ces médicaments peptidiques.

B. Activités biologiques des peptides

Chez l'Homme, de nombreuses études sont menées encore aujourd'hui pour comprendre davantage l'implication des peptides dans notre physiologie, et en particulier leurs rôles dans nos processus vitaux. En effet, les peptides remplissent plusieurs tâches dans un organisme : certains jouent le rôle de « messagers » et délivrent des informations biochimiques pour activer, inhiber ou stimuler une action biologique : ce sont les hormones peptidiques telles que les peptides neurotransmetteurs, également appelés neuropeptides. Les peptides antimicrobiens ont quant à eux un effet direct sur une cible définie, ici les organismes microbiens. D'autres encore sont utilisés comme outil de prédation par différentes familles d'animaux : ce sont les toxines peptidiques. Puisqu'un nombre important de pathologies chez l'Homme est lié à des déficiences relatives à ces macromolécules, il est important de comprendre comment celles-ci interagissent dans l'organisme et avec quelles cibles.

1. Les familles de peptides et leurs cibles

L'activité curative des peptides thérapeutiques dépend de leurs interactions avec un récepteur donné, nommés interactions peptide-protéine (qui seront décrites ci-dessous). Comme on peut le voir sur la Figure 4, le développement de tels peptides s'est concentré ces dernières décennies sur ceux visant quelques familles de récepteurs bien connues.¹² Bien que les récepteurs couplés aux protéines G (*G protein-coupled receptors*, GPCRs) prédominent, de nouvelles classes de peptides thérapeutiques sont récemment apparues, telles que les peptides ciblant les canaux ioniques et les peptides antimicrobiens.

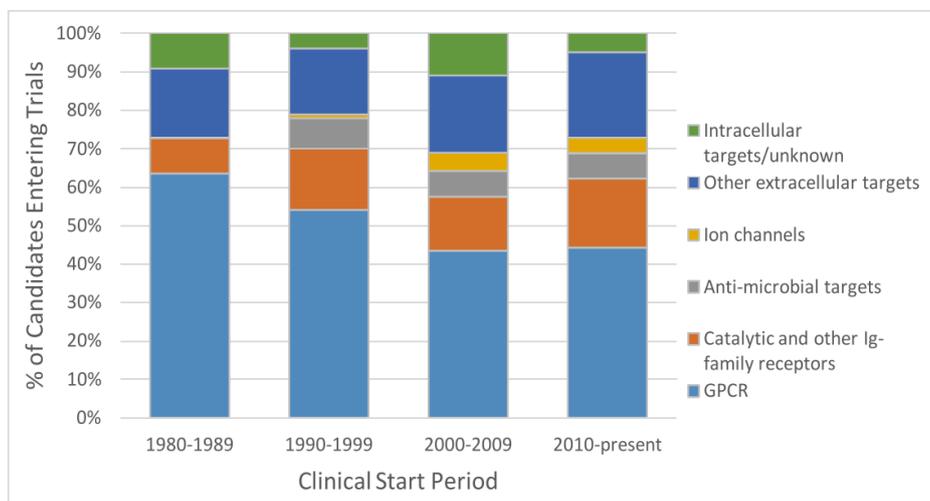


Figure 4 : cibles des peptides thérapeutiques entrant en phase clinique durant les dernières décennies¹²

La classe majoritairement ciblée par les médicaments peptidiques correspond aux récepteurs d'hormones ou de neurotransmetteurs peptidiques, et en particulier les GPCRs. Ceux-ci étaient en effet la cible de plus de 40 % des peptides thérapeutiques entrés en phase clinique entre 2010 et 2017.¹² Le nombre de GPCRs exprimé par le génome humain est estimé à environ 800 protéines,¹⁵ parmi lesquelles on retrouve les GPCRs régulés par des ligands endogènes, les endoGPCRs. Ces derniers sont la cible principale des peptides thérapeutiques, que l'on considère alors comme des peptides hormonaux.

Le premier peptide hormonal utilisé de manière thérapeutique pour cibler un GPCR est l'ocytocine, synthétisé par Du Vigneaud en 1954.¹⁶ Ce peptide de 9 acides aminés contenant un pont disulfure est encore aujourd'hui utilisé pour accélérer le travail lors de l'accouchement en ciblant les endoGPCRs présents à la surface des cellules de la paroi utérine. On trouve également la famille des homologues de la sécrétine, dont les membres ciblent tous les GPCRs de classe B. Le peptide de cette famille le plus connu et utilisé à des fins thérapeutiques est le glucagon. Cette hormone peptidique de 29 acides aminés agit en tant qu'agoniste sur les récepteurs de glucagon principalement présents dans le foie et les reins. Son effet hyperglycémiant, décrit dès 1923 par Kimball et Murlin¹⁷ et confirmé trente ans plus tard,¹⁸ est utilisé cliniquement depuis 1962. Une autre classe de peptides ciblant ces GPCRs correspond à la famille de l'amyline. Parmi les peptides constituant cette famille, la calcitonine, une hormone peptidique de 32 acides aminés, est utilisée pour le traitement de l'ostéoporose et de l'hypercalcémie grâce à son action hypocalcémiante.¹⁹

Les GPCRs sont des protéines transmembranaires se caractérisant par une structure commune, cristallisée pour la première fois à partir de la rhodopsine par les groupes de Stenkamp et Miyano.²⁰ Elle se compose de sept hélices traversant chacune la membrane cellulaire, reliées par six boucles (trois extracellulaires et trois intracellulaires, Figure 5). Grâce à leur structure transmembranaire, les GPCRs jouent un rôle de messenger en transformant un stimulus extérieur à la cellule en signal dans le cytoplasme : c'est la transduction de signal.²¹ Ainsi, lorsque le GPCR est activé par un ligand extérieur, une modification de conformation des hélices transmembranaires lui permet de complexer et d'activer une protéine hétérotrimérique de la famille des protéines G, d'où le nom du récepteur. Les sous-unités de la protéine G vont alors se dissocier et entraîner de nouvelles signalisations au sein de la cellule. Le GPCR, ainsi libéré, pourra de nouveau transmettre un signal. Ce mécanisme est décrit sous le nom de cascade de signalisation.

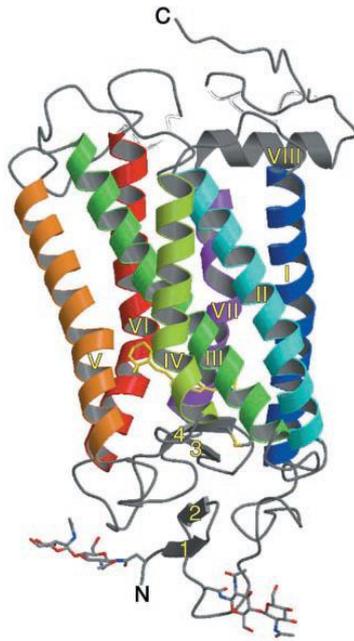


Figure 5 : Représentation schématique de la rhodopsine²⁰

Plus récemment, les canaux ioniques sont devenus une cible d'intérêt pour une exploitation thérapeutique. Ces récepteurs protéiques transmembranaires, présents à la surface de certaines cellules dites excitables, permettent d'émettre des signaux électriques.²² De par cette propriété, ces cellules sont à la base des phénomènes physiologiques cruciaux impliquant le système nerveux allant de la contraction des muscles jusqu'aux tâches cognitives telles que la mémorisation. Le rôle des canaux ioniques est de former un pore entre les milieux intra et extracellulaire afin de permettre la circulation des ions. Il existe des centaines de ces protéines, qui peuvent être classifiées selon plusieurs critères, dont le type de déclencheur permettant l'ouverture ou la fermeture du canal et la nature des ions les traversant. En fonction du type de déclencheur, on distingue principalement deux classes de canaux ioniques.

- Les canaux ioniques voltage-dépendants²³ : l'ouverture et la fermeture de ces canaux sont déclenchées par le potentiel électrochimique de la membrane, induit par les différences de concentrations en ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Afin de détecter ce potentiel, les canaux ioniques voltage-dépendants sont dotés d'un « capteur de tension » sous la forme d'une hélice transmembranaire contenant plusieurs résidus basiques. De par leur nature ionique, ces résidus induisent un mouvement lors d'un changement de polarisation de la membrane se répercutant sur le reste de la protéine, permettant ainsi l'ouverture et la fermeture du pore, également constitué d'hélices transmembranaires. Ces canaux sont très sélectifs des ions qu'ils laissent circuler. On distingue ainsi les canaux voltage-dépendants sodiques (Na_v), potassiques (K_v), calciques (Ca_v) et chloriques (Cl_v) sélectifs des ions sodium, potassium, calcium et chlorure, respectivement. Cette sélectivité provient de deux caractéristiques principales du pore : sa structure tridimensionnelle et les résidus la constituant.²⁴

- Les canaux ioniques ligand-dépendants :²⁵ le changement de conformation du canal permettant la circulation des ions est régi par la complexation d'un neurotransmetteur sur un domaine extra- ou intracellulaire. Dans le cas d'un récepteur externe, les canaux cationiques présentent principalement des récepteurs d'acétylcholine ou de glutamate, tandis que les canaux anioniques sont majoritairement régulés par l'acide γ -aminobutyrique et la glycine. Ces récepteurs, nommés d'après leur agoniste naturel, peuvent cependant être régulés par un grand nombre de ligands différents, agonistes ou antagonistes, en faisant des cibles intéressantes d'un point de vue thérapeutique. De plus, il est intéressant de noter que les canaux cationiques ligand-dépendants sont bien moins sélectifs vis-à-vis des ions qu'ils laissent circuler par rapport à leurs homologues voltage-dépendants. Selon leur structure, on distingue deux sous-familles : les récepteurs à boucle cystéine (ou *cys-loop*), structure pentamérique transmembranaire contenant une boucle formée par un pont disulfure, et les récepteurs de type glutamate, caractérisés par une structure transmembranaire tetramérique, comme représentées schématiquement Figure 6.

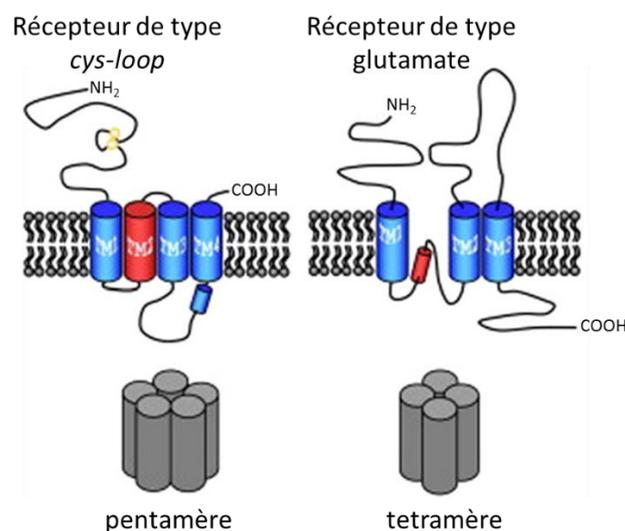


Figure 6 : représentation schématique des récepteurs de type *cys-loop* et glutamate. Les représentations du haut correspondent à une unique sous-unité, et celles du bas à l'assemblage multimérique de ces sous-unités. Adaptée de la référence 25

Au vu du rôle majeur que jouent les canaux ioniques dans tous les phénomènes liés au système nerveux, un dysfonctionnement d'un de ces canaux, dû à une mutation génétique par exemple, peut entraîner de graves pathologies. Bien que la majorité des thérapies agissant sur les canaux ioniques repose sur l'utilisation de petites molécules, il existe quelques exemples de peptides thérapeutiques modulant leur activité. Ainsi le ziconotide, ou Prialt d'après son nom commercial (Elan Pharmaceuticals Inc.),²⁶ a été approuvé par la *food and drug administration* (FDA) en 2004 pour le traitement des douleurs chroniques sévères. Celui-ci agit en tant qu'antagoniste des canaux calciques voltage-dépendants de type N, responsables de la propagation et de la transmission de la douleur, en les bloquant de manière hautement sélective. Le dalazatide constitue un autre exemple de peptide ciblant un canal ionique.²⁷ Ce composé, initialement isolé du venin d'anémone de mer *Stichodactyla*

helianthus,²⁸ est actuellement en phase clinique pour le traitement du psoriasis, maladie auto-immune entraînant l'apparition de plaques sur la peau. Ces plaques sont provoquées par une prolifération de cellules surexprimant les canaux Kv1.3. En agissant en tant qu'antagoniste, le dalazatide bloque sélectivement ces canaux et permet de supprimer efficacement cette prolifération. Les résultats des essais cliniques sont prometteurs, avec notamment peu d'effets indésirables liés au traitement.²⁷

Une autre famille de peptides a récemment attiré l'attention des laboratoires et entreprises pharmaceutiques : les peptides antimicrobiens (*antimicrobial peptides*, AMPs). Ces peptides se retrouvent naturellement dans la majorité des organismes vivants et font partie de leur réponse immunitaire naturelle face aux différents micro-organismes pathogènes (bactéries, champignons microscopiques et virus). Les premiers AMP naturels, les gramicidines, ont été extraits par Dubos en 1939 à partir d'un bacille.²⁹ Les gramicidines sont ainsi les premiers AMPs à avoir été produits et utilisés à des fins thérapeutiques, notamment durant la seconde guerre mondiale.³⁰ De nos jours, plus de 2000 AMPs ont été isolés d'une multitude d'organismes vivants et décrits dans la littérature.³¹ Avec l'arrivée de souches microbiennes ayant développé des résistances aux antibiotiques classiquement utilisés, les AMPs constituent une alternative particulièrement intéressante pour les entreprises pharmaceutiques. Ainsi, plus d'une dizaine de médicaments antibiotiques sont aujourd'hui basés sur l'activité antimicrobienne des AMPs.³² Parmi eux, un glycopeptide appelé Vancomycine était vendu dès 1954 pour le traitement de diverses infections bactériennes. Plusieurs AMPs homologues à ce dernier ont ensuite été approuvés par la FDA dans les années 2000 et 2010, dont la Dalbavancine, l'Oritavancine et la Telavancine. La majorité des AMPs présente plusieurs caractéristiques communes³³ : ils sont constitués de moins d'une cinquantaine d'acides aminés, dont plusieurs résidus basiques leur conférant une charge nette positive et une importante proportion d'acide aminés hydrophobes. Ils sont généralement classifiés selon leurs structures secondaires, avec la majorité des AMPs rangés dans la classe des peptides α -hélicoïdaux ou ceux présentant un feuillet β .

Si l'on considère leur mécanisme d'action, la famille des AMPs constitue une classe particulière de peptides thérapeutiques. En effet, alors que toutes les familles de peptides citées précédemment agissent sur des récepteurs protéiques spécifiques, l'action antibiotique de la majorité des AMPs repose sur leur capacité à interagir directement avec les membranes cellulaires. Cette capacité provient du fait que les membranes des bactéries présentent de multiples charges négatives à leur surface, permettant ainsi une forte interaction ionique avec les AMPs, chargés positivement.³³ Cette caractéristique est d'ailleurs en partie responsable de la sélectivité chez l'Homme des AMPs envers les bactéries, puisque les cellules de mammifères, contrairement aux cellules bactériennes, présentent une charge nette globalement neutre au niveau de leur membrane. Une fois en interaction avec les membranes des bactéries, le caractère amphiphile des AMPs leur permet de s'insérer dans la membrane, voire de former un canal, aboutissant à la mort cellulaire. De nombreux mécanismes sont décrits dans la littérature.³³

Il existe de nombreuses autres cibles thérapeutiques pour les peptides, aussi bien exprimées à la surface des cellules (récepteurs cytokine par exemple) qu'extracellulaires

(protéines structurales, enzymes secrétées, par exemple), dont l'activité peut être modulée grâce à l'utilisation de peptides endogènes ou exogènes, agonistes ou antagonistes.

L'action d'un peptide thérapeutique sur un récepteur dépend de leur capacité à interagir. Les interactions peptide-récepteur sont présentes naturellement dans tous les organismes vivants et représentent 15 à 40 % de toutes les interactions protéine-protéine (IPPs) naturelles connues chez l'Homme.^{34,35} De manière générale, une IPP peut être définie comme le contact physique spécifique et réversible, au sein d'un organisme vivant, de deux ou plusieurs protéines afin de mener à bien une action biologique particulière.³⁶ Dans le cas des interactions peptide-protéine, cela implique qu'une protéine réceptrice formera une surface d'interaction donnée, tandis que le peptide la ciblant devra adopter une structure aussi complémentaire que possible du récepteur. La notion de réversibilité implique que ces interactions sont considérées comme un équilibre : $L + P \rightleftharpoons LP$ avec L le ligand, P la protéine et LP le complexe ligand-protéine. Cette équilibre repose sur la combinaison de différents types d'interactions non-covalentes à l'interface protéine-protéine : des interactions hydrophobes, notamment entre résidus aromatiques, des ponts salins entre résidus de charges opposées, mais également des liaisons hydrogène.³⁷ La nature de ces interactions peut être déterminée grâce à diverses techniques expérimentales telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la cristallographie.³⁸ L'interaction du glucagon avec son GPCR a par exemple été résolue de cette manière au début des années 2010,^{39,40} (Figure 7).

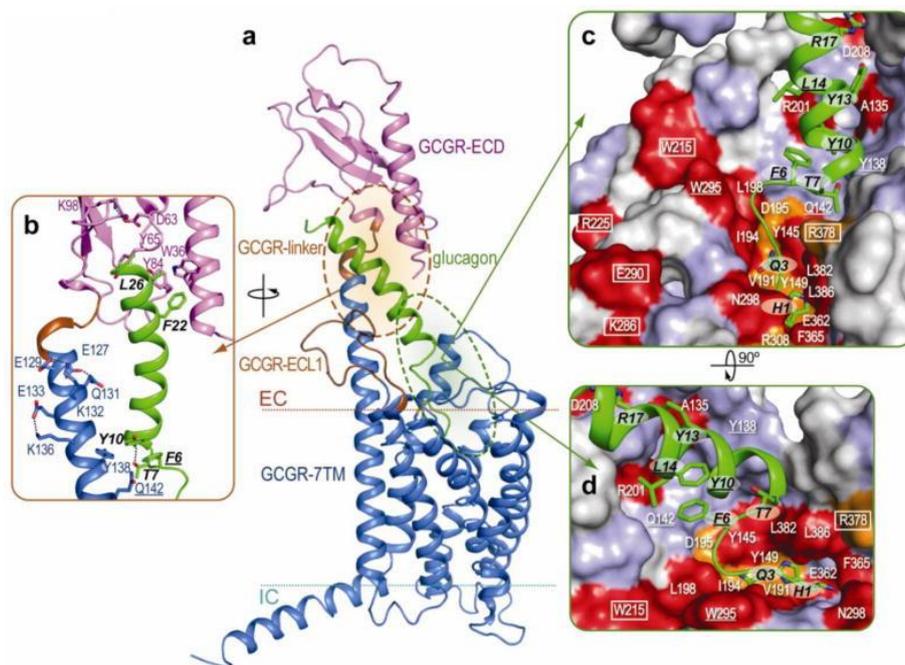


Figure 7 : modélisation du GPCR du glucagon (GCGR) lié au glucagon.³⁹ a. et b. le domaine extracellulaire (ECD) est représenté en magenta, le domaine transmembranaire en bleu et le glucagon en vert. c. et d. détails des interactions entre le glucagon (en vert) et son récepteur. Les résidus du glucagon participant activement aux interactions sont signalés en noir. Les résidus du domaine extracellulaire du récepteur ayant une forte importance pour l'interaction sont signalés en rouge, ceux ayant une importance moyenne en orange, et ceux ayant une importance mineure en bleu clair.

Dans le cadre d'un développement thérapeutique, l'étude de telles interactions a deux buts principaux : l'identification de nouveaux composés d'intérêt pour une cible dite orpheline, c'est-à-dire dont le ou les agonistes naturels ne sont pas encore connus, ou l'analyse détaillée d'IPPs déjà identifiées afin d'affiner la structure d'agonistes ou d'antagonistes synthétiques afin que ceux-ci se lient préférentiellement à la cible.⁴¹ Ainsi, ces études permettent l'identification de nouveaux peptides d'intérêts ayant une forte affinité et sélectivité pour le récepteur ciblé. L'affinité correspond à la force de l'interaction. Elle est quantifiée par la constante de dissociation K_d égale à la concentration en ligand à laquelle la moitié des récepteurs protéiques sont sous forme de complexe avec le ligand à l'équilibre.⁴² Ainsi, plus la valeur de K_d sera faible, plus le ligand aura une forte affinité avec sa cible. D'un point de vue expérimental, les valeurs mesurées sont appelées dose ou concentration efficace médiane (ED50 ou EC50) dans le cas d'un agoniste, et concentration inhibitrice médiane (IC50) dans le cas d'un antagoniste, et correspondent à la concentration en ligand ajoutée à laquelle 50 % des récepteurs sont activés ou inhibés. La mesure et la comparaison des constantes de plusieurs peptides pour une cible donnée permettent de déterminer le meilleur candidat thérapeutique.

La comparaison des constantes de dissociation d'un ligand pour différentes cibles revient à déterminer sa sélectivité pour le récepteur d'intérêt. Cette sélectivité est d'une importance majeure lors de l'identification de peptides thérapeutiques, puisque la protéine cible sera toujours entourée d'une multitude de cibles différentes. D'un point de vue pharmacologique, la forte sélectivité du composé thérapeutique permettra de minimiser les effets indésirables dus à son interaction avec des protéines non ciblées. Il est important de souligner que la sélectivité est fortement dépendante de la concentration en ligand. En effet, à fortes concentrations, la sélectivité d'un ligand diminuera puisque cette haute concentration déplacera les équilibres vers la formation de complexes non désirés. Les candidats thérapeutiques visant un récepteur donné seront ainsi évalués *in vitro* en fonction de leur affinité et de leur sélectivité, souvent regroupées sous le terme d'efficacité. La sélectivité peut être illustrée avec le ziconotide cité précédemment, qui bloque sélectivement les canaux calciques voltage-dépendants de type N par rapport à ceux de type L.⁴³

De par leur nature, les peptides sont souvent considérés comme de meilleurs principes actifs en termes d'efficacité par rapport à leurs homologues non peptidiques. Cela est notamment dû au fait que les surfaces d'interactions des IPPs sont bien plus larges et planes, et impliquent donc de multiples interactions que les petites molécules ne permettent pas.⁴⁴ Cette caractéristique fait que les peptides agissent généralement à des concentrations très faibles par rapport aux petites molécules.

2. Elaboration d'un médicament peptidique

L'élaboration d'un médicament peptidique doit faire face à un certain nombre d'inconvénients importants inhérents à la nature des peptides. La première difficulté majeure à l'utilisation de peptides en tant que solution thérapeutique est leur faible stabilité métabolique. En effet, ces polymères d'acides aminés sont facilement dégradés par les

enzymes protéolytiques présentes dans l'organisme appelées protéases et peptidases.¹¹ Ces enzymes ont diverses fonctions primaires, allant de la digestion des aliments à la maturation de protéines, qu'elles accomplissent en cassant les liaisons peptidiques amides. Leur présence en grandes quantités, en particulier dans le sang, le foie et les reins, et leur diversité compliquent considérablement l'utilisation des peptides thérapeutiques. Pour répondre à ce problème, deux types d'approches peuvent être employées : l'une, directe, est la modification chimique des peptides et l'autre, indirecte, est l'adaptation du mode d'administration.^{11,45}

La modification chimique des peptides leur permet de ne plus être reconnus par les peptidases et ainsi d'augmenter leur durée de vie dans l'organisme. Une des méthodes consiste à identifier les sites de coupures des peptidases, *via* un Ala-scan par exemple, et à muter les acides aminés concernés par d'autres acides aminés ou par leurs énantiomères, voire à alkyler les azotes formant la liaison amide. Sachant qu'un grand nombre d'enzymes protéolytiques dégrade un peptide à partir de ses extrémités *N*- et *C*-terminales, une attention particulière doit leur être portée.⁴⁶ La nature des acides aminés présents aux extrémités est notamment importante, puisque certains résidus terminaux sont plus sensibles à la dégradation enzymatique que d'autres. Leur mutation peut donc présenter un intérêt, ou à défaut de mutations, l'acétylation de l'extrémité *N*-terminale ou l'amidation de l'extrémité *C*-terminale permettent de limiter cette dégradation. Une autre possibilité consiste à favoriser la formation de structures secondaires au sein du peptide. Cela passe la plupart du temps par la cyclisation du peptide, que ce soit par la formation d'une liaison covalente entre les extrémités *N* et *C*-terminales (cyclisation tête-à-queue), entre les chaînes latérales (ponts disulfure entre deux cystéines ou lactame entre une lysine et un acide glutamique ou aspartique),⁴⁷ ou encore en introduisant un bras bifonctionnel non naturel. Au vu de l'efficacité de ces modifications, certaines entreprises pharmaceutiques, telle que Bicycle Therapeutics, se sont spécialisées dans le développement de telles molécules. L'illustration de l'efficacité de ces modifications peut être directement trouvée dans la nature avec l'exemple de la cyclosporine A (Figure 8).⁴⁸ Ce peptide de onze résidus est utilisé depuis les années 1980 en tant qu'immunosuppresseur pour éviter le rejet de greffe. Issu d'un champignon microscopique, il présente une cyclisation tête-à-queue, un acide aminé dextrogyre et plusieurs méthylations sur les amines formant le squelette, permettant ainsi une administration orale. Plus récemment, la tésamoréline a été approuvée en 2010 en tant qu'hormone de libération de l'hormone de croissance, sous le nom commercial Egrifta, pour le traitement de la lipodystrophie associée au traitement du VIH. Cet analogue synthétique de 44 acides aminés a été modifié avec un acide *trans*-3-hexénoïque à l'extrémité *N*-terminale, augmentant ainsi son temps de demi-vie de quelques minutes à plus d'une heure chez l'homme sain.⁴⁹

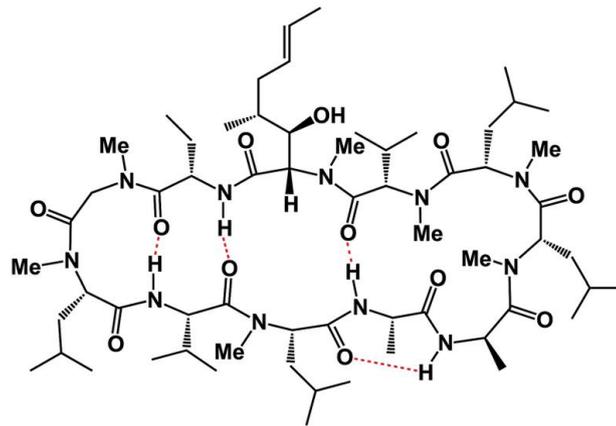


Figure 8 : représentation schématique de la cyclosporine A⁵⁰

L'adaptation du mode d'administration est un autre paramètre que l'on peut adapter pour augmenter la biodisponibilité d'une macromolécule peptidique. Deux modes d'administration sont classiquement employés : la voie orale et l'injection. Lorsqu'un médicament est administré oralement, celui-ci passe successivement dans l'estomac, l'intestin, le foie, le sang, les reins et finalement les tissus.⁵¹ Ainsi, en plus d'être exposé à une forte concentration en peptidases dans le foie et les reins, un peptide administré de la sorte sera exposé au pH acide de l'estomac pouvant provoquer sa dégradation, et devra franchir les muqueuses intestinales avant de pouvoir atteindre sa cible, bien que ses caractéristiques physicochimiques n'y soient pas favorables. Pour ces raisons, l'injection en intraveineuse reste depuis longtemps le mode d'administration principale des peptides thérapeutiques. Bien que relativement efficace, cette méthode reste néanmoins contraignante pour le patient, et de nombreux efforts ont été fait pour trouver des alternatives. Parmi elles, l'exemple le plus innovant est certainement le développement d'un implant sous-cutané connu sous le nom de DUROS®, capable de délivrer un principe actif en continu pendant plusieurs mois.⁵² Cette technologie est utilisée avec succès depuis 2000 avec la commercialisation du Viadur®, implant délivrant du leuprotide acétate, peptide de neuf acides aminés utilisé pour le traitement palliatif du cancer de la prostate avancé. Plus récemment, Intarcia Therapeutics a utilisé cet implant pour l'administration sous-cutanée de l'exénatide, peptide à l'action hypoglycémiant, afin de réguler la glycémie des patients atteints de diabète de type 2.⁵³ Ce dispositif, appelé ITCA 650, est en cours d'approbation par la FDA.

L'inconvénient de la dégradation rapide des peptides par les peptidases constitue également une des forces des peptides thérapeutiques. En effet, leurs temps de demi-vie relativement faible fait qu'ils ne s'accumulent pas dans les tissus.¹¹ De plus, les produits de dégradation des peptides étant des acides aminés, ceux-ci présentent un risque de toxicité moindre que les produits de dégradation des petites molécules organiques.

Les avantages et les inconvénients des médicaments peptidiques sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 1). Les avantages certains de ces macromolécules combinés à une dynamique où de nombreux efforts ont été faits pour pallier les inconvénients cités ici, ont largement participé à l'essor du marché des peptides thérapeutiques durant les dernières

décennies. Les peptides approuvés ou en cours de développement clinique proviennent globalement de trois stratégies d'identification : une stratégie dite de « force brute » correspondant au *screening* de bibliothèques de peptides, une stratégie calculatoire identifiant *in silico* les fragments de protéines responsables des IPPs, et une stratégie d'identification et de caractérisation de peptides naturels aux divers pouvoirs thérapeutiques.⁵⁴ Cette dernière stratégie se révèle particulièrement intéressante pour une approche industrielle puisqu'elle ne nécessite pas la construction, souvent longue et complexe, de bibliothèques de composés. Parmi toutes les molécules peptidiques naturelles, une famille de composés se distingue des autres par son accessibilité, sa diversité et ses activités biologiques : ce sont les toxines issues de venins.

Avantages	Inconvénients
Sélectivité	Chimiquement instable <i>in vivo</i>
Efficacité	Faible biodisponibilité
Tolérance, faible toxicité	Modes d'administration contraignants
Métabolisation prévisible	Coût de production
Innovant	
Temps de demi-vie court, élimination rapide = durée d'action faible, mais pas d'accumulation	

Tableau 1 : avantages et inconvénients des peptides thérapeutiques

II. Les toxines : des candidats au potentiel thérapeutique important

La puissance des venins est reconnue par l'Homme depuis plusieurs millénaires. On retrouve ainsi des traces de l'utilisation de venins dans un but thérapeutique dès l'antiquité avec le médecin grec Galien, qui utilisait les piqûres d'abeilles comme traitement contre les rhumatismes. En 67 avant J.-C. certains médecins utilisaient des venins de vipères comme coagulants pour traiter les hémorragies par application sur la plaie.⁵⁵ La médecine traditionnelle chinoise utilise également des sécrétions de peaux de crapauds depuis plus de 1000 ans en tant qu'agent diurétique, anesthésiant et anti-cancéreux.⁵⁶ Bien que les exemples d'utilisations de venins ou d'extraits de venins ne manquent pas dans les médecines traditionnelles, il faut attendre les années 1940 avant que la médecine moderne mette en place une approche plus rigoureuse de l'utilisation des venins en isolant les composés d'intérêt.⁵⁷ En effet, les venins résultent de milliers d'années d'évolution qui ont permis aux espèces venimeuses de se doter de mélanges complexes de dizaines voire de centaines de peptides appelés toxines. Alors que ces cocktails de composés sont généralement néfastes voire mortels pour l'Homme, chaque toxine prise séparément peut s'avérer être un puissant principe actif. L'isolation et la caractérisation de ces toxines représentaient alors un véritable défi qui a pu être relevé notamment grâce à l'émergence de nouvelles technologies d'isolation et d'identification, dont certaines ont été décrites précédemment.⁵⁸ Ainsi, des centaines de toxines sont aujourd'hui caractérisées structuralement et pharmacologiquement. Malgré tout, celles-ci représentent une infime partie du nombre total de toxines estimé. Les venins constituent donc une immense source très peu exploitée de biomolécules aux potentiels thérapeutiques diversifiés.

A. Organismes d'origine et identification des toxines d'intérêt

Les animaux ayant développé un système biologique de production de venins sont nombreux et variés et sont représentés dans de nombreuses familles : les sangsues, les cnidaires (dont les méduses et les anémones de mer), les échinodermes (dont les étoiles de mer), les mollusques (dont les cônes de mer particulièrement étudiés) et les vertébrés (avec en particulier les serpents, les grenouilles et les lézards, mais également les poissons et les mammifères tels que l'ornithorynque et certaines musaraignes). Mais la famille présentant le plus grand nombre d'espèces venimeuses reste incontestablement celle des arthropodes, avec en tête les scorpions et les araignées.⁵⁹ Parmi les classes d'animaux venimeux les plus représentées, on compte environ 42000 espèces venimeuses d'araignées recensées, 2200 de serpents, plus de 1700 scorpions et environ 700 cônes marins.

Les venins sont un mélange complexe de sels inorganiques, de petites molécules organiques, de peptides et de protéines. Leurs compositions peuvent fortement varier selon l'organisme d'origine du venin. De manière générale, les venins d'invertébrés sont majoritairement composés de peptides, tandis que la majorité des venins de serpents contient une proportion plus importante de protéines.⁶⁰ Le nombre de composés présents dans un venin, de même que leurs fonctions, varient également d'une famille à une autre. Ainsi, les

venins de serpents contiennent généralement entre 25 et 50 protéines, ciblant pour la plupart le système cardiovasculaire ou neuromusculaire. Les venins d'invertébrés sont globalement plus riches, avec plus d'une centaine de peptides par venin de scorpion⁶¹ et jusqu'à 1000 toxines dans les venins de cônes marins⁶² et d'araignées,⁶³ ciblant majoritairement les différentes fonctions du système nerveux.⁵⁹ Compte tenu de ces chiffres et du nombre d'espèces venimeuses recensées, on estime ainsi le nombre minimum de toxines de scorpions à environ 100000, de même que pour les toxines de cônes. Les araignées, de par le nombre d'espèces, surpassent largement scorpions et cônes réunis, avec une estimation minimum de 10 millions de peptides. Ces estimations ne sont basées que sur les espèces venimeuses recensées, ce qui laisse présager en réalité un nombre bien plus important de toxines si l'on considère les espèces qu'il reste à découvrir. Les venins constituent ainsi un gigantesque réservoir de molécules bioactives que les laboratoires et industries pharmaceutiques commencent à peine à exploiter.

Les différentes études de venins (et des organes producteurs, les glandes à venins) par le biais des multiples approches et technologies disponibles sont réunies sous l'appellation *venomics*. Ce terme regroupe ainsi les études de génomes, de transcriptomes, de protéomes/peptidomes ainsi que les études bio-informatiques appliquées aux venins et à leurs glandes.⁶⁴ Chaque venin peut être considéré, au vu de sa composition, comme une petite librairie de peptides. Traditionnellement, l'analyse d'un venin se base donc sur un fractionnement guidé par l'activité biologique, où le venin passe par plusieurs cycles successifs de séparations et de tests biologiques jusqu'à l'isolation du ou des composés d'intérêt.⁶⁵ Les fractionnements successifs sont généralement réalisés par HPLC avec des techniques de séparation dites orthogonales, telles que l'utilisation de phase inverse et de phase échangeuse d'ions.⁵⁸ Les structures des toxines d'intérêt sont alors caractérisées, notamment par séquençage d'Edman, spectrométrie de masse et RMN. Ce procédé, bien qu'efficace, est chronophage, se restreint à l'activité biologique recherchée et demande une quantité de venin importante. Pour ces raisons, de nouvelles approches sont désormais employées, tirant parti des différentes avancées technologiques, notamment en ce qui concerne l'automatisation des outils de détermination structurale et de caractérisation biologique.⁵⁸

Afin de valoriser l'ensemble des composés d'un venin, des études, souvent regroupées sous les termes *proteomics* ou *peptidomics*, se sont intéressées à l'analyse globale des toxines d'un venin. Un premier aperçu de la complexité d'un venin peut être obtenu par l'analyse HPLC de celui-ci, donnant une idée du nombre approximatif de composés mais pas de leur nature. La détermination de la taille et de la structure des composés d'un venin est réalisable à partir des différentes techniques de spectrométrie de masse développées ces dernières décennies. Ces techniques se sont ainsi imposées comme les outils indispensables à la caractérisation d'un venin. La spectrométrie de masse est effectivement bien adaptée pour appréhender la complexité d'un venin puisqu'elle permet, à partir d'un venin brut, de déterminer le nombre de toxines présentes dans celui-ci, mais également leurs poids moléculaires. Dans ce but, deux types d'analyses sont complémentaires : l'ionisation par électrobuliseur (plus communément appelée ESI, *ElectroSpray Ionization*) et le MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*). Alors que le MALDI est réputé pour être plus résolutif dans l'analyse de mélanges complexes, des phénomènes de suppressions de signaux

sont souvent observés, en particulier pour les composés minoritaires.⁶⁶ Bien qu'un fractionnement préalable du venin puisse résoudre ce problème, l'analyse par ESI en phase liquide, pouvant être couplée de par sa nature à un système HPLC, se révèle être une solution adaptée. Une étude comparative de Biass *et coll.* témoigne de la complémentarité de ces techniques, puisque seulement 21% des toxines d'un même venin de cône sont communes aux deux types d'analyses.⁶⁷

Un modèle permettant la représentation de la complexité d'un venin a été proposé dans les années 2000.⁶³ Ce modèle se base sur le fractionnement du venin par HPLC en phase inverse, suivi de l'analyse des fractions obtenues par MALDI. Cela permet le tracé d'un diagramme tridimensionnel représentant l'intensité des masses détectées en fonction du temps de rétention en HPLC et de la masse, tel qu'illustré Figure 9. L'analyse par MALDI des fractions a permis l'identification de certaines toxines présentes dans chaque fraction par comparaison avec des bases de données. Dans le cas des venins d'araignées analysés, le temps de rétention se révèle non seulement corrélé avec l'hydrophobicité des toxines, mais également avec leur structure et donc leur famille. Chaque îlot sur le diagramme tridimensionnel représenterait donc une famille de toxines aux structures et propriétés pharmacologiques similaires. Bien que ce modèle n'ait été validé que sur quelques venins et reste approximatif, il est un bon moyen de représenter de manière concrète un venin. De plus, il peut éventuellement diriger le processus de découverte de composés thérapeutiques, en associant des toxines encore inconnues aux effets pharmacologiques de composés connus de la même famille.

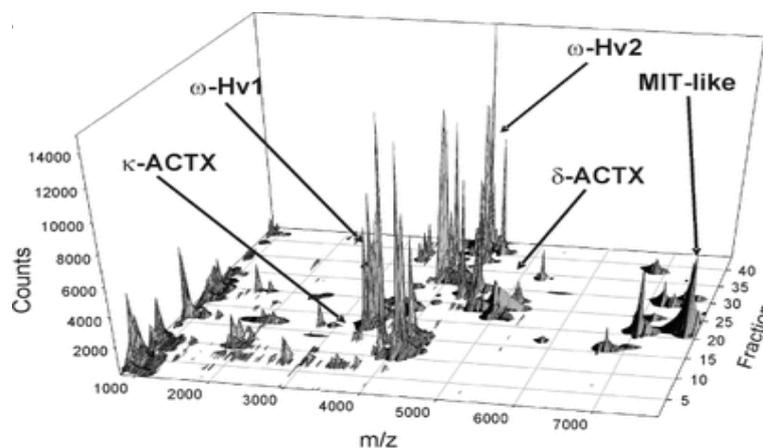


Figure 9 : diagramme tridimensionnel représentant les analyses MS par MALDI de chaque fraction du venin d'araignée *Hadronyche versuta*⁶⁶

De nombreuses autres technologies ont été mises au point ou adaptées pour l'analyse des venins. Le séquençage *de novo* permet par exemple la détermination de la séquence des toxines par MS, en analysant les masses de fragments obtenus soit par digestion enzymatique, soit directement par fragmentation en phase gazeuse lors de l'analyse (MS/MS).⁶⁵ La connaissance des points de fragmentations théoriques permet, par des méthodes calculatoires, d'accéder à une détermination partielle, si ce n'est totale, de la séquence de la toxine. Cette méthode, de par sa sensibilité, nécessite très peu de quantité de matériel et est

donc particulièrement adaptée à la caractérisation de toxines, certaines n'étant présentes qu'à l'état de traces dans les venins. Le domaine de la bio-informatique a également vu naître des outils adaptés à l'étude des venins. Des bases de données propres à chaque famille d'animaux venimeux (ConoServer pour les cônes,⁶⁸ ArachnoServer pour les araignées,⁶⁹ etc...) ont par exemple été créées pour regrouper les différentes informations relatives aux toxines de ces espèces. Ces outils permettent ainsi de retrouver sur un même serveur les séquences des toxines, les gènes dont elles sont issues, mais également les structures tridimensionnelles et leurs fonctions lorsqu'elles ont été déterminées.

Les multiples études menées sur les toxines jusqu'à aujourd'hui ont permis de révéler une large diversité de structures à travers les différents venins analysés. Ces structures, souvent communes au sein d'une même classe d'animaux, sont généralement classées par famille et peuvent être reliées à certaines activités pharmacologiques.

B. Structures chimiques et familles de toxines

La structure d'un peptide est décrite en trois temps : la structure primaire correspond à la séquence peptidique, c'est-à-dire à un enchaînement donné d'acides aminés. Cette chaîne a la capacité, selon les acides aminés présents, de former différents agencements, notamment des hélices α ou des feuillets β , *via* des liaisons hydrogènes, pour donner la structure secondaire du peptide. L'organisation de ces agencements dans l'espace donne la structure tertiaire du peptide, ou plus simplement la structure tridimensionnelle. Cette organisation spatiale est stabilisée par des liens qui peuvent être non covalents, tels que des liaisons ioniques, hydrogène, de Van der Waals, ou covalent sous forme de pont disulfure entre cystéines.

Les toxines, dans leur grande majorité, ont pour point commun d'être fortement structurées, donnant des molécules peptidiques compactes et rigides. En effet, les venins sont destinés à être injectés, et les toxines, pour agir, doivent atteindre leurs cibles sans être dégradées par les différentes protéases et peptidases des organismes. Comme nous l'avons vu précédemment, la structuration et le repliement des peptides est un moyen efficace de lutter contre cette dégradation enzymatique. Cette caractéristique a ainsi été un critère de sélection naturel chez les animaux venimeux durant des milliers d'années, donnant aux toxines cette particularité structurale.⁵⁹

A quelques exceptions près, toutes les toxines possèdent des séquences peptidiques riches en cystéines. Leur caractère structuré leur est ainsi conféré par une modification post-translacionnelle (*post-translational modification*, PTM) oxydant deux cystéines pour former un pont disulfure. La formation de ponts disulfures entre cystéines réparties le long de la chaîne d'acides aminés implique ainsi un repliement de celle-ci, donnant *in fine* une molécule relativement compacte. Il existe une large variété de types de repliements dans les venins, généralement appelés *folds*. Des motifs communs sont malgré tout identifiables, permettant ainsi une classification des toxines selon leur structure.

1. Structure ICK

Parmi les structures connues, l'une des plus décrites est certainement le motif ICK, pour *inhibitor cystine knot*.⁷⁰ Ce type de fold, décrit pour la première fois en 1994, se retrouve majoritairement dans les venins d'araignées,⁷¹ bien qu'il soit également présent dans les venins de scorpions⁷² et de cônes marins.^{70,73} Les deux composants principaux du motif ICK sont un nœud de cystine formé par trois ponts disulfures et un feuillet β (Figure 10). Les deux premiers ponts entre les cystéines C1-C4 et C2-C5 (numérotées par ordre d'apparition dans la séquence, de l'extrémité N-terminale vers C-terminale) forment une boucle avec le squelette peptidique les connectant. Le troisième pont correspondant aux cystéines C3-C6 traverse cette boucle, donnant son nom de nœud au motif ICK. Le feuillet β est constitué d'au moins dix résidus s'arrangeant en deux ou trois brins anti-parallèles. Ce feuillet, totalement intégré dans le nœud, est notamment stabilisé par le pont C2-C5 reliant les brins constituant les extrémités du feuillet. Bien qu'ayant une structure commune, les séquences peptidiques formant ce motif sont très diverses et peu conservées en terme de nature des résidus ou de longueur. Le motif tire son nom d'« inhibiteur » du fait que les premières molécules découvertes comportant ce type de repliement ICK agissent en tant qu'antagonistes de leur récepteur cible.

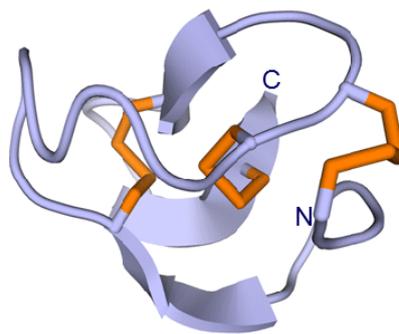


Figure 10 : représentation schématique du motif ICK de l' ω -conotoxin GVIA.⁶⁴ Les ponts disulfures sont représentés en orange.

Ce motif est particulièrement redondant dans les venins des araignées.⁷⁴ La majorité des toxines d'araignées présentant le motif ICK a également la particularité d'avoir un feuillet β ne contenant que deux brins, là où les toxines ICK d'autres classes d'animaux en ont généralement trois. Ces toxines ciblent majoritairement les canaux ioniques des neurones, et plus précisément les canaux Nav, Kv et Cav, mais également certains récepteurs ligand-dépendants. Leur mode d'action est divers : certaines toxines peuvent agir directement sur le pore en le bloquant physiquement, tandis que d'autres vont interagir avec des domaines annexes et modifier la vitesse d'activation ou d'inactivation du récepteur.⁷⁵ La plupart de ces toxines sont spécifiques de sous-familles de ces canaux et modulent leur activité sans modifier le fonctionnement d'autres canaux présents. De plus, ces toxines ont une affinité très forte pour leur récepteur, avec des valeurs d'IC50 généralement de l'ordre du nanomolaire. Un des exemples les plus intéressants est certainement celui de la Protoxin II, décrite pour la première fois en 2002.⁷⁶ Cette toxine de la tarentule *Thrixopelma pruriens* bloque le canal ionique

Nav1.7 humain avec un IC50 de 0,3 nM, faisant ainsi de ce peptide un des modulateurs de ce canal le plus affin.⁷⁷ De plus, la Protoxin II s'avère être cent fois plus sélective pour le Nav1.7 que pour les Nav1.2 à 1.8.

Les toxines de cônes marins, appelées conotoxines, sont également riches en motif ICK. Ces toxines peuvent être classées de différentes manières : selon leur propriété pharmacologique, leur espèce d'origine, la répartition des cystéines le long de la chaîne peptidique, la connectivité des cystéines entre-elles (également appelée *pattern*), et leur structure tridimensionnelle.⁷⁸ On distingue ainsi les familles de *folds* A à L, avec le *fold* de type C correspondant aux conotoxines formant un motif ICK. Les conotoxines ayant ce type de repliement se retrouvent notamment dans les familles pharmacologiques δ (activation ou inactivation des canaux ioniques Nav), κ (blocage des Kv), μ (blocage des Nav), et ω (modulation des Cav).^{78,79} Parmi ces conotoxines, l' ω -conotoxine GVIA a servi de support pour la première description du motif ICK.⁷⁰

2. Structure CS- $\alpha\beta$

Une autre structure bien connue dans les toxines de venins est le motif CS- $\alpha\beta$, pour *cysteine-stabilized* $\alpha\beta$. Cette structure a été identifiée pour la première fois par Cornet *et coll.* en 1995.⁸⁰ Bien qu'initialement décrite à partir de la défensine A d'une larve, cette structure se retrouve largement dans les venins de scorpions, si bien qu'elle est également appelée « scorpion toxin-like family ». ⁸¹ Elle a d'ailleurs été décrite de manière isolée, et sans être nommée, dans plusieurs toxines de scorpions bien avant les travaux de Cornet.^{82,83} Elle consiste en une hélice α et un feuillet β de deux ou trois brins anti-parallèles dont la structure tridimensionnelle est stabilisée par plusieurs ponts disulfures (trois ou quatre dans le cas des toxines de scorpions ; Figure 11). Parmi ces ponts, deux jouent un rôle prépondérant dans l'orientation réciproque des structures secondaires.

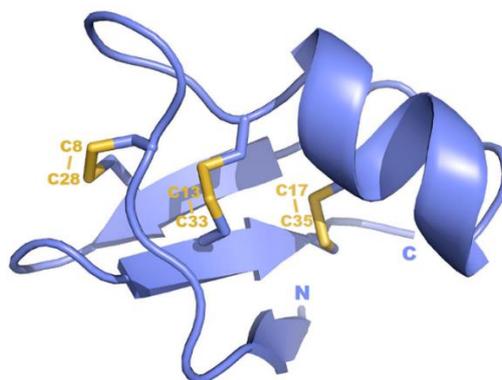


Figure 11 : représentation schématique du motif CS- $\alpha\beta$ de la toxine de scorpion AmmTx3⁸⁴

Les toxines de scorpions peuvent cibler un grand nombre de récepteurs, dont les canaux ioniques potassiques, calciques et sodiques, qu'ils soient voltage- ou ligand-dépendants.⁸⁵ Le motif CS- $\alpha\beta$ est particulièrement bien représenté dans la famille des toxines

de scorpions ciblant les canaux potassiques, aussi appelées KTx. Ainsi, parmi les quatre familles de KTx (α , β , κ , et γ , classées selon les homologies de séquences et les appariements de cystéines), trois sont caractérisées par ce motif, l'exception étant la famille κ . La plus grande famille est la famille α -KTx avec plus de 140 peptides, bloquant les canaux potassiques avec des affinités pouvant descendre à quelques picomolaires. C'est par exemple le cas du peptide α -KTx23.1 qui bloque le canal $K_v1.3$ avec une constante de dissociation d'environ 3 pM, dose à laquelle cette toxine ne serait pas toxique pour l'Homme.⁸⁶ En plus de cette forte affinité, α -KTx23.1 se montre environ 1500 fois plus sélective pour le canal $K_v1.3$ que 10 autres canaux potassiques et calciques testés. Avec ces propriétés, cette toxine pourrait s'avérer être un excellent composé thérapeutique pour le traitement de maladies auto-immunes impliquant la prolifération de cellules surexprimant ce canal, à l'image du dalazatide décrit précédemment.

3. Structure trois-doigts

Une autre structure peptidique est largement présente dans les venins : il s'agit du motif « trois-doigts ». Bien que cette structure soit exprimée dans une grande variété d'organismes vivants, dont l'Homme,⁸⁷ on la retrouve très majoritairement dans les venins de serpents.⁸⁸ Ce motif est présent chez les hydrophiidés (serpents de mer), les colubridés, vipéridés et crotalidés, et est particulièrement prépondérant chez les élapidés (cobras, mambas et bongares), à l'image du serpent corail *Micrurus tschudii* dont 95% des toxines présentent ce motif.⁸⁹ Ces toxines de serpent forment la famille des toxines trois doigts, aussi appelée famille 3FTx ou TFT (*three-finger toxin family*). La première toxine découverte appartenant à cette famille est l' α -Bungarotoxin, isolée en 1963 à partir du venin de *Bungarus multicinctus*,⁹⁰ dont la structure a été déterminée avec précision à partir de données cristallographiques en 1986.⁹¹ Le premier modèle de toxine trois-doigts a cependant été décrit en 1976 à partir des erabutoxines.^{92,93} La famille 3FTx est caractérisée par des peptides de 60 à 74 résidus s'arrangeant en trois boucles (les doigts, numérotés I, II et III du N-terminal vers le C-terminal), formées par des feuillets β , et émergeant d'un petit domaine globulaire compact et hydrophobe.⁹⁴ Ce domaine doit sa compacité à la présence de quatre ponts disulfures hautement conservés, s'arrangeant selon le *pattern* C1-C3, C2-C4, C5-C6 et C7-C8, qui constitue une autre caractéristique des 3FTxs (Figure 12A). Cette famille se divise en trois sous-familles : les 3FTxs à chaînes courtes dont les chaînes peptidiques sont constituées de moins de 66 résidus, les 3FTxs à chaînes longues pour les toxines de plus de 66 acides aminés et possédant un cinquième pont disulfure au sein de la deuxième boucle, et les 3FTxs dites non-conventionnelles possédant un cinquième pont dans la boucle I. Des exemples de structures de chaque sous-famille sont données Figure 12. Comme on peut le voir, la présence d'un cinquième pont à la pointe de la boucle I ou II induit une torsion de celle-ci.

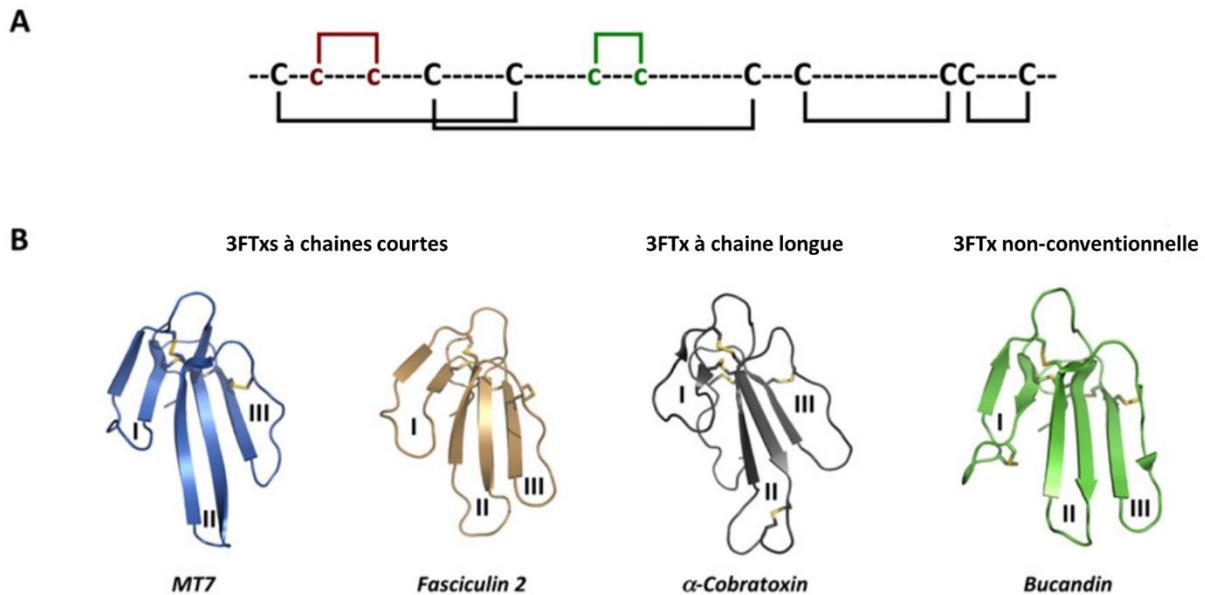


Figure 12 : Les structures trois doigts. A) représentation schématique de la connectivité des cystéines. La présence d'un éventuel cinquième pont est représentée en rouge pour les 3FTxs non-conventionnelles et en vert pour les 3FTxs à chaînes longues. B) Exemples de structures tridimensionnelles des différentes sous-familles de 3FTxs. Les ponts disulfures sont représentés en jaune.⁸⁸

Ces variations dans la structure globale des 3FTxs sont responsables de la grande diversité de récepteurs affectés par ces toxines. La majorité des 3FTxs cible le système cholinergique en agissant sur différents types de récepteurs.⁸⁸ Le fonctionnement de ce système est dépendant d'un neurotransmetteur appelé l'acétylcholine. Celui-ci régule les récepteurs de l'acétylcholine (*acetylcholine receptors*, AChRs), également appelés récepteurs cholinergiques, qui peuvent être des canaux ioniques ou des GPCRs appelés récepteurs de l'acétylcholine nicotiques (nAChRs) et muscariniques (mAChRs), respectivement. Le système cholinergique joue un rôle majeur dans plusieurs fonctions biologiques vitales du système nerveux, telles que la thermorégulation, les processus cognitifs, la contraction des muscles, ou la force et la vitesse de battement du cœur. En dehors du système nerveux, le système cholinergique régule également des fonctions essentielles telles que la prolifération des cellules, leur mobilité, ou leur migration. De par ces fonctions centrales dans l'organisme, un dysfonctionnement du système cholinergique peut engendrer de lourdes pathologies, telles que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, mais également des dysfonctionnements cardiaques ou neuromusculaires.⁸⁸

Les 3FTxs s'avèrent ainsi être des outils pharmacologiques intéressants pour l'étude du système cholinergique. En effet, les 3FTxs sont sélectives de certaines sous-familles d'AChRs. Par exemple, les α -neurotoxines sont des antagonistes sélectifs des nAChRs des muscles,⁹⁵ les κ -neurotoxines modulent spécifiquement les nAChRs neuronaux,⁹⁶ tandis que les toxines muscariniques ciblent les mAChRs.⁹⁷ Au sein de chaque sous-famille, les toxines montrent une sélectivité pour différents sous-types de récepteurs. De nombreuses études ont tiré parti de cette sélectivité pour caractériser ces récepteurs et leur implication dans différents phénomènes physiologiques. Les toxines muscariniques MT1, 2 et 3 du venin de

mamba vert *Dendroaspis angusticeps* ont ainsi permis, de par leur sélectivité, d'identifier les sous-types de mAChRs responsable de la mémorisation.⁹⁸ Ces mêmes toxines ont aussi montré que ces récepteurs étaient deux fois moins présents chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer que chez les sujets sains, montrant ainsi leur implication dans cette maladie.⁹⁹ L' α -Bungarotoxin, de la famille des α -neurotoxines, est également largement utilisée depuis plus de 50 ans en tant qu'outil pharmacologique.¹⁰⁰ Celle-ci est en effet sélective de certains sous-types de nAChRs et a ainsi rendu accessible leur étude et leur caractérisation. L'utilisation de cette toxine marquée à l'iode 125 a par exemple permis l'identification de sous-types de nAChRs impliqués dans la maladie de Parkinson en 2002.¹⁰¹

Le spectre des récepteurs affectés par les 3FTxs ne se limite pas au système cholinergique. Certaines peuvent par exemple bloquer sélectivement les canaux ioniques de type L, telle que la calsiseptine.¹⁰² Les cardiotoxines peuvent quant à elles influencer le rythme cardiaque en ciblant les myocytes cardiaques.¹⁰³ Enfin, un grand nombre de ces toxines sont dites « orphelines », c'est-à-dire que leur récepteur n'a pas encore été identifié, laissant ainsi penser que de nombreuses autres utilisations pharmacologiques sont à venir.

Bien que la liste soit loin d'être exhaustive, ces quelques exemples de familles de repliements témoignent de la grande diversité de *folds* existants dans les venins. Comme le montre l'étude de Mouhat *et coll.*, pas moins de 23 types de repliement différents existent rien qu'au sein des toxines ciblant les canaux ioniques.¹⁰⁴ Comme nous l'avons vu à travers ces exemples, la vaste majorité des toxines issues de venins contient un ou plusieurs ponts disulfures qui leur confèrent un caractère compact et plus ou moins rigide. Ces structures leur permettent ainsi d'être résistantes aux variations de chaleur et de pH, et surtout aux différentes protéases et peptidases présentes dans l'organisme.¹⁰⁵ De même, ces repliements sont responsables d'une forte affinité et sélectivité vis-à-vis de leur cible.^{59,74} Parmi les peptides en général, les toxines forment ainsi une classe particulière de molécules au fort potentiel thérapeutique.

C. Exemples de toxines sur le marché

Comme nous l'avons vu, alors que le cocktail de toxines que constituent les venins mène à de sérieuses pathologies pouvant aller jusqu'à la mort, les toxines prises de manière isolée peuvent s'avérer être de très bons outils thérapeutiques. Celles-ci sont pourtant restées longtemps inexploitées.⁵⁹ Cela s'explique par plusieurs facteurs, et notamment par la difficulté de maintien des espèces venimeuses en captivité, ainsi que la très faible quantité de venin produite par chaque individu, limitant largement leur étude. De plus, les techniques analytiques de pointe ne sont arrivées que tardivement, repoussant ainsi l'exploitation des venins à la fin du XXe siècle. Malgré tout, quelques médicaments basés sur des toxines peptidiques sont entrés sur le marché durant les quatre dernières décennies.

Le premier exemple historique d'un tel médicament est le Captopril, approuvé par la FDA en 1981 pour un usage thérapeutique. Le développement de ce médicament est basé sur

des peptides isolés du venin de la vipère *Bothrops Jararaca* par Feirrerera *et coll.* en 1970.¹⁰⁶ Feirrerera avait alors constaté que ces molécules pouvaient inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine (*angiotensin converting enzyme*, ACE). Cette enzyme joue un rôle majeur dans la régulation de la pression artérielle en convertissant l'angiotensine I en angiotensine II, hormone peptidique à l'action hypertensive. De plus, l'ACE régule également la concentration de bradykinine dans l'organisme en la dégradant. La bradykinine est une hormone peptidique de neuf acides aminés ayant une action hypotensive qui, de manière intéressante, a été découverte en 1949 grâce à l'étude des effets du venin de *Bothrops Jararaca* sur l'organisme.¹⁰⁷ Ainsi, l'utilisation d'une toxine inhibant l'ACE a été suggérée pour contrôler la régulation de la pression sanguine. Les toxines découvertes par Feirrerera n'étant pas actives oralement, un *screening* de plus de 2000 composés a permis d'identifier le motif nécessaire à l'IPP avec l'ACE, lui-même menant à un nouveau *screening* basé sur des homologues de structures.¹⁰⁸ Ces *screenings* visaient ainsi à réduire la toxine à une structure minimale tout en gardant l'activité recherchée. Le composé le plus actif oralement ainsi révélé était le 1-((2S)-3-mercapto-2-méthylpropionyl)-L-proline, plus tard nommé Captopril et utilisé pour traiter l'hypertension (Figure 13).¹⁰⁹ Le captopril, bien que non-peptidique, a ainsi montré l'exemple et ouvert la porte à l'utilisation des toxines en tant que molécules thérapeutiques.

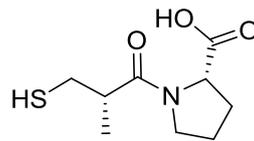


Figure 13 : Structure chimique du captopril

Le deuxième exemple d'un tel composé thérapeutique, l'eptifibatide, est également issu du venin d'un serpent, la vipère *Sistrurus miliarius barbouri*. Ce principe actif a été mis sur le marché en 1999 pour son action anticoagulante. La coagulation est possible grâce à des récepteurs présents sur les plaquettes sanguines, les intégrines. La formation de caillots sanguins provient de l'agrégation abusive des plaquettes *via* ces récepteurs, et en particulier les glycoprotéines IIB-IIIa, aussi appelé intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$. Le *screening* de 62 venins de serpent a permis d'identifier plusieurs toxines, appelées désintégrines, qui inhibent l'agrégation des plaquettes en ciblant les intégrines.¹¹⁰ Celles-ci contiennent toutes le motif RGD dans leur séquence, connu pour être la clé de l'interaction avec les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$.¹¹¹ En particulier, la barbourine, une toxine de 73 acides aminés, s'avère très spécifique des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, là où les autres désintégrines ciblent également d'autres récepteurs de ce type. Des travaux sur la relation structure/activité de la barbourine ont permis de réduire celle-ci à un peptide de sept acides aminés contenant un pont disulfure tout en maintenant une forte affinité et spécificité pour les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Figure 14). Par ailleurs, il a été constaté une certaine résistance aux protéases présentes dans le sang dû à sa forme cyclique.¹¹⁰ Ce peptide, nommé eptifibatide, a ainsi été mis sur le marché sous le nom commercial Integrilin pour la prévention de syndromes coronariens aigus. De manière intéressante, le tirofiban, principe actif non peptidique mais inspiré d'une toxine issue du venin de vipère *Echis carinatus*, l'echistatine, sera développé sur la même période et pour la même activité anticoagulante, et deviendra un

concurrent direct de l'éptifibatide.^{112,113} En marge du domaine des venins, la bivalirudine, inspirée d'une toxine de sangsue, l'hirudine, a également été approuvée en 2000 pour ses propriétés anticoagulantes.¹¹⁴

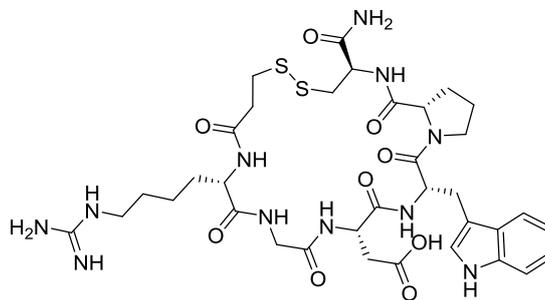


Figure 14 : structure chimique de l'éptifibatide

Un autre exemple de toxine utilisée à des fins thérapeutiques correspond au ziconotide, équivalent synthétique de l' ω -conotoxin MVIIA. Comme vu précédemment, ce médicament a été approuvé par la FDA en 2004 pour le traitement des douleurs chroniques sévères.²⁶ Cette toxine, extraite du venin de *Conus Magnus* en 1984,¹¹⁵ est formée par une chaîne de 25 acides aminés et contient trois ponts disulfures formant un motif ICK (Figure 15).^{116,117} Cette structure, indispensable à son activité, confère également une certaine résistance aux peptidases présentes dans l'organisme. Elle bloque ainsi sélectivement les canaux ioniques $Ca_v2.2$ avec une constante d'affinité inférieure à 10 pM.¹¹⁸ Ce type de canaux, parmi d'autres, est connu pour être impliqué dans les mécanismes conduisant à la douleur.¹¹⁹ Le ziconotide tire parti de cette sélectivité pour proposer un mode d'action différent des opiacés classiquement utilisés, ces derniers ciblant des GPCRs. Face à ces antidouleurs classiques, cette conotoxine présente plusieurs avantages : 1) elle se montre active dans le cas où les antalgiques opiacés ont peu d'effet, 2) aucune tolérance ni dépendance au médicament n'a été recensée et 3) ses effets secondaires sont faibles à petites doses.¹²⁰ De plus, les pouvoirs analgésiques des opiacés et du ziconotide s'additionnent.

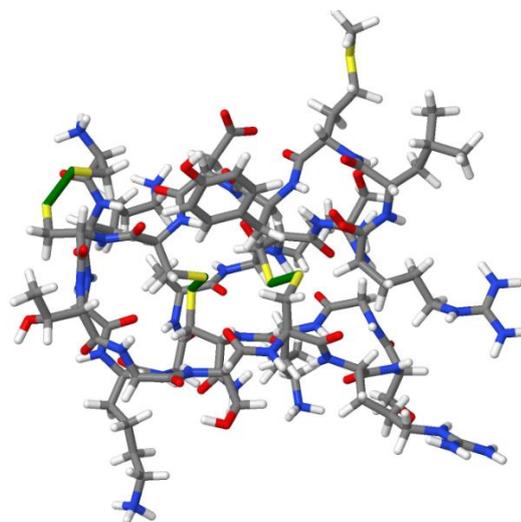


Figure 15 : Structure du ziconotide. Les trois ponts disulfures sont représentés par des liaisons vertes. Modélisée à partir de <http://www.3dchem.com/Ziconotide.asp#>

Bien que non considérée comme un venin à part entière par certains, la salive du lézard *Heloderma suspectum*, aussi appelé monstre de Gila, est également la source de la découverte d'un composé peptidique d'intérêt thérapeutique. L'étude de ce venin a en effet permis l'identification d'un groupe de toxines, appelées exendines, dont l'activité hypoglycémiant s'avérait intéressante pour une utilisation antidiabétique.¹²¹ L'exendine-4, peptide de 39 acides aminés, montre notamment une résistance particulière aux protéases du plasma sanguin.¹²² Son temps de demi-vie *in vivo* est ainsi de 2,4 heures dans le plasma sanguin, contre deux minutes pour son équivalent naturel exprimé dans le corps humain, le GLP-1. Son équivalent synthétique, l'exénatide, est ainsi à la base du médicament Byetta commercialisé depuis 2005 pour le traitement du diabète de type 2 (Figure 16).¹²³ Comme nous l'avons vu dans la partie I.B.2, des efforts ont été faits quant à l'administration de l'exénatide avec le développement de l'ITCA-650, implant sous-cutané permettant de délivrer ce principe actif pendant plusieurs mois sans intervention médicale autre que la mise en place du dispositif.⁵³

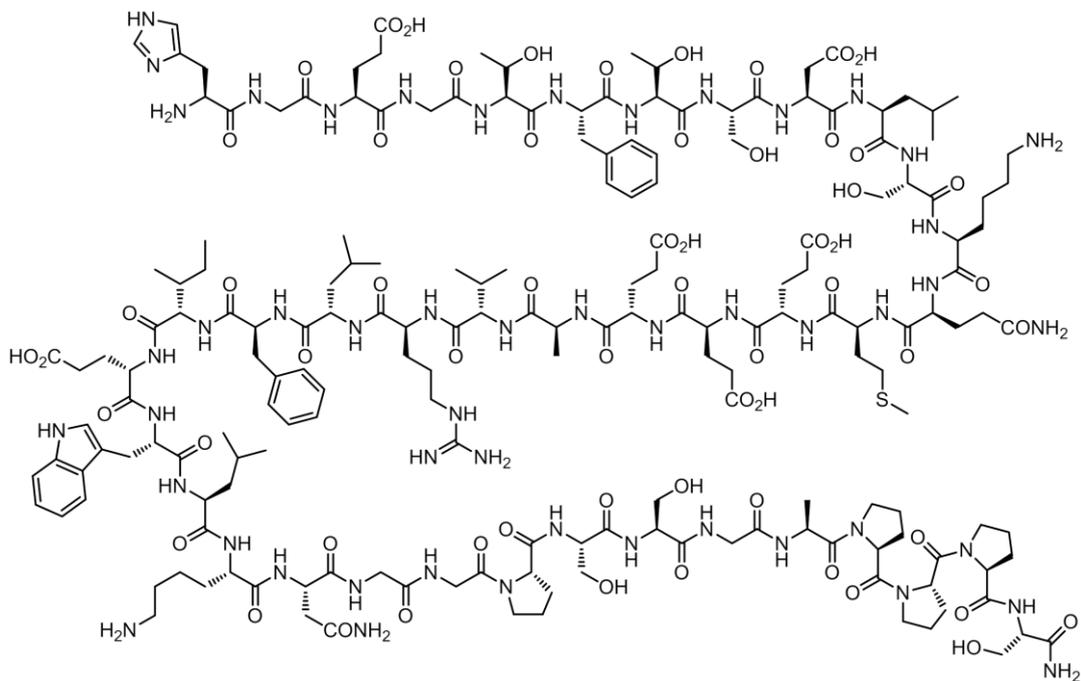


Figure 16 : structure chimique de l'exénatide. Source : <https://cpcscientific.com/exenatide>

Ces quelques médicaments peptidiques basés sur l'étude des venins ont montré la voie aux industries pharmaceutiques, qui s'intéressent désormais de plus en plus à ces composés. D'autres toxines sont actuellement en phase clinique ou préclinique, à l'image du dalazatide décrit précédemment.²⁷ Les toxines d'araignées sont par exemple largement étudiées pour leur pouvoir antidouleur. Plusieurs de ces toxines sont en effet spécifiques du canal $Na_v1.7$, impliqué dans les mécanismes de la douleur avec entre autres le $Ca_v2.2$ cité plus tôt. C'est le cas de la Prototoxin II vu précédemment, mais également de l'huwentoxin IV, de la μ -theraphotoxin-Pn3a, de la ceratotoxin-1 et de la GpTx-1, toutes issues de venins d'araignées.⁶⁴ Ces toxines ont ainsi fait l'objet d'études approfondies, en particulier d'optimisation de structures, menant à certains homologues particulièrement affins et sélectifs de ce canal. Un analogue de l'huwentoxin IV, dont trois acides aminés ont été mutés, a par exemple permis

d'obtenir un IC50 d'environ 0.5 nM pour le Nav1.7.¹²⁴ De même, un mutant de GpTx-1 présente un IC50 de l'ordre du nanomolaire, avec en plus une très forte sélectivité pour le Nav1.7 face au Nav1.1 et Nav1.6.¹²⁵ Les toxines d'araignées ne sont pas les seules à cibler ce canal. En effet, une toxine de scolopendre de 46 acides aminés et contenant trois ponts disulfures, la μ -SLPTX-Ssm6a, montre également une forte affinité pour celui-ci.¹²⁶ Avec un IC50 d'environ 25 nM, celle-ci est 30 à 150 fois plus sélective pour le Nav1.7 que les autres Nav humains, et se montre ainsi plus efficace que la morphine chez les rongeurs. De plus, sa séquence ne présente d'homologies avec aucun peptide connu à ce jour, laissant penser qu'elle bloque le Nav1.7 avec un mode d'action différent des toxines d'araignées. Les cônes marins constituent également une source de candidats thérapeutiques. En effet, sur la base d'outils bioinformatiques, Essack *et coll.* estiment que parmi toutes les conotoxines découvertes en plus de quatre ans (2007 à 2011), une centaine avait un potentiel thérapeutique important.¹²⁷ Celles-ci, en ciblant différents récepteurs, pourraient avoir une application dans diverses maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer.

Bien que toutes ces molécules présentent un intérêt certain d'un point de vue médical, leur exploitation repose sur l'obtention de leur version synthétique. En effet, les espèces venimeuses ne produisent que très peu de venin, et chaque toxine dans un même venin n'est généralement présente qu'à hauteur de quelques pourcents. Plusieurs centaines de kilos de peptide, voire quelques tonnes, sont nécessaires pour alimenter un marché thérapeutique de taille conséquente.⁹ Dans ce but, extraire la toxine d'intérêt d'un venin n'est donc pas envisageable. Ainsi, plusieurs méthodes ont été développées afin d'obtenir synthétiquement les toxines, et plus généralement les peptides.

III. Obtention de peptides et protéines

La première méthode historique d'obtention de peptides et protéines est l'extraction à partir d'organismes vivants ou d'organes. Par définition, cette méthode ne permet pas la production de peptides non-naturels ou modifiés. L'obtention de peptides par voie synthétique a donc fait l'objet de très nombreuses études, menant à plusieurs méthodes de synthèse de peptides. Parmi elles, des voies biologiques sont employées en utilisant des organismes génétiquement modifiés, ou à défaut uniquement leur système d'expression de peptides. La SPS et la SPPS, citées précédemment, se basent quant à elles sur des procédés chimiques pour obtenir les séquences peptidiques désirées. Ces différentes méthodes ont toutes leurs avantages et leurs limitations. Les voies biologiques permettent la production de longs peptides à grande échelle, tandis que la SPS sera plus adaptée à la production de peptides relativement courts. Cette dernière permet en outre une bonne isolation et caractérisation des intermédiaires de synthèse, au détriment d'un développement de procédé plutôt long. La SPPS, de par son principe, ne permet pas un suivi direct de la synthèse des peptides, mais facilite et accélère grandement l'enchaînement des étapes de couplages des acides aminés en se basant sur un support solide. Contrairement aux voies biologiques, les méthodes chimiques permettent de plus une incorporation aisée de résidus non naturels.

Au cours des travaux exposés dans ce manuscrit, la SPPS a été la voie de synthèse exclusivement employée pour l'obtention des peptides. Ainsi, seule cette dernière sera abordée dans cette partie. Comme nous le verrons, la SPPS présente une limitation en terme de longueur de séquences pouvant être obtenues. Pour pallier cet inconvénient, une méthode de ligation de fragments peptidiques, la *native chemical ligation*, a été employée et sera détaillée. De plus, la SPPS permet l'obtention de la chaîne d'acides aminés sous sa forme linéaire. Ainsi, dans le cas des toxines, une attention toute particulière doit être portée à l'appariement des cystéines lors du repliement oxydatif final. De cet appariement dépendra la reproduction fidèle de la structure tridimensionnelle naturelle de la toxine, pour ainsi lui conférer l'action biologique recherchée.

A. Synthèse de peptides par SPPS

La SPPS a été inventée par Merrifield en 1963.⁶ Celle-ci se base sur l'utilisation d'un support solide, appelé résine, insoluble dans les solvants utilisés pour la synthèse, et d'acides aminés protégés orthogonalement sur les chaînes latérales et les amines *N*-terminales. Le premier résidu est alors fixé sur la résine grâce à un lien stable dans les conditions de synthèse, mais qui pourra être coupé une fois la séquence peptidique obtenue. La SPPS est alors décrite comme la succession de deux étapes clés : la déprotection de l'amine *N*-terminale du résidu fixé sur la résine, puis le couplage de cette amine libre sur l'acide carboxylique d'un nouvel acide aminé pour former un lien amide. La répétition de ces deux étapes permet ainsi de réaliser la synthèse d'un peptide de l'extrémité *C*-terminale vers le *N*-terminale (Figure 17). Enfin, le peptide est récupéré en solution grâce à un traitement de la résine dans des conditions permettant la coupure du lien entre l'extrémité *C*-terminale du peptide et le

support. L'avantage de la SPPS par rapport à la SPS réside dans le fait que les réactifs utilisés sont éliminés par simple filtration, seul le produit voulu après chaque réaction restant accroché sur le support solide. Cela permet ainsi l'utilisation d'un large excès de chaque réactif afin d'atteindre des rendements de réaction quasi quantitatifs. De plus, l'automatisation possible de ces cycles de synthèse représente l'atout majeur de la SPPS.

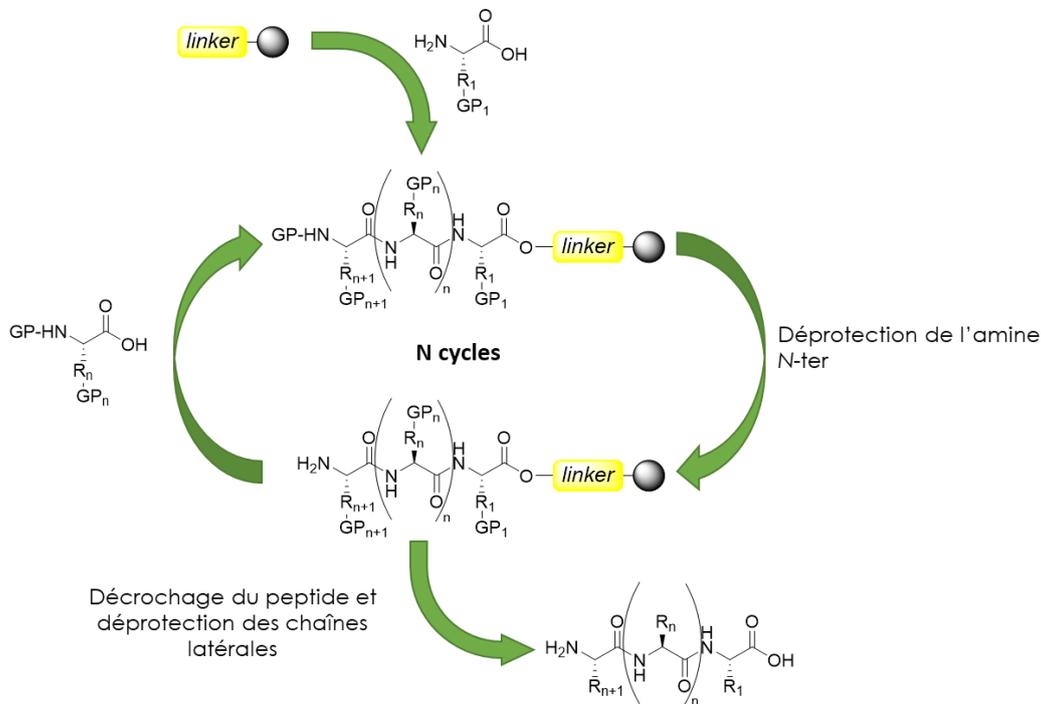


Figure 17 : schéma de principe de la SPPS. R représente une chaîne latérale et GP un groupement protecteur

A partir de ce principe, de nombreuses optimisations ont été apportées, notamment concernant les stratégies de protections l'amine et des chaînes latérales. Ainsi, deux stratégies principales de synthèse de peptides sur support solide sont aujourd'hui utilisées : la stratégie Boc pour *tert*-butyloxycarbonyl, et la stratégie Fmoc pour fluorénylméthoxyloxycarbonyl, du nom du groupement protecteur de l'amine alpha. Bien que la stratégie Boc soit réputée pour fournir de meilleurs rendements de synthèse par rapport à la stratégie Fmoc,¹²⁸ notamment dans le cas de séquences difficiles à synthétiser, sa mise en place repose sur l'utilisation d'acide fluorhydrique pour l'étape finale de séparation de la résine et de déprotection des chaînes latérales. De nos jours, les contraintes matérielles que cela implique réservent cette stratégie à quelques laboratoires très spécialisés.

Pour pallier cela, la majorité des peptidistes s'est tournée vers la stratégie Fmoc, utilisant des réactifs moins contraignants. Les nombreuses optimisations faites sur cette stratégie ont mené aujourd'hui à une technologie mature avec une bonne qualité générale de synthèse. Cela passe par la limitation, voire la suppression des différentes réactions secondaires propres à cette stratégie, notamment grâce à l'introduction de groupements protecteurs adaptés des chaînes latérales, mais également du squelette peptidique. De plus, l'introduction de nouveaux supports solides et de blocs dipeptidiques permettent l'accès à des séquences dites difficiles.

1. Principe de la SPPS en stratégie Fmoc

La stratégie Fmoc a été décrite pour la première fois par Meienhofer en 1978.¹²⁹ Cette technique repose sur l'utilisation du groupement protecteur fluorénylméthoxycarbonyl pour la protection de la fonction amine en *N*-terminal de l'acide aminé.¹³⁰ En synthèse peptidique, la déprotection de ce groupe est généralement réalisée à l'aide d'une solution de pipéridine *via* une β -élimination. En combinaison avec le Fmoc, des groupements protecteurs orthogonaux au Fmoc et sensibles aux acides sont utilisés pour la protection des différentes chaînes latérales. Ceux-ci resteront donc sur les acides aminés tout au long de la synthèse et pourront être retirés en même temps que le décrochage final du peptide de la résine. Les résines communément utilisées sont sensibles aux acides, et l'acide trifluoroacétique (TFA) est généralement utilisé à forte concentration pour réaliser la déprotection totale du peptide.

L'étape clé dans cette stratégie est le couplage de l'acide aminé. En effet, le rendement et la qualité de synthèse reposent principalement sur le bon déroulement de la formation des liaisons amide. Cette étape se déroule en deux temps, tout d'abord l'activation de l'acide carboxylique de l'acide aminé à coupler grâce à un agent de couplage électroattracteur, puis l'attaque nucléophile de l'amine *N*-terminale de la séquence en cours d'élongation sur ce carbonyle activé (Figure 18).¹³¹ Pour être efficace, un agent de couplage doit donc être à la fois un bon nucléophile pour l'étape d'activation, et un bon nucléofuge pour l'étape de couplage.

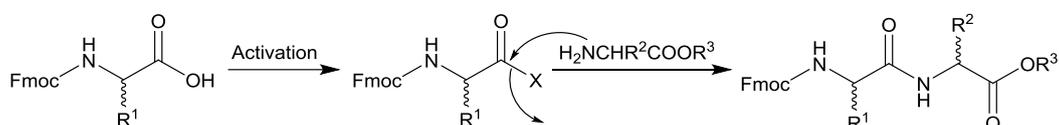


Figure 18 : formation d'une liaison peptidique. X représente l'agent de couplage.

Lors de synthèses automatisées, l'acide carboxylique est le plus souvent activé *in situ*. Plusieurs classes d'agents de couplage peuvent alors être utilisées, les plus courantes étant les carbodiimides, les acylazoles, et plus récemment les sels de phosphonium et les sels d'uronium.¹³¹ En stratégie Fmoc, le carbodiimide principalement utilisé est le diisopropylcarbodiimide (DIC). Cette espèce, légèrement basique, réagit spontanément avec l'acide carboxylique à activer pour donner l'*O*-acylisourée correspondante. Celle-ci réagit ensuite avec l'amine *N*-terminale présente sur la résine pour former la liaison peptidique (Figure 19). Alternativement, dans le cas de la présence de plus de deux équivalents d'acide aminé à coupler, l'acide carboxylique de celui-ci peut réagir avec l'*O*-acylisourée pour donner l'anhydride symétrique correspondant, qui pourra lui-même réagir avec l'amine.

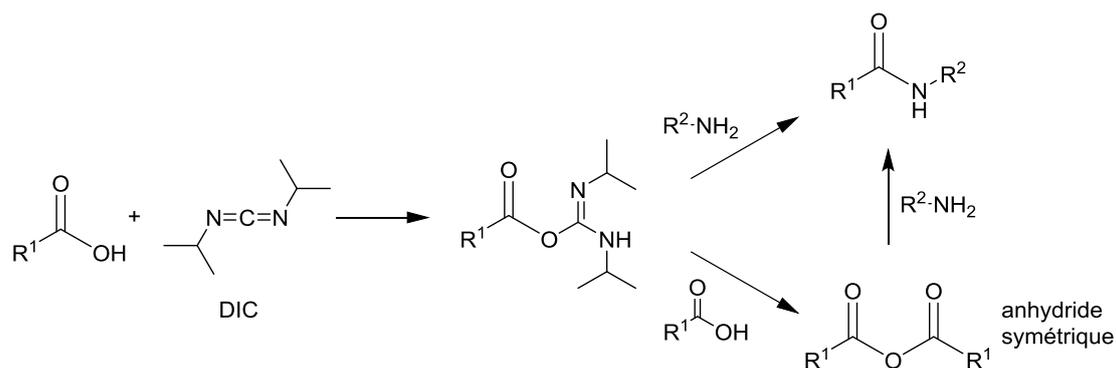


Figure 19 : formation d'une liaison peptidique avec le DIC

Concernant les acylazoles, le plus utilisé en synthèse peptidique en stratégie Fmoc est le carbonyldiimidazole (CDI).¹³² Ce composé basique réagit avec l'acide carboxylique à coupler pour donner l'acylimidazole correspondant et un équivalent d'imidazole, ce qui permettra en présence de l'amine *N*-terminale de réaliser le couplage de l'acide aminé (Figure 20).

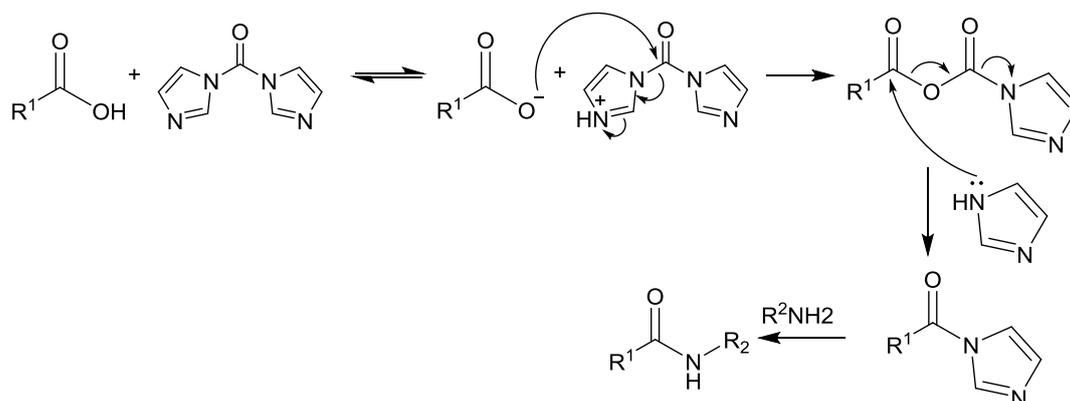


Figure 20 : Formation d'une liaison peptidique avec du CDI

Plus récemment, les sels de phosphonium sont également entrés dans le domaine de la synthèse peptidique, avec en premier le (Benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP, figure 21).¹³³ Parmi les plus répandus et les plus efficaces, on trouve désormais l'hexafluorophosphate de bromotri(pyrrolidino)phosphonium (PyBroP)¹³⁴ et l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytri(pyrrolidino)-phosphonium (PyBOP, Figure 21).¹³⁵ En particulier, Le PyBroP se montre très efficace pour le couplage d'un résidu sur une amine secondaire, mais également pour le couplage d'acides aminés encombrés tels que l'acide α -aminoisobutyrique.¹³⁴ Avec le PyBOP, la réaction de couplage se fait *via* la formation d'un ester activé d'hydroxybenzotriazole en présence d'une base, généralement la diisopropyléthylamine (DIPEA, Figure 22). Avec le PyBroP, la formation de la liaison peptidique peut passer par la formation d'un anhydride symétrique lorsque l'acide aminé est introduit en excès en l'absence de HOBT, de la même manière que lorsque le DIC est utilisé.¹³⁶

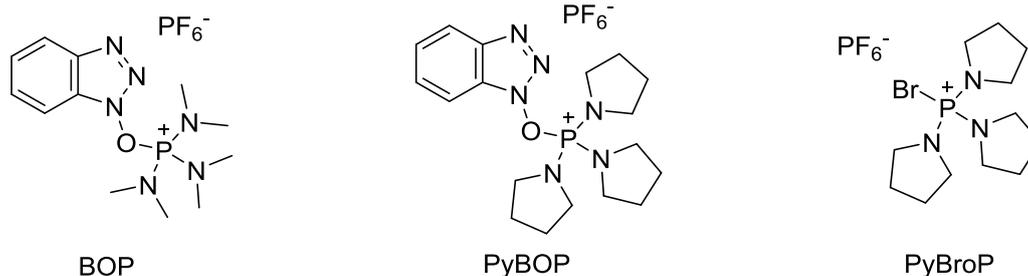


Figure 21 : structures chimiques du BOP, PyBOP et du PyBroP

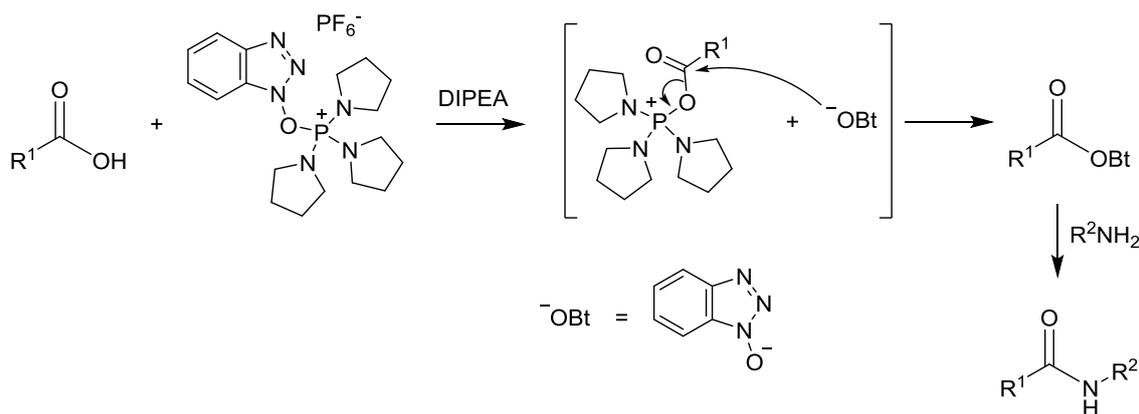


Figure 22 : Formation d'une liaison peptidique avec du PyBOP

Les sels d'uronium, également appelés sels d'aminium, présentent de par leur structure une réactivité proche des sels de phosphonium. Parmi les nombreux composés représentant cette famille, l'hexafluorophosphate de 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium (HBTU) est généralement le plus accessible commercialement, et a été largement utilisé durant les travaux décrits ici.¹³⁷ Ce composé forme un ester activé en présence d'une base de la même manière qu'avec le PyBOP (Figure 23).

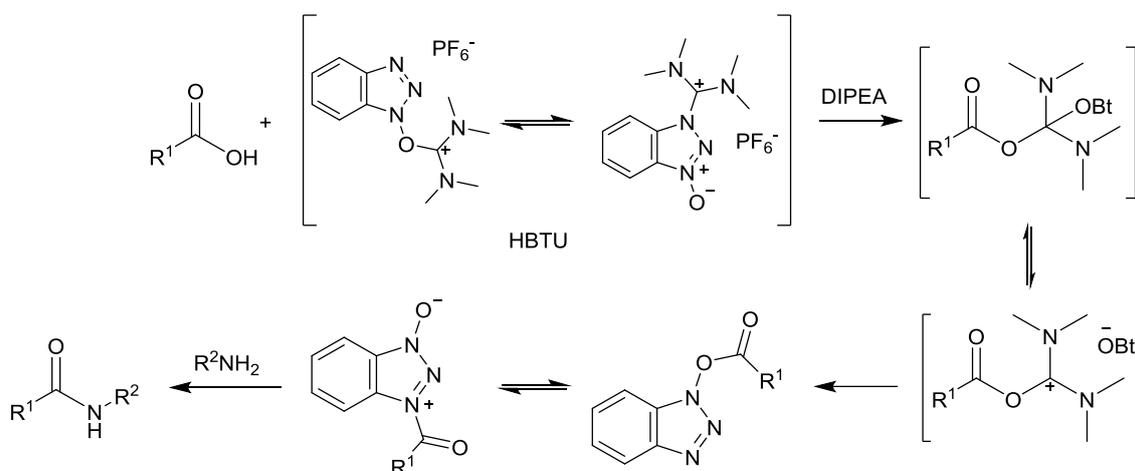


Figure 23 : formation d'une liaison peptidique avec du HBTU

Lors d'un couplage en SPPS automatisée, l'activation de l'acide carboxylique se fait très souvent en présence de l'amine *N*-terminale de la chaîne en cours d'élongation. Celle-ci peut réagir avec les sels d'uronium de la même manière que l'acide carboxylique, menant à la formation d'une guanidine substituée.¹³⁸ La formation de ce groupe empêche ainsi le couplage du prochain acide aminé. Afin d'éviter cette réaction secondaire, un léger défaut de sel d'uronium est introduit lors du couplage. Si ceci n'est généralement pas un problème en SPPS où un large excès d'acide aminé est utilisé, cela empêche l'utilisation du HBTU et de ses analogues pour le couplage de composé coûteux que l'on ne souhaite pas introduire en excès, ou pour la condensation de fragments peptidiques, généralement introduits en quantités équimolaires. Dans ces cas-là, l'utilisation de sels de phosphonium sera préférée.

D'autres réactions secondaires propres à la SPPS en stratégie Fmoc sont décrites. Afin d'obtenir des synthèses peptidiques de qualité et avec de bons rendements, il est important de les prendre en considération et de les limiter autant que possible. Plusieurs optimisations peuvent également être apportées lors de l'automatisation de la SPPS.

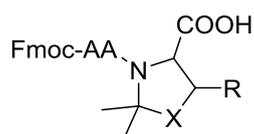
2. Optimisations de la SPPS en stratégie Fmoc

Grâce à l'automatisation de la SPPS à l'aide de synthétiseurs de peptides, plusieurs optimisations, qui seraient laborieuses lors d'une synthèse réalisée manuellement, peuvent être apportées au procédé. Parmi elles, la répétition du couplage d'un acide aminé difficile à coupler permet d'augmenter le rendement final et d'éviter la formation d'un peptide présentant une délétion. Dans le cas où l'acide aminé n'est pas totalement couplé même après plusieurs répétitions, une étape dite de *capping* peut être réalisée avec de l'anhydride acétique. Cela permet de bloquer les chaînes n'ayant pas réagi avec l'acide aminé en acétylant l'amine *N*-terminale. De cette manière, la formation de peptides délétés est évitée au profit de la formation de peptides tronqués, facilitant la purification par HPLC après synthèse.

Lorsque le rendement de couplage de plusieurs acides aminés successifs dans la chaîne peptidique désirée est faible, même après répétition des couplages, on parle alors de séquence difficile à synthétiser.¹³⁹ Ce cas de figure est souvent lié à la formation de structures secondaires au sein du peptide en croissance, généralement des feuilletts β , provoquant l'agrégation de la chaîne sur elle-même ou de plusieurs chaînes entre elles. Cela rend les amines *N*-terminales des chaînes en cours d'élongation faiblement accessibles pour les résidus suivants, et diminue ainsi fortement les rendements de couplage. Ce phénomène, principale cause d'échec de synthèse, est favorisé par plusieurs facteurs. Parmi eux, un taux de substitution de la résine trop important et l'utilisation d'un solvant non adéquat pour la solvater sont deux causes externes courantes. La multitude de supports solides disponibles commercialement peut cependant assez facilement résoudre cette problématique.

Le paramètre intrinsèque le plus déterminant est la séquence peptidique en elle-même. En effet, l'agrégation des chaînes peptidiques est principalement causée par une combinaison d'acides aminés et de groupements protecteurs favorables à ce phénomène.^{140,141} De nos jours, plusieurs outils informatiques permettent la prédiction du potentiel d'agrégation des séquences peptidiques, le premier en date et certainement le plus

utilisé étant Peptide Companion.¹⁴² A partir de ce programme, ou après analyse par spectrométrie de masse des peptides tronqués provenant d'une synthèse non satisfaisante, il est possible d'identifier les zones difficiles d'une séquence donnée. Une des méthodes de choix pour améliorer le couplage des acides aminés impliqués consiste à introduire en amont de la zone difficile un dipeptide sous forme de pseudoproline.¹⁴³ Cette structure chimique imite la capacité qu'a la proline à casser les feuilletts β en introduisant un coude dans la chaîne peptidique. Les pseudoprolines s'inspirent ainsi du caractère cyclique de la proline pour imposer cette contrainte. De plus, la suppression du proton porté par l'azote formant la liaison amide empêche également la formation de ces feuilletts β . Ces dipeptides sont constitués d'un acide aminé quelconque protégé par un Fmoc en *N*-terminal et d'une sérine, thréonine ou cystéine comme résidu *C*-terminal. La chaîne latérale de ce dernier est cyclisée avec l'azote du lien amide sous la forme d'une oxazolidine ou d'une thiazolidine, le plus souvent diméthylée (Fmoc-AA-AA_x($\psi^{Me,Me}$ pro)-OH, avec AA_x une sérine, thréonine ou cystéine, Figure 24). Ce dipeptide est introduit comme un acide aminé standard en SPPS, et la présence de TFA permet de rompre le cycle et de récupérer la structure naturelle du peptide. L'efficacité de cette stratégie a été prouvée à maintes reprises et est largement utilisée au sein du laboratoire pour améliorer les rendements de synthèses peptidiques.¹⁴⁴



X = O (Ser, Thr), S (Cys)
R = H (Ser, Cys), Me (Thr)

Figure 24 : structure chimique générale d'une pseudoproline diméthylée

Outre la présence de zones difficiles au sein d'une séquence, plusieurs réactions secondaires peuvent diminuer drastiquement les rendements de synthèse si les précautions pour les limiter ne sont pas prises. L'avènement des synthétiseurs de peptides couplés à un mode de chauffage du réacteur, généralement par micro-ondes ou infra-rouge, a notamment fait ressurgir certaines de ces réactions auparavant contrôlées.¹⁴⁵ L'une de ces réactions indésirables est la racémisation des acides aminés. La stéréochimie des résidus dans un peptide a en effet une importance capitale pour obtenir l'activité biologique recherchée. Pour cela, la racémisation doit être limitée au maximum lors du couplage des acides aminés. Celle-ci peut se produire sur l'acide aminé activé selon deux mécanismes.¹³¹ Le premier est une énolisation directe de l'acide aminé *via* l'abstraction du proton en α par la base utilisée pour le couplage (Figure 25).

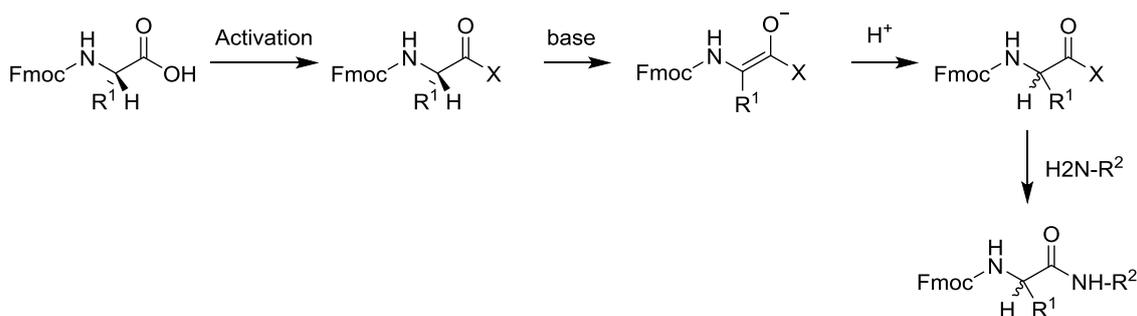


Figure 25 : racémisation d'un acide aminé durant son couplage via la formation d'un énolate

Afin de limiter ce mécanisme de racémisation, l'usage d'une base encombrée est recommandé en SPPS, d'où l'utilisation classique de la DIPEA pour les couplages peptidiques. Certains acides aminés sont plus sensibles à la racémisation que d'autres. C'est le cas de l'histidine, dont l'amine non protégée de la chaîne latérale joue le rôle de base pour former l'énolate par un mécanisme intramoléculaire.¹⁴⁶ La cystéine est également très sensible à la racémisation par le mécanisme décrit dans la Figure 25.¹⁴⁷ Pour les acides aminés dont la racémisation est détectée, et pour la cystéine en particulier, l'usage d'une base plus encombrée et plus faible du type 2,4,6-collidine ou *N*-méthylmorpholine est généralement recommandée.¹⁴⁸

Le second mécanisme bien connu de racémisation passe par la formation d'une oxazolone catalysée par la base présente lors du couplage, comme représenté Figure 26.¹⁴⁹ Ce mécanisme est possible lorsque l'amine de l'acide aminé est acylée, donc en particulier lors du couplage de fragments peptidiques.

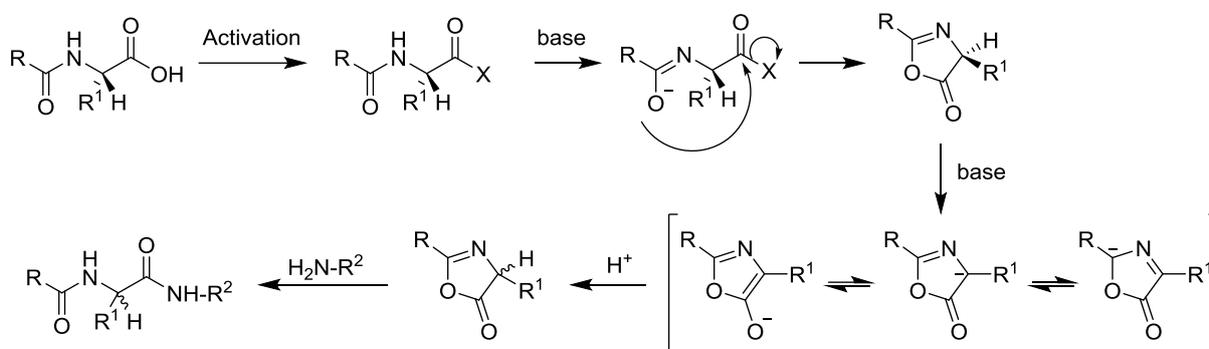


Figure 26 : racémisation d'un acide aminé durant son couplage via la formation d'une oxazolone

La protection de l'amine par un carbamate, comme c'est le cas avec le Fmoc, permet de limiter la formation de l'oxazolone.¹³¹ L'activateur utilisé doit également être choisi avec soin pour prévenir la racémisation du résidu. En effet, un agent de couplage activant fortement l'acide carboxylique en ester permettra un couplage rapide, et diminuera donc la proportion de racémisation durant l'étape d'activation. Cependant, une activation excessive risque également d'augmenter la formation d'oxazolone en formant un très bon groupe partant, menant à une racémisation plus importante. Ainsi, dans le cas de couplages réalisés avec un carbodiimide, il est vivement conseillé d'utiliser un additif de la famille des hydroxybenzotriazoles, connus pour diminuer la racémisation en convertissant l'*O*-acylisourée

en un ester activé de cet additif.¹³¹ Celui-ci évite également la formation du *N*-acylurée correspondant, espèce non réactive pouvant diminuer les rendements de couplage. C'est pour cette même raison que les agents de couplage les plus utilisés (PyBOP, HBTU, ...) ont été conçus pour contenir un dérivé d'hydroxybenzotriazole, qui participe activement aux mécanismes de couplage.

Une autre réaction secondaire prépondérante durant la SPPS est la formation d'aspartimide. Celle-ci est particulièrement problématique puisqu'elle peut être à la fois catalysée par une base ou un acide, et se met en place aussi bien sur support solide qu'en solution.¹⁵⁰ Cette réaction indésirable est possible dès lors qu'un acide aspartique est introduit dans une séquence peptidique, et peut également se faire dans une moindre mesure avec l'asparagine et l'acide glutamique (on parlera alors de formation de glutarimide). L'acide aspartique est généralement introduit en SPPS protégé sous forme d'un ester. Celui-ci est un bon groupe partant lors de l'attaque nucléophile de l'azote impliqué dans la liaison amide avec le résidu présent côté *C*-terminal, menant ainsi à la formation de l'aminosuccinimide correspondant (Figure 27). A cette étape, le proton de l'aspartimide correspondant au H α de l'acide aspartique précurseur est relativement plus acide, ce qui mène à la racémisation accélérée de l'aspartimide.¹⁵¹ Le cycle peut ensuite être réouvert par une attaque nucléophile sur l'un des deux carbonyles de l'aminosuccinimide. Lorsque l'eau joue le rôle de nucléophile, cela mène à la formation du peptide avec le résidu Asp racémisé, ou à l'isopeptide correspondant. Ce cas de figure est particulièrement problématique puisque ces sous-produits possèdent la même masse moléculaire que le peptide désiré et ne peuvent être détectés en spectrométrie de masse, et sont généralement difficilement séparables par purification en phase inverse. Dans le cas où la pipéridine, utilisée pour la déprotection du Fmoc, joue le rôle de nucléophile dans ce mécanisme, deux sous-produits correspondants au pipéridinyl-peptide et pipéridinyl-isopeptide sont obtenus. Ceux-ci peuvent être détectés par spectrométrie de masse et correspondent à un adduit +67 Da par rapport à la masse voulue. Ces quatre sous-produits, ainsi que l'aspartimide lui-même, peuvent tous être obtenus à l'issue de la synthèse d'un peptide contenant un acide aspartique.

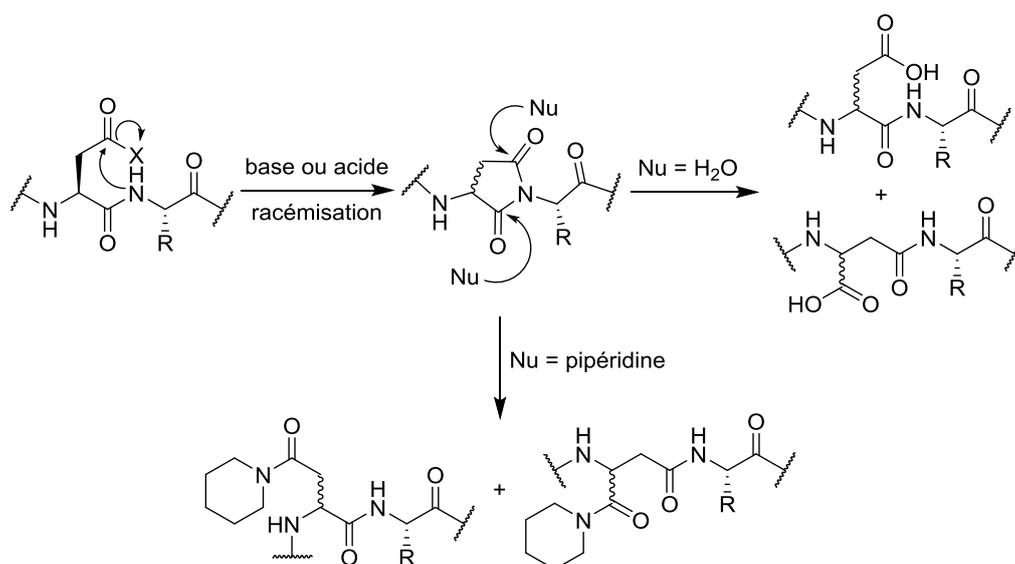


Figure 27 : formation d'aspartimide et des sous-produits correspondants

Au vu du mécanisme, la formation de l'aspartimide est fortement dépendante du résidu présent en C-terminal de l'acide aspartique. Ainsi, le motif Asp-Gly formé avec une glycine, faiblement encombrée, sera le cas de figure le plus favorable à sa formation.¹⁵² Un des moyens pour supprimer totalement la formation d'aspartimide durant la SPPS consiste à protéger l'azote de la liaison amide impliquée. Le groupement le plus efficace pour cela est le diméthoxybenzyle (Dmb).¹⁵² Le motif Fmoc-Asp(OtBu)-N(Dmb)Gly-OH, disponible commercialement, peut directement être introduit lors de l'élongation de la chaîne de la même manière qu'un acide aminé classique. Cela évite le couplage difficile de l'acide aspartique sur l'amine secondaire de la glycine protégée par le Dmb. Ce groupement protecteur, sensible aux acides, sera déprotégé lors du traitement final au TFA. Cependant, la formation d'aspartimide sera susceptible de se produire en solution, et une attention particulière devra être portée à la manipulation de tels peptides.

De très nombreuses autres réactions secondaires peuvent se produire lors de la SPPS, comme en témoigne les 376 pages du livre « Side Reactions in Peptide Synthesis ». ¹⁵³ Celles-ci sont cependant moins généralisables et doivent être étudiées au cas par cas. Bien que la connaissance des différents mécanismes régissant la SPPS et les réactions indésirables associées permettent de synthétiser une grande diversité de peptides avec quelques optimisations, certaines séquences restent tout de même inaccessibles. C'est le cas des peptides longs, c'est-à-dire contenant plus d'une cinquantaine d'acides aminés. Au-delà de cette limite théorique, fortement influencée par la séquence peptidique, les synthèses sont bien souvent inexploitable. Cela est dû à l'accumulation de sous-produits issus de l'agrégation des chaînes peptidiques, rendant incomplets les couplages et les déprotections des Fmoc. De même, la succession d'acides aminés encombrés mène bien souvent à des couplages partiels de ces résidus. Ainsi, la pureté du peptide voulu diminue inexorablement avec l'augmentation du nombre de résidus, si bien que celui-ci se trouvera uniquement à l'état de traces à la fin de la SPPS. Pour pouvoir accéder à des peptides plus longs voire des protéines, différentes méthodes de ligations chimiques ont été mises au point, dont la désormais bien connue *Native Chemical Ligation* (NCL).

B. Native Chemical Ligation

Afin d'accéder à des peptides de tailles relativement importantes, différentes méthodes de ligations de fragments peptidiques ont été développées. Une des premières approches avancées consiste en la condensation de deux fragments peptidiques protégés sur support solide ou en solution.¹⁵⁴ Bien que cette méthode ait prouvé son efficacité par le passé,⁹ celle-ci souffre de plusieurs inconvénients. Parmi eux, la solubilisation parfois difficile de fragments protégés¹⁴¹ et la racémisation de l'acide aminé activé pour la condensation sont deux problèmes majeurs.¹⁵⁵ Les points de condensation possibles sont également limités puisqu'il faut prendre en considération l'encombrement des résidus impliqués. Pour ces raisons, le développement d'une méthode généralisée de ligation impliquant des fragments non protégés, et donc chimiosélective, était nécessaire. La NCL a ainsi été mise au point en

1994 par Dawson et Kent.¹⁵⁶ Cette réaction est la première décrite pour donner une liaison peptidique, dite native, entre deux fragments déprotégés, contrairement aux autres ligations chimiques existantes.

1. Mécanisme et extensions de la NCL

La NCL permet la ligation d'un fragment portant une fonction thioester à son extrémité C-terminale avec un second fragment présentant une cystéine à son extrémité N-terminale. La ligation s'effectue ainsi sélectivement aux extrémités de chaque fragment grâce à un mécanisme en deux étapes (Figure 28): (i) un équilibre de trans-thioestérification *via* une attaque de la fonction thiol de la chaîne latérale de la cystéine en N-terminal sur la fonction thioester de l'autre fragment et (ii) un transfert intramoléculaire irréversible de la fonction carbonyle du S vers l'amine de la cystéine.¹⁵⁶ Cette deuxième étape, appelée *S-to-N acyl shift*, est favorisée par un arrangement géométrique formant un cycle à cinq atomes, formant rapidement le composé voulu. Dans le cas où des cystéines intrachaînes sont présentes, la trans-thioestérification peut également être réalisée avec les chaînes latérales de celles-ci. Cependant, le réarrangement intramoléculaire *S-to-N acyl shift* n'est pas possible puisque l'azote de la cystéine correspondante est impliqué dans une liaison amide. Cette espèce reste cependant disponible pour réaliser une autre trans-thioestérification, qui mènera *in fine* au lien amide voulu de manière irréversible.

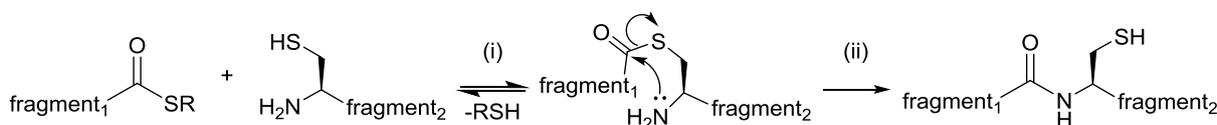


Figure 28 : mécanisme en deux étapes de la NCL

Une stratégie de synthèse par NCL d'un peptide long consiste donc à tirer profit d'une ou plusieurs cystéines judicieusement placées pour s'en servir de point de ligation. Ces cystéines seront généralement sélectionnées pour découper le peptide long en plusieurs fragments de taille équivalente. Dans le cas d'une séquence difficile à synthétiser, les points de ligations permettront de segmenter la zone posant problème. Pour un schéma réactionnel impliquant trois fragments, le fragment médian portera durant la NCL à la fois une cystéine à son extrémité N-terminale et le thioester activé à son extrémité C-terminale. Pour éviter la cyclisation intramoléculaire ou la polymérisation de ce fragment dans les conditions de NCL, sa cystéine N-terminale est généralement protégée sous forme de thiazolidine (Thz).¹⁵⁷ La synthèse du peptide voulu se fait alors de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale *via* deux ligations successives, avec une déprotection de la Thz intermédiaire. Selon le mode d'obtention du thioester activé, il est également possible de réaliser les ligations dans l'ordre inverse sans la nécessité de protéger la cystéine du fragment médian (voir partie III.B.2).

Cette réaction efficace en condition équimolaire se déroule en milieu aqueux, sous atmosphère inerte et à pH proche du neutre. Le pH neutre permet une transthoestérification rapide tout en maintenant l'hydrolyse du thioester à un niveau raisonnable. Un pH supérieur

à 8 conduit généralement à une hydrolyse trop importante et diminue considérablement les rendements de ligation.¹⁵⁸ A pH acide, la cinétique de la réaction devient excessivement lente, si bien que l'hydrolyse du thioester est ici encore susceptible d'être la réaction la plus rapide.¹⁵⁶ Le tampon classiquement utilisé pour réaliser une NCL inclut également un dénaturant à haute concentration, généralement la guanidine, pour casser les structures secondaires éventuellement présentes afin de maintenir une bonne accessibilité des extrémités mises en jeu pendant la réaction. Cela permet également la solubilisation des fragments à fortes concentrations, condition nécessaire à une réaction rapide. Parfois, du TCEP est également ajouté afin d'éviter l'oxydation des thiols, et en particulier des cystéines du peptide.

Lors de la réaction de NCL, le point de ligation a une forte influence sur la cinétique de la réaction.¹⁵⁹ En effet, bien que la NCL puisse être en théorie réalisée à n'importe quel point de ligation, la vitesse de réaction sera dépendante de l'encombrement du résidu portant la fonction thioester. Ainsi, les acides aminés encombrés tels que la proline ou les résidus isoleucine et valine, branchés en position β auront des cinétiques de ligation particulièrement lentes, menant à des réactions pouvant durer plus de 24h. A l'inverse, des résidus peu encombrés tels que la glycine ou l'alanine auront les cinétiques de réaction les plus rapides. De plus, les points de ligation impliquant un résidu Asn, Asp, Gln ou Glu peuvent poser des problèmes de réaction secondaires.¹⁶⁰ En effet, dans certaines conditions, une formation importante de sous-produits correspondant à la ligation du fragment C-terminal en position β ou γ de l'acide aspartique ou glutamique a été observée.¹⁶¹ Ceci est dû à la formation d'un anhydride intramoléculaire avec la chaîne latérale de ces résidus rendue possible par l'activation sous forme de thioester de l'extrémité C-terminal du peptide. Cet anhydride est ensuite ouvert par une attaque du thiol, pouvant conduire à la formation du thioester sur la chaîne latérale, comme illustré Figure 29 dans le cas de l'acide aspartique. L'anhydride peut également réagir avec l'eau et conduit alors à l'obtention de l'acide carboxylique correspondant, non réactif dans les conditions de NCL. L'activation d'une lysine sous forme de thioester peut également poser problème, puisque la chaîne latérale de ce résidu peut réaliser une lactamisation intramoléculaire durant la NCL.¹⁶²

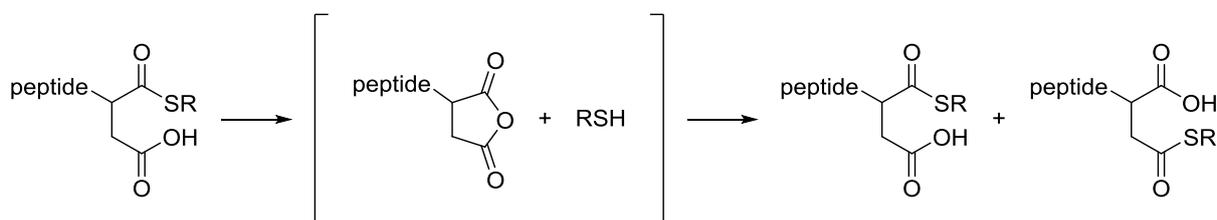


Figure 29 : migration de la fonction thioester sur la chaîne latérale de l'acide aspartique

Un autre critère déterminant pour la cinétique de la NCL est le thioester utilisé.¹⁶³ En effet, le groupe SR du thioester COSR doit former un bon groupement partant pour favoriser l'étape limitante de transthioestérification. La plupart du temps, ce thioester réactif sera formé *in situ* dans le milieu réactionnel de NCL *via* diverses méthodes (voir partie III.B.2) pour éviter son hydrolyse durant sa manipulation. Cela implique l'introduction d'un thiol externe

dans le milieu réactionnel pour mener à la formation du thioester correspondant. Ce thiol, en plus d'activer le fragment thioester, sert également à maintenir les cystéines sous leur forme réduite. De plus, dans le cas de la formation indésirée de thioesters avec les cystéines intrachâînes, ce thiol, ajouté en large excès, permet de redonner un thioester pouvant réagir avec la cystéine *N*-terminale du fragment cystéinyle. Il est donc généralement introduit en large excès dans le milieu réactionnel, généralement entre 50 et 100 équivalents par rapport au fragment à activer. Au cours d'une étude,¹⁶⁴ Johnson et Kent ont identifié l'acide mercaptophénylacétique (*mercaptophenylacetic acid*, MPAA), soluble dans l'eau, comme étant le thiol donnant les meilleurs résultats, si bien que celui-ci est désormais largement utilisé pour les réactions de NCL. En effet, cette espèce combine à la fois une formation rapide du thioester réactif à l'extrémité *C*-terminale du fragment, et une transthioestérification favorisée par son caractère de bon groupe partant. De plus, l'utilisation du MPAA permet dans certaines conditions d'exploiter les points de ligation impliquant les résidus Asn, Gln et Glu, bien que le résidu Asp reste problématique.¹⁶⁰

Avec une telle activation de l'extrémité *C*-terminale du peptide thioester, une racémisation prononcée du résidu thioester *via* la formation d'une oxazolone pourrait être crainte. Avant la généralisation du MPAA en tant qu'additif, des études ont montré que la racémisation est négligeable lorsque le thioester est formé avec du phénylméthanethiol. En particulier, la ligation impliquant une histidine, résidu particulièrement sensible à l'épimérisation, ne montre que des traces de racémisation.¹⁵⁹ De même, la NCL au point de ligation Leu-Cys, dont la cinétique particulièrement lente pourrait laisser place à l'épimérisation de la leucine, ne montre aucune trace de ce type de réaction indésirable.¹⁶⁵ Dans le cas de thioesters de MPAA, très peu de cas de racémisation ont été rapportés à ce jour, à l'exception de la sérine.¹⁶⁶

L'un des inconvénients majeurs de cette méthode est sa limitation aux points de ligation contenant une cystéine. En effet, ce résidu est plutôt rare, avec une fréquence d'apparition de seulement 1.3% dans les peptides naturels.¹⁶⁷ Ainsi, de nombreux peptides longs ne contenant pas de cystéine ne peuvent être obtenus par le biais de la NCL, de même que les peptides ayant une cystéine qui n'offre pas un point de ligation judicieux. De nombreux efforts ont ainsi été faits afin d'étendre la NCL à d'autres points de ligation. Dans ce but, Yan et Dawson ont montré pour la première fois en 2001 l'utilité de la désulfuration combinée à la NCL.¹⁶⁸ Cette stratégie consiste à muter une alanine bien placée dans le peptide en cystéine afin de s'en servir comme point de ligation. Après la NCL, la réaction de désulfuration est mise en œuvre afin de récupérer l'alanine native de la séquence (Figure 30). Dans le cas d'un peptide contenant des cystéines natives mal positionnées pour servir de point de ligation, celles-ci devront être protégées pour éviter leur désulfuration.

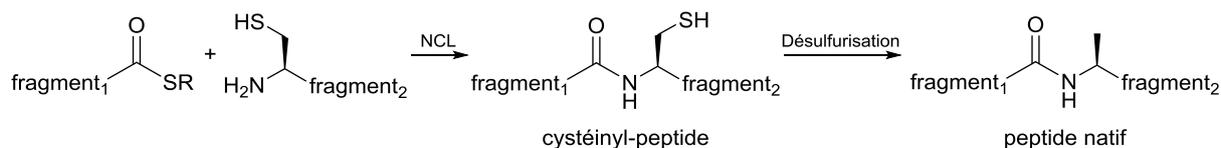


Figure 30 : stratégie de ligation-désulfuration

Initialement, la désulfuration était décrite avec des réactifs à base de métaux de types palladium ou nickel de Raney. Cependant, ces espèces impliquent également l'apparition de réactions indésirables telles que la déméthylthiolation des méthionines, et sont associées à des rendements relativement faibles causés par l'agrégation des peptides en présence du métal.^{168,167} Des méthodes de désulfuration sans métaux ont donc été décrites par la suite, basées sur un mécanisme radicalaire. Parmi elles, la plus aboutie a été décrite par Wan et Danishefsky en 2007.¹⁶⁹ Celle-ci utilise la tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) en tant que réducteur et le 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane]dihydrochloride (VA-044) en tant qu'initiateur radicalaire, tous deux solubles en milieu aqueux. Le mécanisme proposé est illustré sur la Figure 31. Pour accélérer la réaction, du 2-méthyl-2-propanethiol et de l'éthanethiol sont également ajoutés en tant que donneur d'hydrogène.

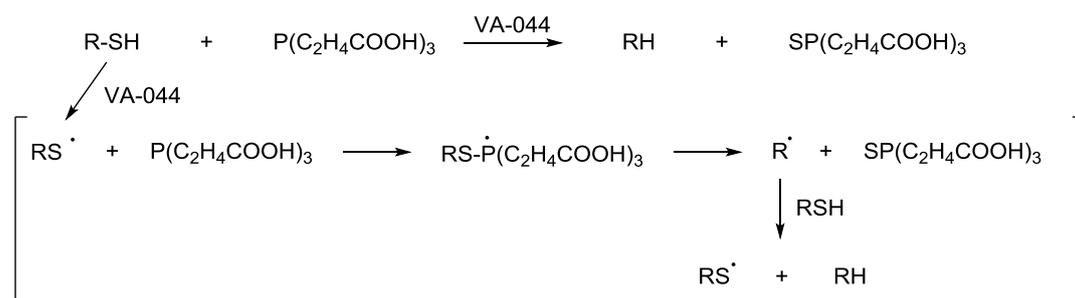


Figure 31 : mécanisme radicalaire de la désulfuration en présence de TCEP et de VA-044

De manière intéressante, cette réaction peut se faire en présence des 20 résidus naturels, et en particulier la méthionine, sans réaction secondaire. Celle-ci est de plus compatible avec les groupements protecteurs de la cystéine communément employés, que ce soit l'acétamidométhyle (Acm) utilisé pour protéger les cystéines natives de la désulfuration, ou la thiazolidine utilisée pour la protection des cystéines *N*-terminales. Ainsi, la stratégie de ligation-désulfuration a permis de largement étendre le spectre des peptides longs pouvant être obtenus par NCL. Afin d'optimiser davantage cette réaction, il a également été montré la possibilité de réaliser les réactions de ligation et de désulfuration en *one-pot*, supprimant ainsi la purification intermédiaire pour optimiser les rendements.¹⁷⁰

Pour aller plus loin, cette réaction de désulfuration a par la suite été employée à d'autres points de ligation. Ainsi, plusieurs groupes ont démontré l'utilité de cette réaction pour réaliser la NCL au niveau des résidus Arg,¹⁷¹ Asn,¹⁷² Asp,¹⁷³ Gln,¹⁷⁴ Glu,¹⁷⁵ Ile,¹⁷⁶ Leu,^{177,178} Lys,¹⁷⁹ Phe,¹⁸⁰ Pro,¹⁸¹ Thr,¹⁸² Trp,¹⁸³ ou encore Val¹⁸⁴ en utilisant des acides aminés non naturels thiolés en β ou en γ . L'inconvénient de la plupart de ces points de ligation est qu'ils nécessitent la synthèse organique multi-étapes des précurseurs thiolés. Malgré tout, ceux utilisant la proline ou la valine sont particulièrement intéressants puisqu'ils impliquent l'utilisation d'équivalents non-naturels commerciaux de ces résidus, respectivement la (2S,4R)-Mpt et la pénicillamine. De même, le point de ligation au niveau du tryptophane ne requiert pas la synthèse d'un précurseur puisque celui-ci peut être thiolé sélectivement au cours de la SPPS, ou après déprotection en solution. Sa désulfuration ne peut cependant être réalisée qu'avec du palladium.

Comme nous l'avons vu, un des points clés de la NCL est l'utilisation d'un thioester. Alors que celui-ci peut être obtenu directement par SPPS en stratégie Boc,¹⁵⁹ la déprotection répétée du groupement protecteur de l'amine avec de la pipéridine, en stratégie Fmoc, n'est pas compatible avec la fonction thioester utilisée pour accrocher le peptide à la résine. Assez rapidement après l'apparition de la NCL, plusieurs groupes de recherche ont ainsi cherché des alternatives pour l'obtention de thioesters en stratégie Fmoc.

2. Obtention de précurseurs de thioesters en stratégie Fmoc

Alors que les premières études se sont focalisées sur la synthèse du thioester voulu directement en fin de SPPS,¹⁸⁵ les recherches plus récentes se sont rapidement tournées vers l'obtention de précurseurs. Ceux-ci sont généralement stables et peuvent facilement être manipulés, contrairement aux thioesters qui s'hydrolysent, interdisant souvent leur purification. Ils sont convertis dans un deuxième temps en thioesters dans des conditions particulières, généralement *in situ* dans le milieu réactionnel de ligation. On distingue ainsi plusieurs de ces méthodes, chacune ayant ses avantages et ses inconvénients, désormais largement généralisées pour l'obtention de thioesters lors de NCLs.

a) Peptides *N*-acyl-benzimidazolinone

La première utilisation d'un précurseur de thioester dans le cadre de la NCL a été décrite par Blanco-Canosa et Dawson en 2008.¹⁸⁶ La synthèse par SPPS en stratégie Fmoc de ce précurseur, appelé peptide *N*-acyl-benzimidazolinone (Nbz), est réalisée à partir d'une résine fonctionnalisée *via* un lien amide par un acide 3,4-diaminobenzoïque (Dbz). L'élongation du peptide se fait alors sur une des deux amines pour donner à la fin de la SPPS le peptide *o*-aminoanilide correspondant attaché à la résine. De manière intéressante, le couplage du premier acide aminé sur une des amines rend la seconde moins réactive et encombrée, et cette dernière reste donc sous forme primaire tout au long de la synthèse. Le dernier acide aminé est introduit avec une protection Boc sur l'amine *N*-terminale. Cela permet l'acylation sélective de l'amine primaire de l'*o*-aminoanilide avec du *para*-nitrophénylchloroformate. L'extrémité C-terminale est alors activée par une cyclisation intramoléculaire en présence d'une base pour donner le peptide Nbz (Figure 32). Celui-ci est déprotégé et séparé de la résine par un traitement avec du TFA. Le thioester correspondant peut alors être obtenu en présence d'un thiol et isolé, ou directement généré *in situ* en présence de MPAA avant NCL.

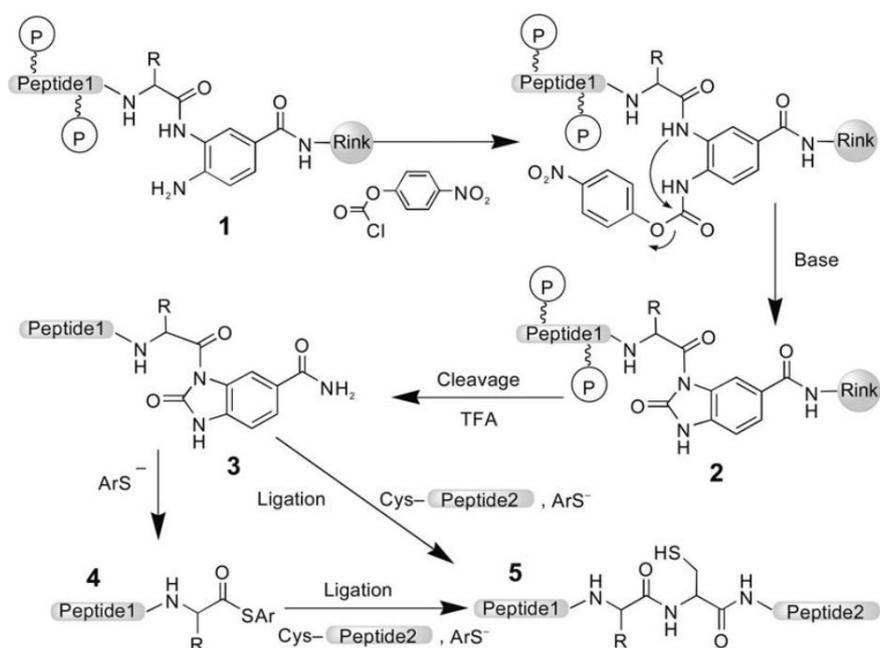


Figure 32 : obtention d'un peptide thioester via un précurseur *N*-acyl-benzimidazolone¹⁸⁶

Cette première méthode se montre ainsi efficace pour réaliser des réactions de ligations par NCL à partir de fragments synthétisés par SPPS en stratégie Fmoc. Son succès a même rendu la résine préchargée avec le groupement Dbz commerciale sous le nom de « Dawson Dbz AM resin ». En plus de donner l'accès aux peptides thioesters par Fmoc-SPPS, ce *linker* Dbz a l'avantage de pouvoir servir de support pour un tag solubilisant.¹⁸⁷ En effet, il est possible de coupler par SPPS un tel tag, par exemple (Arg)₆, avant d'installer le groupement Dbz. Après élongation du peptide hydrophobe désiré et activation, le traitement au TFA donnera le peptide lié au tag solubilisant par le Nbz, sous la forme peptide-Nbz-(Arg)₆. Celui-ci aura une solubilité dans l'eau améliorée et pourra de ce fait être plus facilement manipulé, que ce soit pour la purification ou la réaction de ligation.

Cette stratégie souffre cependant de plusieurs inconvénients. Le premier est l'obtention de deux isomères à l'issue de la SPPS, due à la présence de deux amines primaires réactives sur la résine fonctionnalisée en début de synthèse. Cela peut considérablement compliquer la purification après SPPS, en particulier dans le cas de synthèses difficiles où plusieurs peptides délétés peuvent être présents. De même, la présence d'une amine primaire sur le groupement *o*-aminoanilide du peptide en cours d'élongation peut être problématique. En effet, bien que l'amidation d'une des deux amines inactive la seconde par encombrement stérique, le couplage d'une glycine faiblement encombrée, au cours de la SPPS, risque d'acyler cette amine, en particulier avec les agents de couplage très performants.¹⁸⁸ Cela mène donc à des sous-produits correspondant à des peptides branchés *via* le Dbz et empêche l'activation avec le *para*-nitrophénylchloroformate. Pour la même raison, l'utilisation d'anhydride acétique pour des étapes de *capping* est proscrite avec cette stratégie. Pour pallier ce problème, Mahto et coll. ont proposé une protection temporaire d'une des deux amines avec un groupement allyloxy-carbonyle (Alloc).¹⁸⁸ Bien que la protection Alloc sur une des deux amines inactive légèrement la seconde, le couplage du premier acide aminé reste possible et total pour la majorité des résidus. Cette protection supprime ainsi totalement les sous-

produits décrits ci-dessus et permet les étapes de *capping*. Celle-ci implique cependant deux étapes supplémentaires : une pour l'installation et une pour la déprotection de l'Alloc.

Plus récemment, Dawson et coll. ont proposé une seconde génération de cette technologie, où l'amine en position quatre est présente sous forme méthylée.¹⁸⁹ Cette méthylation de l'amine résout les problèmes de sur-acylation par la glycine de la même manière que le groupement protecteur Alloc. De plus, le méthyle n'empêche pas l'activation du groupement Dbz avec le *para*-nitrophénylchloroformate. Pour cette même raison, il ne permet tout de même pas l'utilisation d'anhydride acétique pour les étapes de *capping*. Cette méthode a ainsi l'avantage de supprimer les étapes supplémentaires induites par l'utilisation de l'Alloc. De plus, en combinaison avec l'utilisation de MPAA, cette stratégie permet l'exploitation de tous les points de liaison à l'exception d'Asp-Cys, pour les raisons décrites précédemment.¹⁸⁹

L'obtention d'un peptide pré-activé à l'issue de la NCL demeure un inconvénient majeur de cette stratégie. En effet, comme indiqué par les auteurs de cette méthode, les peptides Nbz sont plus sensibles à l'hydrolyse que leurs équivalents thioesters.¹⁸⁹ Bien que cela ne soit pas signalé comme un problème majeur, leur manipulation doit être limitée au minimum. Malgré cette précaution, l'hydrolyse des peptides Nbz reste inévitable et constitue le point faible principal de cette méthode.

b) Peptides bis(2-sulfanyléthyl)amide

Une autre méthode d'obtention de thioesters a été décrite en 2010 à partir de peptides bis(2-sulfanyléthyl)amide.¹⁹⁰ Ces précurseurs sont synthétisés à partir d'une résine chlorotriyle fonctionnalisée par la bis(2-sulfanyléthyl)amine (Figure 33). De manière intéressante, la réaction de ce composé avec la résine en l'absence de base permet la formation sélective de liaisons avec les fonctions thiols plutôt qu'avec l'amine secondaire. Pour cela, la réactivité de l'amine est masquée par sa protonation grâce à un traitement préalable du composé avec du TFA. Cela donne ainsi un *linker* ponté lorsque le dithiol est introduit en défaut. Le couplage du premier acide aminé sur cette amine secondaire s'avère difficile et nécessite l'utilisation de l'agent de couplage PyBroP pour obtenir de bons rendements de couplage. Après SPPS, un traitement de la résine au TFA permet d'obtenir le peptide bis(2-sulfanyléthyl)amide portant deux fonctions thiols à son extrémité C-terminal. Les fonctions thiols étant libres, le peptide amide se retrouve en équilibre avec son équivalent thioester en solution. Afin de simplifier les purifications par HPLC, une oxydation des fonctions thiols pour former un pont disulfure permet de bloquer le peptide dans sa forme amide, appelée SEA^{off}.

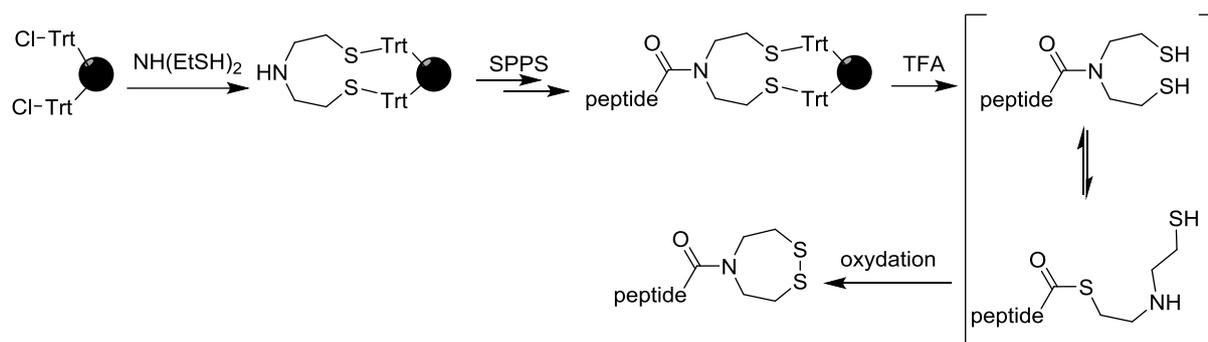


Figure 33 : obtention d'un peptide bis(2-sulfanyléthyl)amide par SPPS

Une fois dans les conditions de NCL, la présence de TCEP permet de réduire ce pont pour donner la forme réactive SEA^{on}, et la présence de MPAA initie la formation du thioester réactif. La réaction de NCL, dans ce cas appelée ligation SEA, se déroule alors avec la présence d'un second fragment cystéinyle à 37°C. La racémisation au point de ligation n'est observée qu'à l'état de traces. Les cinétiques de ligation rapportées semblent plus longues que certaines méthodes décrites, avec des temps de réactions durant environ 24h, voir sept jours pour la ligation avec la valine, particulièrement encombrée. Cela est certainement dû à l'équilibre lent et non favorable entre la forme amide et la forme thioester du peptide.¹⁹⁹ Cependant, ce point faible semble être compensé par une forte stabilité du fragment SEA, qui ne s'hydrolyse pas même lors d'une réaction prolongée.

De manière intéressante, la forme SEA^{off} n'est pas réactive dans les conditions de NCL en l'absence de TCEP. En effet, la présence de MPAA ne permet pas de réduire le pont disulfure de la fonction SEA^{off}.¹⁹¹ Ainsi, un fragment médian portant une cystéine à l'extrémité N-terminale et la fonction SEA^{off} à l'extrémité C-terminale pourra être utilisé en combinaison avec un fragment portant une fonction thioester préformée pour réaliser une première ligation. A l'issue de cette première NCL, l'addition de TCEP et d'un second fragment cystéinyle permet de réaliser la ligation SEA dans le même milieu réactionnel pour une synthèse dans la direction N- vers C-terminale.¹⁹¹ Cette stratégie à l'avantage de pouvoir être réalisée en *one-pot*, mais nécessite la formation préalable du premier fragment thioester et son isolation, avec les risques d'hydrolyse décrits précédemment. Cette méthode a cependant fait ses preuves avec la synthèse du domaine K1 de la protéine HGF,¹⁹¹ mais également son domaine N.¹⁹²

Plus tard, cette propriété de la fonction SEA^{off} a également été employée pour la synthèse de peptides longs par des ligations SEA successives sur support solide dans la direction N vers C.¹⁹³ En effet, la synthèse par SPPS d'un fragment SEA^{off} fonctionnalisé à son extrémité N-terminale par un *linker* 2-[2-(2-azido-ethoxy)éthylsulfonyl]-2-ethoxycarbonyle (N₃-Esoc)¹⁹⁴ permet sa fixation *via* ce *linker* sur un support solide (Figure 34).

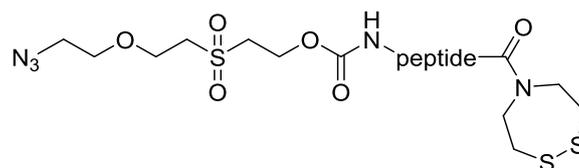


Figure 34 : peptide SEA^{off} fonctionnalisé à son extrémité N-terminale avec le linker N₃-Esoc

Afin d'être engagé dans des réactions de ligations, ce support doit être compatible avec une utilisation dans l'eau, d'où l'utilisation d'une résine polyéthylène glycol diméthyle acrylamide (PEGA). Un peptide SEA^{off} présentant le *linker* N₃-Esoc peut alors être fixé sur ce support fonctionnalisé avec un alcyne grâce à une réaction de cycloaddition azoture/alcyne catalysée au cuivre I (Cu^I-catalyzed azide/alkyne cycloaddition, CuAAC), donnant un lien triazole stable.¹⁹⁵ Une alternative consiste à utiliser une résine fonctionnalisée avec l'alcyne contraint bicyclononyne pour pouvoir réaliser la cycloaddition à pH acide et sans ajout de cuivre.¹⁹⁶ Le *linker* Esoc forme à l'extrémité N-terminale du peptide SEA^{off} un groupement sulfonylethoxycarbamate qui permet de libérer le peptide de son support solide par traitement basique, mais qui reste stable à pH acide ou neutre.¹⁹⁴ Ainsi, la fonction SEA^{off} du peptide peut être activée en SEA^{on} sur le support en présence de TCEP à pH acide. Un lavage intensif de la résine permet alors une première ligation sur le support avec un second fragment portant une cystéine et une fonction SEA^{off} à ses extrémités N- et C-terminales, respectivement. L'absence de TCEP évite ainsi l'activation de cette nouvelle fonction SEA^{off}, et donc la formation de sous-produits indésirables. Après lavages de la résine, la répétition des étapes d'activation et de ligation permet le couplage des fragments suivants. A l'issue de la synthèse, un traitement basique de la résine permet de relâcher le peptide en phase liquide. L'efficacité de cette méthode a été prouvée avec la synthèse d'un peptide de 94 résidus.¹⁹³ De manière intéressante, un peptide long synthétisé avec cette méthode peut également être récupéré avec une fonction SEA^{off} intacte pour pouvoir réaliser dans un second temps une ligation en solution avec un fragment cystéinyle. Récemment, cette stratégie a été modifiée avec l'utilisation d'un nouveau *linker* afin d'éviter l'utilisation de conditions basiques fortes pour relâcher le peptide, pouvant mener à des réactions secondaires indésirables.¹⁹⁷

c) Peptide hydrazide

Liu et coll. ont proposé en 2011 un nouveau précurseur de thioester fonctionnalisé à son extrémité C-terminale par une fonction hydrazide.¹⁹⁸ Ce précurseur peut être simplement obtenu par SPPS à partir d'une résine préalablement fonctionnalisée avec un groupement hydrazine. Initialement, les études étaient menées sur une résine Wang fonctionnalisée avec un *linker* hydrazinecarboxylate. Sur la résine Wang, cette fonction est susceptible d'être suracylée par une glycine activée durant la SPPS, menant alors à des sous-produits branchés.¹⁹⁹ Ce problème a été rapidement résolu en synthétisant les peptides hydrazides à partir d'une résine 2-chlorotriylchloride (2-CTC) préalablement traitée avec de l'hydrazine.²⁰⁰ L'encombrement stérique du groupement trityle ne permet en effet pas une suracylation de l'hydrazine. Le peptide hydrazide obtenu après séparation de la résine est stable dans les

conditions standards de manipulation, et en particulier dans les conditions de NCL. Ce crypto-thioester est activé pour réaliser la ligation *in situ* par oxydation en présence de NaNO_2 à pH acide et basse température pour donner le peptide acylazoture correspondant. Comme précédemment, ces conditions permettent l'activation sélective de l'extrémité C-terminale du peptide sans réaction secondaire sur les chaînes latérales. En présence de MPAA, cette fonction est rapidement convertie en thioester après ajustement du pH à 7 et permet la réaction de NCL.

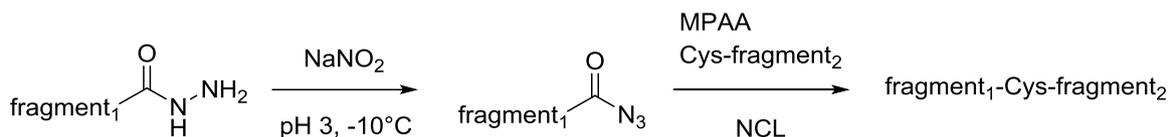


Figure 35 : réaction de NCL via l'utilisation d'un peptide hydrazide

Au vu de leur caractère de crypto-thioesters, de tels fragments peuvent être utilisés pour la synthèse de peptides impliquant trois fragments ou plus, puisque la fonction hydrazide est stable dans les conditions de NCL avant activation.²⁰¹ En effet, après activation du fragment N-terminal par le NaNO_2 , l'excès de ce réactif est consommé par ajout de MPAA. Le fragment médian ajouté par la suite n'est donc pas activé et sa fonction hydrazide reste intacte et non réactive dans les conditions de NCL. Le peptide ainsi obtenu conserve ce groupement à son extrémité C-terminale et peut de nouveau être engagé dans une réaction de ligation après activation. Cet avantage compense ainsi le fait que cette méthode d'activation soit incompatible avec le groupement protecteur Thz communément utilisé pour la protection des cystéines N-terminales. De plus, les points de ligation impliquant les résidus Asp, Asn et Gln ne sont pas envisageables avec cette méthode.¹⁹⁸ En effet, les chaînes latérales de ces résidus peuvent réaliser une cyclisation intramoléculaire avec la fonction hydrazide durant la SPPS. Ce problème a cependant récemment été résolu pour le résidu Asp, pour lequel la protection avec un groupement protecteur Allyle permet la synthèse du peptide thioester ainsi que la ligation sans réaction secondaire.²⁰² Bien que l'efficacité de cette méthode ait été montrée avec la stratégie hydrazide, celle-ci est généralisable pour supprimer la cyclisation de l'extrémité C-terminale d'un peptide thioester sous forme d'anhydride dans les conditions de NCL. Cette méthode d'obtention de précurseurs de thioesters, étant robuste, peu coûteuse et désormais très bien décrite,²⁰³ semble s'être imposée comme une des stratégies prédominantes pour l'obtention de thioesters et a été largement utilisée lors des travaux décrits dans ce manuscrit.

d) Peptides benzotriazole

Afin de résoudre le problème récurrent de la manipulation délicate des peptides Nbz, le groupe de Liu a présenté une amélioration de la méthode de Dawson en 2015.²⁰⁴ En effet, les auteurs proposent de traiter la résine Dawson de première génération avec du TFA avant activation sous forme de Nbz pour ainsi récupérer en fin de SPPS le peptide *o*-aminoanilide, aussi appelé Dbz. Sous cette forme, l'extrémité C-terminale du peptide est stable et

l'hydrolyse du Dbz en acide carboxylique n'est pas observée. Cependant, le peptide ainsi obtenu est totalement déprotégé et l'activation par le *para*-nitrophénylchloroformate n'est pas envisageable puisque les chaînes latérales nucléophiles peuvent également réagir avec ce composé. L'activation du peptide Dbz se fait alors avec du nitrite de sodium NaNO_2 à pH acide et à -10°C . Même à cette température, l'activation se fait rapidement et sélectivement sur le Dbz et donne le peptide benzotriazole correspondant. Après ajout de MPAA et élévation du pH autour de 7, le peptide est rapidement converti en thioester pour réaliser la ligation (Figure 36). De manière intéressante, cette activation se fait *in situ* dans le milieu réactionnel et évite ainsi la manipulation du peptide benzotriazole. De plus aucune réaction secondaire avec les chaînes latérales des résidus naturels n'a été rapportée.

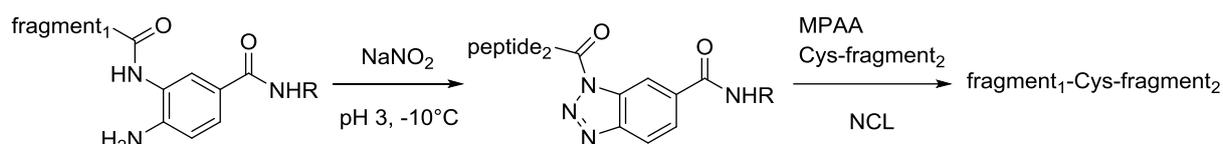


Figure 36 : réaction de NCL via l'utilisation d'un peptide benzotriazole

Comme la méthode précédente, cette stratégie est compatible avec tous les points de ligation à l'exception de celui impliquant un acide aspartique. L'avantage supplémentaire de cette méthode réside dans le fait que le peptide Dbz précurseur est stable dans les conditions de NCL et ne se convertit en thioester qu'après activation, d'où son nom de crypto-thioester. Cette particularité permet ainsi la synthèse de peptides longs à partir de trois fragments ou plus, de l'extrémité *N*- vers *C*-terminale, sans introduction de groupement protecteur de la cystéine, de la même manière qu'avec les fragments hydrazides.²⁰⁴ Pour finir, les auteurs montrent que la fonction Dbz est également stable dans les conditions de désulfuration, permettant des stratégies de synthèses complexes impliquant NCL et désulfuration.

e) Peptides *N*-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)cystéine

Assez récemment, le groupe de Aucagne a développé un nouveau crypto-thioester avec l'introduction à l'extrémité *C*-terminale d'un groupement *N*-(2-hydroxy-5-nitrobenzyl)cystéine, ou N-Hnb-Cys.²⁰⁵ Ce groupement peut facilement être introduit par SPPS automatisée en introduisant la cystéine par couplage peptidique classique puis en réalisant une amination réductrice pour installer le composé Hnb. Au début de l'étude, les auteurs ont constaté une dégradation rapide des peptides portant ce groupement, dû à son activation spontanée. Pour résoudre ce problème, la cystéine est alors introduite avec un groupe protecteur *tert*-butylethiol –*St*Bu lié à la chaîne latérale de la cystéine *via* un pont disulfure. Celui-ci est stable dans les conditions de déprotection acide utilisées à la fin de la SPPS, et est rapidement supprimé dans les conditions réductrices de la NCL, notamment en présence de TCEP. Cependant, la présence d'une cystéine avec un tel groupement protecteur à l'extrémité *C*-terminale favorise la β -élimination du groupement thiol ainsi que la racémisation du résidu.²⁰⁶ L'incorporation d'une glycine en *C*-terminal avant la cystéine permet de résoudre simplement ce problème, sans conséquence sur la réactivité du groupement lors de la NCL. De manière intéressante, cela ouvre également la porte à l'introduction de tag solubilisant à

l'extrémité C-terminale, comme décrit précédemment avec la stratégie de Dawson, sous réserve que celui-ci n'impacte pas la réactivité. Comme montré par Alewood,²⁰⁷ la fonction alcool du Hnb assiste l'introduction du premier résidu de la séquence lors de la SPPS, *via* un mécanisme de *O-to-N acyl shift* intramoléculaire favorisé par la présence du groupement nitro en *para* de l'alcool (Figure 37). Cela facilite ainsi l'acylation de l'amine secondaire de la cystéine, sans quoi la difficulté de ce couplage serait un frein notable à cette méthode. Avec ce dispositif, la majorité des vingt acides aminés naturels se couplent avec de très bons rendements, bien que les résidus les plus encombrés nécessitent la répétition du couplage ou le chauffage du milieu réactionnel. Au contraire de la méthode hydrazide, aucun résidu ne cause de réaction secondaire détectable.

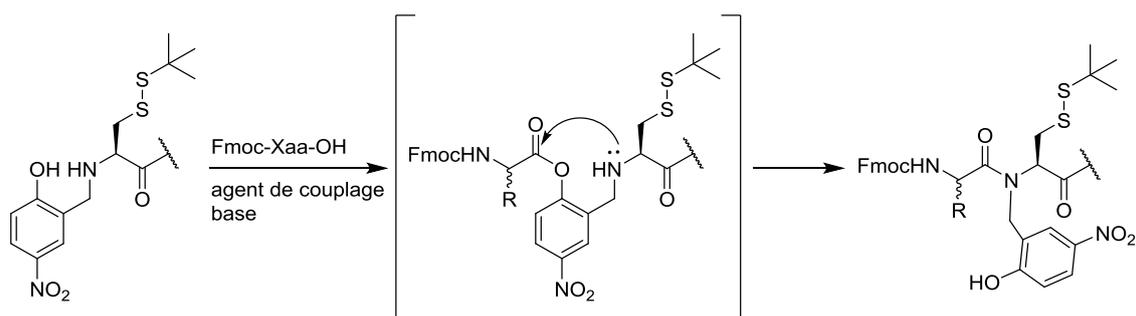


Figure 37 : mécanisme du *O-to-N acyl shift* assisté par le groupement Hnb lors de la synthèse d'un peptide N-Hnb-Cys.

A nouveau, l'alcool du N-Hnb-Cys représente la clé du mécanisme de formation du thioester dans le milieu de NCL. En effet, après déprotection de la Cys(StBu) par le TCEP, le groupement thiol se cyclise à pH neutre par une attaque sur le lien amide. Le pK_a proche de 7 de l'alcool permettrait alors de protoner l'azote impliqué pour finalement mener à un *N-to-S acyl shift* et ainsi former le thioester correspondant (Figure 38). Ce mécanisme a plus tard été confirmé par des études plus poussées.²⁰⁸

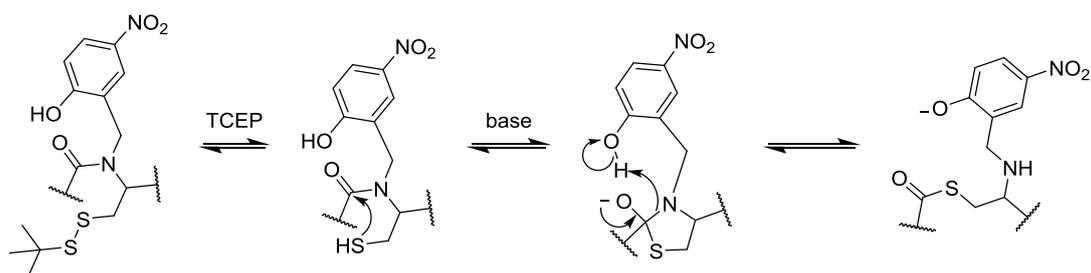


Figure 38 : mécanisme de la formation du thioester avec le groupement N-Hnb-Cys

En présence de MPAA, cette stratégie permet d'obtenir des cinétiques de ligation similaires à celles observées lors de l'utilisation de thioesters préformés, confirmant un mécanisme de *N-to-S acyl shift* rapide. De plus, les produits secondaires correspondant à l'hydrolyse du thioester ou à la racémisation du résidu portant cette fonction ne sont observés qu'à l'état de traces. Son efficacité a ainsi été démontrée par le groupe avec la synthèse de

deux peptides longs,²⁰⁵ mais également pour la cyclisation de peptides riches en cystéines.²⁰⁹ De plus, l'utilité de cette stratégie a été démontrée pour l'introduction d'une cystéine à l'extrémité C-terminale de peptides sans les réactions secondaires associées à la SPPS.²¹⁰ Lors de l'exploitation de cette méthode, De Rosa et coll. ont montré que la fonction alcool du Hnb, non protégée durant la SPPS, était susceptible de réagir avec les résidus activés introduits lors de la SPPS.²¹¹ Malgré cela, l'utilisation généralisée de larges excès d'acides aminés permet tout de même le couplage du résidu à l'extrémité N-terminale sans réelle compétition de la fonction alcool. De plus, les traitements basiques répétés après chaque couplage hydrolysent les liens esters formés et permettent d'obtenir la fonction alcool désirée en fin de SPPS. Une attention particulière doit cependant être portée aux couplages impliquant des résidus coûteux, généralement couplés en faible excès.

Cette méthode, de par son mécanisme, ne nécessite pas de réelle étape d'activation à l'inverse des méthodes décrites précédemment. Cette simplicité d'utilisation ainsi que son efficacité en font une nouvelle méthode de choix pour réaliser les réactions de NCL. Celle-ci nécessite cependant l'introduction de deux acides aminés supplémentaires en début de synthèse et l'installation du Hnb, ce qui implique un coût certainement plus élevé que la méthode hydrazide, par exemple.

Les stratégies décrites ci-dessus constituent les principales méthodes d'obtention de précurseurs de thioesters pouvant être engagés dans des réactions de NCL. Selon leur ancienneté, ces méthodes ont été plus ou moins largement appliquées pour la synthèse de peptides longs, et toutes présentent des avantages qui leurs sont propres. Ces méthodes s'avèrent complémentaires, si bien que le choix d'une méthode en particulier peut s'avérer judicieux pour un cas donné. Enfin, la combinaison de ces méthodes pour des synthèses à partir de trois fragments ou plus peut également mener à des résultats particulièrement intéressants, notamment dans le cas de stratégies convergentes.²¹¹

La synthèse par NCL se prête particulièrement bien à l'obtention des toxines. En effet, celles-ci sont très riches en cystéines et offrent donc de nombreux points de ligation. Outre les toxines longues, les séquences de certaines d'entre-elles, bien que courtes, peuvent s'avérer difficiles à obtenir par SPPS. Opter pour la synthèse de plusieurs fragments ensuite liés par NCL peut ainsi être un choix judicieux.^{84,212} Après obtention de la séquence linéaire d'une toxine, une étape importante d'oxydation des cystéines pour former les ponts disulfures doit être accomplie.

C. Formation de ponts disulfures

L'obtention de l'activité biologique recherchée d'une toxine synthétique dépend principalement de la reproduction de la structure tridimensionnelle naturelle de la toxine, elle-même étant impactée par la formation des ponts disulfures natifs.²¹³ En effet,

l'appariement correct des cystéines permet de stabiliser la structure tridimensionnelle de la toxine dans sa conformation bioactive en induisant des restrictions conformationnelles.²¹⁴ De manière statistique, un peptide contenant quatre cystéines pourra former trois isomères oxydés différents, six cystéines donneront 15 appariement distincts, et huit cystéines pourront mener jusqu'à 105 isomères différents. L'étape de formation des ponts, cruciale dans la synthèse d'un peptide riche en cystéines, est donc bien souvent la plus complexe. Cette étape est appelée repliement oxydatif, et correspond au processus durant lequel un peptide réduit et non replié acquiert à la fois son appariement de cystéines natif et sa conformation correcte pour donner sa structure tridimensionnelle native.²¹⁵ Il existe ainsi un lien étroit entre la formation des ponts et le repliement de la chaîne peptidique, tous deux étant interdépendants durant ce processus.

Pour mener à bien le repliement oxydatif d'un peptide riche en cystéines tel qu'une toxine, deux stratégies principales existent.²¹⁴ La première, appelée repliement oxydatif direct, consiste en la formation simultanée des ponts disulfures à partir du peptide linéaire réduit dans lequel toutes les cystéines sont libres. La seconde, appelée formation dirigée de ponts disulfures, consiste à oxyder successivement les cystéines deux par deux de manière régiosélective grâce à des jeux de groupements protecteurs orthogonaux des cystéines. Au vu du caractère laborieux de ce dernier procédé, le repliement oxydatif direct est généralement préféré dans un premier temps. Celui-ci peut cependant mener à la formation de multiples isomères, dont un seul aura la bonne configuration de ponts. Le succès de cette méthode dépend de nombreux paramètres et les conditions d'oxydation doivent donc être judicieusement sélectionnées. Dans le cas où cette stratégie échoue, l'oxydation dirigée sera alors une alternative prometteuse.

1. Repliement oxydatif direct

Le repliement oxydatif direct consiste à replier un peptide linéaire riche en cystéines et à former les différents ponts disulfures de manière concomitante. Comme son nom l'indique, la formation d'un pont disulfure est une réaction d'oxydation impliquant deux cystéines. Cette réaction est généralement accomplie *in vitro* par deux mécanismes différents (Figure 39).²¹⁴

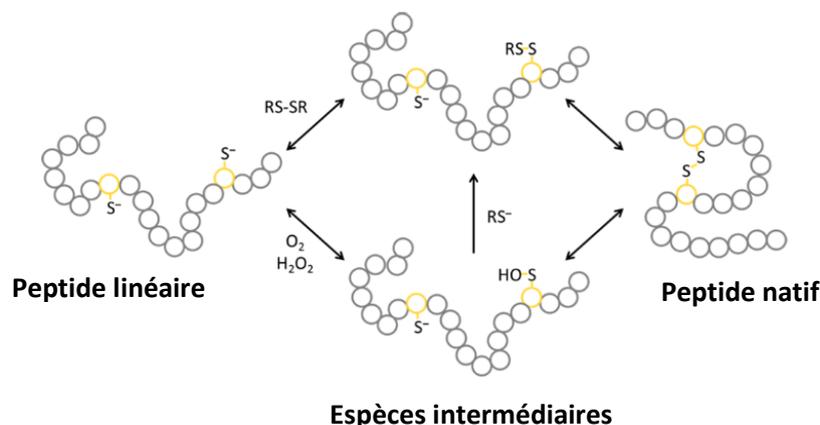


Figure 39 : mécanismes de formation d'un pont disulfure. Adapté de la référence 214

La première utilise des molécules organiques contenant un pont disulfure, par exemple le glutathion oxydé ou la cystine, en tant qu'agent oxydant. La formation du pont disulfure passe alors par un pont disulfure mixte entre le peptide et cet agent à partir de la forme thiolate d'une des cystéines, suivi d'un échange thiol-disulfure menant à un réarrangement de pont intramoléculaire par l'attaque nucléophile d'un second thiolate. La formation du composé mixte dépend principalement de la concentration en groupement thiolate, et donc du pH du milieu. L'échange thiol-disulfure est lui régi thermodynamiquement par la conformation de la chaîne peptidique. En effet, l'échange de pont disulfure est possible grâce à la proximité entre le thiolate et le pont disulfure, qui permet une délocalisation de la charge négative entre les trois atomes de soufre.²¹⁵ Ainsi, l'efficacité de l'échange dépendra de cette proximité, et donc du repliement de la chaîne. La seconde voie fait appel à des agents électrophiles de type dioxygène ou diméthyle sulfoxyde (DMSO).²¹⁴ Dans le cas du dioxygène, le thiolate est d'abord oxydé en acide sulfénique. L'atome de soufre, alors rendu suffisamment électrophile, est ensuite attaqué par un deuxième thiolate intramoléculaire pour former le pont. Le cas le plus courant correspond généralement à un milieu contenant un additif disulfure en présence du dioxygène de l'air. Ces deux mécanismes coexistent alors, avec notamment la possibilité de former un pont disulfure mixte à partir de la cystéine sous forme d'acide sulfénique.

Dans le cas d'un peptide contenant plusieurs ponts disulfures, ces mécanismes vont mener à la formation d'intermédiaires partiellement oxydés présentant des ponts natifs et non-natifs. Selon leur stabilité, ceux-ci pourront alors de nouveau être attaqués par un groupement thiolate intramoléculaire pour mener à la formation d'un nouveau pont, plus stable (*scrambling*). Le processus de repliement oxydatif se déroule alors par la formation de ponts disulfures, leur réduction et leur échange, tout en impliquant un changement de structure tridimensionnelle au fur et à mesure que les ponts se forment.²¹⁶ Bien que de nombreux facteurs influencent le repliement oxydatif, quatre sont prédominants : la proximité, la réactivité et l'accessibilité des sulfures au cours du processus, et la concentration en groupement thiolate.^{214,217} La proximité est déterminée par la capacité de la chaîne à se replier pour rapprocher les cystéines. La réactivité est principalement affectée par l'environnement électrostatique des fonctions thiols et disulfures. L'accessibilité des thiols et des ponts disulfures semble être le paramètre le plus déterminant, puisque l'échange thiol-disulfure n'est possible que lorsque ces deux fonctions sont proches. Avec le paramètre de proximité, l'accessibilité est le facteur le plus impacté par la formation de structure tertiaire. Celles-ci vont en effet avoir tendance à exposer ou masquer les fonctions thiols et disulfures, permettant ou non l'échange thiol-disulfure. Ainsi, les intermédiaires non-natifs vont en général être peu structurés et donc permettre cet échange. A l'inverse, les intermédiaires natifs vont acquérir localement la structure compacte recherchée, et ainsi sécuriser les ponts natifs en les masquant.²¹⁵

Le processus de repliement peut donc être vu comme un entonnoir où le désordre, appelé entropie, d'un peptide réduit et non replié, mène progressivement à la conformation native, structurée et de faible énergie (Figure 40).²¹⁷ Ce profil énergétique varie largement selon les intermédiaires formés. Cette diversité peut être représentée par deux peptides largement utilisés comme support lors d'études de repliement : la BPTI (*bovine pancreatic*

trypsin inhibitor),²¹⁸ contenant 58 résidus et trois ponts disulfures, et l'hirudine de 49 acides aminés et trois ponts disulfures.²¹⁹ Les intermédiaires à un et deux ponts formés lors du repliement oxydatif de la BPTI seront peu nombreux et présenteront majoritairement les ponts disulfures natifs, menant directement à la structure native finale (Figure 40a). À l'inverse, le repliement de l'hirudine est caractérisé par la formation de nombreux isomères partiellement oxydés, menant à plusieurs structures natives et non-natives à trois ponts (Figure 40b). L'obtention de la structure native se fait alors par une étape dite de consolidation, où les intermédiaires non-natifs subissent réductions et réarrangements de ponts.

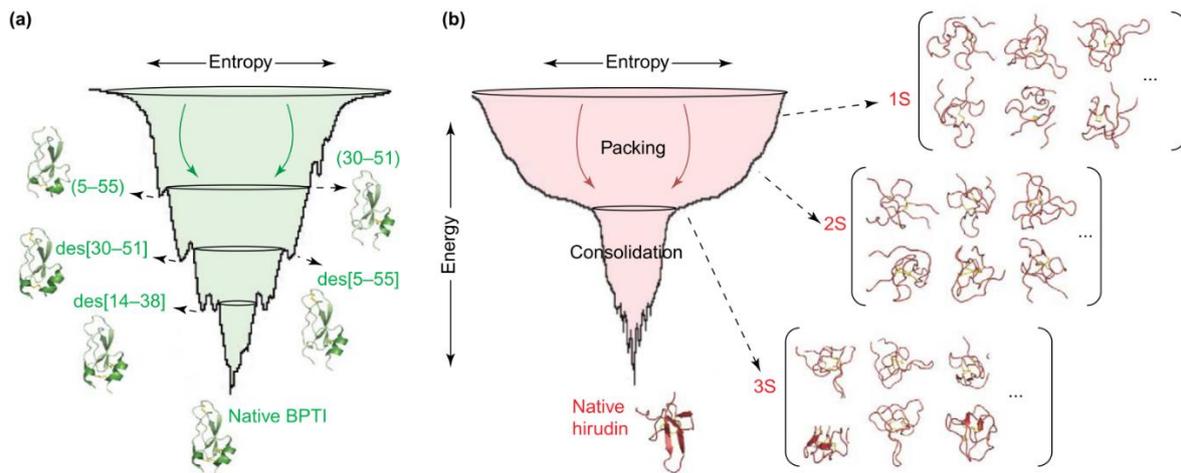


Figure 40 : représentation schématique des profils énergétiques du repliement oxydatif.²¹⁷ (a) correspond à la BPTI. L'appariement des cystéines des intermédiaires à un pont est écrit entre parenthèses. Le pont manquant dans les intermédiaires à deux ponts est signalé par des[X-X]. (b) correspond à l'hirudine. Les intermédiaires à un, deux et trois ponts sont signalés par 1S, 2S et 3S, respectivement.

De par cette diversité de mécanismes, la généralisation de méthodes expérimentales de repliement oxydatif est impossible à l'heure actuelle. L'unique paramètre généralement invariant correspond à la forte dilution du peptide à replier, afin de favoriser des réactions de réarrangements thiols-disulfures intramoléculaires et non intermoléculaires.²¹⁴ D'après les facteurs physico-chimiques influençant le repliement, plusieurs paramètres expérimentaux vont impacter le bon déroulement du repliement *in vitro*.²²⁰ Le premier paramètre est le choix de l'agent oxydant. En effet, la nature de celui-ci et sa concentration vont avoir un impact direct sur la formation de ponts disulfures mixtes et les réarrangements thiols-disulfures. Il est ainsi possible de tester différents agents oxydants (glutathion, cystéine, etc...), mais également différents ratios du couple oxydo-réducteur correspondant. Le second et le troisième paramètre sont interdépendants et correspondent au pH et à la durée de repliement. Le pH va avoir une influence directe sur le rapport thiol/thiolate : au-dessus du pK_a du thiol (8,7), la concentration locale en thiolate sera élevée et permettra une oxydation rapide des cystéines.²²¹ À l'inverse, diminuer le pH permettra de réduire la vitesse de réaction pour favoriser les produits thermodynamiques. En fonction du pH, la durée de réaction devra être adaptée. Une réaction suffisamment longue laissera le temps aux réarrangements des différents intermédiaires, processus relativement lent, de se produire. Cependant, une

réaction trop longue peut également mener à la précipitation des intermédiaires partiellement oxydés plus rapidement qu'à la formation de la conformation native.²²⁰ La température, la force ionique et le choix de l'espèce tamponnant le milieu vont également avoir une forte influence sur le bon déroulement du repliement. Enfin, la présence d'additifs tels que des détergents, des agents dénaturants ou des co-solvants organiques va avoir une importance. Le bénéfice de leur présence peut être testé à concentration fixe dans un premier temps, puis la concentration des espèces les plus utiles au repliement pourra être ajustée plus finement. En particulier, le chlorure de guanidinium (Gn.HCl) va stabiliser ou déstabiliser les structures tridimensionnelles à faible ou forte concentration, respectivement.²²² Celle-ci peut donc être employée lors du repliement oxydatif à différentes concentrations pour radicalement changer le cours du repliement oxydatif.

Ainsi, chaque peptide riche en cystéines, et en particulier chaque toxine, devra faire l'objet d'un *screening* de ces paramètres pour déterminer les conditions optimales de repliement.²²⁰ L'impact de certains de ces paramètres est largement visible avec l'exemple du repliement oxydatif de l'hirudine (Figure 41).

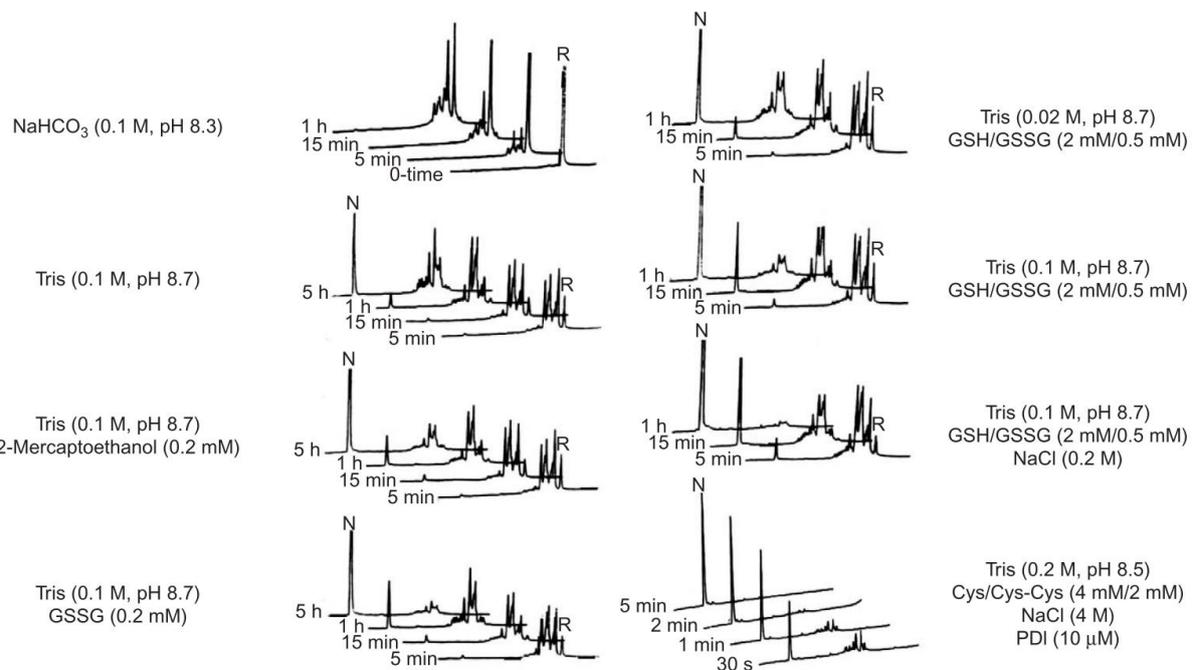


Figure 41 : repliement oxydatif de l'hirudine dans différentes conditions expérimentales. Sur les chromatogrammes, R représente l'hirudine réduite non repliée, N l'hirudine native. Tris correspond au tris(hydroxyméthyl)aminométhane, GSH au glutathion réduit et GSSG au glutathion oxydé, et PDI à la protéine disulfure isomérase.^{219,217}

Dans certains cas, même un *screening* rigoureux des conditions de repliement ne permettra pas l'obtention majoritaire de la configuration native. C'est le cas lorsque certains intermédiaires se retrouvent piégés dans une configuration stable ou précipite, ne permettant pas de réarrangement. Dans ce cas de figure, suivre une stratégie de formation dirigée de ponts disulfures peut s'avérer être une alternative productive.

2. Formation dirigée de ponts disulfures

La formation dirigée de ponts disulfures, ou repliement régiosélectif, est généralement employée lorsque la stratégie de repliement oxydatif direct ne donne pas de résultats satisfaisants. Cette méthode a en effet l'avantage d'imposer un appariement de cystéines donné ainsi que l'ordre dans lequel sont formés les ponts, donnant généralement *in fine* la conformation voulue. L'inconvénient principal de cette méthode est son caractère laborieux. En effet, le nombre d'étapes nécessaires à sa mise en place est démultiplié par le nombre de ponts à former. De plus, l'ordre d'enchaînement des ponts va avoir une importance capitale sur le rendement total de la stratégie.²²³ Pour un peptide à trois ponts dans une configuration donnée, six enchaînements différents sont par exemple possibles. Il peut ainsi être nécessaire de tester plusieurs enchaînements avant d'obtenir des résultats corrects.

a) Principe

Le repliement dirigé consiste à former les ponts disulfures un par un grâce à des paires de groupements protecteurs orthogonaux de la cystéine.²²⁴ Le peptide voulu est synthétisé par SPPS avec les cystéines destinées à être appariées protégées avec un même groupement. Il faudra ainsi autant de types de groupements protecteurs orthogonaux que de ponts à former. Par la suite, chaque paire de cystéines sera successivement déprotégée et oxydée pour former les ponts disulfures de manière régiosélective, comme illustré sur la Figure 42 pour un peptide contenant trois ponts disulfures.

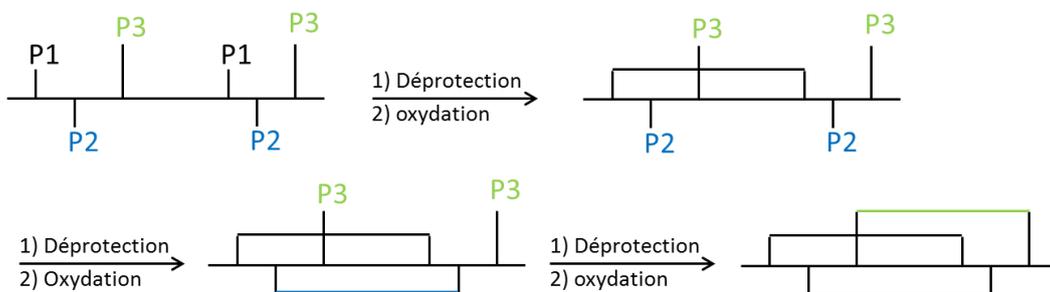


Figure 42 : stratégie générale de la formation dirigée de ponts disulfures dans le cas d'un peptide à trois ponts. P_1 , P_2 et P_3 représentent trois groupes protecteurs orthogonaux de la cystéine.

En général, les cas les plus fréquents dans lesquels une telle stratégie est adoptée sont les peptides à deux et trois ponts disulfures. En effet, la mise en place d'une telle stratégie pour un peptide à deux ponts ne requiert que peu d'étapes supplémentaires pour un bénéfice certain. Le repliement oxydatif des peptides à trois ponts est le cas où le plus d'échecs sont constatés et où le repliement dirigé s'impose. Pour les peptides à quatre ponts en revanche, le repliement dirigé s'avère complexe pour un bénéfice souvent négligeable par rapport au repliement oxydatif classique. En effet, il a été observé qu'avec un nombre croissant de ponts disulfures, le repliement oxydatif direct donne généralement des résultats satisfaisants.²²⁴ Enfin, le repliement régiosélectif se fait très communément en solution,²²⁵ bien que certaines

stratégies dans lesquelles le ou les premiers ponts sont formés sur résine aient été décrites.^{226,227}

Au cours du repliement régiosélectif, l'échange thiol-disulfure doit être réduit au minimum pour éviter le *scrambling*, conduisant à la formation d'isomères non désirés. Cela passe par des conditions expérimentales judicieusement choisies aussitôt qu'une paire de cystéines est déprotégée en présence d'un premier pont disulfure. Ainsi, l'addition de thiols externes, l'exposition à un pH basique et des temps de réactions longs sont autant de facteurs à éviter pour réduire le scrambling.⁷⁸ Lorsque deux cystéines libres doivent être appariées en présence d'un ou plusieurs ponts disulfures, l'oxydation au DMSO, efficace et rapide à pH acide,²²⁸ sera par exemple préférée par rapport à l'oxydation avec du dioxygène. Le DMSO joue de plus le rôle de co-solvant organique et permet de maintenir les peptides hydrophobes solubles en empêchant la formation d'agrégats.²²⁴ De même, certains groupements protecteurs permettront simultanément la déprotection et l'oxydation des cystéines de manière régiosélective.

Lors de l'élaboration d'une stratégie de repliement dirigé, deux facteurs sont d'une grande importance pour obtenir des résultats satisfaisants : le choix des groupements protecteurs de la cystéine et leur position. Le choix des groupements protecteurs va être orienté par leur orthogonalité, mais également par leur facilité de déprotection. En particulier, les conditions de déprotection devront être suffisamment douces pour ne pas causer de *scrambling* ou de réactions secondaires sur l'ensemble des résidus présents sur la chaîne. Pour cette même raison, la position des groupements protecteurs va avoir une forte influence sur les rendements finaux, puisque certains groupes pourront causer des réactions indésirables lorsqu'ils sont adjacents à des résidus sensibles. De plus, un groupement protecteur donné peut être stable aux conditions de déprotection d'un second, sans que l'inverse soit vrai. La position relative de chaque paire de groupements protecteurs va donc souvent déterminer l'ordre de formation des ponts. Vu le nombre important de groupements protecteurs de la cystéine existants, ceux-ci doivent donc être minutieusement examinés pour élaborer une stratégie de repliement dirigé efficace.

b) Groupements protecteurs de la cystéine

Au vu des dizaines de groupements protecteurs de la cystéine existants,^{229,230} seules les cystéines protégées disponibles commercialement les plus utilisées et adaptées à la stratégie Fmoc seront abordées ici. Par ailleurs, de nombreux groupements protecteurs sont sensibles aux acides plus ou moins forts, faisant de la SPPS en stratégie Fmoc une méthode de choix pour la synthèse de peptides protégés orthogonalement sur les cystéines.²²⁴ Parmi cette sélection, on retrouve principalement les groupements protecteurs trityle (Trt), Acm, méthoxybenzyle (Mob), *tert*-butyle (*t*Bu), *St*Bu et certains de leurs dérivés respectifs, et plus récemment le 4,4'-diméthylsulfinylbenzhydryle Msbh (Figure 43).

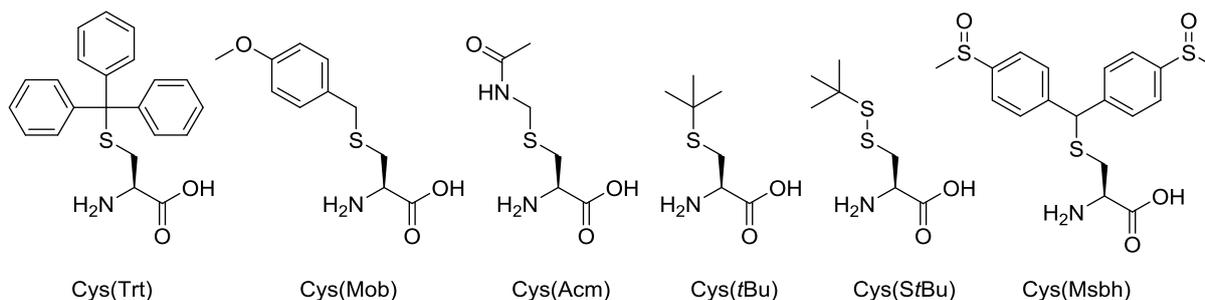


Figure 43 : groupements protecteurs de la cystéine employés pour la formation dirigée de ponts disulfures

Avant même d'évaluer la pertinence de ces groupements pour le repliement régiosélectif, plusieurs paramètres généraux doivent être considérés. Le premier concerne la racémisation de la cystéine durant la SPPS. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la cystéine est un des résidus les plus susceptibles de s'épimériser au cours de la synthèse sur support solide.¹⁴⁷ Le groupement protecteur de la cystéine est alors un paramètre qui détermine la propension à racémiser. Pour les groupements les plus courants, la facilité de racémisation est $StBu > Trt > Acm > Mob > tBu$.²²⁹ Les conditions de couplages doivent ainsi être adaptées pour minimiser autant que possible la racémisation des cystéines portant les groupes les plus sensibles.¹⁴⁸ Une autre réaction secondaire à prendre en compte est la formation d'aspartimide quand la cystéine est précédée par un acide aspartique ou une asparagine dans la séquence. Bien que cette réaction indésirable soit minimisée avec une Cys(Trt), celle-ci peut être favorisée par d'autres groupements protecteurs tels que l'Acm.²³¹ Si possible, il faudra ainsi éviter de placer une Cys(Acm) adjacente à l'acide aspartique. En particulier, cela peut s'avérer particulièrement problématique lorsqu'une étude systématique sur l'ordre d'enchaînement des ponts est entreprise. Une dernière réaction secondaire à prendre en compte est la β -élimination du groupement thiol, catalysée en SPPS en stratégie Fmoc par la pipéridine et menant à la formation d'une pipéridinyle alanine (Figure 44). Cette réaction est particulièrement prépondérante lorsqu'une cystéine est présente à l'extrémité C-terminale et protégée par les groupements Acm ou StBu.^{206,229} Ici encore, il faudra éviter de placer ces groupements protecteurs à l'extrémité C-terminale, au profit des groupements protecteurs Trt ou Mob par exemple.

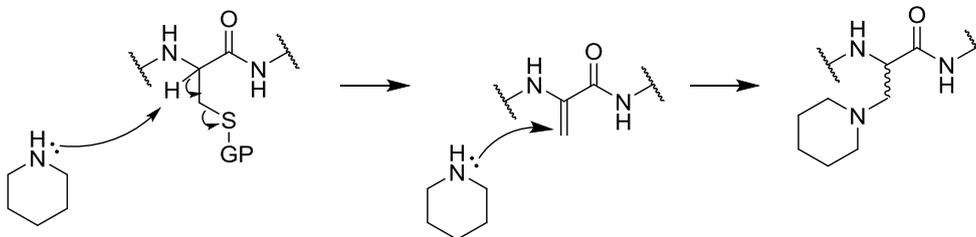


Figure 44 : β -élimination du groupement thiol protégé de la cystéine en présence de pipéridine. GP représente un groupement protecteur.

Le Trt est le groupement protecteur de la cystéine classiquement utilisée pour la SPPS en stratégie Fmoc. Celui-ci est éliminé par 25% de TFA en même temps que le décrochage du

peptide de la résine.²²⁵ A partir d'une paire de Cys(Trt), un pont peut ainsi être formé dans un tampon oxydant de la même manière que le repliement classique, en présence de dioxygène ou de DMSO par exemple. Malgré tout, cette étape peut prendre plusieurs heures.²²⁸ Dans ces cas-là, l'addition de certains réactifs permet la formation du pont disulfure en quelques minutes seulement, à l'image du 2,2'- ou 4,4'-dithiodipyridine (DTP)²³² ou plus récemment du *N*-chlorosuccinimide (ce dernier étant cependant incompatible avec les peptides contenant des méthionines déprotégées lorsqu'il est utilisé en excès).²³³ Dans le cas de la synthèse des α -conotoxin CIA et CIB, la formation du premier pont disulfure est réalisée en cinq minutes en présence de 2,2'-dithiodipyridine, contre 24 heures lors d'une oxydation à l'air, pour des taux de conversion similaires.²³⁴ Ces réactifs étant efficaces à pH acide, ils peuvent de plus être employés en présence de ponts disulfures tout en minimisant le *scrambling*.²²⁴ Étonnamment, leur usage ne reste cependant qu'anecdotique.

La cystéine portant le groupement protecteur StBu, également commerciale, se déprotège en conditions réductrices. Bien que cela empêche son utilisation en présence d'autres ponts disulfures, celle-ci peut être déprotégée sur résine pour former un premier pont disulfure avant décrochage du peptide.²³⁵ Avec une résine adaptée, un dérivé du Trt, le 4-méthoxytrityle (Mmt), peut également être employé pour la formation d'un pont sur résine.²³⁶ En effet, ce groupement se déprotège à 1% de TFA, pourcentage auquel le peptide reste accroché sur certains types de support. Cela le rend également orthogonal au diphénylméthyle par exemple, qui se déprotège à des concentrations plus élevées en TFA. Le pont peut alors être formé sur résine avec du DMSO. Cette méthode tire parti du phénomène dit de pseudo-dilution, où le support solide va se comporter localement comme une solution diluée par rapport aux chaînes peptidiques.²³⁷ Cela permet donc, en fonction du taux de chargement de la résine, la formation de ponts disulfures intramoléculaires plutôt qu'intermoléculaires.

La Cys(Acm) est également largement employée pour la formation dirigée de ponts disulfures.²²⁵ Ce groupement protecteur est en effet stable aux conditions de la SPPS en stratégie Fmoc ainsi qu'au TFA. Cependant, le succès de la synthèse de peptides contenant des Acm par SPPS dépend fortement de leurs positions, et une permutation des paires de Cys(Acm) et Cys(Trt), par exemple, peut largement faire varier les rendements de synthèse.²²⁵ Bien que les conditions de déprotections initialement décrites utilisent des réactifs à base de métaux,²³⁸ les méthodes de déprotection largement employées aujourd'hui exploitent le diiode.^{224,239,240} Ces conditions permettent la déprotection et l'oxydation simultanées et rapides d'une paire de cystéine portant ce groupement, évitant ainsi une étape d'isolation intermédiaire. Le *scrambling* est de plus limité pourvu que les temps de réactions restent courts.²³⁹ Ce mécanisme en deux étapes passe par la formation d'un intermédiaire iodure de sulfényle RSI qui pourra réaliser une attaque électrophile sur une seconde cystéine, protégée par un Acm ou sous forme d'iodure de sulfényle.²³⁹

Cependant, outre la formation d'aspartimide favorisée avec la Cys(Acm), plusieurs autres réactions secondaires ont été décrites lors de la déprotection par l'utilisation du diiode. Tout d'abord, des adduits d'iode sur les Tyr, His et Trp peuvent être observés dans certaines conditions, de même que l'oxydation du cycle indole du Trp. Cela dépend notamment du

solvant utilisé.²³⁹ L'addition de tryptophane libre dans le milieu réactionnel en tant que *scavenger* peut permettre d'éviter de telles réactions secondaires sur ce résidu.²⁴¹ De plus, un intermédiaire iodure de sulfényle peut également réagir avec le cycle indole de ce résidu pour former un thioindole stable, comme constaté lors de la synthèse de la relaxin-3 par exemple.²⁴² Comme l'ont montré les auteurs de cette étude, cette réaction secondaire dépend principalement de l'accessibilité et de la proximité spatiale du cycle indole et de la cystéine, et donc par extension de la séquence peptidique et de sa flexibilité.^{243,240} L'oxydation des chaînes latérales des résidus Met est également une réaction secondaire envisageable, qui n'est cependant pas observée dans des conditions suffisamment douces.²³⁹ Par ailleurs, il a été constaté une migration du groupement Acm sur les chaînes latérales des résidus Ser et Thr,²⁴⁴ Asn et Gln durant sa déprotection,²⁴⁵ et sur le résidu Tyr lors du décrochage du peptide de la résine en milieu acide.²⁴⁶ L'addition de *scavengers* lors de la déprotection à l'iode tels que le glycérol et la glutamine libre permet de réduire la formation de tels adduits sur les chaînes latérales alcools et amides, respectivement. Pour la tyrosine en revanche, cet adduit se forme sur le cycle aromatique durant le traitement de la résine au TFA. Il faudra ainsi éviter de placer une Cys(Acm) adjacente à une tyrosine. De manière générale, des temps de réactions courts ainsi qu'une titration au diiode plutôt qu'un excès de réactif permettent de minimiser voire de supprimer la quasi-totalité de ces réactions indésirables, de même que le *scrambling* en présence d'autres ponts disulfures.^{225,239} Le solvant utilisé et le pH sont également deux facteurs importants, et un pH acide sera généralement préféré.²²⁴ Le phénomène de *scrambling* peut tout de même être occasionnellement observé, d'autant plus lorsque la configuration non-native d'un peptide est recherchée.²⁴⁰

Le Mob est un autre groupement protecteur largement employé pour les stratégies de repliement dirigé.²²⁵ Ce groupe est stable au TFA et dans une moindre mesure au diiode.²²⁹ Plus labile en milieu acide que son homologue 4-méthylbenzyle (Meb), il est classiquement déprotégé avec 10 % d'acide trifluorométhanesulfonique (TFMSA) dans le TFA en présence d'un *scavenger*, généralement le *p*-crésol ou le phénol, pour donner la cystéine libre sous sa forme réduite.²⁴⁷ De plus, conduite à 0°C, cette réaction ne provoque pas la formation de sous-produits majeurs. Ces conditions acides ont l'avantage de minimiser le *scrambling* lors de la mise en place de stratégie de formation dirigée de ponts disulfures. Après déprotection des groupements Mob, la formation d'un pont disulfure peut alors se faire à pH acide en présence de DMSO par exemple. De plus, il a été montré qu'une paire de Cys(Mob) peut être déprotégée de manière oxydative dans un mélange DMSO/TFA pour donner le pont disulfure correspondant à température ambiante.²⁴⁸ Il en va de même pour le Meb à une température plus élevée,²⁴⁹ pouvant cependant provoquer des réactions secondaires sur les résidus Trp et Met.²⁴⁸ Plus récemment, il a également été montré que le 2,2'-DTP et le 2,2'-dithiobis(5-nitropyridine) (DTNP) peuvent également déprotéger les Cys(Mob) dans le TFA en présence de thioanisole.²⁵⁰ Cette méthode permet notamment d'éviter la sur-oxydation des cystéines et l'oxydation des méthionines par le DMSO. Avec un large excès, ces réactifs peuvent également déprotéger et oxyder une paire de Cys(Acm).

La Cys(*t*Bu) est employée comme une alternative au Mob.²²⁵ A l'image de ce dernier, le *t*Bu se déprotège dans un mélange DMSO/TFA à température ambiante tout en formant le pont disulfure correspondant.²⁴⁹ Le succès de cette méthode de déprotection dépend

cependant de plusieurs paramètres, tels que la concentration en peptide, le nombre d'équivalents de DMSO, le temps de réaction et la température, comme le montrent Schulz *et coll.*²⁵¹ Ainsi, des temps de réactions courts à haute température pourront être préférés pour éviter la suroxydation des cystéines, tandis que dans d'autres cas une température excessive pourra provoquer une hydrolyse du lien Asp-Pro lorsqu'il est présent dans la chaîne peptidique.

Plus récemment, un nouveau groupement protecteur de la cystéine, le Msbh, a été introduit.²⁵² Ce groupement protecteur est basé sur le principe appelé *safety-catch*, c'est-à-dire qu'il sera stable dans certaines conditions voulues tant qu'il n'est pas modifié chimiquement.²⁵³ La forme initiale oxydée du Msbh contient des groupements électroattracteurs sulfoxyde qui le rend stable aux acides forts tels que le TFA et le TFMSA. Une fois réduits, ces groupements deviennent électrodonneurs et rendent le Msbh sensible aux acides. Ainsi, des conditions réductrices acides provoquent la modification et la déprotection du Msbh de manière concomitante. Cela est possible avec un mélange NH₄I/diméthylsulfure (DMS)/TFA, conditions précédemment employées pour la réduction des méthionines oxydées sous forme de sulfoxyde.²⁵⁴ L'iodure d'ammonium et le DMS jouent ici le rôle de réducteurs. De manière intéressante, le diiode et les intermédiaires iodosulfonium générés durant cette réaction permettent l'oxydation consécutive d'une paire de cystéines portant ce groupement protecteur. Cette méthode n'est cependant pas compatible avec les peptides contenant des résidus Trp, puisqu'elle provoque, entre autres, la dimérisation des peptides *via* les cycles indoles. De plus, sa stabilité lorsque du diiode est utilisé pour la déprotection des Acm a également été montrée.²⁵² En revanche, la compatibilité avec les conditions DMSO/TFA employées pour la déprotection oxydative des Mob n'ont pas été éprouvées.

c) *Stratégies de repliement oxydatif dirigé*

Cette diversité de groupements protecteurs et de conditions de déprotection a permis l'élaboration de nombreuses stratégies différentes de formation dirigée de ponts disulfures. Pour commencer, le premier pont disulfure est généralement formé à partir d'une paire de cystéines protégées avec un groupement protecteur sensible à un pourcentage d'acide relativement faible. En effet, le traitement au TFA après SPPS donnera directement ces cystéines libres prêtes à être oxydées, tandis que d'autres groupements orthogonaux resteront présents sur les autres cystéines. Pour cela, la Cys(Trt) est le groupement protecteur le plus classiquement utilisée pour la formation du premier pont disulfure.²²⁵ Elle est alors réalisée avec une des conditions oxydatives décrites précédemment, généralement en présence de DMSO ou de dioxygène. Puisqu'une seule paire de cystéines est déprotégée à cette étape, la réaction d'oxydation peut être réalisée à pH basique sans risque de *scrambling*. Bien que cette méthode de formation du premier pont en solution à partir de deux Cys(Trt) soit largement répandue, il existe une alternative où le premier pont est formé sur support solide. Cela est par exemple possible avec les groupements protecteurs StBu et Mmt, qui se déprotègent sur résine en conditions réductrices ou faiblement acide, respectivement. Le pont disulfure est alors formé en présence de DMSO avant libération du peptide.

La formation du second pont disulfure fait appel à un groupement protecteur orthogonal au Trt pour les stratégies en solution. La stratégie la plus commune est alors une combinaison du Trt avec l'Acm.²²⁵ En effet, les Trt peuvent être déprotégés en conditions acides sans modifications des Cys(Acm), et les cystéines correspondantes oxydées en présence de DMSO. En présence de ce premier pont, la paire de Cys(Acm) peut par la suite être déprotégée et oxydée par le diiode en conditions acides pour éviter le *scrambling*. L'efficacité de cette combinaison Trt/Acm pour les peptides à deux ponts disulfures a désormais été largement prouvée, avec par exemple la synthèse de plusieurs conotoxines.²⁵⁵ Une amélioration notable de cette stratégie utilise le DTP pour accélérer la formation du premier pont, comme cela a été fait pour les α -conotoxines CIA et CIB.²³⁴ Par ailleurs, comme l'on montré les auteurs de la déprotection de l'Acm au diiode, la vitesse de déprotection et d'oxydation des Cys(Acm) est largement dépendante du solvant utilisé.²³⁹ De plus, le diiode permet aussi l'oxydation de cystéines libres ou protégées avec des Trt, également de manière solvant-dépendant. Cette observation a été mise à profit pour effectuer la formation des deux ponts disulfures successivement en one-pot²⁵⁶ : un premier pont disulfure à partir de deux cystéines libres est formé dans l'acide acétique glacial, solvant dans lequel la déprotection des Acm est très lente par rapport à l'oxydation des cystéines libres.²³⁹ Après quelques minutes, une dilution du milieu réactionnel avec de l'eau accélère considérablement la déprotection oxydative des Cys(Acm) et permet de former le deuxième pont en conditions acides tout en évitant le *scrambling*.

De manière alternative, l'Acm peut être utilisé pour former un second pont sur résine en combinaison avec le StBu, le Mmt ou d'autres groupements très sensibles aux acides. La faisabilité de cette méthode a par exemple été montrée avec la synthèse des différents isomères de l' α -conotoxine SI,²⁵⁷ avec cependant des rendements peu satisfaisants dus à l'encombrement des groupements protecteurs et au *scrambling* important des ponts disulfures.

En combinaison avec le Trt et l'Acm, la stratégie de repliement dirigé de peptides à trois ponts disulfures emploie généralement le groupement protecteur Mob.²²⁵ Après formation des deux premiers ponts dans les conditions décrites précédemment, une paire de Cys(Mob) peut être déprotégée en présence de TFMSA pour donner les cystéines libres. Le pont disulfure est alors formé en conditions oxydantes acides. Cette stratégie employant la combinaison Trt/Acm/Mob a par exemple été appliquée à la synthèse de l' α -conotoxin MVIIA.⁷⁸ Alternativement, un pont disulfure peut directement être formé à partir d'une paire de Cys(Mob) en les déprotégeant de manière oxydative dans le mélange DMSO/TFA ou DTP/TFA/thioanisole. De manière intéressante, dans ces conditions, l'absence de thioanisole empêche la déprotection de se réaliser.²⁵⁰ Ainsi, le DTP peut être utilisé dans un premier temps seul dans un tampon basique pour former rapidement un premier pont disulfure sur des cystéines libres en présence de Cys(Mob),²³² puis dans les conditions décrites ci-dessus pour former un autre pont à partir de ces Cys(Mob).²⁵⁸ Une seconde stratégie assez répandue pour former un troisième pont disulfure consiste à substituer les Mob par des tBu pour une stratégie Trt/Acm/tBu.²²⁵ Le troisième pont disulfure est alors formé à partir d'une paire de Cys(tBu) dans des conditions acides et oxydatives. L'efficacité de cette méthode a par exemple été montrée avec la synthèse d'isomères de conotoxin PIIIA.²¹³

Une autre stratégie pour la formation régiosélective de trois ponts disulfures exploite la différence de réactivité en fonction de la température des Cys(*t*Bu) et Cys(Meb) dans un mélange DMSO/TFA. Ceci permet une stratégie Trt/*t*Bu/Meb où les deux derniers ponts sont formés en *one-pot*.²⁵⁹ La formation de deux ponts en *one-pot* par cette méthode a initialement été éprouvée sur l' α -conotoxine SI protégé par une combinaison *t*Bu/Meb.²⁴⁹ Le premier pont est ainsi formé par déprotection oxydative des Cys(*t*Bu) à température ambiante, puis une augmentation de température dans le même milieu réactionnel permet la déprotection successive des Cys(Meb) et leur oxydation. Combinée avec le Trt, cette méthode peut donc être appliquée après isolation de l'intermédiaire contenant un premier pont disulfure, comme cela a été fait avec un fragment d'enterotoxine ST.²⁵⁹

Cette méthode a ensuite été adaptée pour la formation régiosélective des quatre ponts disulfures d'un dimère de conotoxine en combinaison avec l'Acm.²⁶⁰ Les deux premiers ponts sont alors formés en deux étapes à partir des Cys(Trt) et Cys(Acm), et dans une troisième étape un saut de température permet la formation successive des ponts correspondant aux Cys(*t*Bu) puis Cys(Meb). En combinaison avec le Trt, l'Acm et le Meb ou Mob, le Msbh a également permis la formation dirigée de quatre ponts disulfures, avec par exemple la synthèse de l'hepcidine humaine,²⁵² et plus tard de la ϕ -conotoxin MiXXVIIA.²⁶¹ Une autre stratégie à quatre ponts exploite la combinaison StBu/Trt/Acm/Meb pour la synthèse de l'hepcidine humaine.²⁶² L'utilisation des groupements StBu et Trt implique normalement la formation du premier pont à partir des Cys(StBu) sur résine. Cette méthode n'étant cependant pas efficace, les auteurs font le choix de séparer le peptide de la résine pour l'obtenir avec une paire de cystéines libres et les groupements StBu, Acm et Meb toujours en place. Une réaction de tritylation sélective des cystéines est alors employée pour protéger de nouveau la paire de cystéines libres, et ainsi former le premier pont à partir des Cys(StBu). Les ponts suivants sont alors formés dans l'ordre à partir des groupements Trt, Meb puis Acm.

Ces différentes stratégies montrent le large éventail de combinaisons possibles pour la formation de plusieurs ponts disulfures de manière régiosélective. Bien que certaines stratégies exposées ici soient considérées comme des méthodes de références, de nombreuses autres combinaisons sont évidemment possibles, de même que des ordres de déprotection différents. Comme en témoignent les différents exemples cités ici, outre leur orthogonalité, le critère de choix des groupements utilisés est principalement leur compatibilité relative en fonction de leurs conditions de déprotection et par rapport à une séquence donnée. De plus, l'ordre de formation des ponts va avoir une forte influence sur le bon déroulement du repliement dirigé.^{223,263,264} Il est cependant très difficile de trouver une règle générale concernant ce point, et l'élaboration d'une stratégie pour un peptide donné reposera bien souvent sur le principe « essai-erreur ».

IV. Objectifs et contexte des travaux

Le but des travaux de recherche exposés dans ce manuscrit est la mise au point et le développement à l'échelle industrielle de la synthèse de peptides et toxines complexes. L'intérêt de ces recherches est né des difficultés à reproduire chimiquement certaines toxines en vue de leur commercialisation. En effet, deux problématiques majeures sont apparues au cours du développement de l'entreprise Smartox Biotechnology : la synthèse de séquences peptidiques longues ou difficiles à obtenir par SPPS, et le repliement dans leur configuration native de certaines toxines. Nos efforts se sont concentrés sur le développement de méthodes de synthèse adaptées à chaque peptide difficile à produire, tout en prenant en compte, autant que possible, les critères importants de temps et de coût. Les toxines étant des peptides riches en cystéines, les outils décrits précédemment, la NCL et le repliement dirigé, se sont avérés être des réponses pertinentes à nos problématiques. De manière plus générale, la maîtrise avancée de ces outils a pour but de développer un savoir-faire bénéfique tant pour le laboratoire du Département de Chimie Moléculaire de Grenoble que pour l'entreprise.

Dans ce contexte, un premier axe de développement s'est focalisé sur la thématique de la NCL et correspond à la **partie I** des résultats et discussions. Deux toxines ont servi de support à ces recherches : l'AmmTx3 et l' α -Bungarotoxine. L'AmmTx3 a permis d'initier les travaux sur la NCL avec une séquence relativement courte mais difficile à obtenir par SPPS dans nos mains. L' α -Bungarotoxine est quant à elle une séquence relativement longue et idéale pour une stratégie de synthèse à trois fragments peptidiques. Par la suite, les connaissances acquises au cours de ces travaux se sont avérées bénéfiques pour la mise au point d'une méthode de production de deux toxines peptidiques : la Notexine et l'U1-Cyrtautoxine-As1c. Enfin, je décrirai l'obtention grâce à la NCL de deux peptides longs : la Progastrine et un fragment d'Immunoglobuline E. L'obtention de ces deux molécules a nécessité la mise au point d'une stratégie combinant la NCL avec la réaction de désulfurisation.

Le deuxième axe de développement concerne la formation dirigée de pont disulfure et correspond à la **partie II** des résultats et discussions. Dans un premier temps, l'optimisation d'une stratégie à deux ponts disulfures a été réalisée sur l'exemple d'un analogue de conotoxine, la NMB-1. Par la suite, cette stratégie a été adaptée pour la formation sélective des trois ponts disulfures de la Phlotoxine et de la SGTx-1. Une fois ces méthodes mises au point, celles-ci ont pu être appliquées à la production de différentes toxines, contenant deux ou trois ponts disulfures, et ne pouvant être obtenues dans la bonne configuration par repliement oxydatif direct. Un total de quatre toxines supplémentaires a ainsi pu être obtenu. Au vu de certaines difficultés rencontrées avec les groupements protecteurs de la cystéine utilisés, l'utilisation d'un schéma de protection alternatif nous a semblé nécessaire. Nous avons ainsi développé une nouvelle stratégie de repliement dirigé avec un groupement protecteur encore jamais utilisé dans ce but. Son utilité a été prouvée sur l'exemple de la NMB1 et de la SGTx-1, et son orthogonalité vis-à-vis des groupements protecteurs les plus classiques a été explorée.

Par ailleurs, les travaux effectués au cours de cette thèse ne se sont pas limités aux recherches et développements décrits dans ce manuscrit. En effet, le travail en entreprise m'a

amené à travailler sur un grand nombre de projets différents. Parmi les travaux effectués, la synthèse de peptides ou toxines marqués par réaction de CuAAC, le couplage de peptides sur des protéines porteuses, la synthèse de peptides cycliques et bi-cycliques grâce à des *linkers* bi-fonctionnels, ou la synthèse de nombreuses toxines et mutants sont quelques exemples notables. L'ensemble de ces projets ont largement participé à l'acquisition des connaissances d'un chimiste peptidiste. Au final, près de 500 peptides et toxines ont été produits au cours de cette thèse, allant de quelques acides aminés à plus de 110, linéaires ou contenant jusqu'à cinq ponts disulfures. Cependant, n'étant pas le cœur du sujet de la thèse et dans un souci de concision, seuls les projets en lien avec la NCL ou le repliement régiosélectif seront décrits ici.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Native Chemical Ligation

Un des premiers objectifs de cette thèse était le développement de la synthèse totale de toxines et de peptides grâce à des méthodes de ligations par NCL, à des fins de production. Ceci impose certaines contraintes telles qu'une échelle de production suffisamment importante pour alimenter un catalogue, une pureté du composé final élevée, et une certaine efficacité des réactions mises en œuvre, tout en se limitant à un coût raisonnable. Nous avons ainsi cherché dans nos données bibliographiques les meilleures stratégies envisageables pour répondre à ces contraintes. Les travaux concernant ce point ont donc débuté avec l'AmmTx3, toxine de longueur raisonnable mais difficile à synthétiser par SPPS. Les recherches ont ensuite été poursuivies avec les synthèses par ligations de deux toxines de longueur plus conséquente afin d'étudier leurs activités biologiques respectives. Une fois bien maîtrisée, cette technique a été appliquée à plusieurs toxines et peptides dans un but de production.

A. NCL à deux fragments : cas de l'AmmTx3

L'AmmTx3 a été isolée en 2002 à partir du venin de scorpion *Androctonus mauretanicus*.²⁶⁵ Cette toxine de 37 acides aminés contient trois ponts disulfures entre les cystéines C1-C4, C2-C5 et C3-C6⁸⁴ et a la particularité de présenter une extrémité N-terminale cyclisée sous forme d'acide pyroglutamique (Figure 45). Cette toxine est un bloqueur spécifique des canaux potassiques voltage-dépendants 4.

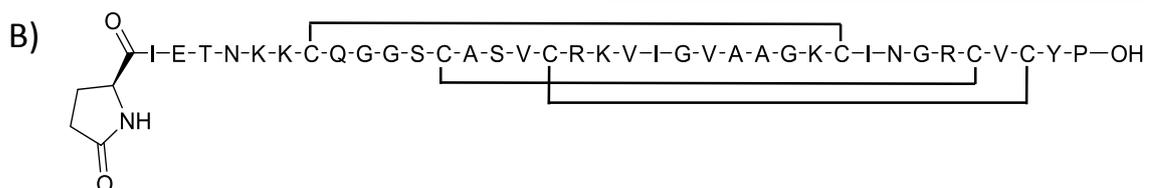


Figure 45 : Toxine AmmTx3. A) *Androctonus mauretanicus* (source : www.latoxan.net) ; B) Séquence de l'AmmTx3

Une première synthèse de la séquence peptidique entière de l'AmmTx3 linéaire **1** (Figure 46) a été réalisée par SPPS en stratégie Fmoc sur une résine polystyrène 2-CTC. La qualité du brut obtenue lors de cette synthèse s'est avérée médiocre, avec l'observation de nombreux peptides tronqués acétylés. La masse moléculaire recherchée étant tout de même présente, le repliement oxydatif a été réalisé sur la toxine brute. Cependant, la qualité de la synthèse a considérablement compliqué la purification de la toxine oxydée, puisque malgré une modification du temps de rétention, celle-ci co-éluait avec des peptides tronqués. L'AmmTx3 repliée **2** a tout de même été obtenue, mais en quantités trop faibles pour les

analyses structurales et biologiques recherchées. Au vu des difficultés de synthèses et de sa séquence riche en cystéines, cette toxine s'avérait ainsi être un candidat idéal pour une stratégie de synthèse par NCL.

La mise au point de la stratégie de ligation commence par la sélection des fragments peptidiques. Pour cela, l'AmmTx3 présente une cystéine en position 17 idéalement positionnée pour réaliser la NCL à partir de deux fragments de tailles équilibrées (Figure 46). Cependant, cette cystéine impose un point de ligation Val-Cys connu pour mener à des cinétiques très lentes. Le point de ligation Ser12-Cys13 s'avérait ainsi être un meilleur choix. Ensuite, la méthode d'obtention du thioester a dû être choisie. La séquence du fragment *N*-terminal contenant deux glycines consécutives proches de l'extrémité *C*-terminale, la stratégie utilisant la résine Dawson de première génération, décrite dans la partie III.B.2.a), a été écartée. Ces glycines risquaient en effet d'acétyler la seconde amine du *linker* Dawson. La stratégie développée par Liu utilisant une fonction hydrazide comme précurseur de thioester, simple, robuste et économique, s'est ainsi avérée être un choix judicieux. Le fragment hydrazide AmmTx3(1-12) **3** de 12 acides aminés et le fragment cystéinyle AmmTx3(13-37) **4** de 25 résidus (Figure 46) ont donc été synthétisés par SPPS automatisée sur résine 2-CTC en suivant les protocoles généraux décrits dans la partie expérimentale, et purifiés par HPLC en phase inverse. Le premier a été obtenu pur à plus de 90 % avec un rendement remarquable de 87%. Le second a été obtenu avec un rendement modéré de 33% après purification, dû à la présence de certains peptides tronqués dans le brut déjà observés lors de la synthèse de l'AmmTx3 entière. L'introduction de pseudoprolines dans le but d'améliorer la qualité de la synthèse était cependant impossible au vu de la séquence peptidique. Il aurait éventuellement pu être bénéfique de changer de résine au profit d'un support connu pour donner de meilleurs rendements de synthèse, de type Tentagel ou ChemMatrix par exemple. Cependant, les quantités obtenues étaient suffisantes pour la suite des manipulations, et une nouvelle synthèse de ce fragment n'a donc pas été nécessaire.

Avec ces deux fragments en main, la réaction de NCL pouvait être entreprise (Figure 46). Le fragment AmmTx3(13-37) ayant été obtenu avec le rendement le moins bon, celui-ci a été engagé en tant que réactif limitant dans la réaction de NCL. De plus, le temps de rétention du produit de ligation est généralement plus proche du fragment le plus hydrophobe, ici AmmTx3(13-37). L'introduire en défaut était donc un choix judicieux pour simplifier la purification du milieu réactionnel en évitant sa co-élution avec l'AmmTx3 entière. Après activation du fragment hydrazide par le NaNO₂ à -15°C et à pH3, la réaction de NCL a été amorcée par une élévation du pH à 6.8 après ajout de MPAA et du second fragment. Après une nuit à température ambiante, la réaction a été traitée avec un large excès de TCEP pour réduire les éventuels ponts disulfures intramoléculaires et intermoléculaires avec le MPAA. Le milieu réactionnel a ensuite été lavé au diéthyle éther afin de supprimer l'excès de MPAA. En effet, cette espèce est bien retenue sur les colonnes utilisées en phase inverse, et le large excès introduit en début de réaction risque de masquer le produit de ligation en co-éluant avec celui-ci. Une analyse par HPLC du milieu réactionnel a permis d'observer la formation d'un unique produit majoritaire de manière très efficace, comme en témoigne la consommation quasi-totale des fragments de départ (Figure 47A). Après purification, l'AmmTx3 linéaire entière a été obtenue avec un rendement isolé de 46% (Figure 47B).

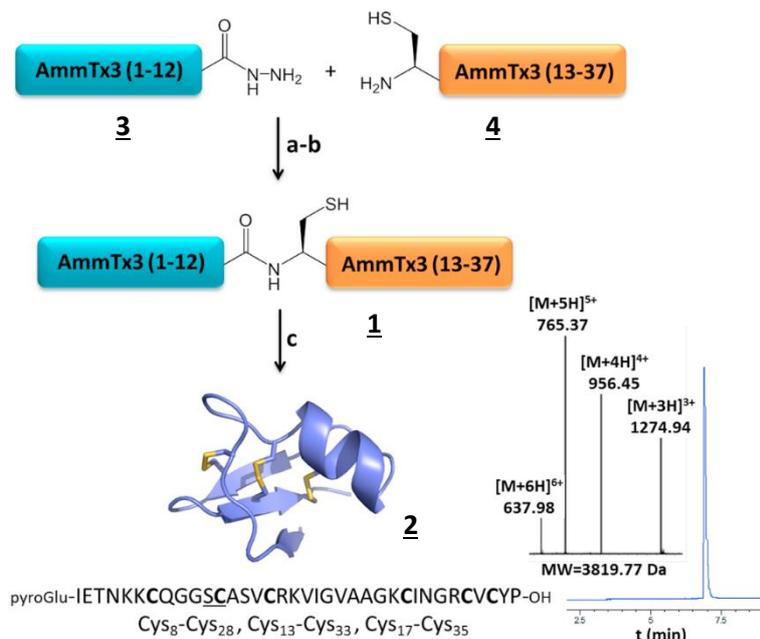


Figure 46 : Synthèse de l'AmmTx3 par NCL à partir de deux fragments. a) Activation du fragment AmmTx3(1-12) : 0,2 M NaH₂PO₄, 6 M Gn.HCl, pH3, -15°C, 10 éq. NaNO₂, 20 min ; b) Ligation : 100 éq. MPAA, 0,77 éq. AmmTx3(13-37), pH 6,5, température ambiante, une nuit ; c) repliement oxydatif : 0,2 M Tris, pH 8,2, 48 h. Analyse RP-HPLC de l'AmmTx3 repliée : t_R = 7,0 min (λ = 214 nm, colonne AdvanceBio Peptide) ; Analyse LC-MS de l'AmmTx3 repliée : masse théorique 3819,87 Da, masse observée 3819,77 Da.

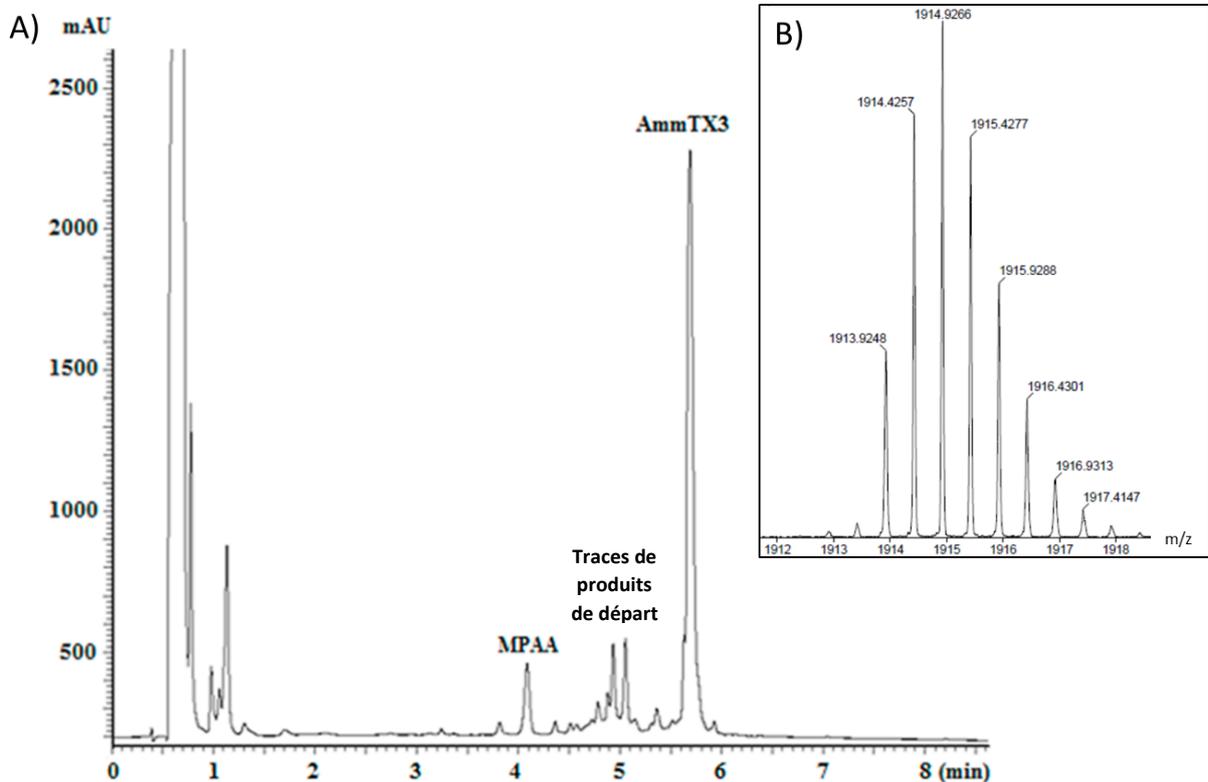


Figure 47 : A) Analyse RP-HPLC (colonne Chromolith, 214 nm, 5-60 % B en 15 min) du milieu réactionnel de la NCL après 18h ; B) Analyse HRMS de l'AmmTx3 linéaire obtenue par NCL. Zoom sur l'amas isotopique [M+2H]²⁺ : M_{mono} calculée : 3825,91 Da, M_{mono} observée : 3825,84 Da

Le repliement oxydatif de la toxine a ensuite été réalisé dans un tampon basique en présence du dioxygène de l'air. Pour cette étape, des conditions de forte dilution (0,2 mg/mL) ont été appliquées afin de favoriser les ponts intramoléculaires par rapport aux ponts intermoléculaires. Un suivi par HPLC et LC-MS a permis d'observer la formation de l'AmmTx3 repliée, qui présente un décalage de temps de rétention correspondant à la formation d'une

espèce plus hydrophile (Figure 48C), et une modification de la masse moléculaire de -6 Da typique de la formation de trois ponts disulfures. Après 24 h, la formation de la toxine repliée n'était que partielle, et l'AmmTx3 linéaire ainsi que les intermédiaires partiellement oxydés étaient observables (Figure 48A). Après 48 h, aucune trace d'AmmTx3 linéaire n'était présente, et un unique produit majoritaire oxydé était formé (Figure 48B). Ainsi, après acidification et purification du milieu réactionnel, les analyses par HPLC et LC-HRMS ont confirmé l'obtention de l'AmmTx3 repliée avec un rendement de 48%, soit un rendement total de 22% sur les étapes de NCL et de repliement (Figure 46).

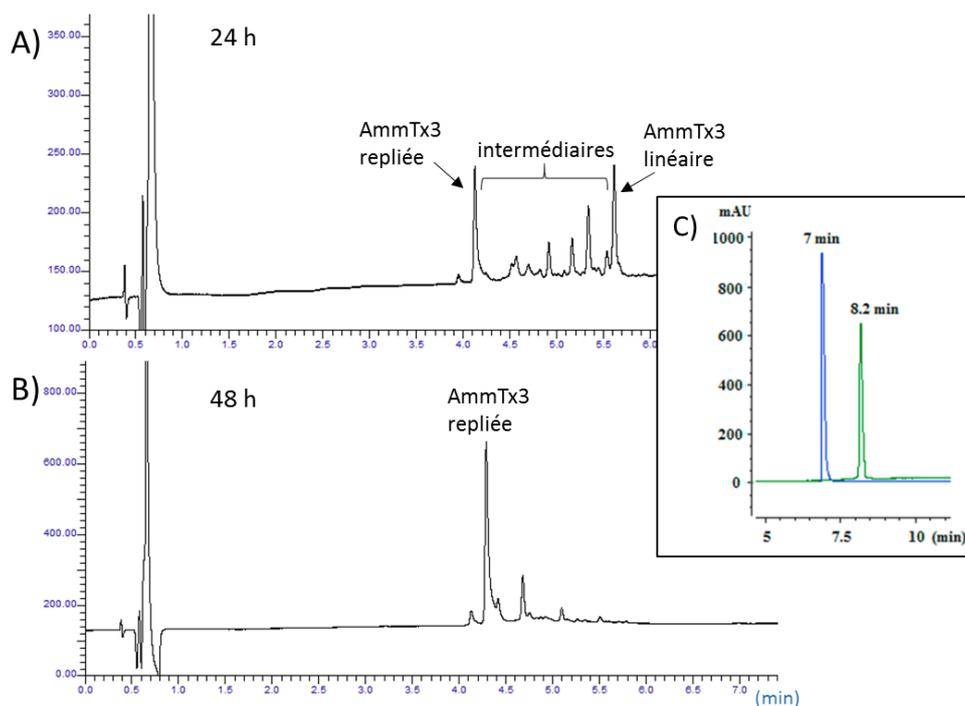


Figure 48 : Suivi du repliement oxydatif de l'AmmTx3. A) Analyse RP-HPLC (colonne Chromolith, 214 nm, 5-60 % B en 15 min) du milieu réactionnel à 24 h ; B) même analyse à 48h. C) comparaison des temps de rétention de l'AmmTx3 linéaire (en vert) et repliée (en bleu) pures par analyses RP-HPLC ($\lambda = 214$ nm, colonne AdvanceBio Peptide).

Afin d'écarter un possible impact de la ligation sur la structure de l'AmmTx3 repliée, des analyses structurales par RMN des toxines obtenues par SPPS classique et par ligation ont été entreprises grâce à une collaboration avec Céline Landon et Hervé Meudal du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans. Des analyses de très bonnes qualités ont pu être réalisées, malgré la faible quantité d'AmmTx3 obtenue par SPPS disponible. Ainsi, les toxines obtenues par les deux méthodes se sont avérées être rigoureusement identiques, avec notamment aucune racémisation de la sérine au point de ligation. La détermination des ponts disulfures présents a également pu être faite, de même que l'identification du motif CS- $\alpha\beta$ typique de ces toxines de scorpions (Figure 49). De plus, l'activité biologique de l'AmmTx3 obtenue par NCL a été confirmée par l'équipe de Michel De Waard à l'Institut du Thorax de Nantes. L'ensemble de ces résultats ont ainsi pu faire l'objet d'un article dans le journal *Bioorganic & Medicinal Chemistry* en 2019.⁸⁴

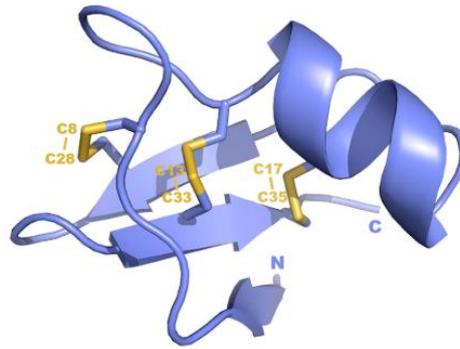


Figure 49 : Représentation schématique du motif CS- $\alpha\beta$ de l'AmmTx3. Les ponts disulfures sont représentés en jaune.

B. NCL successives à trois fragments

Afin d'étendre le champ d'application de la NCL, notre intérêt s'est ensuite porté sur des toxines de longueurs plus importantes. En effet, outre la synthèse de peptides ayant une séquence difficile à obtenir par SPPS, la NCL est principalement destinée à la synthèse de peptides longs. Pour cela, l' α -Bungarotoxine (α -BgTx) a servi de support à nos études afin d'initier la mise au point d'une stratégie à trois fragments peptidiques.

Comme nous l'avons vu précédemment, cette toxine de serpent a été isolée du venin de *Bungarus multicinctus* en 1963.⁹⁰ Cette toxine de 74 acides aminés contient cinq ponts disulfures entre les cystéines C1-C3, C2-C6, C4-C5, C7-C8 et C9-C10 et appartient ainsi à la famille des 3FTxs à chaînes longues (Figure 50).⁹¹ Elle est largement utilisée depuis en tant qu'outil pharmacologique pour la caractérisation de certains sous-types de nAChRs.⁸⁸ Outre les exemples cités précédemment, l' α -BgTx est régulièrement utilisée avec différents marqueurs fluorescents afin de déterminer la localisation des récepteurs associés.²⁶⁶ Elle était d'ailleurs pionnière dans la réalisation de ce type d'expériences sur les nAChRs.²⁶⁷ Cette toxine est proposée commercialement sous sa forme purifiée à partir du venin, et plus récemment produite par expression recombinante, avec cependant deux acides aminés supplémentaires à son extrémité N-terminale.²⁶⁸ Ces modes de production ne permettent pas de modifications chimiques aisées de la molécule. Les marquages fluorescents sont ainsi réalisés de manière non sélective sur l'ensemble de la chaîne peptidique, pouvant avoir un impact important sur l'activité biologique de la toxine.²⁶⁷

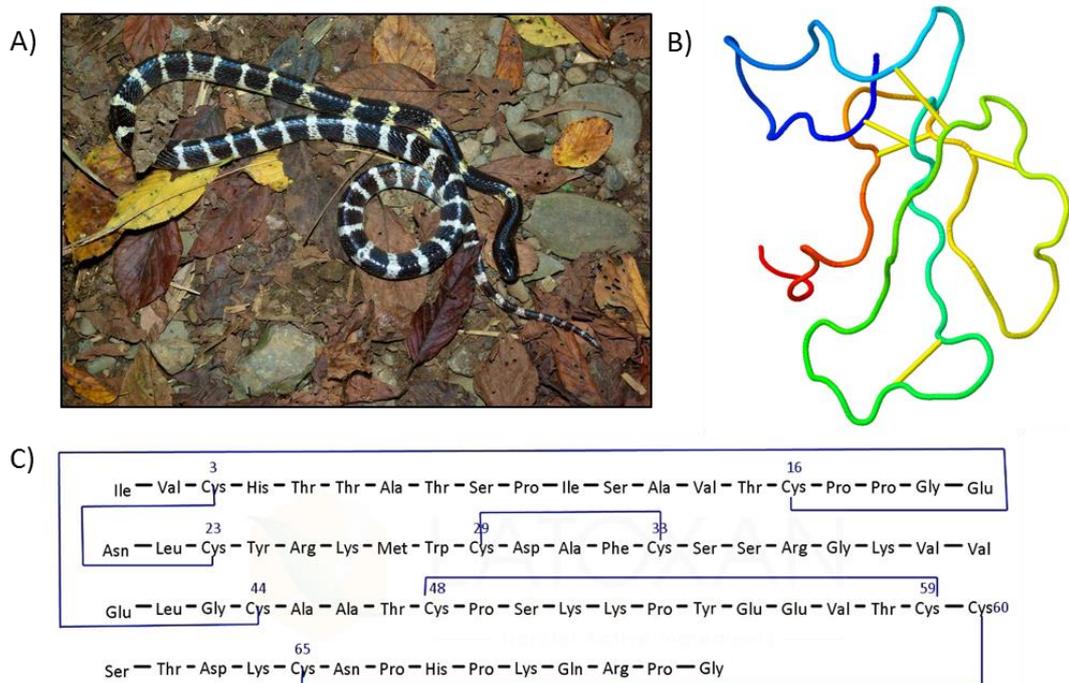


Figure 50 : α -Bungarotoxin. A) *Bungarus multicinctus* (source : www.latoxan.net) ; B) structure tridimensionnelle de l' α -BgTx (PDB : 1IDI) les ponts disulfures sont représentés en jaune ; C) Séquence peptidique de l' α -BgTx (source : www.latoxan.net)

Pour cette raison, nous nous sommes intéressés à la synthèse de cette toxine par voie chimique. En effet, cette méthode de synthèse permet une modification aisée de la chaîne peptidique pour pouvoir y introduire un *linker* non naturel pouvant servir à la modification régiosélective de la toxine. En plaçant une unique modification à un endroit judicieusement choisi, le risque d'interférence dans l'interaction avec sa cible peut ainsi être réduit.

La longueur de l' α -BgTx est trop conséquente pour pouvoir synthétiser sa séquence peptidique entière par SPPS. Nous avons ainsi dû opter pour une stratégie de synthèse par NCL. Considérant le nombre d'acides aminés composant la toxine, découper la chaîne peptidique en trois fragments d'environ 25 résidus nous a semblé être une bonne stratégie pour obtenir de bons rendements de synthèses par SPPS (Figure 51). Le premier fragment ainsi défini, correspondant à l'extrémité *N*-terminale de la toxine, est le fragment α -BgTx(1-28) **5**, offrant un point de ligation Trp-Cys. Un fragment α -BgTx(1-22) aurait également pu être envisagé, mais celui-ci impliquait un point de ligation Leu-Cys moins favorable. De même pour la partie médiane, un fragment court α -BgTx(29-43) **6** donnant un point de ligation Gly-Cys idéal a été préféré au fragment α -BgTx(29-47), légèrement plus long et plus équilibré en terme de taille. Le fragment restant est ainsi α -BgTx(44-74) **7**. Pour cette stratégie de synthèse, la méthode employant des fragments hydrazide a également été employée. Celle-ci permet en effet la ligation des fragments du *N*-terminal vers le *C*-terminal sans recourir à des protections orthogonales temporaires des cystéines, comme c'est le cas avec la méthode de Dawson par exemple. La méthode utilisant des fragments benzotriazoles aurait également pu être employée, mais le fragment α -BgTx(29-43) impliquait de coupler une glycine comme premier acide aminé sur la résine Dawson, réaction pouvant facilement acyler les deux fonctions

amines de cette résine. La synthèse de ces trois fragments a ainsi été réalisée par SPPS automatisée sur résine 2-CTC préalablement fonctionnalisée par de l'hydrazine. De plus, en vue de réaliser le marquage régiosélectif par CuAAC de la toxine, un acide pentynoïque a été introduit à l'extrémité *N*-terminale du fragment α -BgTx(1-28). Comme attendu, la qualité des synthèses était bonne, chaque fragment brut présentant un pic majoritaire en analyse RP-HPLC de masse moléculaire attendue en analyse HRMS. Les fragments α -BgTx(1-28), α -BgTx(29-43) et α -BgTx(44-74) ont ainsi été obtenus après purification avec des rendements de 26 %, 57 % et 44 %, respectivement.

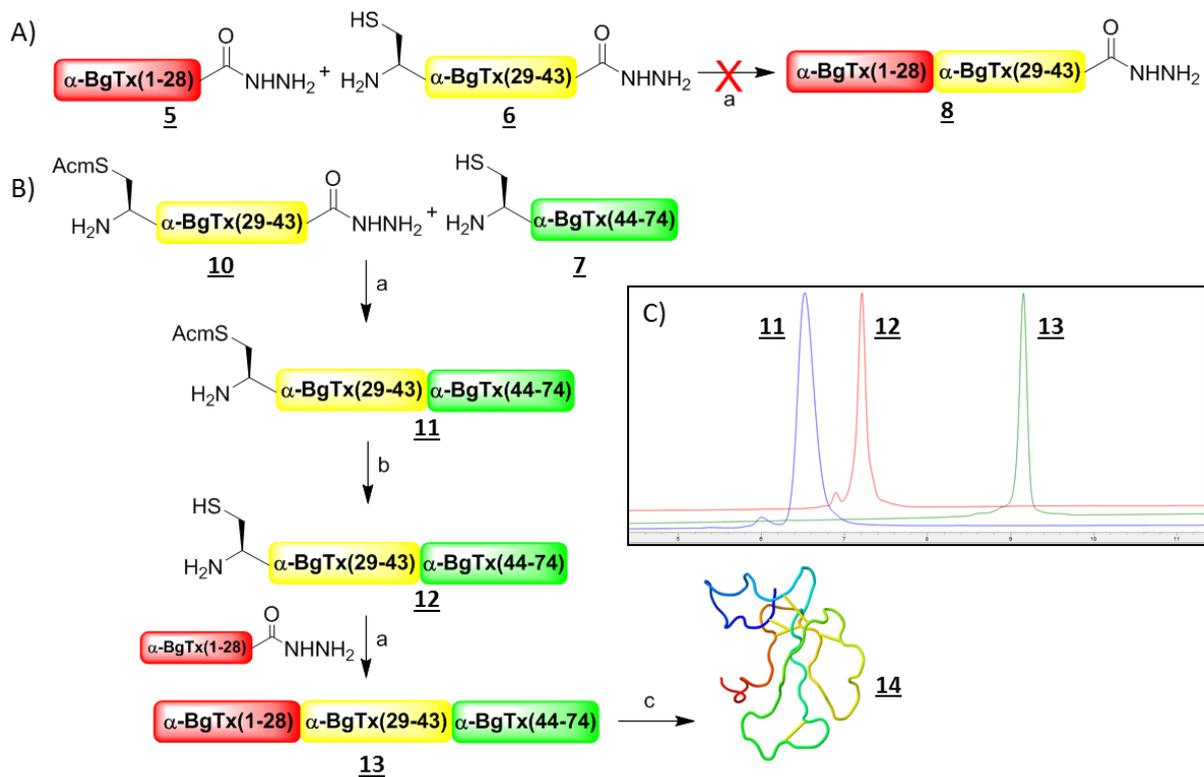


Figure 51 : Stratégies de synthèse de l' α -BgTx par NCL. A) première étape de la stratégie de synthèse du N-terminal vers le C-terminal. a) NCL : 0,2 M NaH_2PO_4 , 6 M Gn.HCl , pH 3, -15°C , 10 éq. NaNO_2 , 20 min, puis 100 éq. MPAA, pH 6,5, température ambiante, une nuit. B) Stratégie de synthèse du C-terminal vers le N-terminal. b) déprotection de l'Acm : 0,2 M NaH_2PO_4 , 6 M Gn.HCl , pH 7, 10 éq. PdCl_2 , 10 min, puis 100 éq. DTT. c) Repliement oxydatif : 0,1 M Tris pH 8,2, 5 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 48 h. C) Superposition des analyses RP-HPLC des produits **11** ($t_R = 6,5$ min), **12** ($t_R = 7,2$ min) et **13** ($t_R = 9,1$ min) purifiés (colonne AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

La première réaction de NCL a ainsi été réalisée à partir des fragments α -BgTx(1-28) et α -BgTx(29-43), le second ayant été introduit en excès (Figure 51A). Dans le cas d'une stratégie à deux fragments, les deux précurseurs peuvent être introduits ensemble dans le milieu réactionnel avant activation du fragment hydrazide avec NaNO_2 . Dans le cas présent, nous avons pris soin de n'introduire que le fragment *N*-terminal α -BgTx(1-28) pour l'étape d'activation afin d'éviter la conversion non désirée de la fonction hydrazide du fragment α -BgTx(29-43) en thioester. A la fin de la réaction d'activation, l'ajout de MPAA avant le second fragment a neutralisé l'excès de NaNO_2 présent. Après une nuit, la purification du milieu réactionnel a permis d'obtenir le produit de ligation α -BgTx(1-43) **8** désiré. Cependant, plusieurs autres produits secondaires étaient également présents en quantités importantes dans le milieu. Des analyses par HRMS de ces produits ont permis d'identifier des peptides

correspondants à l'hydrolyse des liens amides un et deux résidus autour du point de ligation : ~~RKMfWCDfA]FCS~~ (« f » représente les sites de coupures). Afin de déterminer la cause de ces réactions secondaires, la stabilité des fragments α -BgTx(1-28) et α -BgTx(29-43) a été évaluée séparément dans le tampon de NCL à pH 3 et 6,5. Après une nuit à température ambiante, la seule modification observable était la formation d'un pont disulfure à pH 6,5 dans chacun des cas. Ainsi, chaque fragment pris séparément ne se dégrade pas dans les conditions de NCL. À l'inverse, lorsque le produit de ligation α -BgTx(1-43) précédemment isolé a été maintenu en solution dans le tampon de NCL durant une nuit, sa dégradation a été de nouveau observée. Pour aller plus loin, la ligation du fragment α -BgTx(1-28) avec le fragment C-terminal α -BgTx(44-74) a été réalisée pour déterminer si cette réaction secondaire était spécifique à la séquence du produit de ligation. Après une nuit de réaction dans des conditions similaires, le produit de ligation α -BgTx(1-28,44-74) **9** a été obtenu sans trace de produits d'hydrolyse. Ainsi, il semblerait que le mécanisme de ces réactions secondaires soit propre à la séquence peptidique du produit de ligation α -BgTx(1-43). En partant du principe qu'aucune dégradation de ce type n'a été rapportée pour l' α -BgTx entière, réaliser une stratégie de synthèse du C-terminal vers le N-terminal pour éviter la formation de l'intermédiaire α -BgTx(1-43) nous a semblé pertinent (Figure 51B).

Pour cela, le fragment AcM- α -BgTx(29-43) **10** a été synthétisé, avec cette fois-ci une protection AcM sur la cystéine N-terminale. Cette protection permettra ainsi d'éviter la cyclisation ou la polymérisation du fragment dans les conditions de NCL une fois sa fonction hydrazide convertie en thioester. Le choix de ce groupement protecteur a été fait pour tester de nouvelles conditions de déprotection de la Cys(AcM), comme nous le verront plus tard. La réaction de NCL a ainsi été réalisée entre les fragments AcM- α -BgTx(29-43) et α -BgTx(44-74) en présence de MPAA durant une nuit. Après purification, le produit de ligation AcM- α -BgTx(29-74) **11** a été obtenu avec un rendement de 60 % (Figure 52). De plus, aucun de produit de dégradation n'a été observé à cette étape.

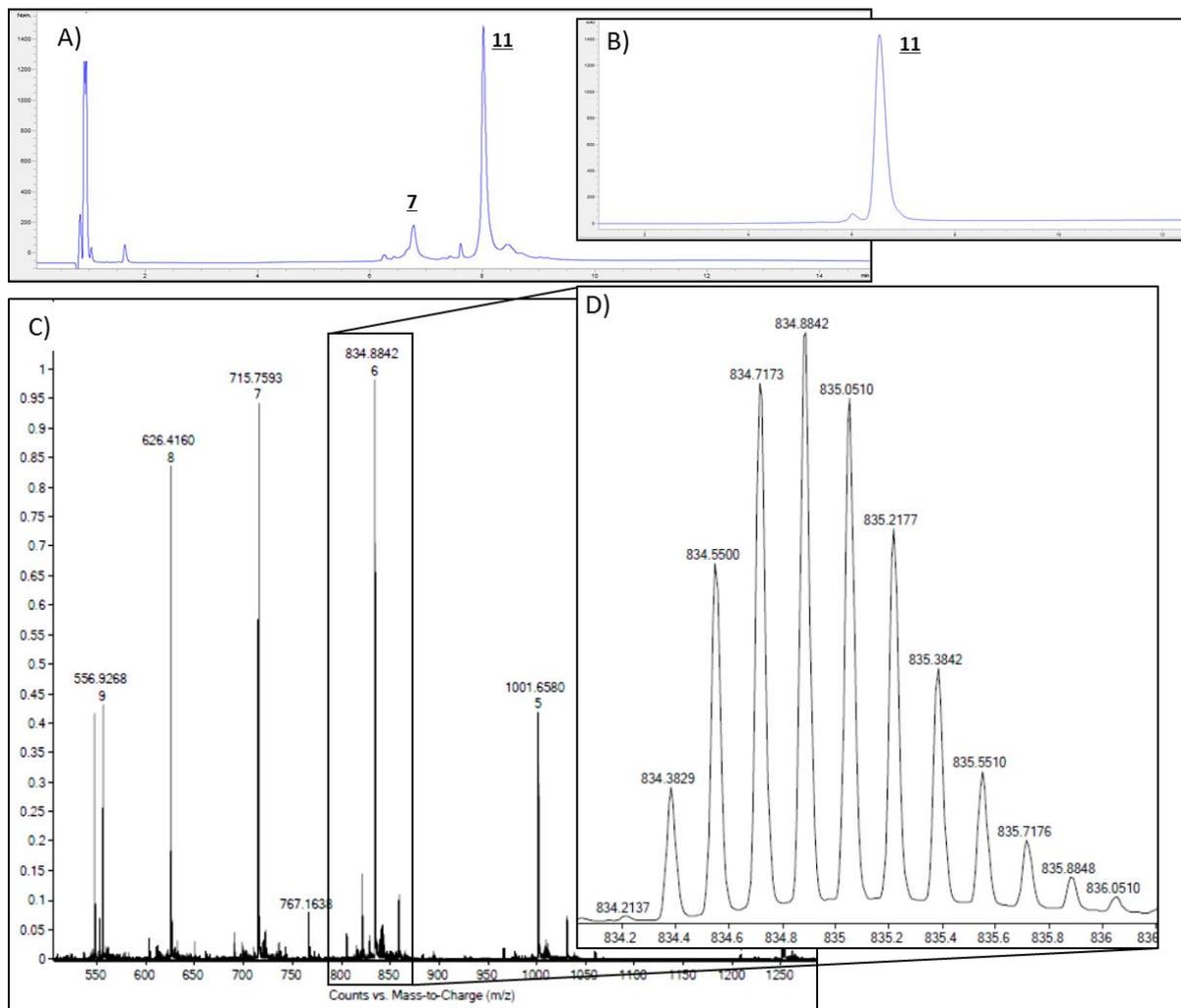


Figure 52 : Analyses RP-HPLC et HRMS de l'Acm- α -BgTx(29-74) **11**. A) Analyse RP-HPLC (colonne Chromolith, 214 nm, 5-60 % B en 15 min) du milieu réactionnel de NCL après une nuit. B) Analyse RP-HPLC ($t_R = 6,5$ min, colonne AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min) de **11** purifié. C) Analyse HRMS de **11** purifié. Le nombre indiqué en dessous du m/z correspond à l'état de charge. D) Zoom sur l'état de charge 6+. M_{mono} calculée : 5000,26 Da ; observée : 5000,29 Da

Par la suite, la déprotection du groupement Acm de la cystéine *N*-terminale a été réalisée. La formation d'un pont disulfure n'étant pas recherchée ici, l'utilisation de diiode n'a pas été jugée judicieuse. Par ailleurs, une méthode de déprotection de l'Acm utilisant du palladium et du dithiothréitol (DTT) avait été récemment décrite par le groupe de Brik.²⁶⁹ Cette méthode a été développée dans le but d'être appliquée à la déprotection de la cystéine *N*-terminale d'un intermédiaire de ligation, comme dans notre cas, mais également pour la déprotection de cystéines natives intra-chaînes après désulfuration d'une alanine mutée en cystéine. De manière intéressante, les réactions de ligation, désulfuration et déprotection des Acm peuvent être réalisées en *one-pot* à partir d'un fragment thioester préformé. Cette méthode a ainsi été évaluée dans notre cas, en réalisant cependant les réactions de manière séquentielles pour éviter la manipulation d'un fragment thioester. Le fragment Acm- α -BgTx(29-74) a été solubilisé dans du tampon de NCL à pH neutre, et 10 éq. de PdCl₂ ont été ajoutés. Après 10 minutes à 37°C, 100 éq. de DTT ont été ajoutés au milieu réactionnel pour complexer l'excès de palladium, qui peut ensuite être éliminé par centrifugation avant purification par RP-HPLC. Le fragment α -BgTx(29-74) **12** a ainsi été obtenu pur avec un

rendement de 53 % (Figure 53). Malgré la purification par RP-HPLC, le produit récupéré après lyophilisation était jaune. Cette couleur est caractéristique de la présence de traces de complexe palladium-DTT, comme observé également par les auteurs de cette méthode de déprotection.²⁷⁰ Bien que d'après les auteurs, ces traces de réactifs peuvent être éliminées aux étapes suivantes, l'utilisation d'un autre groupement protecteur telle que la Thz aurait pu être plus judicieuse pour éviter toute contamination possible du produit final.

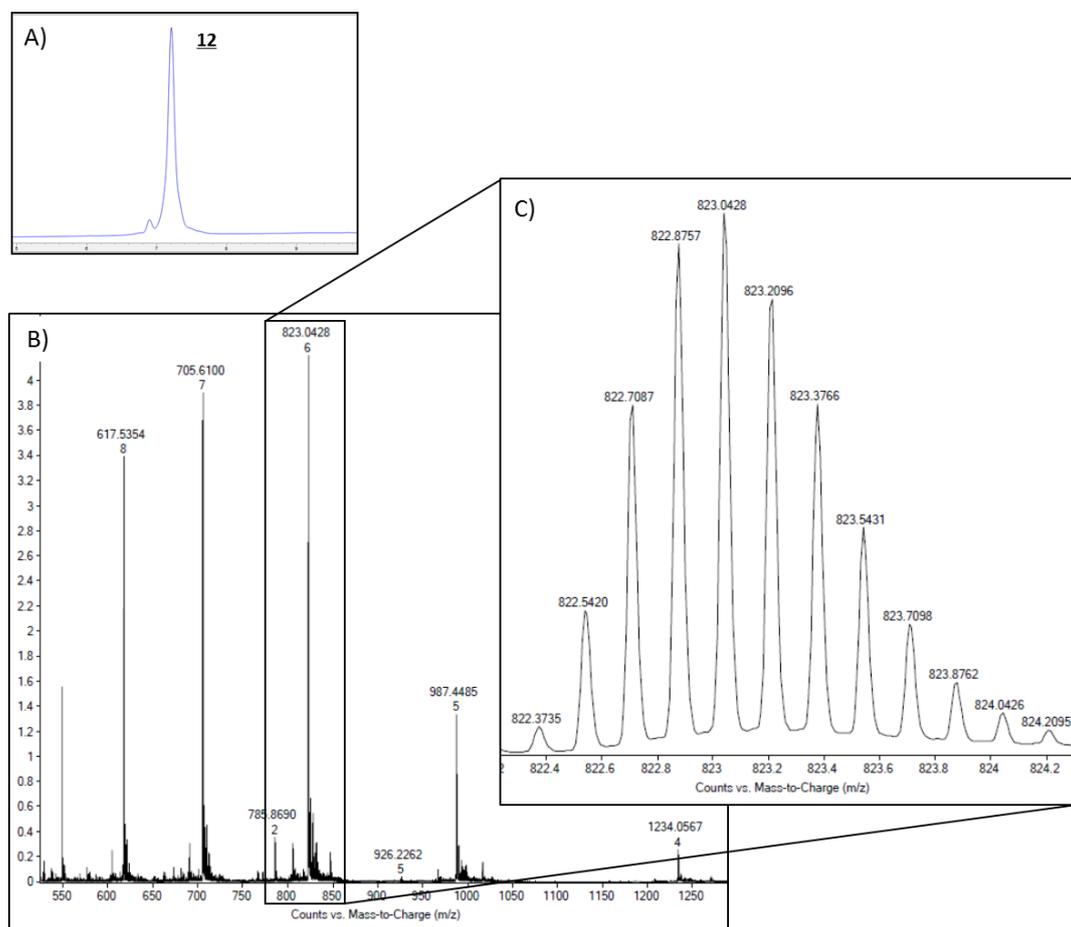


Figure 53 : Analyses RP-HPLC et HRMS de l'α-BgTx(29-74) **12**. A) Analyse RP-HPLC ($t_R = 7,2$ min, colonne AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min) de **12** purifié. B) Analyse HRMS de **12** purifié. Le nombre indiqué en dessous du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 6+. M_{mono} calculée : 4929,23 Da ; observée : 4929,16 Da

Malgré tout, la synthèse de l'α-BgTx a été poursuivie avec la seconde ligation. Pour cela, le fragment hydrazide α-BgTx(1-28) a été activé par oxydation avec du NaNO_2 et mis en présence de MPAA et du fragment α-BgTx(29-74) précédemment obtenu et introduit en défaut dans cette réaction. Après purification et lyophilisation, l'α-BgTx linéaire **13** a été obtenue avec un rendement de 42 % (Figure 54). Plusieurs constatations positives ont pu être faites. Tout d'abord, les traces de complexe palladium-DTT n'ont pas eu d'impact sur le bon déroulement de la réaction de ligation, et le produit obtenu après purification et lyophilisation était blanc, comme attendu. De plus, la réaction de ligation s'est déroulée correctement et sans la formation de produits secondaires notables. Aucune hydrolyse non désirée de la chaîne peptidique ne s'est produite durant la réaction.

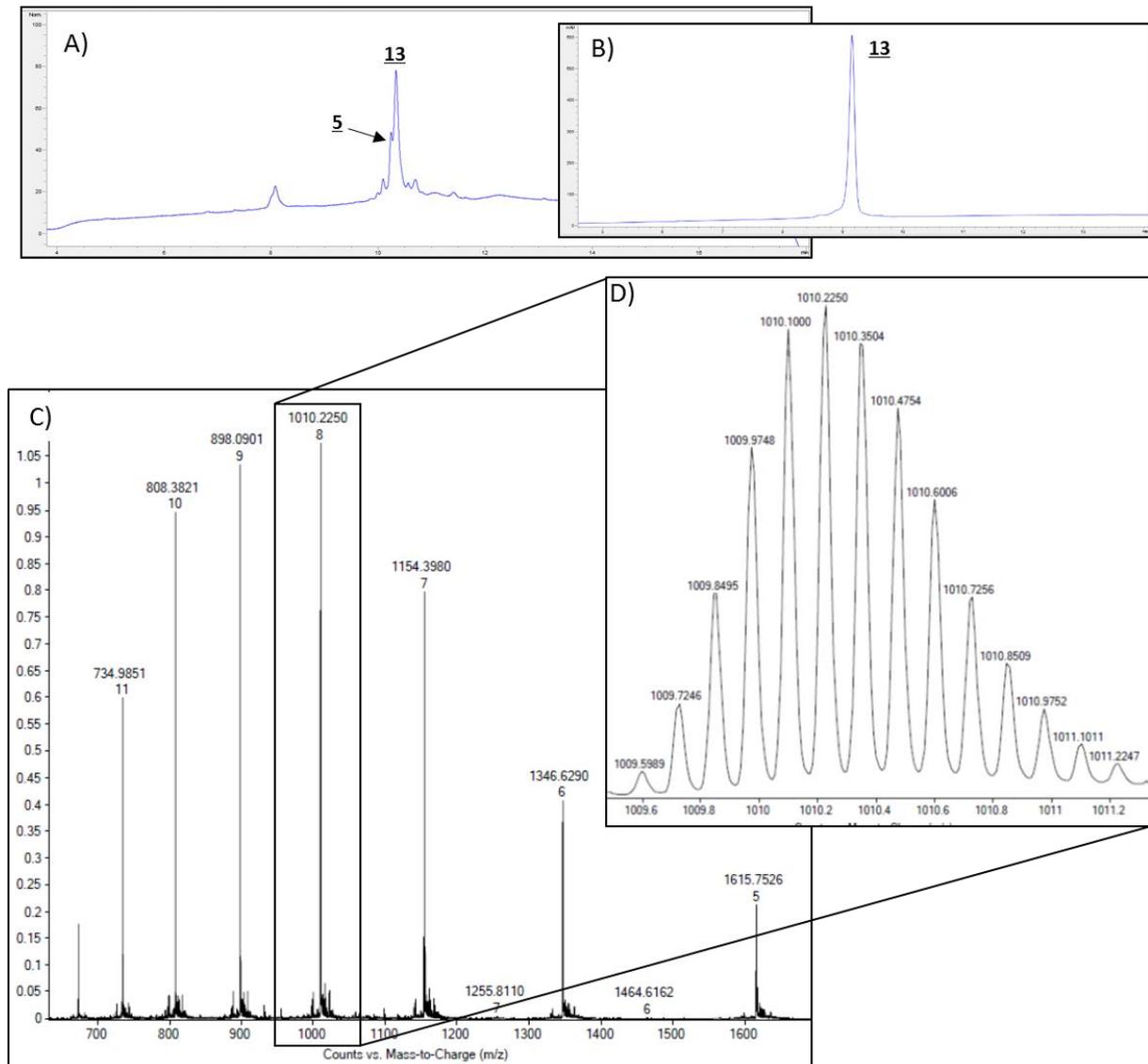


Figure 54 : Analyses RP-HPLC et HRMS de l' α -BgTx linéaire **13**. A) Analyse RP-HPLC (colonne Chromolith, 214 nm, 5-60 % B en 15 min) du milieu réactionnel de NCL après une nuit. L'excès de **5** est présent sous forme hydrolysée. B) Analyse RP-HPLC ($t_R = 9,1$ min, colonne AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min) de **13** purifié. C) Analyse HRMS de **13** purifié. Le nombre indiqué en dessous du m/z correspond à l'état de charge. D) Zoom sur l'état de charge 8+. M_{mono} calculée : 8068,70 Da ; observée : 8068,68 Da

Avec l' α -BgTx linéaire en main, nous avons par la suite dû procéder au repliement oxydatif de la toxine. Parmi les différentes conditions de repliement testées, celles étant composées du couple oxydo-réducteur GSH/GSSG à respectivement 5 mM et 0,5 mM dans un tampon Tris à 0,1 M et pH 8,2, ont donné les meilleurs résultats, avec un pic majoritaire observable par analyse RP-HPLC. Après 48 heures dans ces conditions et purification, l' α -BgTx repliée **14** a été obtenue avec un rendement de 23 % (Figure 55). La réaction ayant été réalisée à petite échelle (3mg d' α -BgTx linéaire), la quantité de toxine obtenue n'a pu être déterminée par pesée. La quantification de l' α -BgTx repliée a alors été réalisée par mesure de l'absorbance à 280 nm de la toxine en solution. L' α -BgTx a ainsi été synthétisée avec un rendement total de 3 % sur quatre étapes.

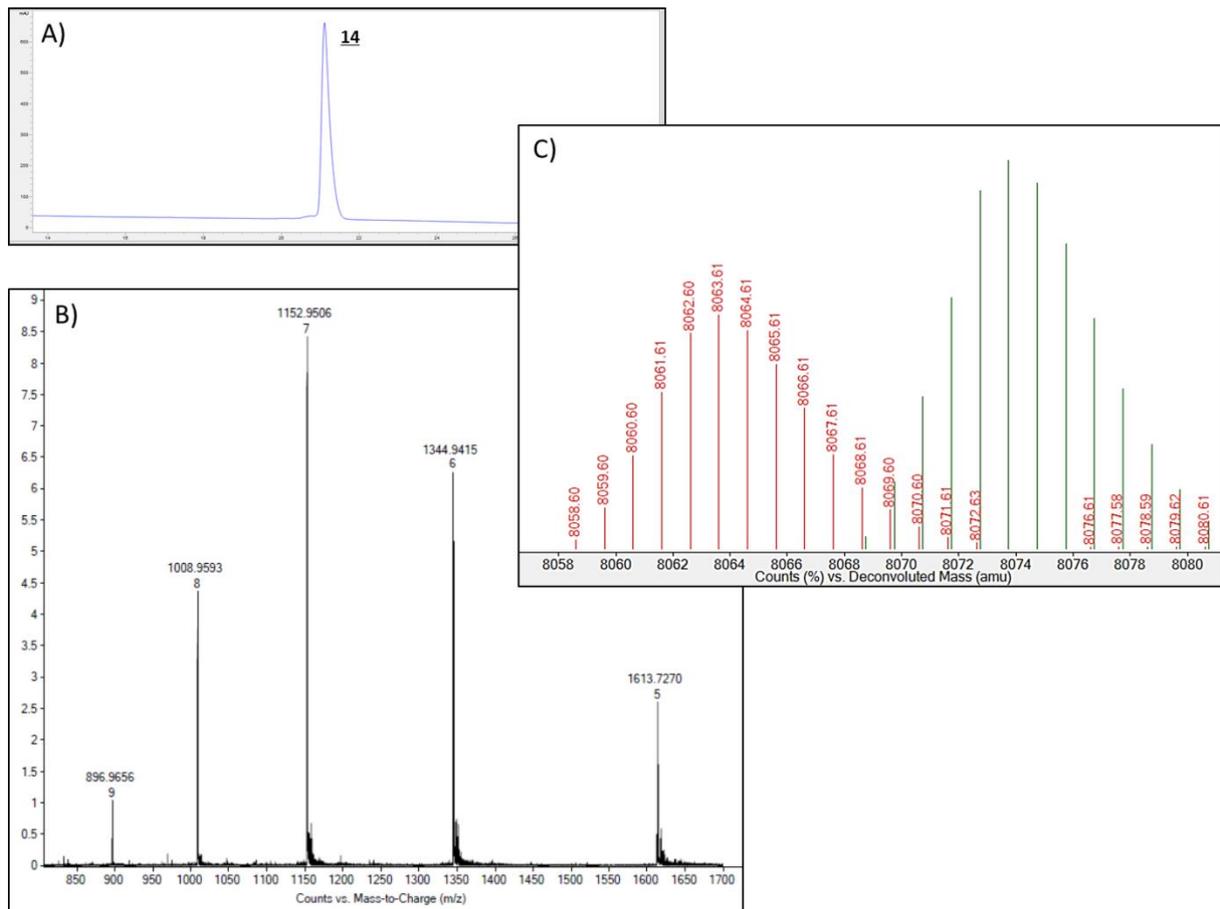


Figure 55 : Analyses RP-HPLC et HRMS de l' α -BgTx repliée **14**. A) Analyse RP-HPLC ($t_R = 21,1$ min, colonne AdvanceBio Peptide C18 25 cm, 214 nm, 15-65 % B en 25 min) de **14** purifié. B) Analyse HRMS de **14** purifié. Le nombre indiqué en dessous du m/z correspond à l'état de charge. M_{mono} calculée : 8058,62 Da ; observée : 8058,60 Da C) Superposition des analyses HRMS déconvoluées de l' α -BgTx repliée **14** (en rouge) et de l' α -BgTx linéaire **13** (en vert).

De manière intéressante, alors que cette toxine forme un pic symétrique par RP-HPLC sur une colonne AdvanceBio C18 25cm, son profil sur colonne Waters XSelect Peptide CSH C18 XP, utilisée en routine pour les analyses qualité des produits finaux produit au sein de la compagnie, laisse apparaître deux pics supplémentaires (Figure 56) pouvant laisser penser à un défaut de pureté. Ayant la toxine naturelle extraite du venin à disposition, celle-ci a été analysée sur ces deux mêmes colonnes pour établir une comparaison, en supposant que l'acide pentynoïque ajouté à la toxine synthétique aurait un impact mineur sur son profil RP-HPLC global. Nous avons été satisfaits de constater que la toxine naturelle avait un comportement similaire à l' α -BgTx synthétique sur ces deux colonnes analytiques. Cela peut s'expliquer par le fait que la phase stationnaire de la colonne CSH est un « mixed-mode » alliant séparation en phase inverse et par échange d'ions. Ainsi, des molécules contenant un nombre important de résidus basiques, comme c'est le cas pour l' α -BgTx (charge nette +4), peuvent avoir un profil particulier sur cette colonne. Cela a par ailleurs été constaté avec plusieurs autres peptides ayant également une charge nette positive importante. Bien qu'une comparaison des temps de rétention ne soit pas appropriée à cause de l'acide pentynoïque, cette constatation laisse penser que la structure native de la toxine a bien été formée.

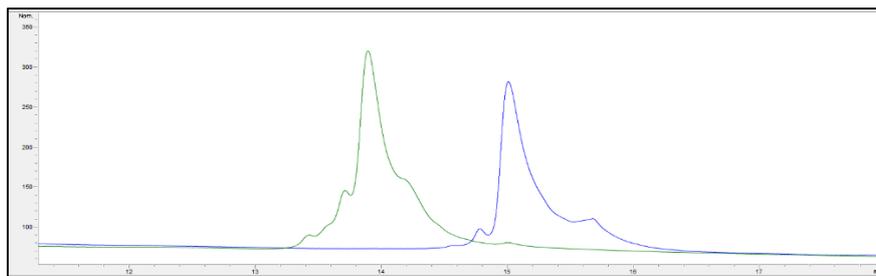


Figure 56 : profils RP-HPLC de l' α -BgTx synthétique **14** (fonctionnalisée à l'extrémité N-terminale par un acide pentynoïque, en bleu) et de l' α -BgTx naturelle (en vert) pures sur la colonne CSH

Afin de vérifier la faisabilité de la réaction de CuAAC sur l' α -BgTx synthétique repliée, nous avons choisi de la marquer sélectivement avec de la cyanine 5 (Cy5). Après solubilisation de la toxine dans un tampon adapté, environ 10 éq. de Cy5-N₃, 10 éq. de complexe CuBr.(CH₃)₂S et 5 éq. de tris(3-hydroxypropyltriazolyméthyl)amine (THPTA) ont été ajoutés. Après une nuit à température ambiante et sous atmosphère inerte, la purification du milieu réactionnel a permis d'isoler la Cy5- α -BgTx repliée **15** avec un rendement de 21 % calculé à partir du dosage à 646 nm de la Cy5. L'excès de Cy5-N₃ a également été récupéré lors de la purification. Malgré un rendement plutôt faible pour une réaction dite de « click », cela montre la possibilité de marquer régiosélectivement l' α -BgTx repliée sur son extrémité N-terminale grâce à cette méthode de synthèse. De plus, les conditions de réactions peuvent certainement être améliorées, en modifiant le nombre d'équivalents de complexe de CuBr et de THPTA et la température de la réaction, par exemple.

Nous avons ainsi montré la possibilité de synthétiser l' α -BgTx par voie chimique à partir de trois fragments peptidiques. De plus, en modifiant son extrémité N-terminale, nous avons montré qu'il était possible de marquer régiosélectivement cette toxine par réaction de CuAAC. Les études sur son activité biologique sont en cours en collaboration avec l'équipe de Michel De Waard à l'Institut du Thorax de Nantes. Pour finir, les résultats de ces recherches font l'objet d'un article en préparation. Il est également à noter qu'une synthèse analogue de l' α -BgTx par une stratégie de NCL à partir de deux fragments a été publiée durant notre étude.²⁷¹ Globalement, la méthode de ligation à partir de fragments hydrazides semble répondre à nos attentes et pouvoir être généralisée dans le cadre de la production de toxines. La déprotection des cystéines protégées avec des groupements AcM avec du palladium reste à être optimisée et testée sur de nouvelles toxines, pour évaluer si cette protection est judicieuse ou doit être remplacé par un autre groupement protecteur.

C. Applications aux projets de Smartox Biotechnology

Grâce à l'expérience acquise au cours des synthèses de l'AmmTx3 et de l' α -Bungarotoxin, plusieurs autres peptides ont pu être synthétisés par cette méthode. Parmi ces molécules, nous nous sommes intéressés à la synthèse de deux toxines, la Notexin et l'U1-cyrtautoxin-As1c, afin d'enrichir le catalogue de toxines de Smartox Biotechnology. De plus, certaines demandes de clients de l'entreprise nous ont amené à étudier la synthèse de peptides longs. La NCL ne se limitant pas qu'à la synthèse de toxines, nous avons donc appliqué nos connaissances à ces cas-là, et en particulier à deux mini-protéines : la progastrine et un fragment d'immunoglobuline E.

1. Notexine

La Notexine (NTX) a été isolée du venin du serpent tigre australien *Notechis Scutatus Scutatus* pour la première fois en 1972,²⁷² et sa séquence peptidique exacte déterminée trois ans plus tard.²⁷³ Cette toxine est composée de 119 acides aminés et sept ponts disulfures entre les cystéines C1-C8, C2-C14, C3-C5, C4-C13, C6-C12, C7-C10, et C9-C11 (Figure 57).²⁷⁴ La NTX inhibe la transmission neuromusculaire en bloquant au sein du système cholinergique l'excrétion d'acétylcholine. A notre connaissance, cette toxine est proposée commercialement uniquement à partir de venin purifié. Afin de proposer une alternative à cette source, nous nous sommes intéressés à sa synthèse par voie chimique. Une fois la stratégie de synthèse mise au point, cela permettrait, à l'image de l' α -Bungarotoxine, de pouvoir proposer cette toxine marquée régiosélectivement, ou encore de pouvoir fournir des mutants de NTX.

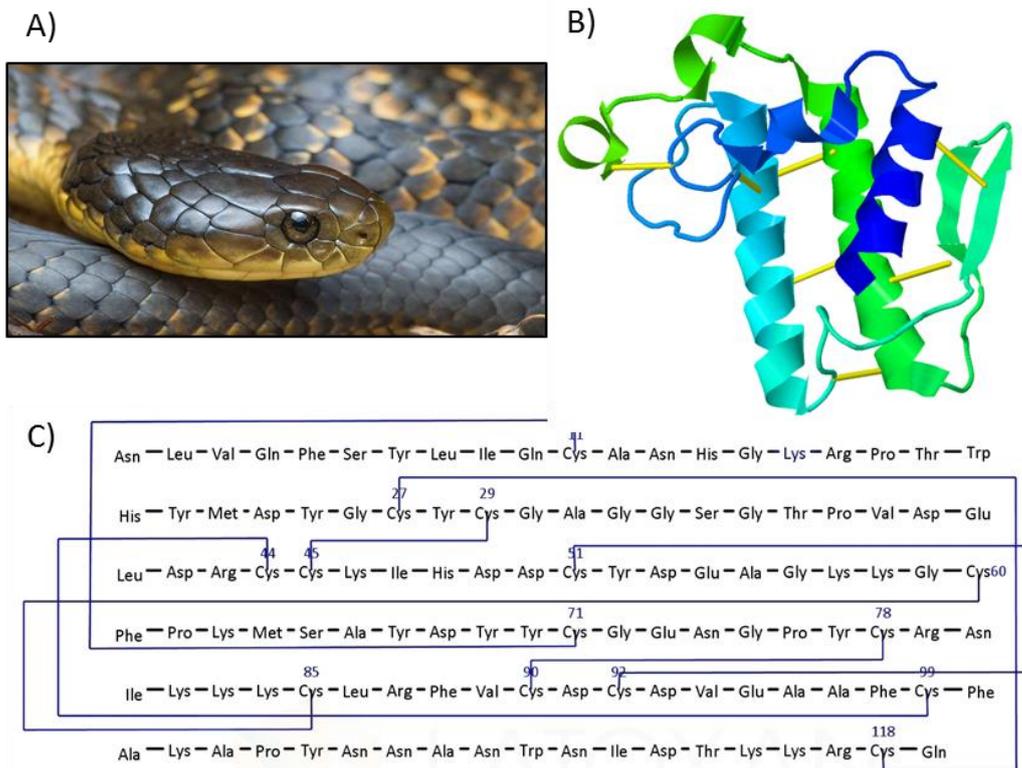


Figure 57 : Notexine. A) *Notechis Scutatus Scutatus* (source : www.latoxan.net) ; B) structure tridimensionnelle de la Notexine (PDB : 4E4C) les ponts disulfures sont représentés en jaune ; C) Séquence peptidique de la Notexine (source : www.latoxan.net)

Au vu de la longueur de la NTX, nous avons envisagé une stratégie de synthèse par NCL à trois fragments d'une quarantaine d'acides aminés chacun. Le premier fragment ainsi défini, correspondant à l'extrémité N-terminale de la NTX, est le peptide hydrazide NTX(1-43) **16** donnant un point de liaison Arg-Cys. Le fragment médian suivant a été choisi comme le peptide cystéinyle hydrazide NTX(44-84) **17**, pour donner un point de liaison Lys-Cys avec le fragment cystéinyle NTX(85-119) **18** correspondant à l'extrémité C-terminale de la NTX. Afin de ne pas ajouter d'étape supplémentaire de déprotection d'une cystéine, les ligations ont été envisagées séquentiellement de l'extrémité N-terminale vers C-terminale, avec la méthode hydrazide de Liu (Figure 58A).

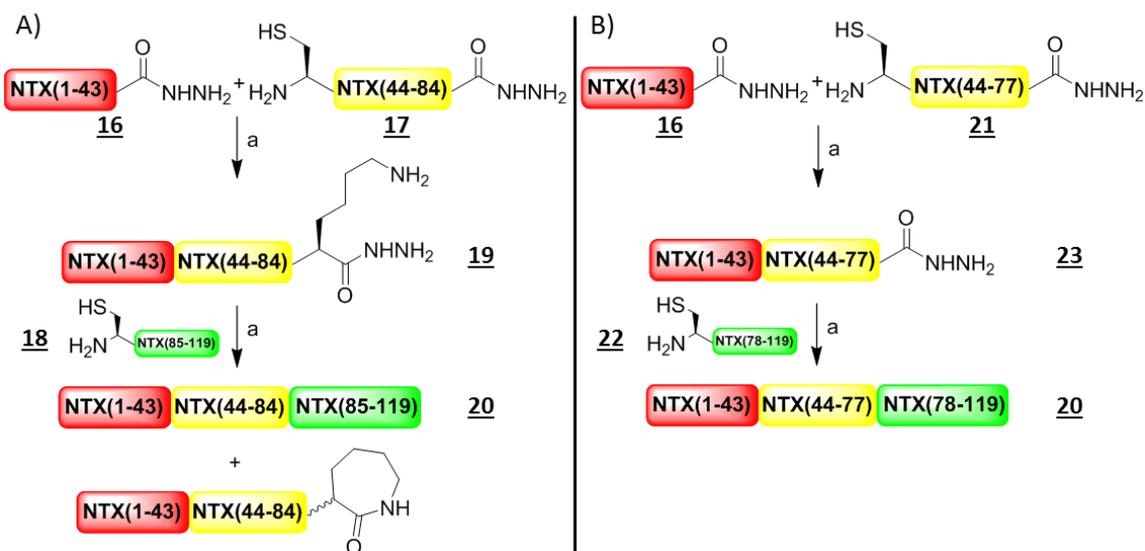


Figure 58 : Stratégies de synthèse de la Notexin par NCL. A) Première stratégie utilisant le fragment NTX(44-84) et menant à la formation d'un lactame. a) NCL : 0,2 M NaH₂PO₄, 6 M Gn.HCl, pH 3, -15°C, 10 éq. NaNO₂, 20 min, puis 100 éq. MPAA, pH 6,5, température ambiante, une nuit. B) Seconde stratégie avec les fragments NTX(1-43), NTX(44-77) et NTX(78-119) pour éviter la formation du lactame indésiré

Les trois fragments ainsi définis ont été synthétisés par SPPS automatisée sur résine 2-CTC. Lors de la première synthèse du fragment NTX(1-43), la présence de plusieurs peptides tronqués a été constatée. La synthèse a ainsi été optimisée en augmentant le nombre de couplages des acides aminés manquants en vue d'améliorer la qualité de la synthèse. Après purification, ce fragment a été obtenu avec un rendement faible de 12%. Le fragment NTX(44-84) a quant à lui été isolé avec un rendement de 9%. Bien que ce rendement soit faible, celui-ci a été obtenu en quantité suffisante pour la suite des manipulations, si bien qu'une nouvelle synthèse avec optimisation n'a pas été nécessaire. Le fragment C-terminal s'est révélé être particulièrement difficile à purifier, si bien que celui-ci a simplement été dessalé par RP-HPLC avant d'être engagé dans les réactions de NCL. En effet, l'analyse HRMS du composé montrait que le produit désiré était majoritairement présent, de même qu'un pic majoritaire se dégageait de l'analyse par RP-HPLC. De plus, les impuretés peptidiques présentes correspondaient à des peptides tronqués, et ne possédaient donc pas la cystéine N-terminale nécessaire à la réaction de ligation. Lors de la NCL, les impuretés ne devraient donc pas interférer dans la réaction, et le produit de ligation, en ayant des propriétés physico-chimiques différentes, pourra être purifié plus facilement que le fragment seul.

La ligation des fragments NTX(1-43) et NTX(44-84) a tout d'abord été entreprise, avec un excès théorique du second fragment qui présentait un défaut de pureté. Après une nuit à température ambiante, le produit de ligation NTX(1-84) **19** a été isolé avec un rendement de 33 % (Figure 59). Le fragment NTX(1-84) ayant une fonction hydrazide à son extrémité C-terminale, il a par la suite été engagé dans une seconde réaction de ligation avec le fragment NTX(85-119). Après une nuit à température ambiante, un produit minoritaire correspondant à la NTX linéaire **20** a pu être isolé avec un rendement décevant de 12 %. Deux produits majoritaires ont par ailleurs été isolés. Après analyses par HRMS, ceux-ci correspondent très

probablement au produit d'hydrolyse du thioester du fragment NTX(1-84) d'une part (avec l'extrémité C-terminale carboxylé, différence de masse de -14 Da par rapport à la masse du peptide hydrazide NTX(1-84)) et d'autre part au produit decyclisation sous forme de lactame de la chaîne latérale de la lysine C-terminale (différence de masse de -32 Da par rapport à la masse du peptide hydrazide NTX(1-84)). La première espèce indique une réaction de ligation trop lente favorisant l'hydrolyse du fragment hydrazide activé sous forme d'acyle azoture ou de thioester. La seconde espèce portant la fonction lactame indique une attaque nucléophile de l'amine en ϵ de la lysine K84 sur l'extrémité C-terminale activée du fragment, comme cela a déjà pu être observé.¹⁶² La formation de ce produit secondaire au point de ligation Lys-Cys n'est cependant pas systématique, et sa propension semble être dépendante de plusieurs facteurs, dont la séquence peptidique et le mode d'obtention du thioester.¹⁶² Au vu du mécanisme de cette réaction indésirable, un moyen de la supprimer pourrait être de protéger la lysine impliquée par un groupement protecteur orthogonal qui serait déprotégé après ligation. Afin de s'épargner une étape supplémentaire de déprotection, nous avons plutôt opté pour un changement du point de ligation, puisque la NTX offre de nombreuses combinaisons de fragments différentes.

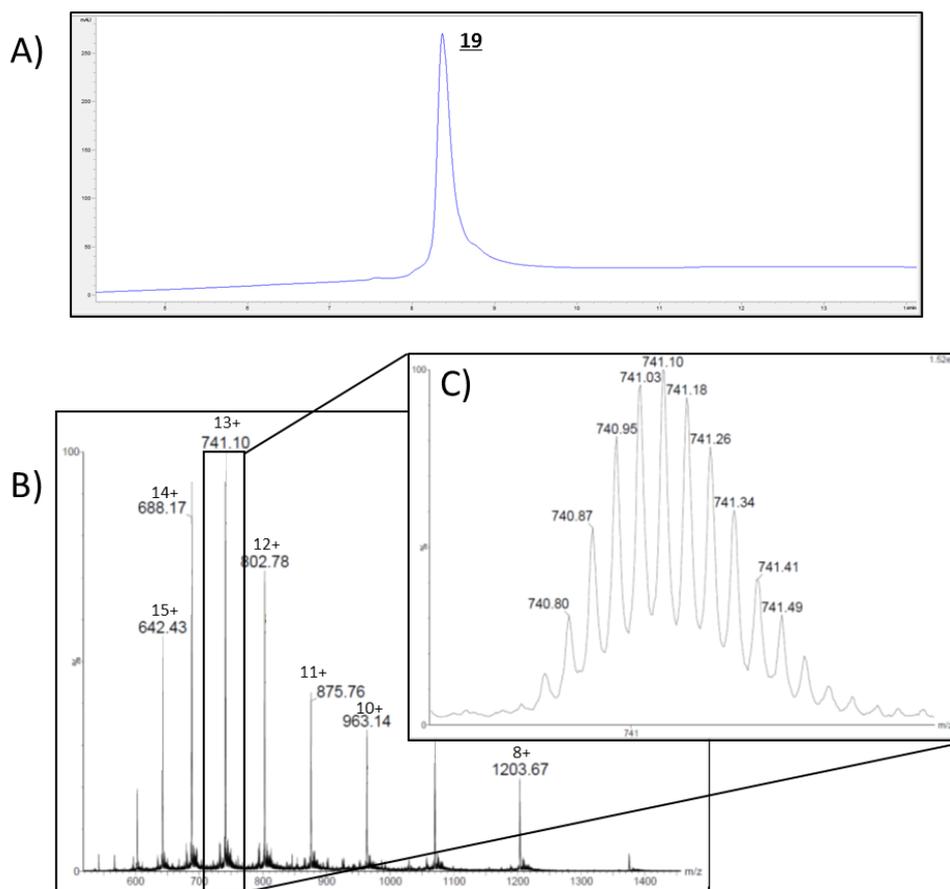


Figure 59 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la NTX(1-84) **19**. A) Analyse RP-HPLC ($t_R = 8,5$ min, colonne AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min) de **19** purifié. B) Analyse HRMS de **19** purifié. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 13+. M_{mono} calculée : 9615,28 Da ; observée : 9615,19 Da

Afin de ne pas avoir à synthétiser de nouveau le fragment NTX(1-43), seul le second point de ligation a été décalé. Nous avons ainsi défini les fragments NTX(44-77) **21** et NTX(78-119) **22** avec un point de ligation Tyr-Cys (Figure 58B). De plus, nous avons évalué la pertinence de cette stratégie avec un outil en libre accès nouvellement développé par le groupe de Kay : Aligator.²⁷⁵ Ce logiciel permet de simuler toutes les stratégies de ligation envisageables à partir d'une séquence donnée et d'une longueur maximale de fragment. Ces stratégies sont ensuite classées selon un système de scores attribués en fonction de cinq critères : les points de ligation favorables ou non, la solubilité estimée des fragments, l'équilibre entre les longueurs de chaque fragment, l'implication d'une ou plusieurs désulfurations, et le nombre de ligation. De manière satisfaisante, notre nouvelle stratégie s'est avérée être la première du classement selon ce logiciel.

Les nouveaux fragments NTX(44-77) **21** et NTX(78-119) **22** ont ainsi été synthétisés sur support solide avec des rendements respectifs de 16 % et 19 %. Bien que le fragment NTX(44-77) n'ait pas pu être obtenu pur après une première purification, celui-ci a été utilisé sans purification supplémentaire, puisque le peptide tronqué présent en mélange ne possède pas la cystéine *N*-terminale nécessaire à la réaction de ligation. Les peptides NTX(1-43) **16** et NTX(44-77) **21** ont ainsi été engagés dans une réaction de ligation pendant une nuit, avec le second fragment en excès. Après purification, le fragment NTX(1-77) **23** désiré a été obtenu avec un rendement de 22 % calculé à partir du fragment *N*-terminal en défaut (Figure 60). Cependant, la disparition totale du fragment NTX(44-77) **21** et la coélution du produit de ligation avec NTX(1-43) hydrolysé tend à montrer que la faible pureté du fragment NTX(44-77) a faussé le nombre d'équivalents réellement introduits dans le milieu réactionnel. Ainsi, le fragment médian NTX(44-77) semble avoir été le réactif limitant de cette réaction, et un excès encore plus important aurait dû être introduit.

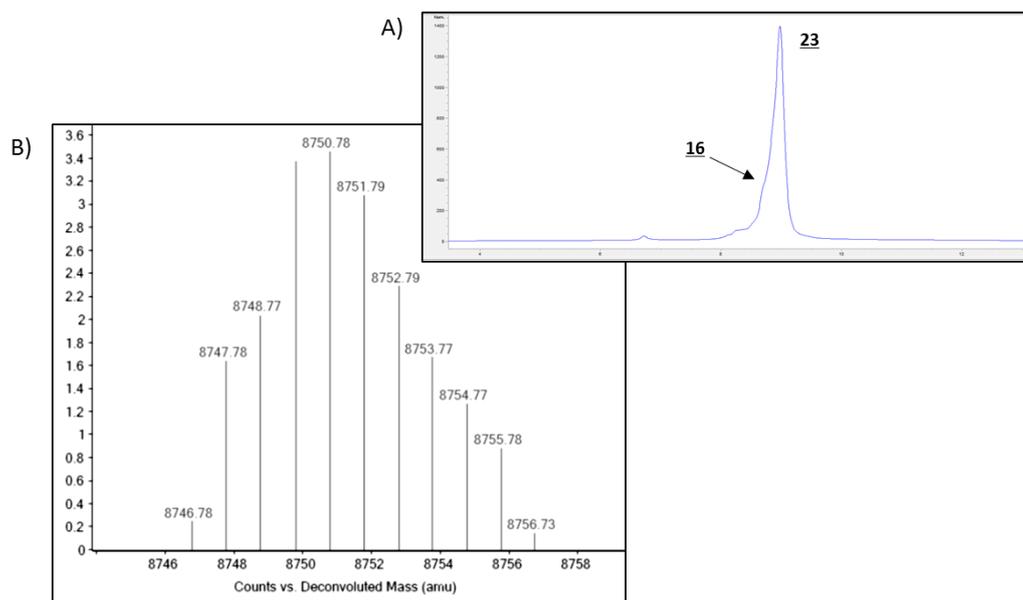


Figure 60 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la NTX(1-77) **23**. A) Analyse RP-HPLC ($t_R = 9,0$ min, colonne AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min) de **23** purifié. **16** est présent sous forme hydrolysé. B) Analyse HRMS déconvoluée de **23** purifié. M_{mono} calculée : 8744,75 Da ; observée : 8746,78 Da. L'intensité de la masse monoisotopique est trop faible pour être observée ici.

Malgré tout, le fragment NTX(1-77) **23** a été engagé dans une réaction de NCL avec un excès de peptide NTX(78-119) **22**. Après une nuit de réaction et purification, la NTX linéaire **20** a été obtenue avec un rendement de 35 %, nettement supérieur au rendement précédemment obtenu (Figure 61). Malgré les deux purifications suivant les réactions de NCL, des traces de NTX(1-43) hydrolysé sont toujours présentes. Celles-ci devraient vraisemblablement pouvoir être facilement éliminées après le repliement oxydatif de la NTX, puisqu'un changement plus important de temps de rétention est attendu pour la toxine entière que pour le fragment après formation des ponts disulfures.

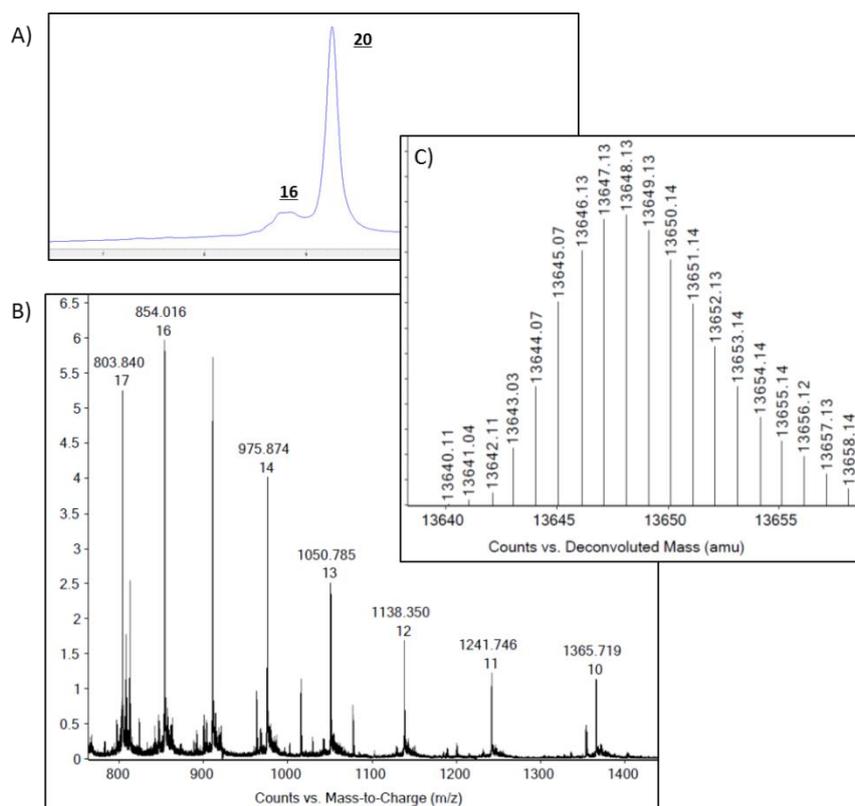


Figure 61 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la NTX linéaire **20**. A) Analyse RP-HPLC ($t_R = 9,3$ min, colonne AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min) de **20** purifié. **16** est présent sous forme hydrolysé et avec un pont disulfure avec du MPAA. B) Analyse HRMS de **20** purifié. Le nombre indiqué en-dessous du m/z correspond à l'état de charge. C) Déconvolution de l'analyse HRMS B. M_{mono} calculée : 13639,08 Da ; observée : 13640,11 Da. L'intensité de la masse monoisotopique est trop faible pour être observée ici.

La séquence linéaire de 119 acides aminés de la Notexine a ainsi pu être obtenue grâce à deux NCLs successives à partir de trois fragments judicieusement définis. Les synthèses peptidiques sur support solide de chaque fragment, qui semblent être le paramètre le plus limitant de cette stratégie, sont en cours d'amélioration. De même, les conditions de repliement les plus adaptées à la NTX doivent être déterminées. En effet, les conditions les plus couramment utilisées n'ont mené qu'à la formation d'agrégats insolubles, ce qui tend à montrer que la NTX nécessite des conditions particulières pour être correctement repliée. L'utilisation de sels chaotropiques tels que la guanidine ou l'urée, ainsi que l'ajout de co-solvants organiques, seront certainement nécessaires.

2. U1-Cyrtautoxine-As1c

L'U1-Cyrtautoxine-As1c (U1-CUTX-Asc1c, raccourci en CUTX ici) est une toxine initialement isolée du venin d'araignée *Aptostichus schlingeri*.^{276,277} Elle est composée de 76 résidus et contient quatre ponts disulfures indéterminés à ce jour (Figure 62). Bien que relativement peu étudiée, cette toxine semble présenter un intérêt particulier en tant qu'insecticide. Une fois de plus, dû à sa taille, ce peptide est proposé commercialement principalement à partir d'une production avec des organismes recombinants. En conséquence, celle-ci est vendue avec au minimum une modification de l'extrémité *N*-terminale pour permettre sa purification. Ceci nous a poussé à proposer une solution alternative de production en établissant une stratégie de synthèse par ligation.

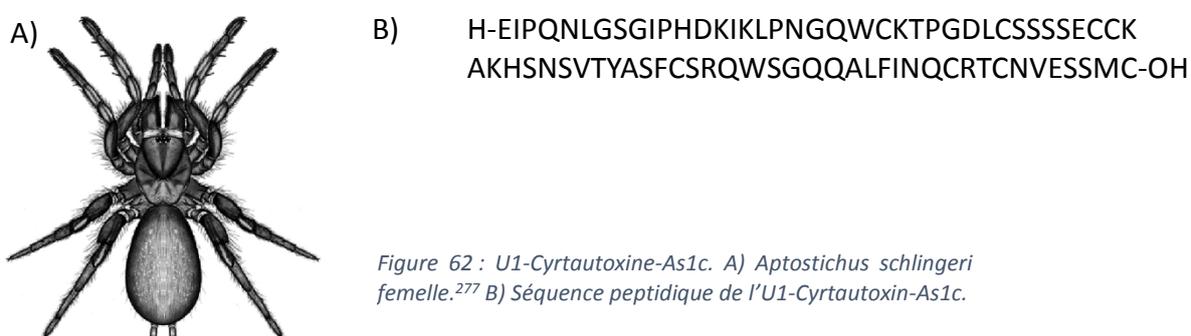


Figure 62 : U1-Cyrtautoxine-As1c. A) *Aptostichus schlingeri* femelle.²⁷⁷ B) Séquence peptidique de l'U1-Cyrtautoxin-As1c.

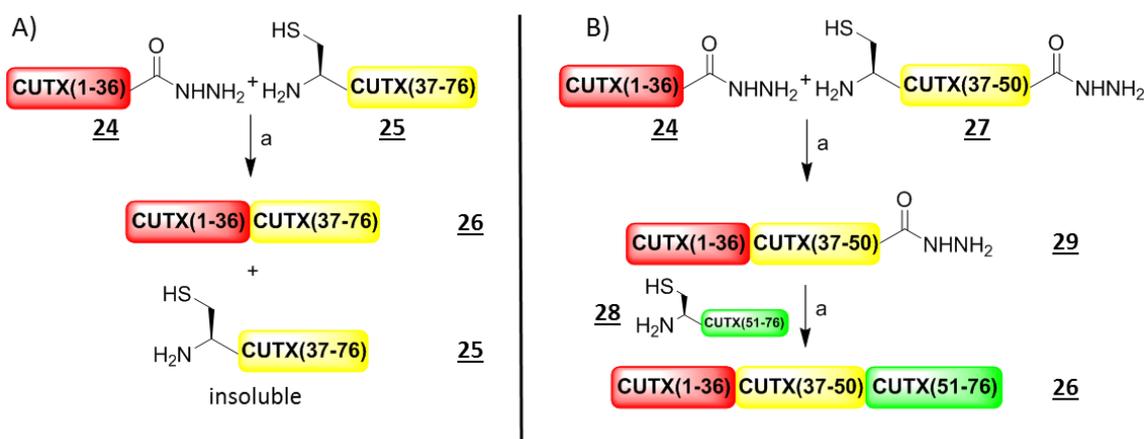


Figure 63 : Stratégies de synthèse de l'U1-Cyrtautoxine-As1c par NCL. A) Première stratégie à partir de deux fragments. Le fragment **25** est insoluble dans les conditions de NCL et mène à une réaction incomplète. a) NCL : 0,2 M NaH₂PO₄, 6 M Gn.HCl, pH 3, -15°C, 10 éq. NaNO₂, 20 min, puis 100 éq. MPAA, pH 6,5, température ambiante, une nuit. B) Seconde stratégie à partir de trois fragments.

Pour ce faire, la CUTX a été découpée en deux fragments de tailles équivalentes, CUTX(1-36) **24** correspondant au fragment *N*-terminal et fonctionnalisé avec un hydrazide, et CUTX(37-76) **25** correspondant au fragment *C*-terminal (Figure 63). Le point de ligation ainsi défini est Cys-Cys. Les deux fragments ont été synthétisés sur résine 2-CTC avec des rendements après purification de 23 % et 4 % respectivement. Le faible rendement du second

fragment est dû à une solubilité très limitée du fragment CUTX(37-76) avant purification. Une partie du peptide brut a ainsi été perdue par filtration avant purification. Une quantité suffisante a malgré tout pu être isolée pour pouvoir réaliser une réaction de ligation avec le fragment complémentaire en excès. Cependant, sa solubilité dans le tampon de NCL a ici encore posé problème. Malgré l'ajout de co-solvants organiques améliorant légèrement sa solubilisation, ce fragment était partiellement insoluble durant la réaction de ligation. Ainsi, à l'issue de la réaction, la CUTX linéaire **26** n'a pu être purifiée que sous forme de mélange avec CUTX(37-76), pourtant introduit en défaut. La part en suspension de ce fragment n'a vraisemblablement pas réagi avec le fragment CUTX(1-36), conduisant à une consommation incomplète de ce réactif.

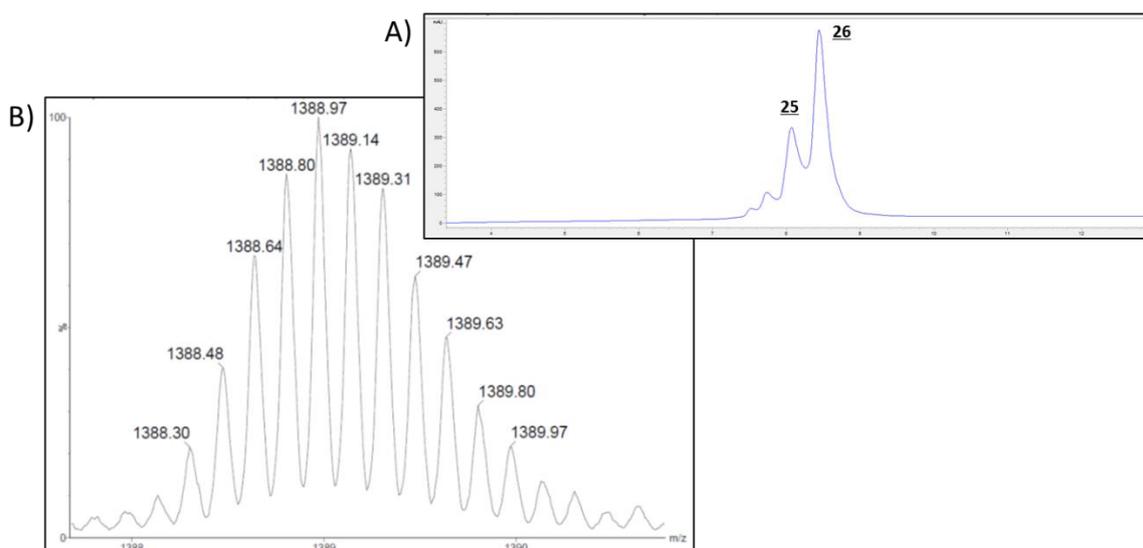


Figure 64 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la CUTX linéaire **26** obtenu par la stratégie à deux fragments. A) Analyse RP-HPLC ($t_R = 8,1$ min et $8,4$ min, colonne AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min) de **26**. **25** n'a pu être séparé par purification RP-HPLC préparative. B) Analyse HRMS de **26**. Zoom sur l'état de charge $6+$. M_{mono} calculée : 8321,79 Da ; observée : 8321,76 Da.

Plusieurs solutions existent pour pallier les problèmes de solubilisation d'un fragment, la plupart utilisant l'ajout d'un tag solubilisant temporaire à la séquence peptidique. Ceci est par exemple possible avec la résine Dawson, comme décrit précédemment.¹⁸⁷ Cependant, le fragment concerné ici correspond au fragment cystéinyle de la CUTX, et n'est donc pas fonctionnalisé à son extrémité C-terminale. Une autre méthode assez élégante a été développée assez récemment et exploite la chaîne latérale d'une lysine.²⁷⁸ Cette méthode consiste à synthétiser le peptide hydrophobe avec une des lysines natives protégée avec un groupement protecteur 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthyle (Dde). A la fin de l'élongation de la chaîne peptidique, le groupement Dde est alors retiré sur résine par traitement avec de l'hydrazine. La lysine libre ainsi obtenue peut alors être fonctionnalisée sur sa chaîne latérale avec un groupement N-Fmoc-1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)-3-[2-(2-aminoéthoxy)éthoxy]-propan-1-ol (Fmoc-Ddae-OH, Figure 65) qui réagit spontanément en présence de l'amine. Ce groupement est dérivé du Dde et possède la même réactivité que celui-ci par rapport à l'hydrazine. Il présente de plus un *linker* PEG terminé par une amine protégée, qui permet la fixation d'un tag solubilisant. Une fois le Fmoc-Ddae-OH installé sur la lysine, le Fmoc peut alors être déprotégé et le tag Lys₆, par exemple, synthétisé par SPPS

classique sur la chaîne latérale. Afin d'éviter une élongation de la séquence peptidique principale, le dernier acide aminé aura préalablement été introduit avec une protection Boc à l'extrémité *N*-terminale. Après séparation de la résine et déprotection, le peptide est ainsi obtenu avec le tag solubilisant accroché sur la chaîne latérale de la lysine *via* le *linker* Ddae. Ce fragment peut alors être engagé dans une réaction de ligation grâce aux propriétés hydrophiles du tag. Une fois la ligation achevée, le tag est enlevé par traitement du peptide avec de l'hydrazine.

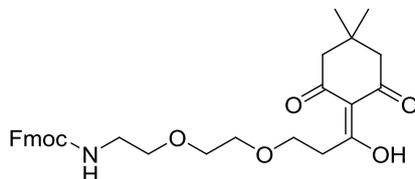


Figure 65 : Fmoc-Ddae-OH

Bien que cette solution ait été envisagée, une autre option a été préalablement testée, plus facile à mettre en œuvre car nécessitant moins d'étapes de synthèse. Celle-ci consistait à segmenter de nouveau le fragment CUTX(37-76) en deux précurseurs plus courts et potentiellement plus solubles. Pour cela, le fragment cystéinyle hydrazide CUTX(37-50) **27** et le fragment cystéinyle CUTX(51-76) **28** ont été synthétisés par SPPS avec des rendements respectifs après purification de 90 % (certainement surestimé par le caractère hygroscopique du produit) et 18%. La première réaction de NCL au point de ligation Phe-Cys entre les peptides hydrazide CUTX(1-36) et cystéinyle hydrazide CUTX(37-50) a permis d'obtenir l'intermédiaire CUTX(1-50) **29** avec un rendement de 46% (Figure 66).

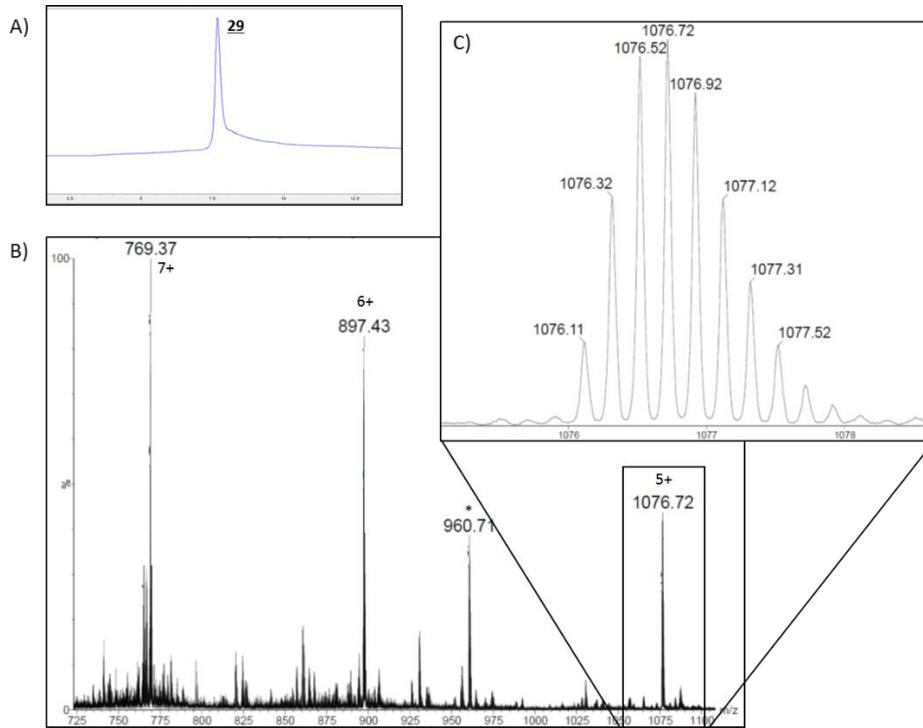


Figure 66 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la CUTX(1-50) **29**. A) Analyse RP-HPLC ($t_R = 7,7$ min, colonne AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min) de **29** purifié. B) Analyse HRMS de **29** purifié. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. La masse indiquée par * correspond à la masse d'un composé non identifié. C) Zoom sur l'état de charge 5+. M_{mono} calculée : 5375,56 Da ; observée : 5375,52 Da

La seconde ligation a ensuite été entreprise avec le fragment CUTX(37-50). De manière satisfaisante, ce dernier était soluble à une concentration de 5mM dans le tampon de NCL, bien que celui-ci nécessite tout de même un temps de sonication prolongé. La réaction de ligation a ainsi été menée pendant une nuit à 37°C, pour donner après purification la séquence peptidique de la CUTX linéaire **26** avec un rendement de 28 % (Figure 67). De manière intéressante, la toxine linéaire semble peu stable en solution, à en juger par les produits de dégradation apparaissant lors de l'analyse par RP-HPLC du peptide purifié (Figure 67A, $t_R = 5,5$ min). De plus, un décalage de temps de rétention important entre le précurseur CUTX(1-50) ($t_R = 7,7$ min) et la CUTX linéaire ($t_R = 8,4$ min) peut être observé. Le fragment ajouté lors de la dernière ligation possède pourtant un temps de rétention proche du précurseur CUTX(1-50) (7,5 min). Cela indique certainement la formation d'une structure tridimensionnelle exposant des résidus hydrophobes à sa surface lorsque la séquence entière est obtenue. Cet exemple montre qu'un produit de ligation n'a pas toujours un temps de rétention compris entre ceux de ses précurseurs, bien que cela soit souvent le cas.

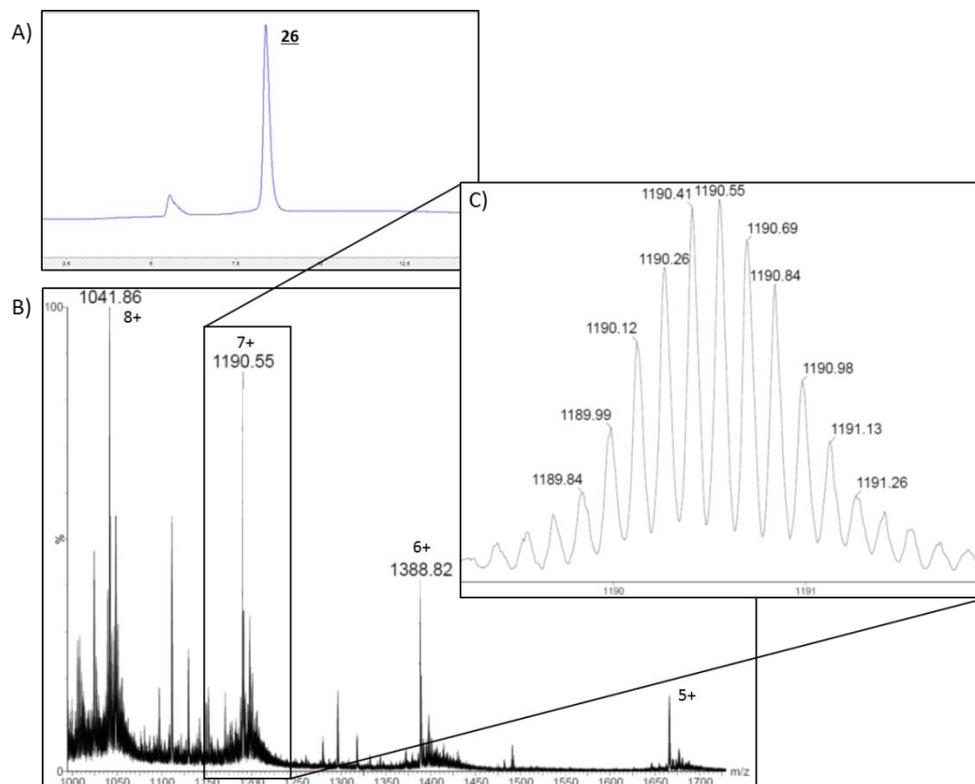


Figure 67 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la CUTX linéaire **26** obtenu par la stratégie à trois fragments. A) Analyse RP-HPLC ($t_R = 8,4$ min, colonne AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min) de **26** purifié. B) Analyse HRMS de **26** purifié. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 7+. M_{mono} calculée : 8321,79 Da ; observée : 8321,81 Da.

Par la suite, la formation des quatre ponts disulfures et le repliement de la toxine ont dû être réalisés. Pour cela, une dizaine de conditions différentes de repliement a été testée, en faisant varier l'espèce chimique tampon, le couple oxydo-réducteur ou l'oxydant utilisé, et la présence de différents co-solvants ou sels chaotropiques. Un suivi par analyse RP-HPLC de ces tests pendant 72 heures a permis de déterminer que la toxine se repliait le plus

efficacement dans un tampon Tris en présence du couple oxydo-réducteur cystéine/cystine pendant au moins 48 heures. De manière intéressante, alors que la plupart des tests donnait la même conformation plus ou moins majoritairement, une des conditions semblait orienter le repliement de la toxine vers une autre structure, à en juger par un temps de rétention différent. Cette condition employait en particulier de la guanidine à une concentration 1 M. Comme nous l'avons vu, un tel dénaturant peut largement modifier le déroulement du repliement en perturbant la tendance naturelle d'un peptide à se replier. Puisque l'ensemble des autres conditions donnait une conformation identique, ces conditions ont donc été écartées au profit de celles décrites ci-dessus, laissant les structures secondaires orienter la formation des ponts disulfures. Avec une montée en échelle, la réaction de repliement de la CUTX linéaire a permis d'obtenir la CUTX repliée **30** avec un rendement de 37 % tout à fait convenable pour ce genre de réactions (Figure 68). Ainsi, l'U1-Cyrtautoxine-As1c a été obtenue avec un rendement total de 5 % sur deux ligations successives et le repliement oxydatif.

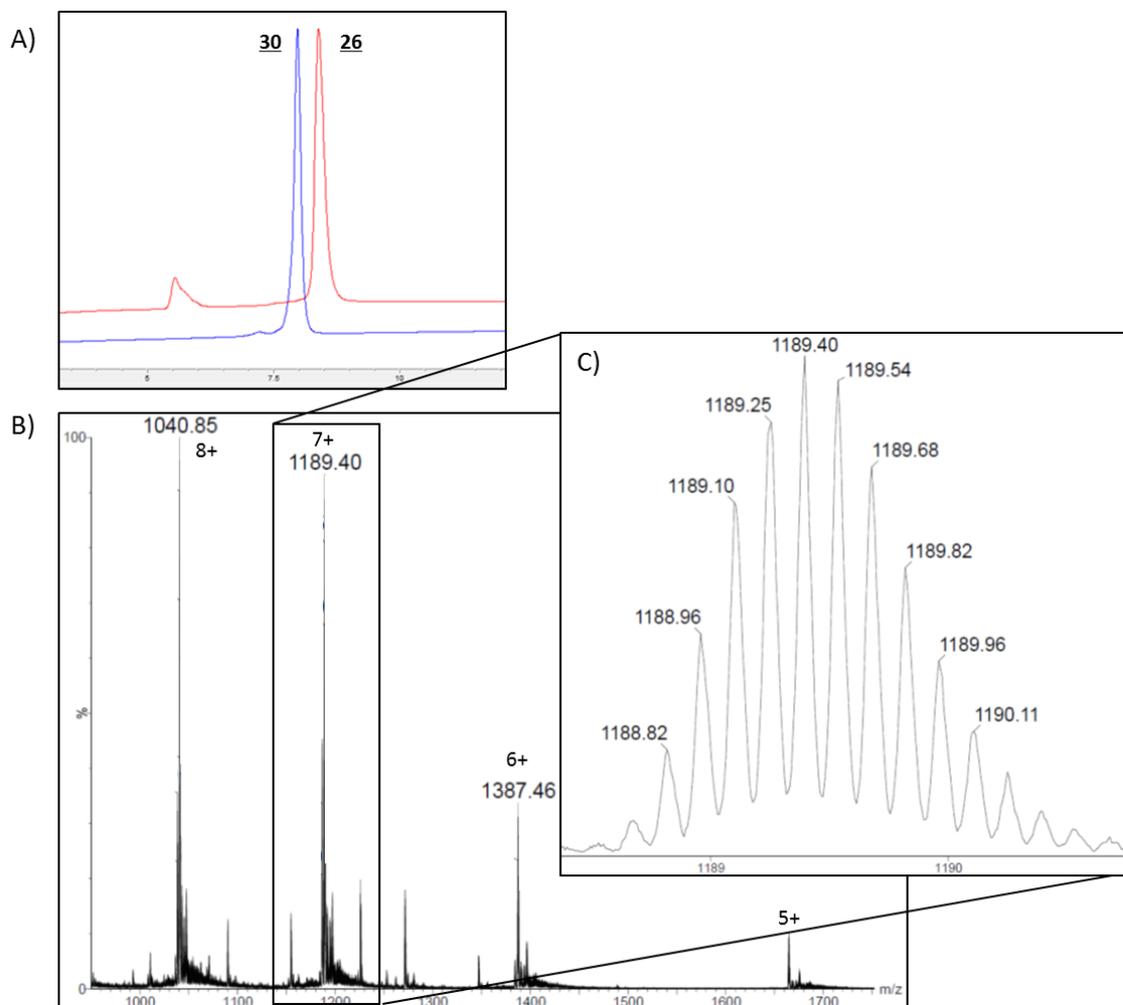


Figure 68 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la CUTX repliée **30**. A) Superposition des analyses RP-HPLC de **30** purifié ($t_R = 8,0$ min, colonne AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min) et de **26** purifié ($t_R = 8,4$ min, colonne AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **30** purifié. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 7+. M_{mono} calculée : 8313,73 Da ; observée : 8313,69 Da.

3. Progastrine

La synthèse de macromolécules peptidiques par NCL ne se limitant pas aux toxines, nous avons pu appliquer cette méthode à la synthèse de peptides longs ne provenant pas de venins. Une des applications où nous avons pu montrer l'utilité de cette réaction de ligation concerne la préparation de la progastrine humaine (Figure 69). La progastrine (ProG) est un peptide de 80 résidus précurseur de plusieurs gastrines, plus courtes, impliquées dans les mécanismes de digestion *via* une voie de signalisation impliquant des GPCRs.^{279,280}

H-SWKPRSQQPDAPLGTGANRDLELPWLEQQGPASHHRRQLG
PQGPPHLVADPSKKQGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN-OH

Figure 69 : Séquence de la Progastrine humaine

La synthèse par une stratégie de ligation de la ProG nécessite ici encore de définir les fragments peptidiques. Cependant, aucune cystéine native ne compose la séquence de cette mini-protéine. En revanche, plusieurs alanines sont présentes dans la chaîne peptidique, si bien que nous avons décidé d'en tirer profit pour les utiliser comme points de ligation. Pour cela, celles-ci seront temporairement mutées en cystéines lors de la synthèse des fragments sur support solide. Après les différentes ligations, les cystéines pourront être désulfurisées pour donner les alanines natives de la séquence de la ProG, comme décrit précédemment. Le résidu A32 a une position quasi centrale et pourrait faire office de point de ligation dans notre cas. Cependant, celui-ci implique une ligation avec une proline connue pour être très défavorable. Ainsi, le résidu A49 constitue une alternative légèrement plus favorable en donnant un point de ligation avec une valine. Une première synthèse par SPPS du fragment ProG(1-48) n'a pas permis d'obtenir la séquence désirée, avec de nombreux arrêts entre les acides aminés W25 et R36. Une nouvelle synthèse a donc été réalisée jusqu'au résidu N18 en augmentant le nombre de couplage de cette zone difficile. Bien qu'envisageable, l'introduction de la pseudoproline AS n'était ici pas judicieuse puisque la proline adjacente induit déjà un coude dans la chaîne peptidique. Les analyses réalisées sur un échantillon de résine en cours de synthèse ont révélé une légère amélioration de la qualité de la synthèse, cependant pas suffisante pour espérer obtenir le fragment entier avec de bons rendements. Ainsi, la synthèse a été terminée par l'ajout d'une cystéine pour donner le fragment médian ProG*(17-48) **31** (avec * signalant la mutation de l'alanine N-terminale en cystéine). La séquence correspondant à l'extrémité N-terminale de la ProG a donc été synthétisée séparément pour former le fragment ProG(1-16) **32**, ce qui offre un point de ligation Gly-Cys particulièrement favorable. Pour finir, le peptide cystéinyle ProG*(49-80) **33** a également été synthétisé pour pouvoir compléter par ligation la séquence de la mini-protéine recherchée. Après purification, les fragments ProG(1-16), ProG*(17-48) et ProG*(49-80) ont ainsi été obtenus avec des rendements de 40 %, 7 % et 15 %.

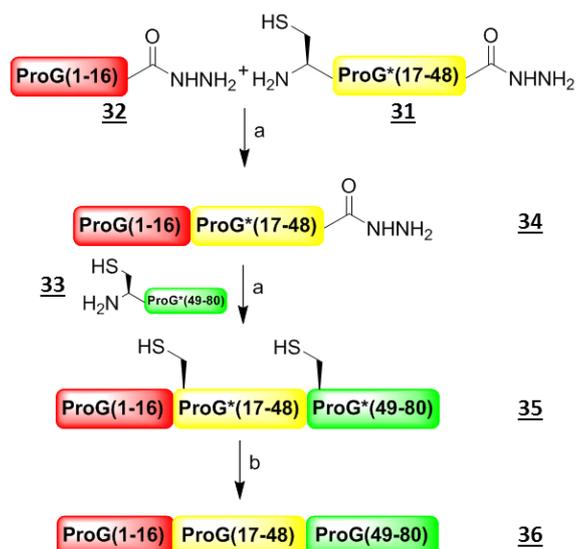


Figure 70 : Stratégie de synthèse de la Progastrine par NCL. a) NCL : 0,2 M NaH_2PO_4 , H_2O , 6 M Gn.HCl , pH 3, -15°C, 10 éq. NaNO_2 , 20 min, puis 100 éq. MPAA, pH 6,8, température ambiante, une nuit. b) désulfuration : 0,2 M NaH_2PO_4 , 6 M Gn.HCl , pH 6,8, 100 éq. TCEP, 20 μL tBuSH, 50 éq. VA-044, atmosphère inerte, 37°C, 4 h.

La première ligation entre les fragments ProG(1-16) et ProG(17-48) a par la suite été entreprise (Figure 70). Le second fragment ayant été le plus difficile à obtenir, celui-ci a été introduit en défaut. De plus, celui-ci a un temps de rétention plus important que ProG(1-16), et a donc plus de chance de co-éluer avec le produit de ligation s'il est introduit en excès. Après une nuit de réaction à température ambiante, une analyse ESI-HRMS du milieu réactionnel a permis de constater la consommation totale du fragment en défaut et la formation du produit de ligation désiré. Ainsi, le peptide ProG*(1-48) **34** a été isolé par purification RP-HPLC avec un rendement de 50 % (Figure 71).

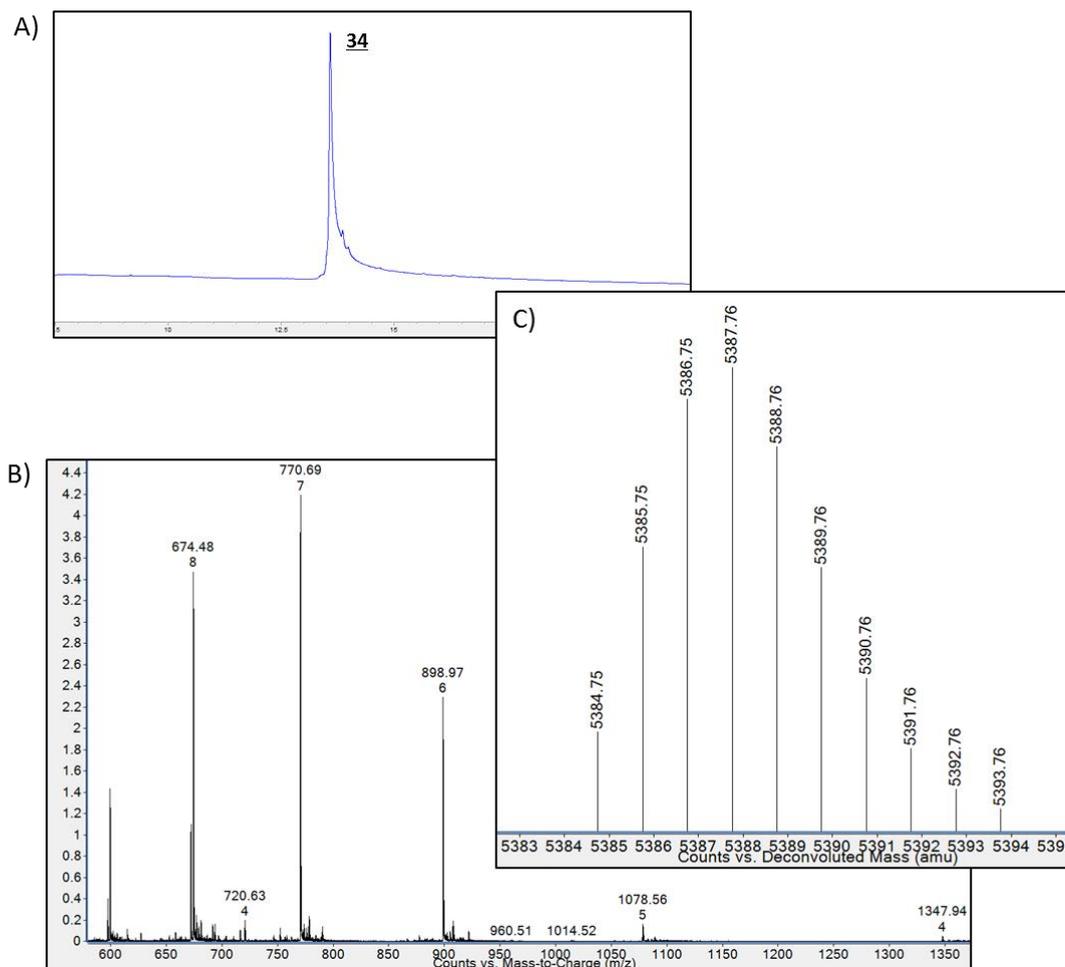


Figure 71 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la ProG*(1-48) **34**. A) Analyse RP-HPLC ($t_R = 13,6$ min, colonne Waters XSelect Peptide CSH C18 XP, 214 nm, 5-60 % B en 20 min) de **34** purifié. B) Analyse HRMS de **34** purifié. Le nombre indiqué en-dessous du m/z correspond à l'état de charge. C) Déconvolution de l'analyse HRMS B. M_{mono} calculée : 5384,74 Da ; observée : 5384,75 Da.

Par la suite, une nouvelle ligation de ce peptide avec son fragment cystéinyle complémentaire ProG*(49-80) a été réalisée. Avec satisfaction, la formation de la ProG* linéaire **35** contenant deux cystéines non-natives a été constatée après une nuit de réaction. Celle-ci a ainsi pu être isolée avec un rendement de 52 % après purification (Figure 72). La ligation entre la valine et la cystéine, particulièrement lente, n'a ainsi pas posé de problème ici en prolongeant suffisamment la réaction. De manière intéressante, l'hydrolyse du fragment ProG*(1-48), qui aurait pu entrer en compétition avec la réaction de ligation, n'a pas été constatée dans notre cas à pH 6,8.

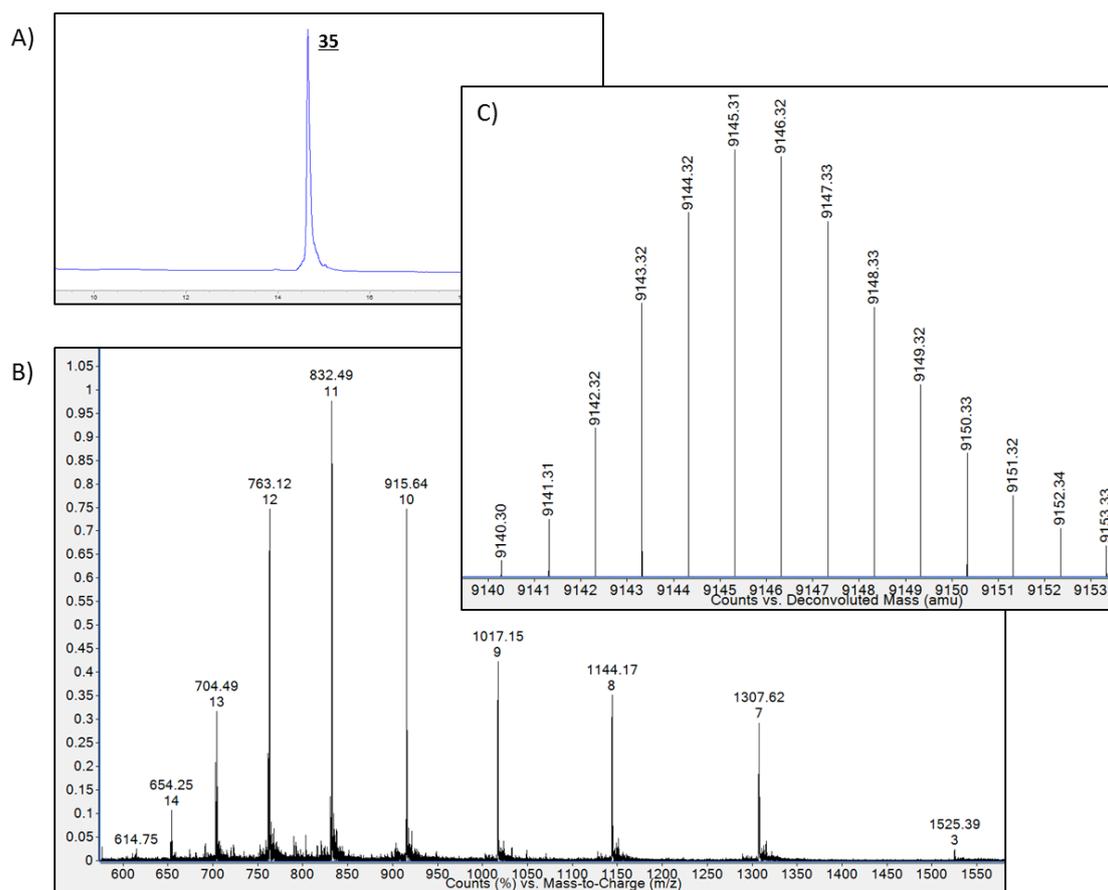


Figure 72 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la ProG* linéaire **35**. A) Analyse RP-HPLC ($t_R = 14,6$ min, colonne Waters XSelect Peptide CSH C18 XP, 214 nm, 5-60 % B en 20 min) de **35** purifié. B) Analyse HRMS de **35** purifié. Le nombre indiqué en-dessous du m/z correspond à l'état de charge. C) Déconvolution de l'analyse HRMS B. M_{mono} calculée 9140,31 Da ; observée : 9140,28 Da.

Afin de récupérer la séquence native de la ProG, la désulfuration des cystéines en position 17 et 49 a ensuite dû être réalisée. Pour cela, le protocole de désulfuration radicalaire de Wan et Danishefsky utilisant du VA-044 en tant qu'initiateur radicalaire a été appliqué.¹⁶⁹ La ProG* linéaire a ainsi été mise en présence de cet initiateur radicalaire avec du TCEP et du *t*BuSH sous atmosphère inerte, et la réaction a été suivie par analyses ESI-HRMS. Après 4 heures de réaction, la disparition totale du composé de départ et la formation d'un produit ayant une masse inférieure de 64 Da par rapport à la ProG* linéaire ont confirmé la conversion des deux cystéines en alanines. Cependant, la formation de deux autres produits ayant des différences de masse de -17 Da et +1 Da avec le produit désiré a également été constatée. Ces différences de masse sont typiques de la formation d'aspartimide ou de glutaramide à partir des acides aminés Asn ou Gln, suivie de la réouverture du cycle par l'eau. La présence dans la séquence de la ProG de trois motifs QG, particulièrement sensible à cette réaction secondaire, tend à confirmer cette hypothèse. Malgré tout, la purification du milieu réactionnel a permis d'obtenir la ProG linéaire **36** native avec un rendement de 35 % (Figure 73). Ainsi, la progastrine a été synthétisée en trois étapes avec un rendement total de 9 %.

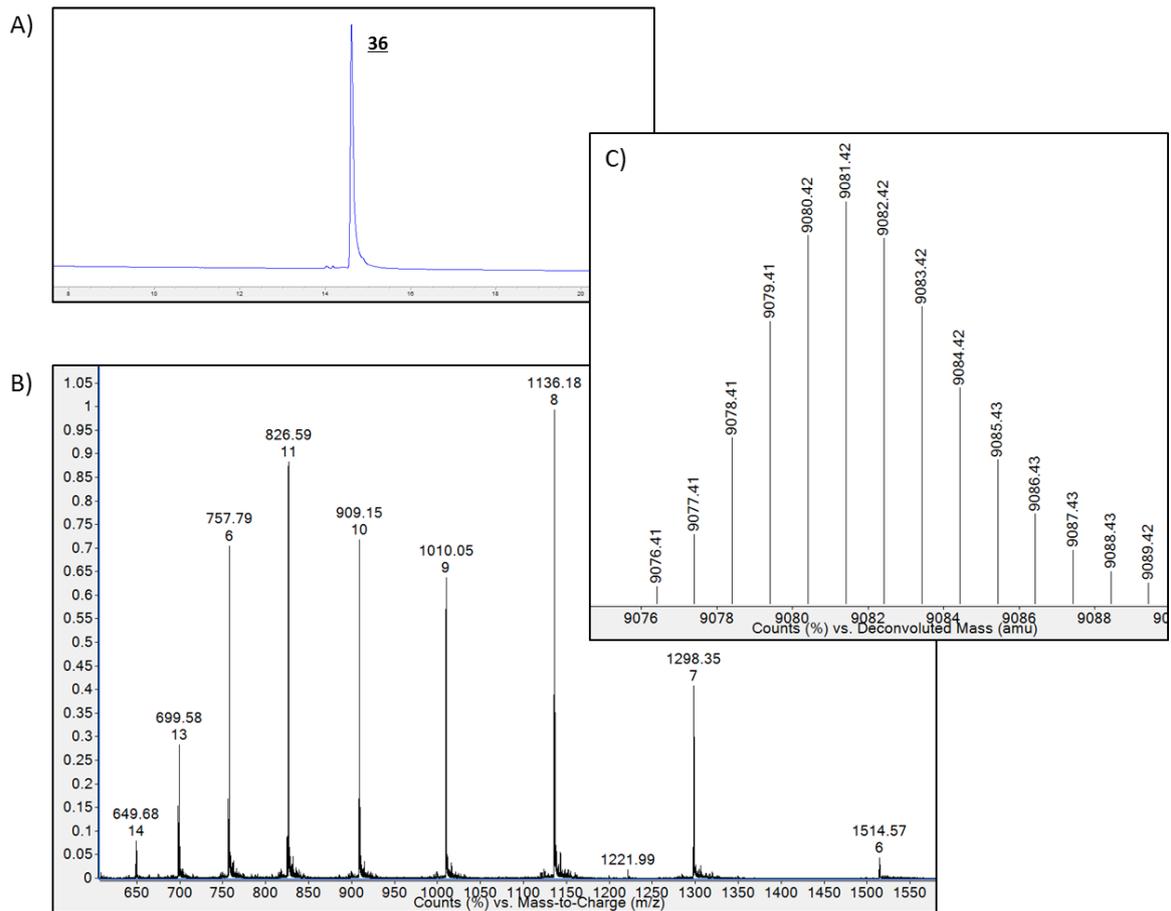


Figure 73 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la ProG linéaire **36**. A) Analyse RP-HPLC ($t_R = 14,7$ min, colonne Waters XSelect Peptide CSH C18 XP, 214 nm, 5-60 % B en 20 min) de **36** purifié. B) Analyse HRMS de **36** purifié. Le nombre indiqué en-dessous du m/z correspond à l'état de charge. C) Déconvolution de l'analyse HRMS B. M_{mono} calculée 9076,37 Da ; observée : 9076,41 Da.

4. Dimère d'un fragment d'immunoglobuline E

Avec les outils de ligation et de désulfuration en main, un projet particulièrement complexe a été abordé pour satisfaire une demande de client de Smartox Biotechnology. Ce projet consistait en la synthèse d'un dimère d'une mini-protéine correspondant à un fragment d'immunoglobuline E (IgE, Figure 74).



Figure 74 : dimère du fragment d'IgE. Z représente une 4-azido-L-homoalanine (Aha)

Le cahier des charges de ce projet imposait de multiples difficultés. Tout d'abord, le monomère est une mini-protéine de 115 résidus contenant trois cystéines. Un pont disulfure entre les cystéines C30 et C90 devait être formé sélectivement tout en gardant la cystéine C7 libre. Un résidu Aha devait également être introduit à l'extrémité C-terminale de la séquence, pour pouvoir par la suite réaliser une réaction de CuAAC. Pour finir, ce peptide devait être obtenu sous forme de monomère, mais également de dimère en formant un pont disulfure entre les cystéines C7 libres de deux chaînes peptidiques. Une stratégie de synthèse par ligation a donc dû être établie en prenant en compte ces différents paramètres. Tout d'abord, la formation sélective du pont C30-C90 impliquait d'être en présence de la cystéine C7 protégée. De plus, les seules cystéines natives présentes dans la séquence et pouvant être exploitées comme point de ligation sont les cystéines C30 et C90. Se servir de ces seules cystéines pour la synthèse du peptide imposait ainsi la synthèse d'un fragment médian de 60 acides aminés, estimé trop long pour être obtenu avec des rendements corrects par SPPS. En considérant cela, au moins une alanine serait mutée en cystéine pour créer un nouveau point de ligation et par la suite être désulfurisée. Afin de conserver les cystéines natives C30 et C90, celles-ci devaient donc être également protégées. De plus, pour former le pont C30-C90 sélectivement, le groupement protecteur utilisé, commun aux deux cystéines, devait être orthogonal à celui de la cystéine C7. Ainsi, les différentes ligations envisagées s'appuieraient uniquement sur des alanines mutées en cystéine. Pour cela, trois alanines judicieusement positionnées ont été sélectionnées pour servir de points de ligation : A36, A49 et A100. Cela définit ainsi les fragments IgE(1-35) **37**, IgE*(36-48) **38**, IgE*(49-99) **39** et IgE*(100-115) **40** (Figure 75). En ce qui concerne les cystéines, la stratégie de formation sélective du pont C30-C90 a été envisagée en protégeant ces deux cystéines avec des groupements Acm pour pouvoir les déprotéger et former le pont de manière concomitante avec du diiode. La C7 sera quant à elle protégée avec un groupement protecteur Mob, insensible au diiode, qui pourra être déprotégé avec du TFMSA une fois le pont formé. La dimérisation du peptide sera alors réalisée à partir de cette cystéine libre.

Le fragment hydrazide IgE(1-35) contenant C7(Mob) et C30(Acm) a donc été synthétisé par SPPS et isolé avec un rendement de 29 %. Les courts fragments IgE*(36-48) et IgE*(100-115), ce dernier contenant le Aha à son extrémité C-terminale, ont été obtenus sans difficulté avec des rendements de 64 % et 53 %, respectivement. Cependant, la synthèse du fragment cystéinyle hydrazide IgE*(49-99), contenant la cystéine C90(Acm), a nécessité certaines optimisations. En effet, une première synthèse réalisée dans des conditions classiques n'a pas permis d'obtenir la séquence désirée majoritairement. Ce fragment étant particulièrement long, nous avons alors introduit les pseudoprolines ST et ET en positions 25-26 et 38-39 du fragment, respectivement. Cela nous a ainsi permis d'obtenir ce fragment avec un rendement de 21% après purification.

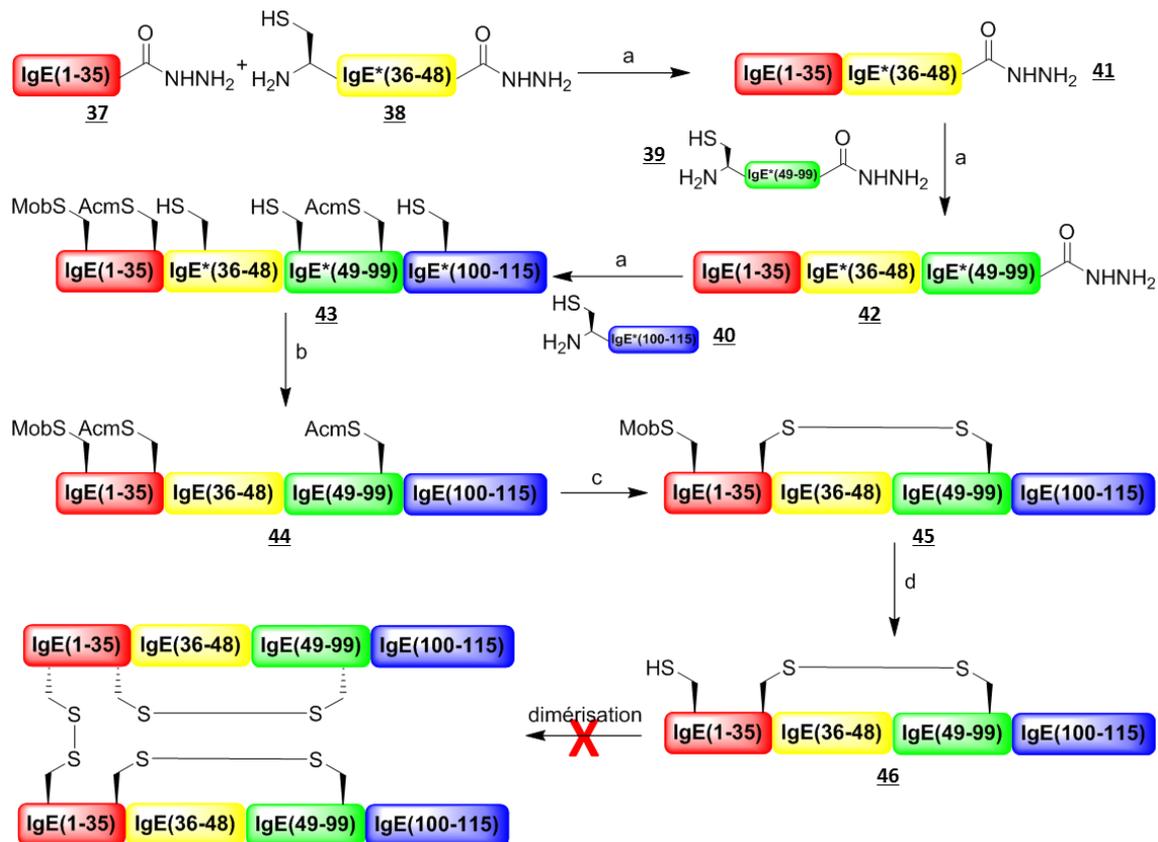


Figure 75 : Stratégie de synthèse d'un fragment d'IgE par NCL. a) NCL : 0,2 M NaH_2PO_4 , H_2O , 6 M Gn.HCl , pH 3, -15°C , 10 éq. NaNO_2 , 20 min, puis 100 éq. MPAA, pH 6,8, température ambiante, une nuit. b) désulfurisation : 0,2 M NaH_2PO_4 , H_2O , 6 M Gn.HCl , pH 6,8, 100 éq. TCEP, 20 μL $t\text{BuSH}$, 50 éq. VA-044, atmosphère inerte, 37°C , 4 h. c) déprotection des Acm et formation du pont disulfure : 0,1 M acide citrique, 2 M Gn.HCl , pH2, 4 x 1 éq. I_2 , 20 min. d) Déprotection du Mob : TFA/phénol/TFMSA 8:1:1, 0°C , 10 min.

Par la suite, les ligations ont été entreprises dans la direction N-terminal vers C-terminal. Pour cela, les fragments hydrazide IgE(1-35) et cystéinyne hydrazide IgE*(36-48) ont été engagés dans une réaction de ligation pendant une nuit. La solubilité du premier fragment était cependant limitée, si bien qu'il a dû être dissous à une concentration relativement faible (2,8 mM) en présence de NMP. Malgré tout, le peptide IgE*(1-48) **41** a été obtenu avec un rendement de 31% après purification. Celui-ci a donc été utilisé pour une seconde ligation avec le fragment IgE*(49-99). Cependant, la solubilisation du fragment IgE*(1-48) a également posé problème ici. Constatant que celui-ci était soluble à l'issue de la ligation précédente à pH 6,8, sa solubilisation a donc été entreprise à pH neutre avant de diminuer le pH à 3 pour son activation avec NaNO_2 . Ceci a permis d'améliorer sensiblement sa solubilisation. Le peptide IgE*(1-99) **42** a ainsi pu être obtenu avec un rendement modéré de 25 % après une nuit de réaction et purification (Figure 76).

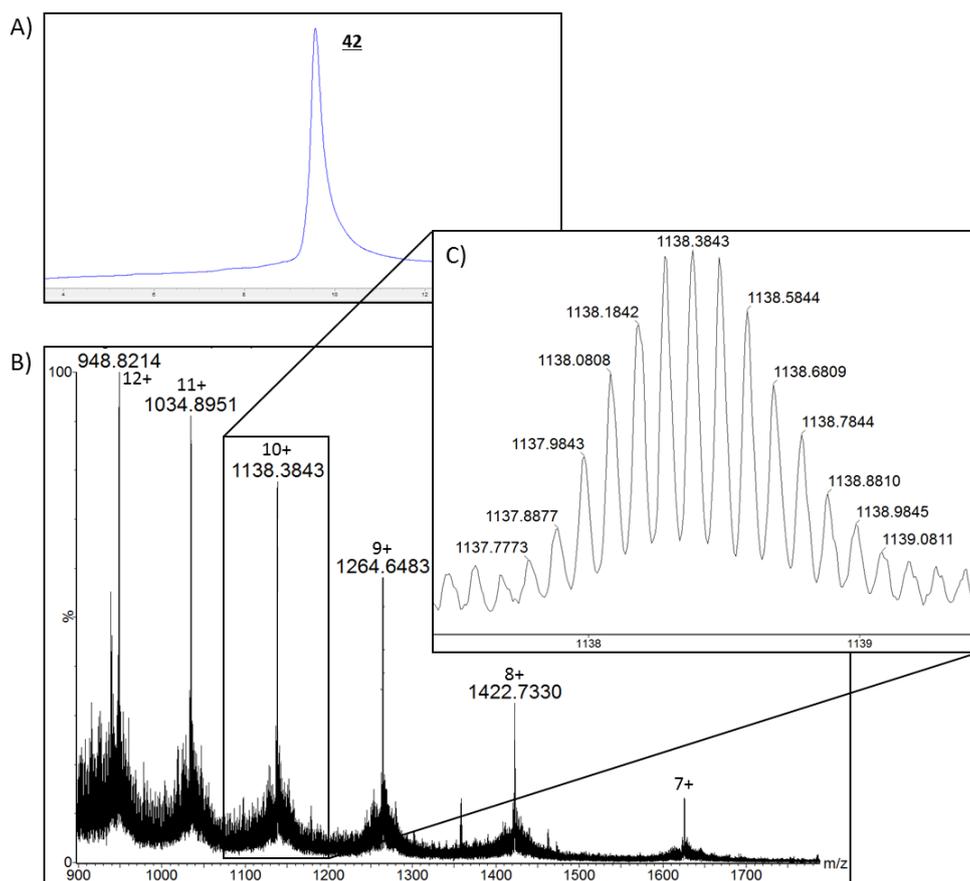


Figure 76 : Analyses RP-HPLC et HRMS de l'IgE*(1-99) **42**. A) Analyse RP-HPLC ($t_R = 9,6$ min, pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)) de **42** purifié. B) Analyse HRMS de **42** purifié. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 10+. M_{mono} calculée : 11366,79 Da ; observée : 11366,63 Da.

Pour finir, la séquence entière du fragment d'IgE recherché a été complétée avec une dernière ligation avec le fragment cystéinyne IgE*(100-115). Après une nuit de réaction, un pic a pu être isolé par purification RP-HPLC (Figure 77). Cependant, d'après les analyses ESI-HRMS, il semblerait que ce pic corresponde en réalité à plusieurs produits ayant le même temps de rétention. Tout d'abord, le produit de ligation entier IgE*(Mob, Acm) linéaire **43**, contenant une cystéine Mob et deux cystéines Acm, est observable, bien que sa masse monoisotopique exacte ne puisse être déterminée avec précision. En effet, un amas isotopique proche masque le pic monoisotopique du produit de ligation. Cet amas correspond à un produit ayant environ 26 Da de moins que le produit recherché. Cette masse est cohérente avec la réduction de la fonction azoture portée par le Aha en amine. Cette réaction secondaire a auparavant été observée à plusieurs reprises au laboratoire lors du repliement oxydatif de toxines modifiées avec un azoture. Dans notre cas, la présence de plusieurs cystéines et du thiol MPAA, qui peuvent former des ponts disulfures intra- et intermoléculaires, semble réduire l'azoture en amine lors de l'oxydation des thiols en ponts disulfures. De plus, une autre espèce ayant une masse inférieure d'environ 18 Da à la masse du produit secondaire précédent est également visible. Cette masse serait ici cohérente avec une cyclisation de l'extrémité C-terminale en lactame, favorisée par la formation d'un cycle à 5.

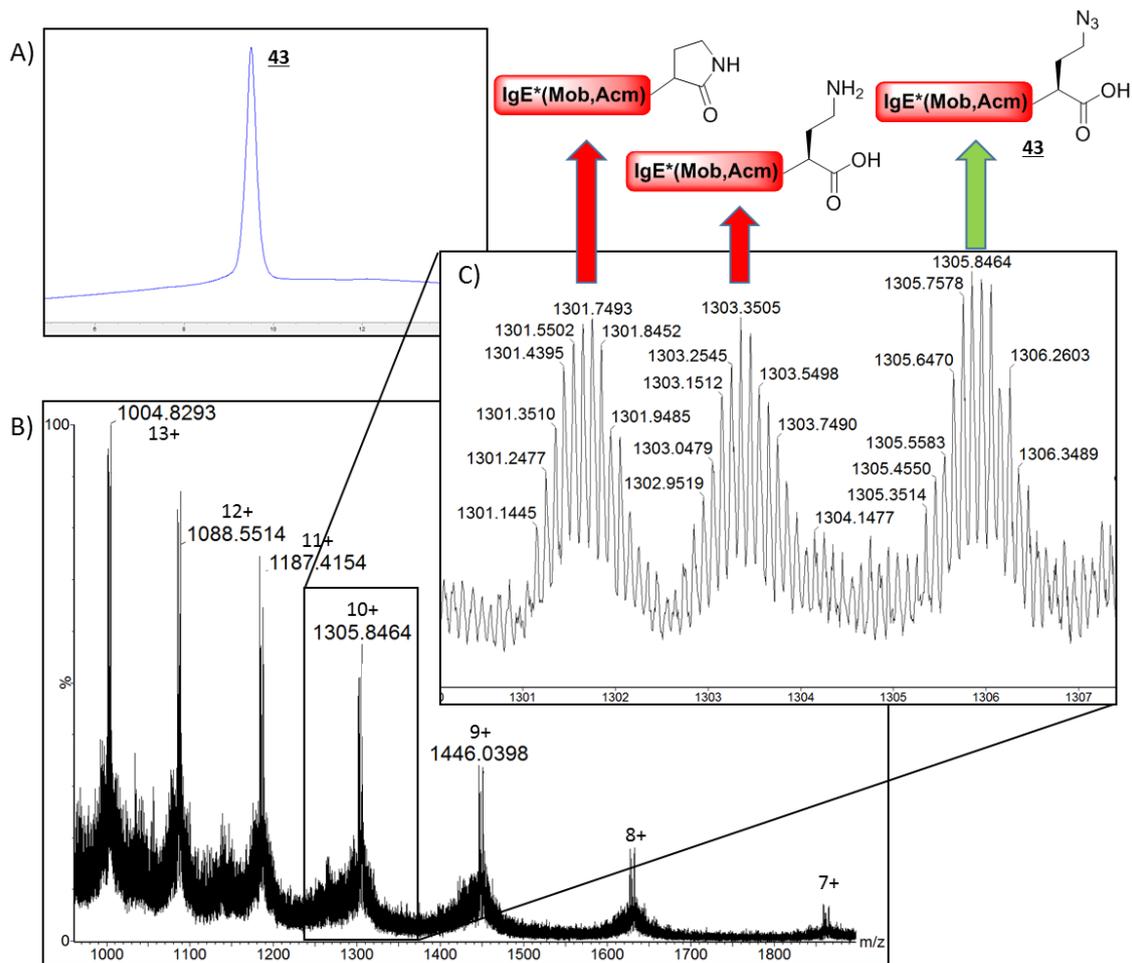


Figure 77 : Analyses RP-HPLC et HRMS de l'IgE*(Mob, Acm) linéaire **43**. A) Analyse RP-HPLC ($t_R = 9,5$ min, pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min) de **43** purifié. B) Analyse HRMS de **43** purifié. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 10+. M_{mono} calculée : 13039,60 Da ; observée : 13042,53 Da ; 13016,46 Da ; 12999,43 Da.

Les difficultés d'analyses par RP-HPLC et LC-MS constatées ici pointent du doigt les limites de ces différentes techniques. En effet, dans le cas de peptides ayant des masses moléculaires conséquentes (environ 13 kDa), des modifications aussi infimes à l'échelle du peptide entier que celles observées ci-dessus ne modifient que très peu les paramètres physico-chimiques globaux du produit. Ainsi, les temps de rétention des produits secondaires ne changent pas, ou de manière si infime que leur séparation du produit désiré s'avère très difficile par RP-HPLC, aussi bien pour les analyses que pour purifier le produit. De plus, les analyses par ESI-HRMS sont également complexifiées par les tailles relativement élevées des composés. En particulier, l'observation d'amas isotopique correspondant à des états de charge élevés implique que le pic monoisotopique de chaque amas possède une très faible intensité, et n'est bien souvent pas observable. La présence de plusieurs produits de masses moléculaires proches complique d'autant plus les analyses, si bien que seules les masses moyennes approximatives peuvent être déterminées.

Ainsi, l'obtention de la séquence entière du fragment d'IgE pur nécessite de supprimer autant que possible les réactions secondaires constatées afin de simplifier la purification

suivant la réaction de ligation. Pour cela, plusieurs études ont été réalisées pour essayer de limiter ces réactions. Dans le but de simplifier les analyses, ces différents tests ont été faits sur le fragment IgE*(100-115) contenant l'azoture. Afin de vérifier l'espèce chimique responsable de ces réactions indésirables, le fragment a été solubilisé dans du tampon de NCL à pH 6,5 en présence de 100 éq. de MPAA et agité durant une nuit sous atmosphère inerte pour reproduire les conditions de NCL. Par la suite, le fragment a été traité avec 100 éq. de TCEP pendant 30 min. Les analyses par ESI-HRMS ont révélé que l'azoture présent à l'extrémité C-terminal était déjà majoritairement réduit avant le traitement au TCEP. L'azoture semble donc instable en présence de MPAA. Afin d'évaluer la rapidité de cette réaction, le fragment IgE*(100-115) a de nouveau été traité avec 100 éq. de MPAA dans du tampon de NCL, avec cette fois-ci un suivi par ESI-HRMS toutes les 30 minutes pendant 4 heures. Après 1h30, la quantité estimée d'azoture réduit était environ la même que celle d'azoture intact. Après 2 h, l'azoture était minoritaire par rapport à l'amine correspondante. Cela implique que dans ces conditions, la réaction de ligation devrait durer au maximum 1 heure pour récupérer majoritairement le produit de ligation contenant l'azoture voulu. Pour finir, l'impact du nombre d'équivalents de MPAA a également été évalué. Pour cela, le fragment contenant l'azoture a été mis en présence de 15, 20, 30, 40 et 50 éq. de MPAA dans les mêmes conditions que précédemment. Les analyses ESI-HRMS de ces différents milieux après 2 heures ont montré que l'azoture intact était toujours majoritaire avec 50 éq. de MPAA, contrairement au test précédent avec 100 éq. Cependant, la réduction de l'azoture est toujours visible, et réduire davantage le nombre d'équivalents de MPAA ne semble pas avoir d'impact sur les proportions d'azoture intact et d'azoture réduit. Ainsi, pour obtenir majoritairement le produit de ligation avec l'azoture désiré, la réaction de NCL devrait durer moins d'1h30 avec au maximum 50 éq. de MPAA. Ces limitations semblent cependant trop contraignantes pour espérer avoir une réaction de ligation totale, au vu des cinétiques de ligation généralement observées.

Afin d'évaluer la pertinence de la suite de la voie de synthèse du produit recherché, les étapes suivantes ont d'abord été entreprises sur le mélange de produits de ligation précédemment obtenu. Tout d'abord, la désulfuration des trois cystéines non natives a été réalisée en présence de VA-044, de TCEP et de *t*BuSH. Après une nuit de réaction et purification, les produits désulfurés ont été obtenus, avec des masses inférieures d'environ 96 Da correspondant bien à la désulfuration de trois cystéines. Ici encore, les techniques de séparation utilisées n'ont pas permis d'isoler le produit IgE(Mob, Acm) linéaire **44** des produits secondaires non désirés contenant l'azoture réduit. De plus, le *t*BuSH utilisé à cette étape semble avoir le même impact que le MPAA sur l'azoture lors de la réaction précédente, puisque la proportion d'azoture réduit semble avoir augmentée par rapport au produit désiré. Par la suite, ce mélange de composés a été traité avec plusieurs ajouts d'1 éq. de diiode toutes les 5 minutes pour déprotéger les cystéines Acm et former le pont disulfure. Après quatre ajouts, la purification du milieu réactionnel a permis d'obtenir IgE(Mob, S-S) **45** sans les Acm, toujours avec les co-produits non désirés également déprotégés. Bien que la masse monoisotopique des composés ne puisse être déterminée avec précision, le pont disulfure est supposé formé puisque le mécanisme de déprotection des Acm et de formation du pont est concomitant. Pour finir, le groupement protection Mob a été déprotégé dans un mélange

TFMSA/phénol/TFA 1:1:8 pendant 10 minutes à 0°C. Après précipitation avec du diéthyl éther, une analyse par ESI-HRMS a permis de constater la formation du produit IgE(S-S) **46** sans le groupement Mob, correspondant à une masse inférieure de 120 Da.

Par la suite, la dimérisation du produit par un pont disulfure entre deux cystéines C7 a été entreprise. Cependant, l'oxydation de ces cystéines en pont disulfure n'a pu être réalisée, que ce soit en présence de DMSO, de diiode ou de DTNP, malgré une concentration élevée en peptide. Nous avons alors supposé que la cystéine était trop encombrée pour pouvoir réagir avec son homologue d'une autre chaîne peptidique, possiblement à cause de la structuration du peptide. L'ajout de fortes concentrations d'urée ou de guanidine, sensées casser les structures secondaires grâce à leurs propriétés dénaturantes, n'a cependant toujours pas permis de former le dimère recherché. Nous avons alors estimé que deux molécules IgE(S-S) étaient trop volumineuses pour pouvoir rapprocher suffisamment leurs cystéines respectives et ainsi former le pont. Une alternative envisagée consistait alors à utiliser un *linker* homo-bifonctionnel afin de compenser l'éloignement des cystéines.^{281,282} Pour cela, l'IgE(S-S) a été traité avec du bismaléimidoéthane (BMOE) pendant 2 heures et purifié pour éliminer l'excès de BMOE et obtenir IgE(BMOE, S-S) **47**. La formation de ce produit indique que la cystéine n'est pas trop encombrée pour réagir avec une petite molécule telle que le BMOE, et que le volume global de la molécule semble bien être la source du problème. Par la suite, IgE(BMOE, S-S) a été mis en présence de IgE(S-S) ayant toujours sa cystéine C7 libre. Malheureusement, aucune formation de dimère n'a pu être constatée après 24 heures d'agitation. Supposant que le *linker* utilisé pourrait être trop court, ce processus a été répété avec du 1,11-bismaléimido-triéthylèneglycol (BM(PEG)₃). Ici encore, seule la formation du monomère fonctionnalisé avec le *linker* a été observée.

Au vu des difficultés rencontrées, tant en ce qui concerne la réduction du Aha que la formation du dimère, ce projet n'a malheureusement pu aboutir dans les délais impartis. En particulier, l'absence de la fonction azoture à la fin de la voie de synthèse a été rédhibitoire. De plus, cette étude avait pour but d'évaluer la faisabilité de la synthèse pour pouvoir par la suite effectuer une montée en échelle et produire plus de 50 mg de monomère et de dimère. Les différentes étapes problématiques de la voie de synthèse envisagée ont ainsi été un frein important à ce projet. Malgré tout, le développement de cette stratégie multi-étapes montre qu'il est possible d'obtenir le fragment d'IgE sans l'azoture en trois réactions de NCL, une réaction de désulfurisation et un repliement oxydatif dirigé pour obtenir finalement un peptide d'environ 13 kDa cyclisé par un pont disulfure avec une cystéine libre. Cependant, les réactions se doivent d'être totales et propres afin d'éviter des purifications complexes et laborieuses. De plus, avec de tels composés, l'abondance des espèces monoisotopiques devient si infime que la masse exacte des produits formés devient difficilement observable. On touche ainsi ici la limite entre la chimie des peptides et celle des protéines, avec les contraintes techniques que cela implique.

II. Formation dirigée de ponts disulfures

Le second axe de recherche de cette thèse concerne le repliement oxydatif régiosélectif de toxines. Notre intérêt pour cette thématique est né de notre incapacité à replier correctement certaines toxines au cours de leur production. En effet, le repliement oxydatif direct de certaines toxines menait à la formation de différentes configurations de ponts disulfures, donnant des rendements trop faibles pour pouvoir produire ces toxines en quantités suffisantes. Pour d'autres toxines, ce type de repliement ne permettait tout simplement pas l'obtention des configurations natives recherchées. L'utilisation de la formation dirigée de ponts disulfures semblait donc être une réponse adaptée à cette problématique. Les travaux ont ainsi commencé par la mise au point et l'optimisation d'une stratégie dans le cas simple d'une toxine à deux ponts disulfures. Par la suite, deux toxines à trois ponts disulfures ont servi de support à l'extension de cette stratégie. Une fois ces stratégies à deux et trois ponts maîtrisées, la production de trois toxines difficiles à obtenir par repliement oxydatif direct a pu être réalisée pour développer le catalogue de Smartox Biotechnology. Au cours de ces travaux, plusieurs difficultés ont été rencontrées concernant la déprotection des groupements protecteurs. Nous nous sommes ainsi intéressés à l'utilisation d'un nouveau groupement protecteur non-commercial de la cystéine, le Hmb^{off/on}, pour l'élaboration de stratégies de repliements régiosélectifs alternatives. Ce groupement protecteur a l'avantage d'être dans un premier temps insensible au TFA lors de la séparation d'un peptide de la résine. Par la suite, un réarrangement spontané en milieu neutre ou basique le rend labile en conditions acides, et permet ainsi de l'ôter de la cystéine par traitement avec du TFA dans les conditions classiquement utilisées lors de synthèses par SPPS en stratégie Fmoc. Ces conditions étant bien connues et largement utilisées, ceci permet de limiter au maximum les réactions secondaires comparé à l'utilisation de diode dans le cas des groupements Acn par exemple.

A. Stratégie à deux ponts disulfures

La mise au point d'une stratégie de repliement dirigé adaptée aux toxines à deux ponts disulfures a été réalisée à partir de l'analogue d'une conotoxine, la NMB-1. Cette analogue inhibe des sous-familles de canaux ioniques activés mécaniquement et sert ainsi d'outil de caractérisation de ces canaux.²⁸³ La NMB-1 est un peptide de 19 acides aminés amidé à son extrémité C-terminal et contenant quatre cystéines formant les ponts C1-C4 et C2-C3 (Figure 78).



Figure 78 : NMB-1²⁸³

Afin d'évaluer différents groupements protecteurs, deux stratégies de protection ont été utilisées. La première consistait à employer une combinaison des groupements Trt et Acn

pour la protection orthogonale des paires de cystéines. La NMB-1 comporte une cystéine en position C-terminale. Afin d'éviter la β -élimination du thiol de cette cystéine durant la SPPS, favorisée lorsque le groupement Acn est utilisé pour sa protection, celle-ci devait être protégée avec un trityle. Cela a ainsi défini le schéma de protection de la NMB-1 pour cette stratégie Trt/Acn, avec les cystéines C1 et C4 protégées par des groupements Trt et les cystéines C2 et C3 par des groupements Acn (Figure 79A). Etant donné que les résidus Cys(Trt) seront déprotégés durant la séparation du peptide de la résine, le pont correspondant à ces cystéines sera formé en premier, puis les Cys(Acn) seront déprotégées dans un second temps pour former le deuxième pont. La seconde stratégie emploie les groupements Trt et Mob. Afin d'être comparable à la première stratégie, nous avons décidé de former les ponts disulfures dans le même ordre. Ainsi, pour cette stratégie Trt/Mob, les cystéines C1 et C4 porteront le groupement Trt, tandis que les cystéines C2 et C3 seront protégées avec des groupements Mob (Figure 79B).

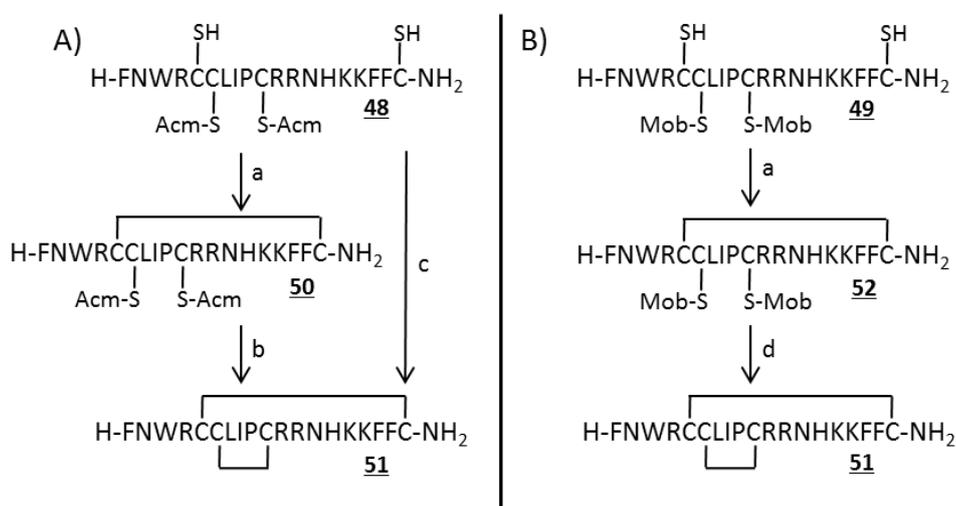


Figure 79 : stratégies de formation dirigée de ponts disulfures de la NMB-1. A) stratégie Trt/Acn. a) 0,1 M Tris, 20 %v/v DMSO, 2M Gn.HCl, pH 8,2, 0,1 mg/mL de peptide, 1 nuit. b) 0,1 M acide citrique, 2M Gn.HCl, pH 2, 0,1 mg/mL de peptide, 4 x 1 éq. I₂ 10mM dans CH₃CN, 20 min, puis ascorbate de sodium. c) 0,1 M acide citrique, 5 %v/v DMSO, 2M Gn.HCl, pH 7, 0,1 mg/mL de peptide, 1 nuit, puis pH 2, 4 x 1 éq. I₂ 10mM dans CH₃CN, 20 min, puis ascorbate de sodium. B) stratégie Trt/Mob. d) TFA/phénol/TFMSA 8:1:1, 0°C, 10 min et précipitation avec Et₂O, puis 0,1 M acide citrique, 20 %v/v DMSO, 2M Gn.HCl, pH 2, 0,1 mg/mL de peptide, 1 nuit.

Les synthèses par SPPS des peptides NMB-1(STrt_{1,4}; SAcn_{2,3}) et NMB-1(STrt_{1,4}; SMob_{2,3}) ont été réalisées sur synthétiseurs automatiques. Après traitement des résines avec du TFA et purifications, les toxines NMB-1(SH_{1,4}; SAcn_{2,3}) **48** et NMB-1(SH_{1,4}; SMob_{2,3}) **49** ont été obtenues avec des rendements de 35 % et 22 %, respectivement. Afin de faciliter les analyses de la formation du premier pont et évaluer précisément les rendements, les peptides ont été purifiés avant la première étape. Cependant, il est à noter que cette première purification n'est pas strictement nécessaire, et que le premier pont peut également être formé à partir des peptides bruts.

Pour commencer, le repliement régiosélectif de la NMB-1(SH_{1,4}; SAcn_{2,3}) **48** a été entrepris. Pour cela, le peptide a été ajouté dans un tampon basique contenant 20 %v/v de DMSO en tant qu'oxydant et 2 M de Gn.HCl. La guanidine sert ici à libérer la chaîne peptidique

de toute contrainte imposée par les structures secondaires éventuellement présentes, afin que les cystéines libres puissent facilement entrer en contact. Bien que la guanidine puisse avoir un impact sur les configurations obtenues dans le cas du repliement oxydatif direct, ceci n'est pas le cas ici puisque seulement deux cystéines sont libres. De plus, une forte dilution du peptide est employée à cette étape afin de favoriser les ponts disulfures intramoléculaires et non intermoléculaires. Après une nuit d'agitation, un suivi par HRMS a montré une diminution de la masse moléculaire du peptide de 2 Da, caractéristique de la formation du pont disulfure. La purification du milieu réactionnel par RP-HPLC a permis d'obtenir la NMB-1(SS_{1,4}; SAcm_{2,3}) **50** avec un rendement de 76 % (Figure 80). A cette étape, aucun sous-produit correspondant à la déprotection précoce d'un groupement Acm n'a été observé.

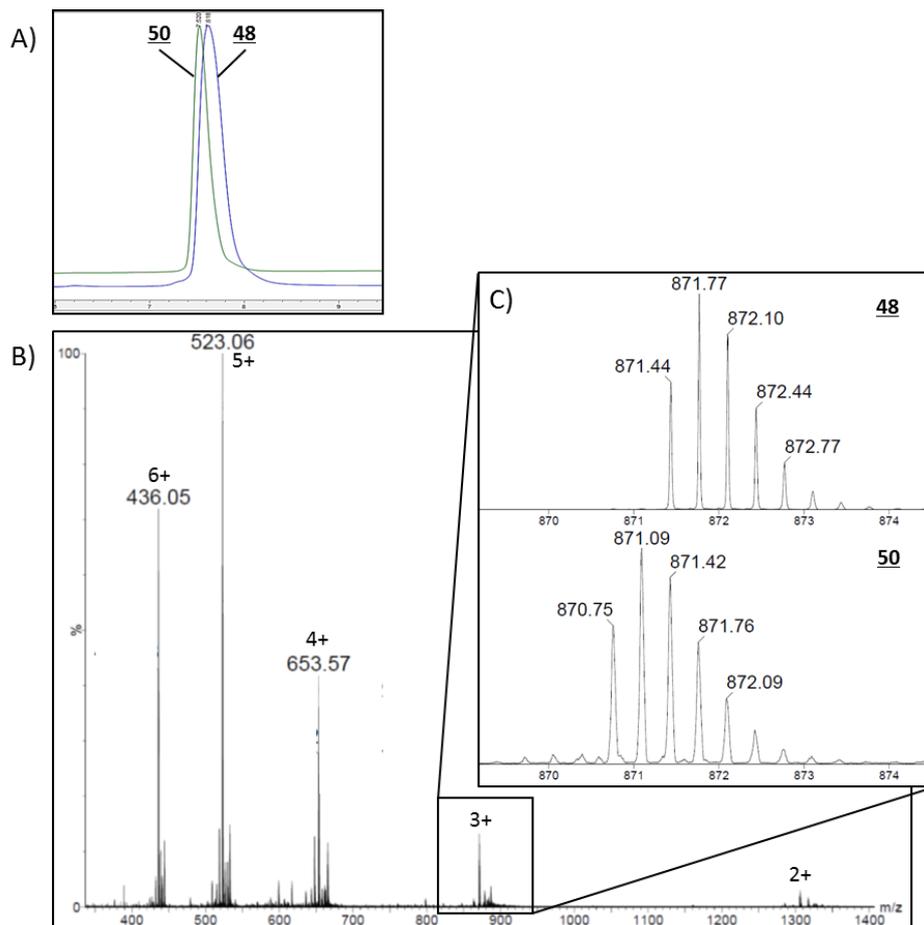


Figure 80 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la NMB-1(SS_{1,4}; SAcm_{2,3}) **50**. A) Superposition des analyses RP-HPLC de **48** purifiée ($t_R = 7,6$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min) et de **50** purifiée ($t_R = 7,5$ min). B) Analyse HRMS de **50** purifiée. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 3+ de **48** purifiée (en haut, M_{mono} calculée : 2611,28 Da ; observée : 2611,30 Da) et **50** purifiée (en bas, M_{mono} calculée : 2609,27 Da ; observée : 2609,23 Da)

La déprotection de ces groupements Acm et la formation concomitante du pont disulfure ont alors été entreprises avec du diiode. Pour cela, le peptide a été solubilisé dans un tampon acide citrique à pH 2 contenant 2 M de Gn.HCl, dans des conditions fortement diluées en peptide. Le pH acide permet ici de limiter le *scrambling* des ponts disulfures. Un équivalent de diiode solubilisé dans de l'acétonitrile a alors été ajouté toutes les cinq minutes.

Ici, plusieurs ajouts d'un unique équivalent de diiode à des intervalles réguliers ont été préférés à un seul ajout de plusieurs équivalents afin de limiter les nombreuses réactions secondaires associées à l'utilisation de ce réactif. Les conditions acides permettent également de limiter ces réactions indésirables. Un suivi par HRMS a permis de montrer une consommation totale du produit de départ après 4 ajouts, et la formation quantitative du produit recherché. De plus, aucun produit secondaire dû à l'utilisation de diiode n'a été observé. La NMB-1 repliée **51** a ainsi été obtenue par purification du milieu réactionnel avec un rendement de 64 %, soit un rendement total sur les deux étapes d'oxydation des cystéines de 49 % (Figure 81). De manière importante, aucun autre pic majoritaire ayant la même masse moléculaire n'a été observé, ce qui tend à montrer que le *scrambling* a été correctement limité.

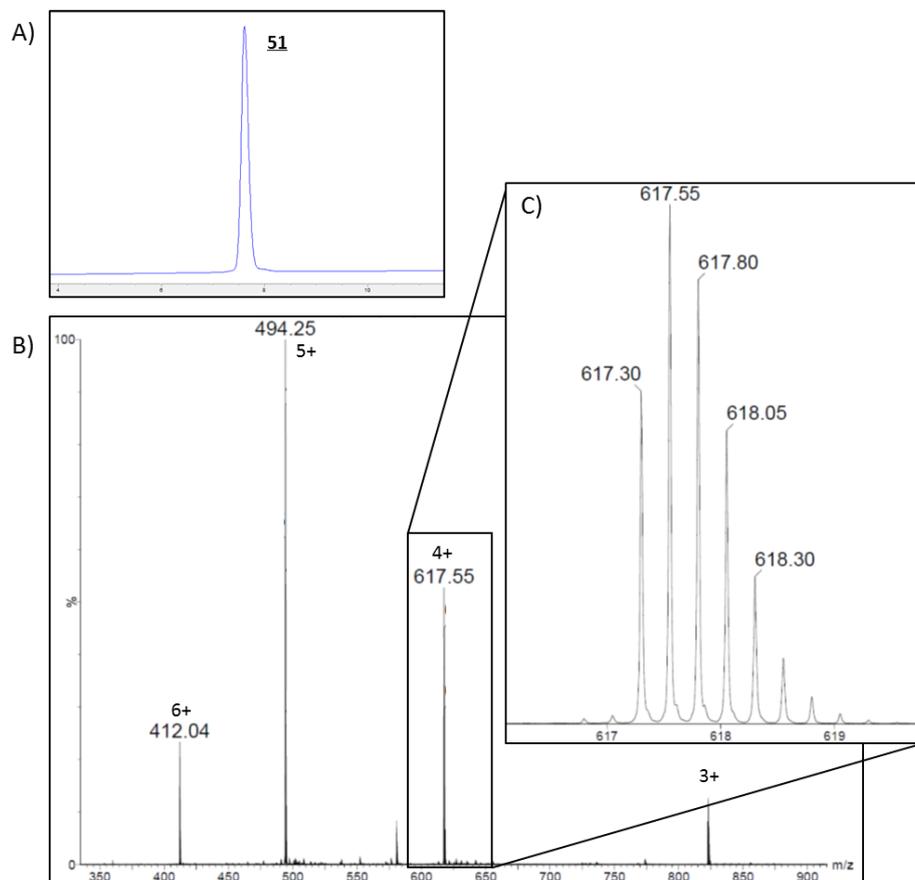


Figure 81 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la NMB-1 repliée **51** obtenue avec la stratégie Trt/Acm. A) Analyse RP-HPLC de **51** purifiée ($t_R = 7,6$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **51** purifiée. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 4+ de **51** purifiée. M_{mono} calculée : 2465,17 Da ; observée : 2465,17 Da.

Afin de s'affranchir d'une étape de purification intermédiaire, nous avons ensuite voulu évaluer la faisabilité de cette stratégie en réalisant les deux étapes en *one-pot*. Pour cela, le premier pont disulfure a été formé dans un tampon citrate à pH 7 en présence de 5 %v/v de DMSO et de guanidine. La concentration en DMSO a été réduite afin d'interférer le moins possible avec la seconde étape d'oxydation. Après une nuit, la formation du premier pont a été observée par HRMS. La diminution de la quantité de DMSO ne semble donc pas

avoir réduit la cinétique de la réaction d'oxydation de manière trop importante. Par la suite, le pH du milieu a été diminué à 2, puis plusieurs équivalents de diiode ont été ajoutés successivement pour la déprotection des Cys(Acm) et la formation du second pont, comme précédemment. Un suivi par HRMS a permis de déterminer le nombre d'ajouts nécessaires à quatre (Figure 82). La présence de DMSO à cette concentration ne semble donc pas avoir d'impact sur cette étape. Ainsi, La NMB-1 repliée **51** a été obtenue après purification avec un rendement de 57 % sur deux étapes réalisées en *one-pot*. Aucun sous-produit issu d'un éventuel phénomène de *scrambling* n'a été observé. La suppression de l'étape de purification intermédiaire a donc permis d'augmenter sensiblement les rendements du repliement régiosélectif de la NMB-1. De plus, cette dernière stratégie constitue un gain de temps précieux dans une optique de production, puisqu'elle permet de gagner environ 24 heures de lyophilisation du produit intermédiaire, en plus de la purification.

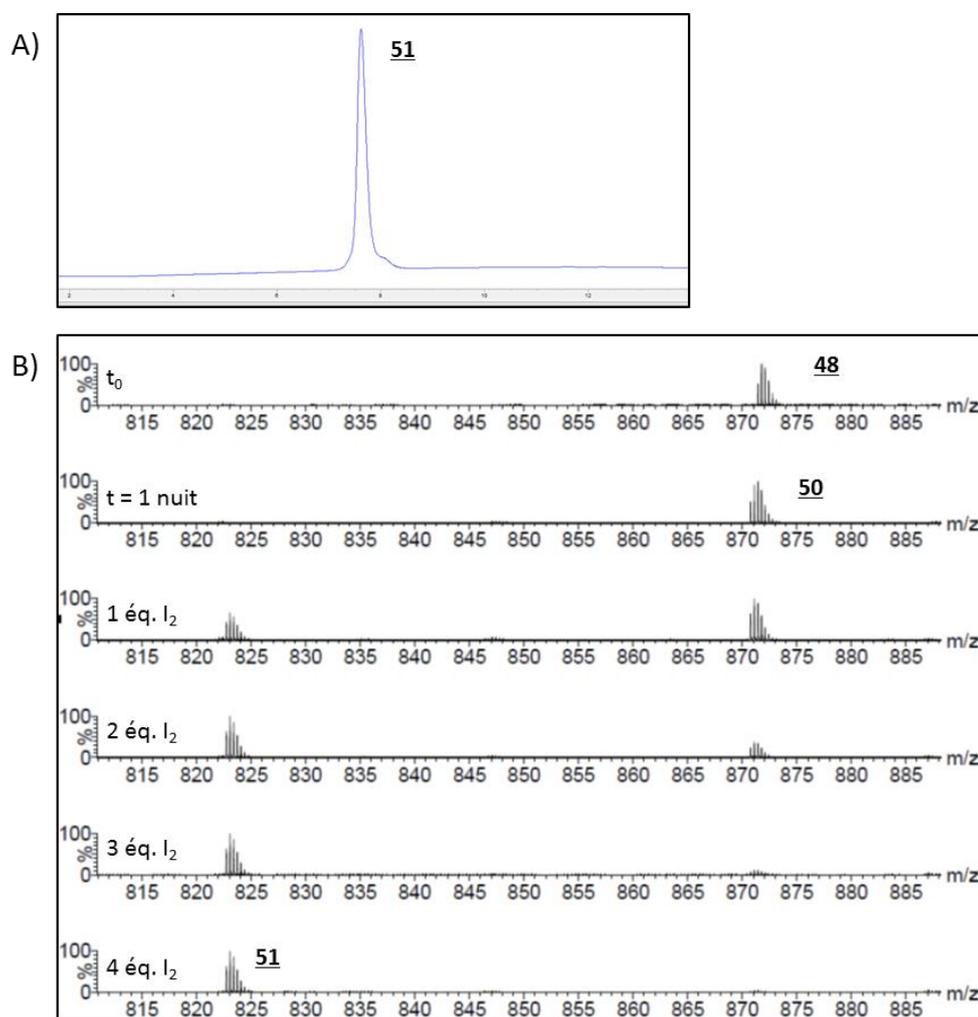


Figure 82 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la NMB-1 repliée **51** obtenue avec la stratégie Trt/Acm en *one-pot*. A) Analyse RP-HPLC de **51** purifiée ($t_R = 7,6$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Suivi du repliement de la NMB-1 par analyses HRMS. Zoom sur les états de charges 3+. **48** : M_{mono} calculée : 2611,28 Da ; observée : 2611,28 Da. **50** : M_{mono} calculée : 2609,26 Da ; observée : 2609,26 Da. **51** : M_{mono} calculée : 2465,17 Da ; observée : 2465,18 Da.

La deuxième stratégie à partir de la NMB-1(SH_{1,4} ; SMob_{2,3}) **49** a ensuite été évaluée. Pour cela, la formation du premier pont a été réalisée dans les mêmes conditions que

précédemment, dans un tampon basique en présence de DMSO et de Gn.HCl. Ici encore, la formation du premier pont a été observée après une nuit, et la purification du milieu réactionnel a permis d'obtenir la NMB-1(SS_{1,4}; SMob_{2,3}) **52** avec un rendement de 51 % (Figure 83).

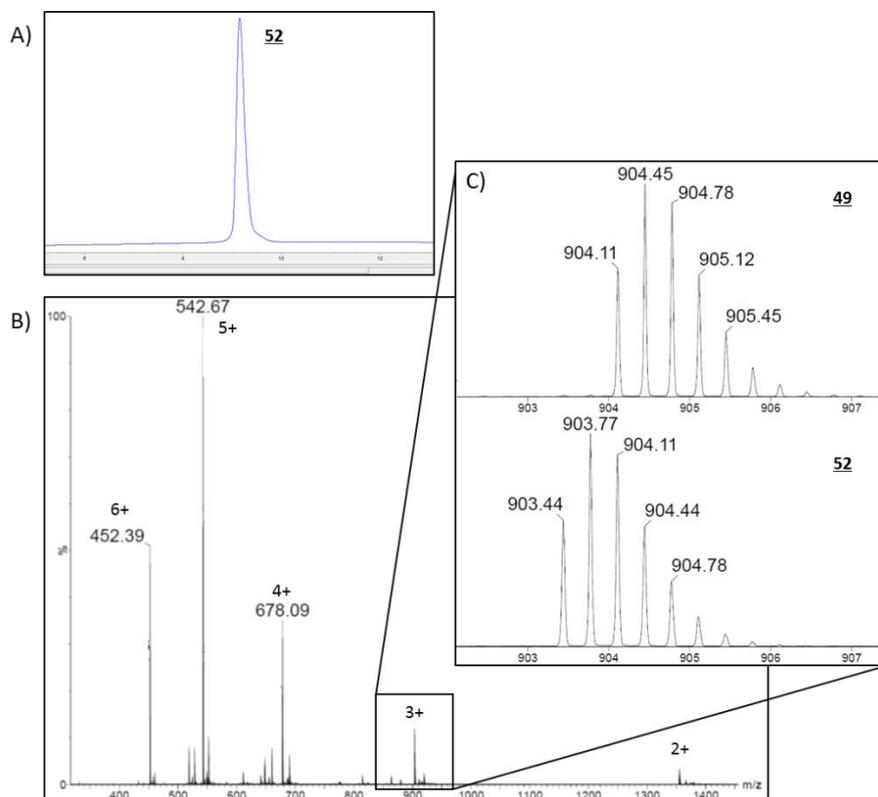


Figure 83 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la NMB-1(SS_{1,4}; SMob_{2,3}) **52**. A) Analyse RP-HPLC de **52** purifiée ($t_R = 9,1$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **52** purifiée. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 3+ de **49** purifiée (en haut, M_{mono} calculée : 2709,32 Da ; observée : 2709,31 Da) et **52** purifiée (en bas, M_{mono} calculée : 2707,31 Da ; observée : 2707,30 Da)

Par la suite, la déprotection des Cys(Mob) a été entreprise. Pour cela, le peptide a été solubilisé dans un mélange TFA/phénol, ce dernier servant de *scavenger* du groupement Mob. Une fois le milieu refroidit à 0°C, du TFMSA a été ajouté à une concentration finale de 10 %v/v et le milieu agité pendant 10 min. Le peptide a ensuite été récupéré sous forme solide par ajout d'éther diéthylique (Et₂O) et centrifugation. La formation du second pont a alors été réalisée sans purification intermédiaire. Pour cela, le peptide a été ajouté à un tampon acide citrique contenant du DMSO et de la guanidine. Après une nuit, un suivi par HRMS a confirmé la formation du second pont disulfure. La purification du milieu réactionnel a permis d'isoler un unique pic correspondant à la NMB-1 repliée **51** avec un rendement quantitatif sur les étapes de déprotection des résidus Cys(Mob) et formation du pont correspondant. Ainsi, la NMB-1 repliée a été obtenue avec un rendement de 51 % sur les deux étapes d'oxydation et l'étape de déprotection, similaire à la stratégie Trt/Acm lorsque les réactions sont réalisées avec une purification intermédiaire. De plus, l'observation du même temps de rétention pour les produits issus des différentes stratégies (Trt/Acm en deux étapes et en *one-pot*, et Trt/Mob) tend à confirmer qu'une unique configuration de ponts disulfures a été obtenue.

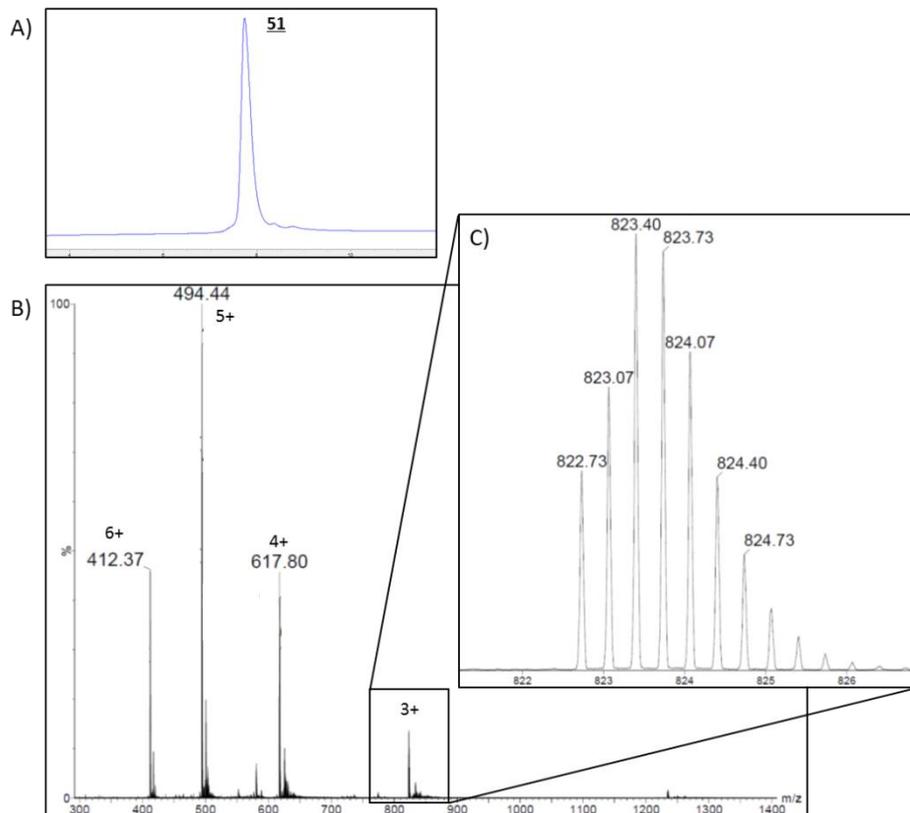


Figure 84 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la NMB-1 repliée **51** obtenue avec la stratégie Trt/Mob. A) Analyse RP-HPLC de **51** purifiée ($t_R = 7,6$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **51** purifiée. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 3+ de **51** purifiée. M_{mono} calculée : 2465,17 Da ; observée : 2465,17 Da.

Cette mise au point sur l'exemple d'une toxine à deux ponts a permis de mettre au point la formation successive et régiosélective de deux ponts disulfures au cours d'une même réaction, et donc de s'affranchir d'une purification intermédiaire. Ceci permet d'aborder le problème plus complexe des toxines à trois ponts en s'assurant des rendements corrects pour les premières étapes.

B. Stratégie à trois ponts disulfures

Les conditions de déprotection des groupements Acm et Mob et la formation des ponts disulfures correspondants étant établies, une stratégie de repliement régiosélectif de toxines à trois ponts disulfures utilisant les groupements Trt, Acm et Mob a ainsi pu être envisagée.

1. SGTx1

La première toxine utilisée pour mettre au point une telle stratégie est la SGTx1. Cette toxine de 34 résidus est issue du venin d'araignée *Scodra griseipes*²⁸⁴ et présente un motif ICK formé par ses trois ponts disulfures (Figure 85).²⁸⁵ Cette toxine inhibe les canaux ioniques Kv1.2 en interagissant avec le domaine « capteur de tension » de ces canaux.²⁸⁶

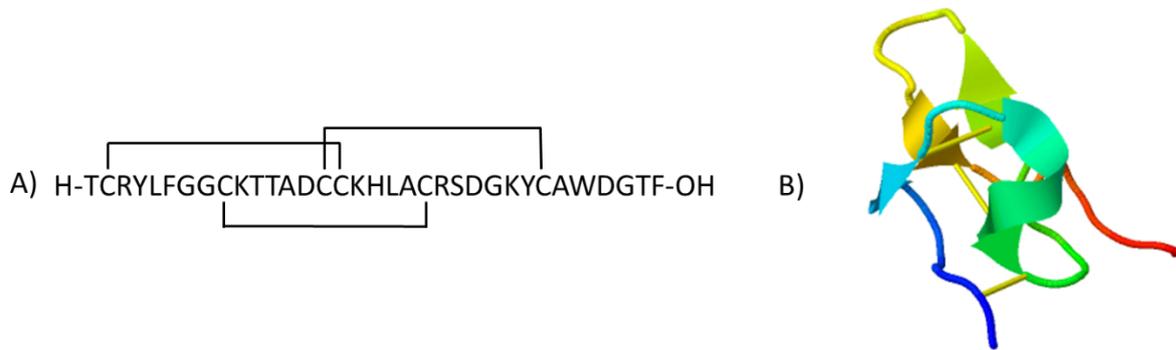


Figure 85 : SGTx1. A) Séquence et ponts disulfure de la SGTx1. B) Structure tridimensionnelle de la SGTx1 (PDB : 1LA4) ; les ponts disulfures sont représentés en jaune.

Afin d'établir une stratégie de repliement régiosélectif, l'environnement des cystéines a été examiné. La cystéine C6 s'avère adjacente à une tyrosine, et empêche donc l'utilisation d'un groupement Acm à cette position pour éviter un éventuel adduit Acm sur la tyrosine pendant la déprotection avec du TFA, comme indiqué dans la littérature.²⁴⁶ De plus, la cystéine C3, partenaire de la cystéine C6, est impliquée dans un motif Asp-Cys empêchant ici aussi l'utilisation de l'Acm comme groupement protecteur pour éviter la formation d'aspartimide. La cystéine C1 est quant à elle proche d'une tyrosine, mais non adjacente. Afin d'éviter une réaction secondaire due à cette proximité, l'utilisation du groupement Acm est ici aussi à proscrire. Ainsi, le schéma de protection optimal est une protection des cystéines C1 et C4 par des groupements Trt, des cystéines C2 et C5 par des groupements Acm et des cystéines C3 et C6 par des groupements Mob.

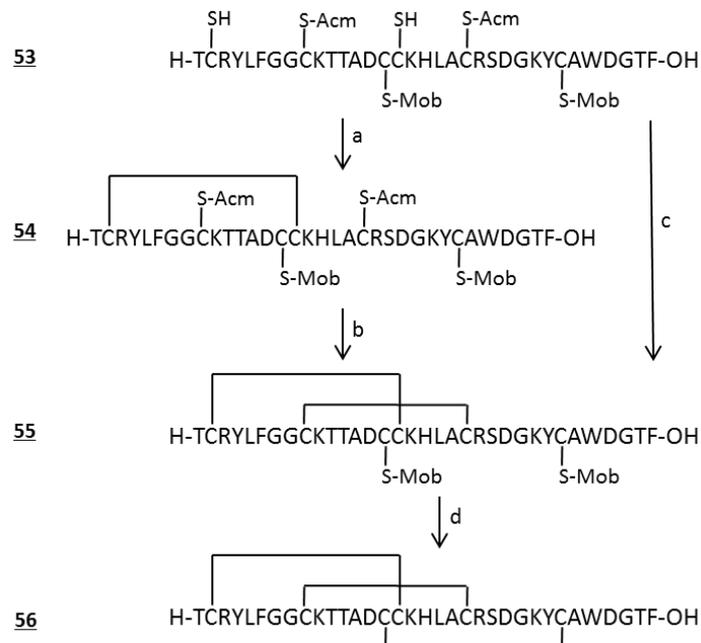


Figure 86 : stratégie de formation dirigée de ponts disulfures de la SGTx1. a) 0,1 M Tris, 10 %v/v DMSO, 2M Gn.HCl, pH 8,2, 0,1 mg/mL de peptide, 1 nuit. b) 0,1 M acide citrique, 2M Gn.HCl, pH 2, 0,1 mg/mL de peptide, 4 x 1 éq. I₂ 10mM dans CH₃CN, 20 min, puis ascorbate de sodium. c) 0,1 M acide citrique, 10 %v/v DMSO, 2M Gn.HCl, pH 7, 0,2 mg/mL de peptide, 1 nuit, puis pH 2, 4 x 1 éq. I₂ 50mM dans CH₃CN, 20 min, puis ascorbate de sodium. d) TFA/phénol/TFMSA 8:1:1, 0°C, 10 min et précipitation avec Et₂O, puis 0,1 M acide citrique, 10 %v/v DMSO, 2M Gn.HCl, pH 2, 0,1 mg/mL de peptide, 48h.

La synthèse de la SGTx1(STrt_{1,4}; SAc_{m2,5}; SMob_{3,6}) a donc été réalisée par SPPS. Afin de limiter la formation d'aspartimide durant la synthèse, les deux motifs Asp-Gly ont été introduits sous la forme du dipeptide Fmoc-Asp(OtBu)-N(Dmb)Gly-OH. Après séparation du peptide de la résine et déprotection avec du TFA, le peptide SGTx1(SH_{1,4}; SAc_{m2,5}; SMob_{3,6}) **53** a été obtenu sous sa forme brut. Les analyses RP-HPLC et ESI-HRMS du peptide ont montré la présence du produit recherché de manière très majoritaire. La qualité du peptide brut étant satisfaisante, une purification de celui-ci n'a pas été jugée nécessaire. La SGTx1(SH_{1,4}; SAc_{m2,5}; SMob_{3,6}) a ainsi été directement engagée dans la réaction de formation du premier pont disulfure correspondant aux cystéines C1 et C4. Le peptide n'étant pas totalement soluble dans un mélange eau/acétonitrile, celui-ci a été tout d'abord solubilisé dans un minimum de TFA, en prenant soin d'ajouter en premier une goutte d'eau pour éviter la formation d'esters de TFA sur les chaînes latérales portant une fonction alcool. Le milieu a ensuite été dilué avec une solution concentrée de guanidine pour maintenir le peptide en solution, puis ajouté à un tampon oxydant composé de Tris, de DMSO et de guanidine, et le pH réajusté à pH 8. Après une nuit de réaction et purification, la SGTx1(SS_{1,4}; SAc_{m2,5}; SMob_{3,6}) **54** a été obtenue avec un rendement de 16 % basé sur le taux de chargement de la résine utilisée pour la synthèse (Figure 87). Le rendement est ici impacté négativement par la présence des impuretés contenues dans le peptide brut qui ont été éliminées lors de cette purification.

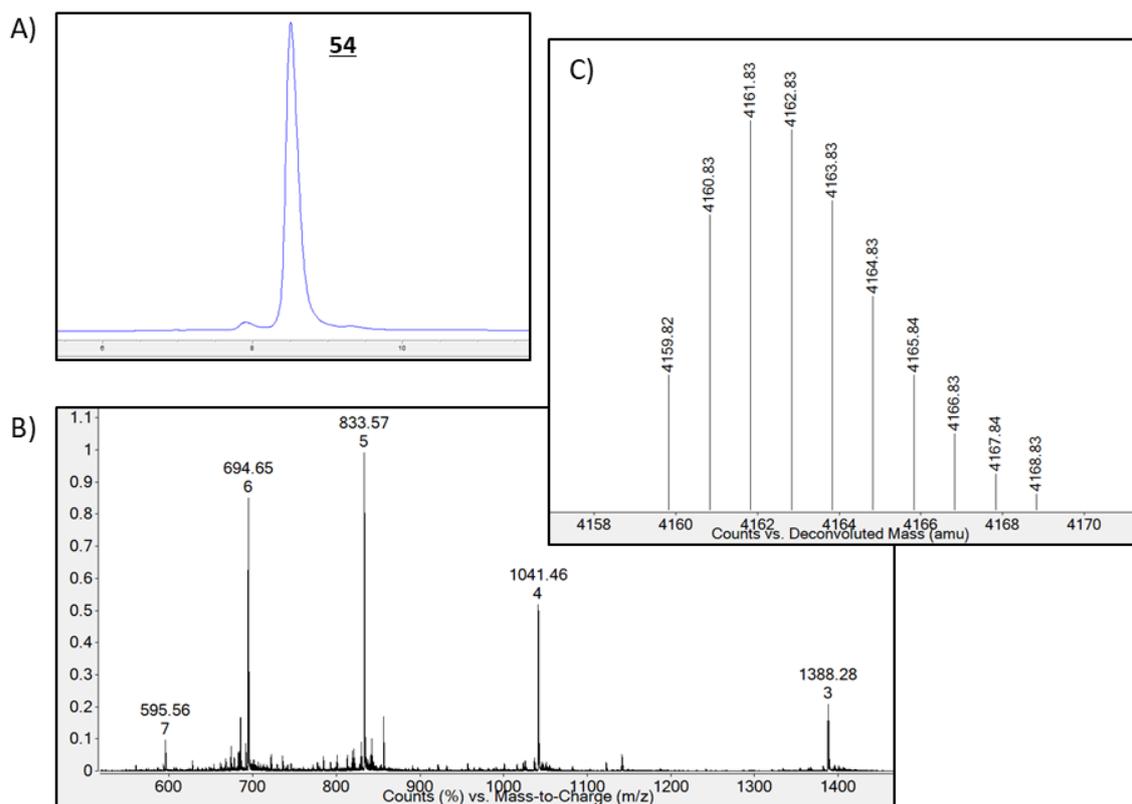


Figure 87 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la SGTx1(SS_{1,4}; SAc_{m2,5}; SMob_{3,6}) **54**. A) Analyse RP-HPLC de **54** purifiée ($t_R = 8,5$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **54** purifiée. Le nombre indiqué en-dessous du m/z correspond à l'état de charge. C) Déconvolution de l'analyse HRMS B. M_{mono} calculée : 4159,80 Da ; observée : 4159,82 Da.

La formation du second pont disulfure à partir des résidus Cys(Acm) a alors été réalisée. Pour cela, les conditions de déprotection des groupements Acm précédemment utilisées ont été appliquées. La SGTx1(SS_{1,4}; SAcm_{2,5}; SMob_{3,6}) a donc été dissoute dans un tampon contenant de l'acide citrique et de la guanidine à pH 2, et plusieurs ajouts successifs d'un équivalent de diode ont été réalisés. Comme pour la NMB-1, le nombre d'ajouts optimal a été évalué à quatre par suivi HRMS, permettant une déprotection totale des groupements Acm et la formation concomitante du pont. Cependant, avec quatre équivalents de diode, l'apparition d'un second produit a été observée. Son analyse par HRMS a révélé qu'il s'agissait de la SGTx1 totalement repliée. Il semblerait donc que le diode déprotège ici partiellement les groupements protecteurs Mob et qu'il permette la formation du dernier pont. Une diminution du nombre d'équivalents de diode ajoutés n'empêche pas la formation de ce produit secondaire, et limite de plus la formation du pont voulu. Quatre équivalents semblent donc être le juste milieu entre la conversion totale du produit de départ et une formation minimum du produit indésirable. La SGTx1(SS_{1,4}; SS_{2,5}; SMob_{3,6}) **55** a ainsi pu être obtenue après purification avec un rendement de 20 % (Figure 88).

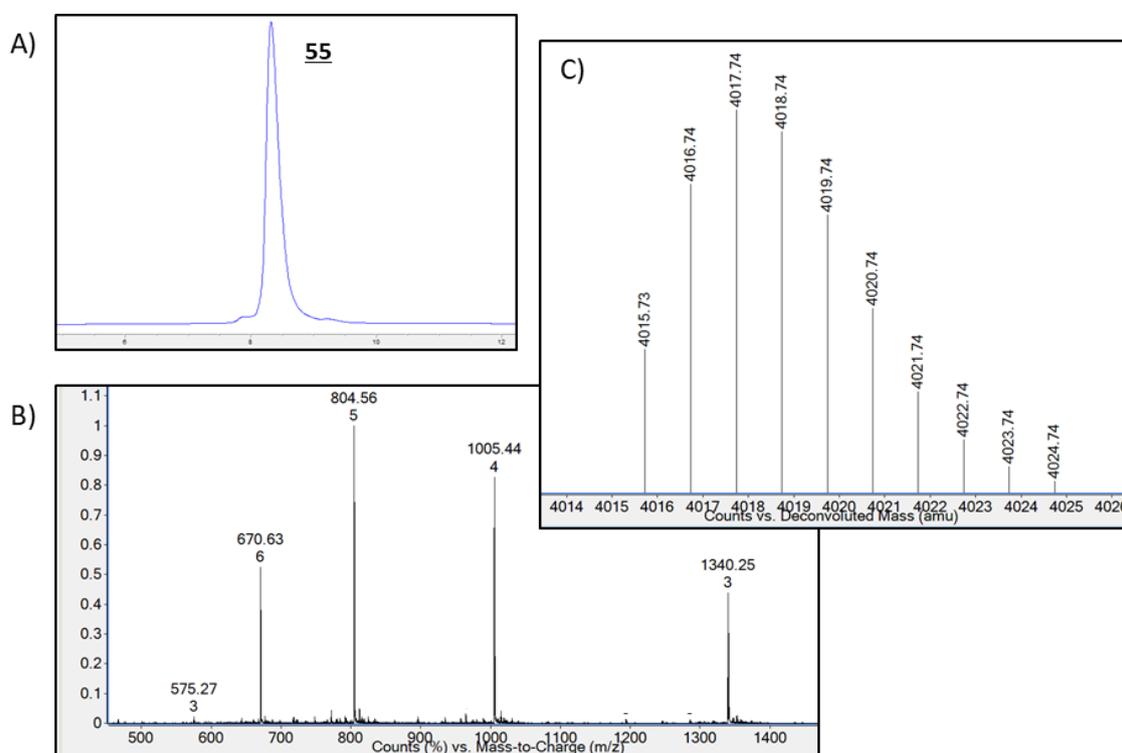


Figure 88 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la SGTx1(SS_{1,4}; SS_{2,5}; SMob_{3,6}) **55**. A) Analyse RP-HPLC de **55** purifiée ($t_R = 8,3$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **55** purifiée. Le nombre indiqué en-dessous du m/z correspond à l'état de charge. C) Déconvolution de l'analyse HRMS B. M_{mono} calculée : 4015,71 Da ; observée : 4015,73 Da.

Afin d'évaluer la pertinence de la stratégie de formation des deux premiers ponts en réaction *one-pot* dans le cas de la SGTx1, cette méthode a également été appliquée ici. La SGTx1(SH_{1,4}; SAcm_{2,5}; SMob_{3,6}) a été placée dans un tampon contenant de l'acide citrique, du DMSO et de la guanidine à pH neutre afin de former le premier pont disulfure. Après une nuit d'oxydation, la formation du premier pont a effectivement été constatée par HRMS. Le pH a

donc été ajusté à 2 et un équivalent de diiode a été ajouté toutes les 5 minutes, pour un total de quatre ajouts. Ici encore, la formation du second pont a pu être observée par HRMS, de même que l'apparition du produit secondaire à trois ponts. La SGTx1(SS_{1,4}; SS_{2,5}; SMob_{3,6}) **55** a été isolée avec un rendement de 19 % avec cette méthode, calculé à partir du taux de chargement de la résine. En comparaison, la formation des deux premiers ponts de manière successive a été réalisée avec un rendement total de 3%. La réaction *one-pot* présente donc un rendement sensiblement supérieur aux deux réactions réalisées séparément, en particulier grâce à la suppression d'une purification intermédiaire.

Avec cette optimisation, la formation du dernier pont disulfure a pu être réalisée sur des quantités assez importantes, ce que la première méthode ne permettait pas. Les groupements protecteurs Mob de la SGTx1(SS_{1,4}; SS_{2,5}; SMob_{3,6}) ont donc été déprotégés, comme dans le cas de la NMB-1, dans un mélange TFA/phénol/TFMSA 8:1:1 à 0°C. Au cours des travaux réalisés sur cette étape, une faible reproductibilité a été constatée, avec des résultats plus ou moins satisfaisants. Dans le meilleur cas, un unique pic majoritaire a pu être observé par RP-HPLC analytique, présentant la bonne masse moléculaire par analyse HRMS. Dans les cas les plus défavorables, de nombreuses impuretés ont été formées, possédant globalement des masses moléculaires inférieures à celle recherchée. Cette faible reproductibilité a été attribuée à la qualité du TFMSA avec des soucis sur des lots anciens. Ce problème a ainsi été en grande partie résolu au cours des manipulations suivantes en utilisant systématiquement des bouteilles de TFMSA récemment entamées. Une fois les groupements Mob correctement déprotégés, la formation du dernier pont a été entreprise dans un tampon oxydant à pH acide. Cependant, après une nuit de réaction, bien que la toxine totalement repliée soit observable, celle ne contenant que deux ponts était encore majoritaire d'après le suivi par RP-HPLC et HRMS. Après 48h, la quasi-totalité de la toxine était totalement oxydée, avec cependant l'apparition d'un second pic, minoritaire, possédant également la masse moléculaire recherchée. Un temps de réaction encore plus long montrait alors la diminution du pic majoritaire en faveur du second pic. Il semblerait ainsi qu'un temps de réaction plus long, permettant une formation quasi-totale du troisième pont, favoriserait également le *scrambling* des ponts disulfures, même à pH acide. Ceci a été confirmé par la détermination expérimentale des ponts disulfures des deux espèces possédant la même masse moléculaire par une collaboratrice de Smartox Biotechnology. En effet, le pic majoritaire possédait la configuration native de ponts disulfures, tandis que le second pic apparaissant au cours du temps présentait un mauvais appariement des cystéines. Un temps de réaction de 48 heures semblait tout de même être un bon compromis entre une conversion totale du produit de départ et la formation du produit secondaire, avec un ratio d'environ 80/20 en faveur du produit désiré, déterminé par RP-HPLC analytique. Dans ces conditions, la SGTx1 repliée **56** a pu être obtenue avec un rendement de 14 % sur les étapes de déprotection des résidus Cys(Mob) et de formation du pont correspondant (Figure 89). La déprotection des groupements protecteurs Mob mène généralement à une espèce chimique plus hydrophile, ayant donc un temps de rétention plus faible, comme c'était le cas avec la NMB-1 par exemple. De manière intéressante, il semblerait ici que ceci soit compensé par la formation du troisième pont, donnant à la toxine une structure tridimensionnelle au caractère hydrophobe. Le temps de rétention n'a donc quasiment pas varié entre le précurseur et la SGTx1 totalement oxydée.

De plus, le temps de rétention de ce produit final s'avère différent de celui du produit secondaire contenant trois ponts observé lors de la déprotection des cystéines Cys(Acm). Il semblerait donc que ce produit secondaire corresponde à un appariement de cystéines non natif.

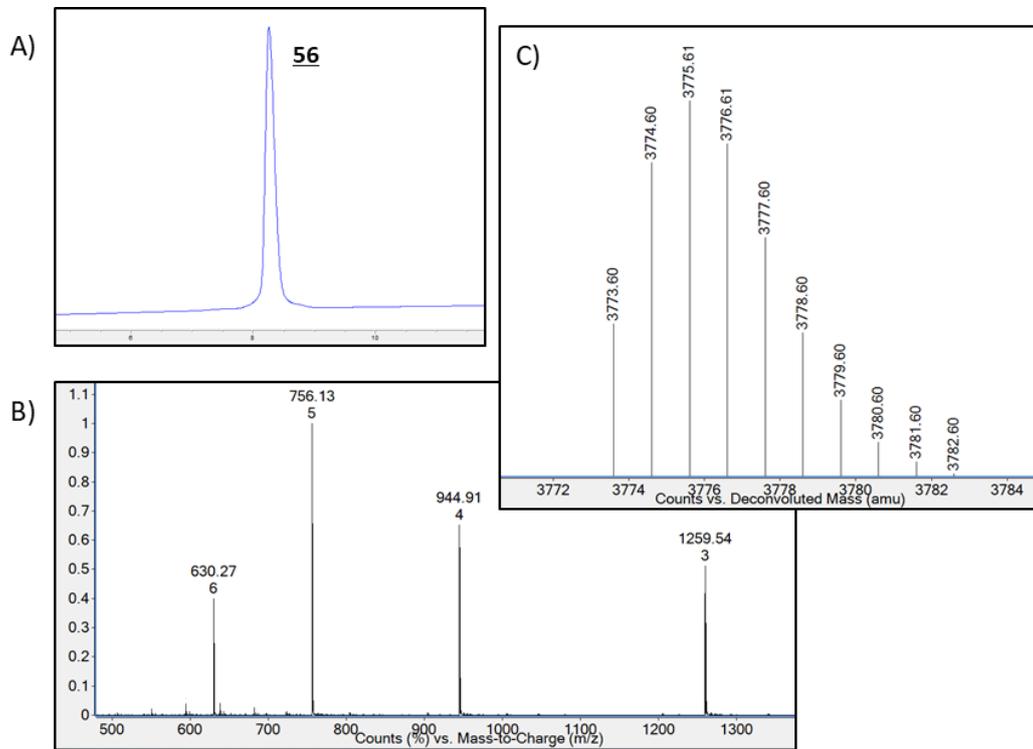


Figure 89 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la SGTx1 repliée **56**. A) Analyse RP-HPLC de **56** purifiée ($t_R = 8,3$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **56** purifiée. Le nombre indiqué en-dessous du m/z correspond à l'état de charge. C) Déconvolution de l'analyse HRMS B. M_{mono} calculée : 3773,58 Da ; observée : 3773,60 Da.

La SGTx1 native a ainsi pu être obtenue par formation dirigée de 3 ponts disulfures avec un rendement total de 3% sur cinq étapes incluant la synthèse par SPPS. Le repliement régiosélectif de la SGTx1 illustre bien le caractère laborieux de cette méthode. Celle-ci est donc à réserver aux toxines ne se repliant pas correctement en utilisant le repliement oxydatif direct. Dans le cas de la SGTx1, ce dernier n'a pas permis l'isolation de la configuration native de la toxine à cause de la présence de nombreuses espèces ne possédant pas l'appariement recherché, malgré le suivi d'un protocole décrit dans la littérature.²⁸⁵

2. Phlotoxine-1

La Phlotoxine-1 (PhITx1) est une toxine extraite des venins de tarentules appartenant à la famille des *Phlogiellus*, et a été brièvement décrite pour la première fois en 2005.²⁸⁷ Celle-ci est formée de 34 acides aminés et contient trois ponts disulfures formant un motif ICK (Figure 90). De manière intéressante, cette toxine ne présente que peu d'homologie avec l'ensemble des toxines précédemment décrites dans la littérature. Afin de préciser son activité

biologique, et en particulier son action inhibitrice sur les canaux ioniques, des quantités plus importantes que celles offertes par l'extraction de venin étaient nécessaires.



Figure 90 : Séquence et ponts disulfures de la Phlotoxine-1

La synthèse par voie chimique de la PhITx1 a donc été entreprise. Dans un premier temps, nous nous sommes orientés vers une stratégie de repliement oxydatif direct de la toxine. Pour cela, la synthèse par SPPS de la séquence de la toxine a été réalisée sans groupements protecteurs orthogonaux des cystéines et a permis d'obtenir la PhITx1 linéaire **57**. Des essais préliminaires conduits sur le peptide brut pour son repliement n'ont pas menés à des résultats satisfaisants, avec des mélanges complexes de peptides repliés ayant plusieurs configurations de ponts disulfures différentes. Afin de faciliter la séparation et l'identification des différents composés, des essais de repliement ont également été conduits sur la toxine linéaire purifiée. Bien que cela ait permis d'améliorer sensiblement la qualité du processus de repliement (Figure 91A), la PhITx1 repliée **58** native (Figure 91B et C) n'a pu être obtenue par repliement oxydatif direct qu'avec des rendements décevants, ne permettant donc pas une étude plus poussée de son activité. Cela nous a ainsi mené à nous orienter vers une stratégie de formation dirigée de ponts disulfures.

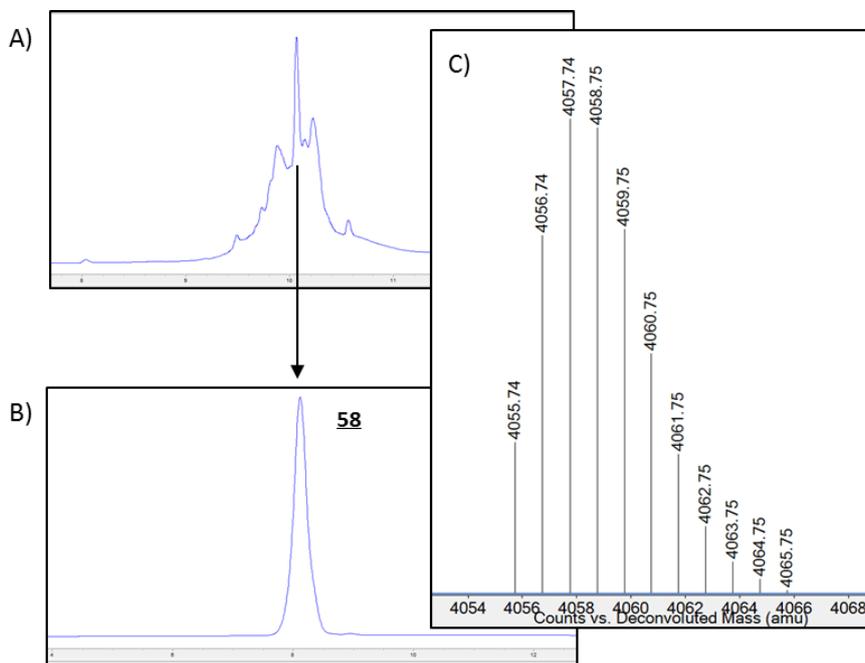


Figure 91 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la PhITx1 repliée **58** obtenue par repliement oxydatif direct. A) Analyse RP-HPLC de la réaction de repliement oxydatif de **57** après 72h (Chromolith® High Resolution RP-18e, 214 nm, 5-60 % B en 15 min). B) Analyse RP-HPLC de **58** purifiée ($t_R = 8,1$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). C) Déconvolution de l'analyse HRMS de **58** purifiée. M_{mono} calculée : 4055,72 Da ; observée : 4055,74 Da.

Pour cela, la synthèse par SPPS de la PhITx1 a été de nouveau réalisée, avec cette fois-ci un jeu de groupements protecteurs Trt/Acm/Mob. Mise à part la cystéine C5, proche d'une tyrosine, aucune cystéine ne présentait de contrainte par rapport au placement des différents groupements protecteurs. Nous avons donc choisi de protéger les cystéines C1 et C4 avec des groupements Acm, les cystéines C2 et C5 avec des groupements Trt et les cystéines C3 et C6 avec des groupements Mob (Figure 92).

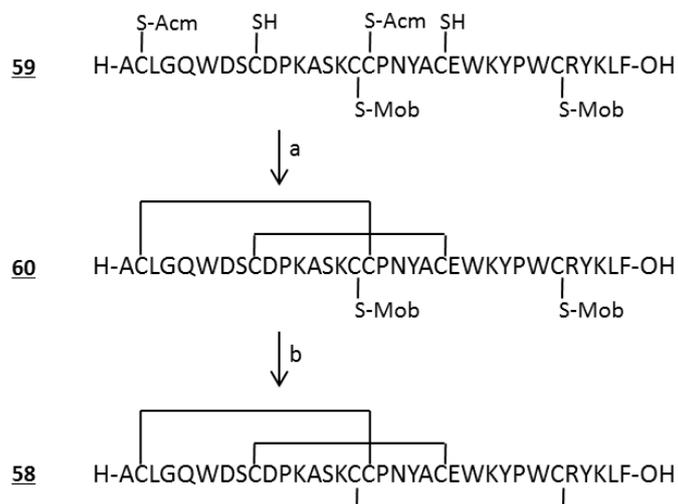


Figure 92 : stratégie de formation dirigée de ponts disulfures de la PhITx1. a) 0,1 M acide citrique, 10 %v/v DMSO, 2M Gn.HCl, pH 7, 0,1 mg/mL de peptide, 1 nuit, puis pH 2, 5 x 1 éq. I₂ 50mM dans CH₃CN, 20 min, puis ascorbate de sodium. d) TFA/phénol/TFMSA 8:1:1, 0°C, 10 min et précipitation avec Et₂O, puis 0,1 M acide citrique, 15 %v/v DMSO, 2M Gn.HCl, pH 2, 0,1 mg/mL de peptide, 48h.

Après synthèse par SPPS, nous avons obtenu après séparation du peptide de la résine et déprotection, le peptide PhITx1(SAcm_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) **59** brut. Des analyses par RP-HPLC et HRMS ont révélé une qualité de synthèse très satisfaisante, si bien qu'une purification de la toxine brute n'a pas été jugée nécessaire. De manière intéressante, la qualité de la synthèse était nettement supérieure à celle réalisée pour la stratégie de repliement oxydatif direct, confirmant ici l'impact non négligeable des groupements protecteurs des cystéines sur la synthèse par SPPS. La formation des deux premiers ponts a donc pu être directement entreprise séquentiellement par une réaction *one-pot*. Comme pour la SGTx1, la toxine a été placée dans un tampon oxydatif composé d'acide citrique, de DMSO et de guanidine pendant une nuit pour former le premier pont. Un suivi par RP-HPLC et HRMS après une nuit a permis de constater la conversion quasi-totale du produit de départ en son équivalent contenant un pont disulfure. Après acidification du milieu, la déprotection des groupements protecteurs Acm et la formation concomitante du second pont ont pu être réalisées par plusieurs ajouts successifs de diiode. Des analyses par HRMS ont permis de déterminer le nombre d'équivalents nécessaires à la formation totale de ce pont. De manière satisfaisante, les étapes de formation des deux premiers ponts se sont déroulées sans formation de produits secondaires majeurs, comme en témoignent les analyses RP-HPLC du milieu réactionnel (Figure 93).

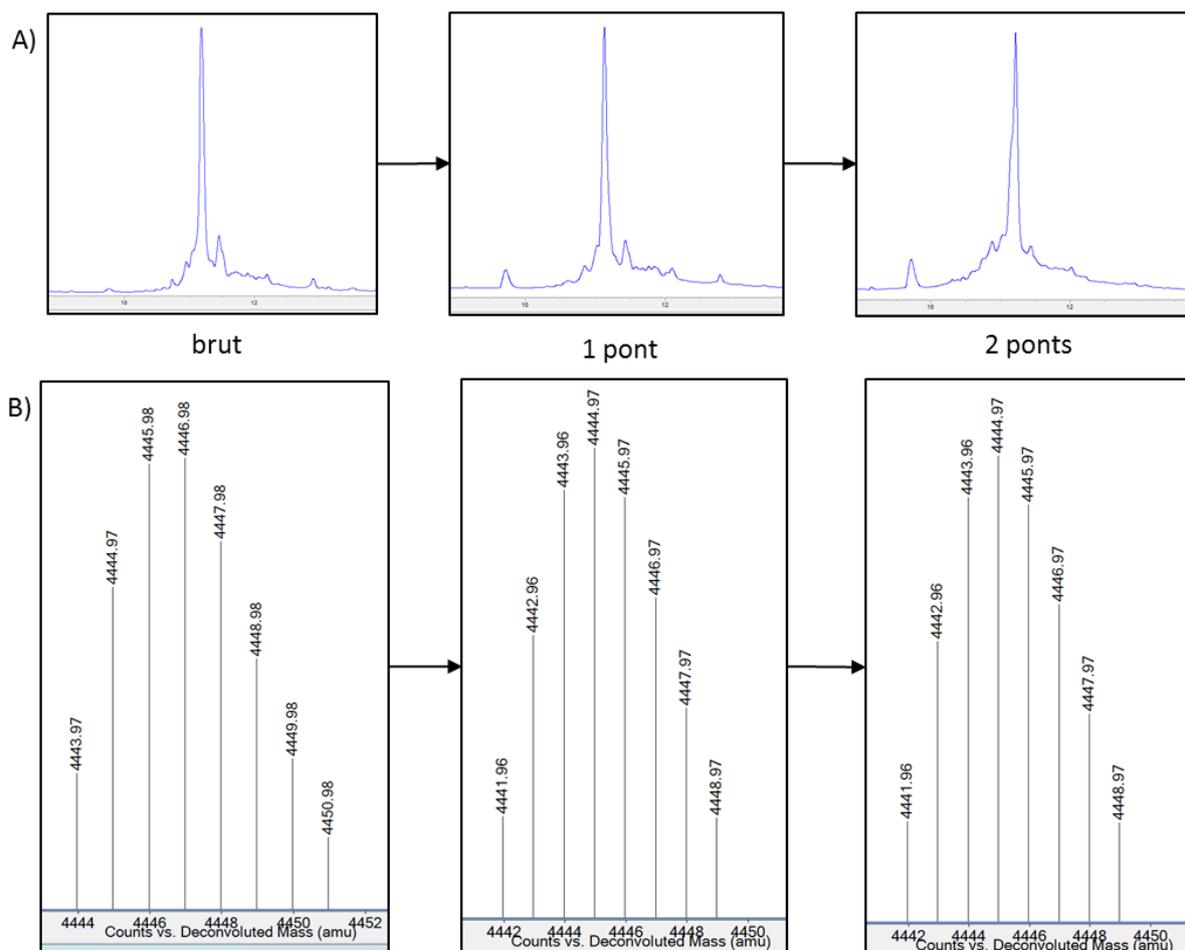


Figure 93 : Suivi des réactions de formation du premier et deuxième pont de la PhITx1 par analyses RP-HPLC et HRMS. A) Analyses RP-HPLC de la PhITx1 brut, après formation du premier pont disulfure après une nuit, et après formation du deuxième pont après ajout de 5 éq. de diiode (Chromolith® High Resolution RP-18e, 214 nm, 5-60 % B en 15 min). B) Analyses HRMS correspondantes.

Ainsi, après purification du milieu, la PhITx1(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) **60** a été isolée avec un rendement très satisfaisant de 47 % basé sur le taux de chargement de la résine utilisée pour la synthèse (Figure 94). Il est intéressant de noter qu'à cette étape, un oubli d'acidification du milieu entre la formation du premier et du second pont a conduit à l'obtention de multiples composés comportant un ou plusieurs adduits d'iode, probablement sur les trois tyrosines contenues dans la séquence. Cela confirme bien les données bibliographiques récoltées recommandant de réaliser la déprotection des groupements Acn en milieu acide.

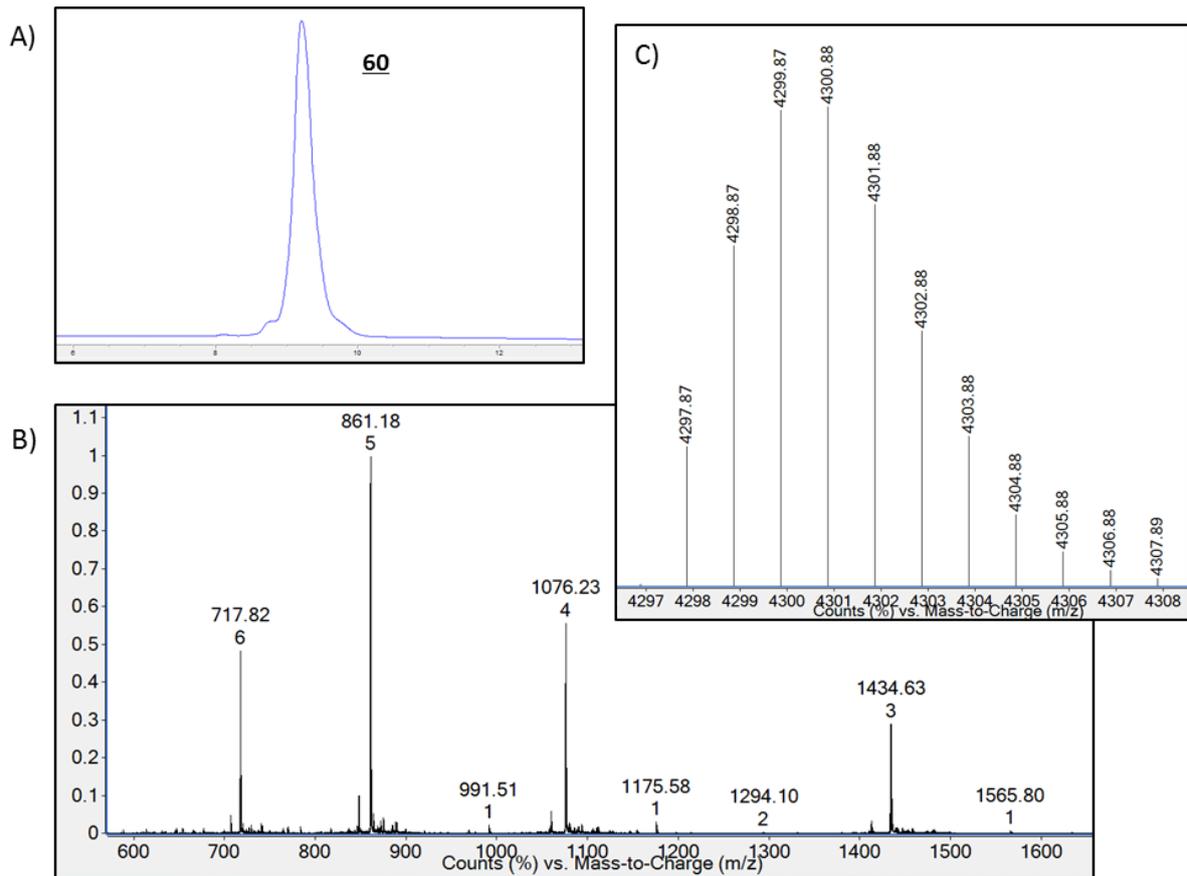


Figure 94 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la PhITx1(SS_{1,4}; SS_{2,5}; SMob_{3,6}) **60**. A) Analyse RP-HPLC de **60** purifiée ($t_R = 9,2$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **60** purifiée. Le nombre indiqué en-dessous du m/z correspond à l'état de charge. C) Déconvolution de l'analyse HRMS B. M_{mono} calculée : 4297,85 Da ; observée : 4297,87 Da.

Pour finir, la déprotection des groupements protecteurs Mob et la formation du dernier pont ont été entreprises. La déprotection des groupements Mob a été réalisée comme précédemment avec du TFMSA à froid. Sans purification intermédiaire, le peptide a par la suite été ajouté à un tampon acide oxydant contenant du DMSO et de la guanidine. Après une nuit, un suivi de la réaction a montré que la réaction d'oxydation n'était pas totale. Celle-ci a donc été réalisée sur 48 heures au total, puis purifiée par RP-HPLC. Deux pics distincts ont alors été récoltés et analysés par RP-HPLC analytique et HRMS. Les deux pics possédaient la même masse moléculaire correspondant à la PhITx 1 totalement oxydée, laissant penser qu'un phénomène de *scrambling* avait pris place lors de cette réaction prolongée. Cependant, l'analyse par RP-HPLC a révélé que les deux pics, bien séparés lors de la purification, possédaient le même temps de rétention à l'échelle analytique. Après de plus amples analyses, il s'est avéré que le comportement de la toxine sur phase inverse dépendait clairement de la température, et formait deux pics à moins de mener les analyses à une température élevée. Cela a été confirmé en collectant les deux pics séparément lors d'une analyse réalisée à température ambiante. La réinjection de chaque pic redonnait alors de nouveau les deux pics observés auparavant. Ce phénomène a pu être observé par le passé à plusieurs reprises au laboratoire avec des toxines à trois ponts présentant un motif ICK, mais également avec des peptides ayant une séquence riche en proline. Ainsi, ce phénomène peut

être dû à plusieurs facteurs. En effet, si l'on considère la séquence de la PhITx1, celle-ci possède trois prolines. La présence des ponts disulfures pourrait alors forcer une des liaisons amides impliquant l'amine d'une proline à adopter une conformation *cis*, menant ainsi à un équilibre *cis/trans* donnant deux isomères. Réaliser les analyses en chauffant permettrait alors de favoriser un unique conformère et donc de n'observer qu'un seul pic. Une autre explication provient du fait que la chaîne peptidique peut s'arranger de plusieurs manières autour des mêmes ponts disulfures, menant à des isomères dit topologiques. Ceci a été montré avec les exemples de la guanyline et de l'uroguanyline.²⁸⁸ Ces deux courts peptides possèdent deux ponts disulfures et forment deux pics lors d'analyses par RP-HPLC à froid. Cependant, alors que chaque isomère de la guanyline pris séparément se rééquilibre pour redonner le second, les isomères de l'uroguanyline semblent bloqués et ne se rééquilibrent pas à température ambiante. Un mécanisme d'interconversion des isomères topologiques de la guanyline a été proposé par les auteurs de la publication, mettant en jeu le passage de la chaîne peptidique autour de la boucle formée par les deux ponts disulfures (Figure 95A). Ce type de conversion peut également être possible pour les peptides à trois ponts, comme cela a été illustré par Craik *et coll* (Figure 95B).²⁸⁹

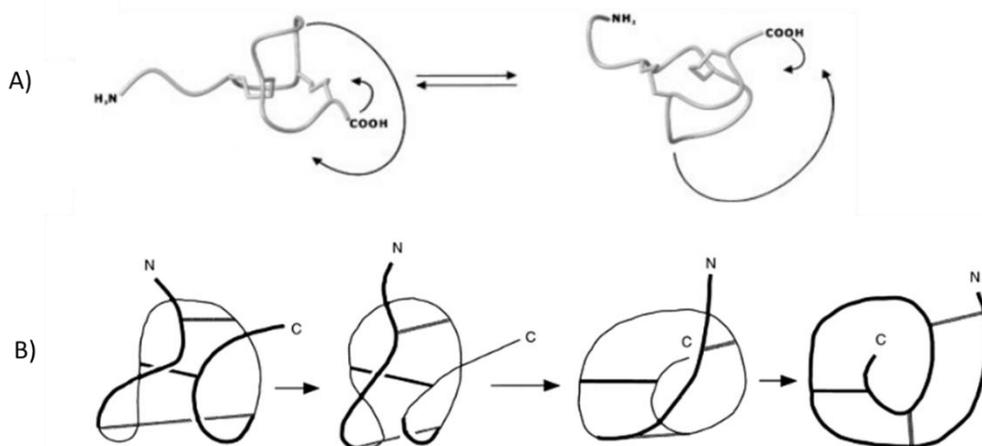


Figure 95 : Interconversion d'isomères topologiques à deux et trois ponts. A) Cas de la guanyline.²⁸⁸ B) Cas générique d'un peptide à trois ponts possédant un motif ICK.²⁸⁹

Ceci confirme donc que la PhITx1 repliée **58** a bien été obtenue à l'issue de la dernière réaction d'oxydation. Cependant, la formation de ces deux pics a sensiblement compliqué la purification, si bien que celle-ci a pu être isolée après purification avec un rendement de seulement 3 % après repurification par RP-HPLC semi-préparative, rendement basé sur un dosage du produit final à 280 nm (Figure 96). La déprotection des groupements protecteurs Mob et l'obtention de la structure native se traduit ici par la formation d'un composé nettement plus hydrophile, comme en témoigne le temps de rétention diminué de plus d'une minute par rapport à son précurseur. La Phlotoxine-1 a donc pu être obtenue par repliement régiosélectif avec un rendement total de 1,6 % sur cinq étapes comprenant la synthèse par SPPS, rendement environ cinq fois supérieur à celui obtenu par repliement oxydatif direct. Ceci a ainsi permis une étude avancée de l'activité biologique de cette toxine sur les canaux

sodiques voltage-dépendants, et en particulier de déterminer sa sélectivité pour le canal $Na_v1.7$, en collaboration avec l'Institut du Thorax de Nantes. Finalement, les résultats de ces recherches ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Toxins*, avec en particulier, à notre connaissance, la première description de la synthèse et du repliement de cette toxine.²⁹⁰ Suite à cette publication, l'étude de la Phlotoxine-1 a été complétée la même année par le groupe de Servent.²⁹¹ Les auteurs de cette publication ont alors confirmé la formation de deux isomères lors du repliement oxydatif. Cependant, ceux-ci n'ont pas eu à recourir au repliement régiosélectif en utilisant des conditions d'oxydation directe rigoureusement sélectionnées différentes de celles testées par nos soins. Aucun rendement n'est annoncé, ce qui ne permet malheureusement pas de comparaison des deux méthodes.

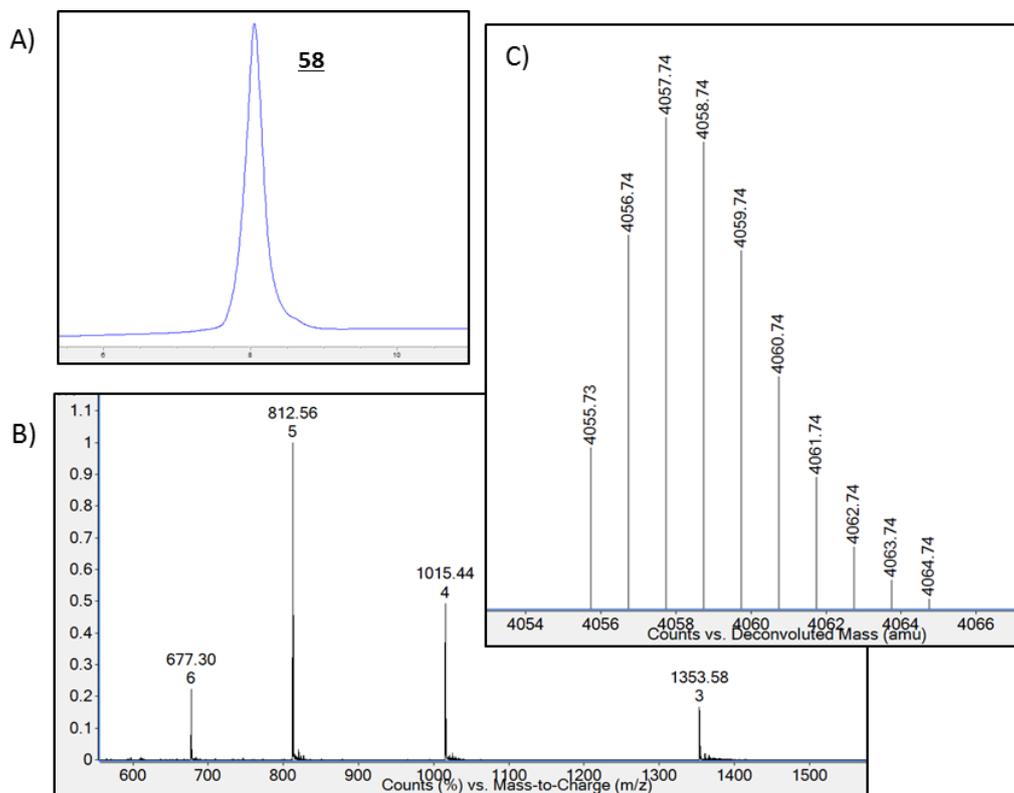


Figure 96 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la PhITx1 repliée **58**. A) Analyse RP-HPLC de **58** purifiée ($t_R = 8,1$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **58** purifiée. Le nombre indiqué en-dessous du m/z correspond à l'état de charge. C) Déconvolution de l'analyse HRMS B. M_{mono} calculée : 4055,72 Da ; observée : 4055,73 Da

C. Applications pour le catalogue de Smartox Biotechnology

La stratégie de repliement régiosélectif utilisant les groupements protecteurs Acm et Mob ayant fait ses preuves avec les toxines décrites précédemment, celle-ci a par la suite été utilisée en routine au laboratoire pour le repliement de toxines difficiles à obtenir par oxydation directe. Parmi les toxines ayant été obtenues avec succès avec cette méthode, on trouve par exemple la δ -theraphotoxine-Hm1a et l'Hanatoxine-1.

1. δ -theraphotoxine-Hm1a

La δ -theraphotoxine-Hm1a (Hm1a) a été initialement isolée du venin de tarantule *Heteroscodra maculata* en 2002 et identifiée sous le nom d'Heteroscodratoxine-1.²⁹² L'Hm1a comporte 35 résidus et trois ponts disulfures qui forment un motif ICK (Figure 97). Une activité inhibitrice des canaux potassiques Kv4.1 avait alors été décrite. Cette toxine a par la suite été renommée Hm1a en 2016 lorsque que son rôle d'agoniste des canaux sodiques Nav1.1 avec une affinité nettement supérieure a été décrit.²⁹³ Celle-ci a alors servi d'outil de caractérisation de ces canaux et de leur rôle dans les mécanismes de la douleur.

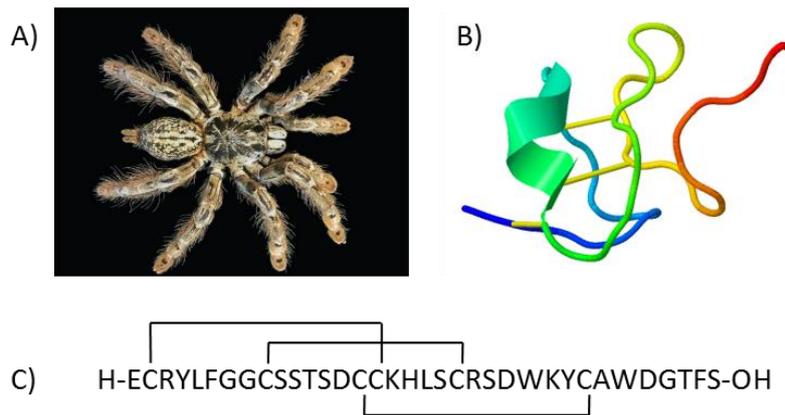


Figure 97: δ -theraphotoxine-Hm1a. A) *Heteroscodra maculata*²⁹³; B) structure tridimensionnelle de la δ -theraphotoxine-Hm1a (PDB: 2N6O); les ponts disulfures sont représentés en jaune. C) Séquence peptidique et ponts disulfures de la δ -theraphotoxine-Hm1a

Les auteurs de la seconde publication sur la Hm1a ont décrit la synthèse de la Hm1a, et en particulier son repliement par oxydation régiosélective de chaque pont.²⁹³ Cela laissait penser que son repliement oxydatif direct ne permettait pas d'obtenir cette toxine avec de bons rendements. En effet, après plusieurs essais de repliement à partir de la séquence linéaire de cette toxine, aucun isomère n'a pu être formé de manière majoritaire. Les analyses par RP-HPLC et HRMS des différentes réactions d'oxydation n'ont révélé que la présence de multiples espèces à différents degrés d'oxydation réunies sous forme d'amas. Nous nous sommes donc également orientés vers une stratégie de repliement dirigé des ponts disulfures de la Hm1a.

Dans la publication d'Osteen *et coll.*, le repliement est décrit avec la formation des ponts disulfures dans l'ordre C3-C6 puis C2-C5 et enfin C1-C4.²⁹³ Pour cela, le premier pont est formé à partir d'une paire de cystéines protégées par des groupements Trt avec du diiode, en présence de l'ensemble des chaînes latérales protégées. Le peptide est par la suite totalement déprotégé à l'exception de la paire de cystéines C1 et C3 protégées avec des groupements méthylbenzyle, et le second pont est formé à partir de cystéines, initialement protégées avec des groupements diphenylméthyle, avec du DMSO. Enfin, les groupements Meb sont déprotégés à l'aide d'acide fluorhydrique, et le dernier pont formé par oxydation avec du DMSO. Afin d'éviter l'utilisation d'acide fluorhydrique, nous avons choisi d'utiliser la stratégie Trt/Acm/Mob précédemment mise au point pour réaliser le repliement de la Hm1a.

Au vu de sa séquence, les cystéines C3 et C6 ne peuvent être protégées avec un groupement Acm. En effet, la cystéine C3 est impliquée dans un motif Asp-Cys où un groupement protecteur Acm favoriserait la formation d'aspartimide. La cystéine C6 est quant à elle adjacente à une tyrosine qui risquerait d'être alkylée par l'Acm lors de la déprotection avec du TFA. Ainsi, nous avons choisi de positionner les groupements Acm sur la paire de cystéines C1 et C4, les groupements Trt sur les cystéines C2 et C5 et les groupements Mob sur les cystéines C3 et C6.

La Hm1a(SAcm_{1,4} ; STrt_{2,5} ; SMob_{3,6}) a donc été synthétisée par SPPS, en introduisant le motif DG en position 31-32 avec le composé commercial Fmoc-Asp(OtBu)-N(Dmb)Gly-OH pour éviter la formation d'aspartimide. La qualité de cette première synthèse n'étant pas satisfaisante, nous avons décidé de synthétiser une seconde fois cette toxine en introduisant le motif Ser-Ser en position 10-11 sous forme de pseudoproline pour améliorer le couplage des acides aminés suivants. Ceci a été efficace, et la Hm1a(SAcm_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) **61** a été obtenue brute sous forme d'un pic majoritaire en analyse RP-HPLC. Ceci permettait ainsi la formation du premier pont sans purification intermédiaire. Il a cependant été décidé de ne pas réaliser le second pont disulfure en réaction *one-pot* comme précédemment pour ne pas compliquer d'avantage la purification du milieu réactionnel. Le premier pont a donc été formé dans un tampon Tris basique en présence de DMSO, d'acétonitrile et d'une concentration importante en guanidine pendant une nuit. De manière intéressante, l'absence de guanidine à cette étape ralentit considérablement la formation du pont, si bien que la réaction d'oxydation n'était pas terminée après 48 heures d'agitation. Au vu de l'action dénaturante de la guanidine, il semblerait donc que des structures secondaires soient présentes lorsque la Hm1a est totalement réduite et aient un impact sur la réaction d'oxydation. Comme nous l'avons vu précédemment, la proximité des cystéines est un facteur clé lors de la formation d'un pont disulfure. Ici, ces structures secondaires doivent donc empêcher la formation du pont en maintenant les cystéines éloignées. De plus, la présence d'acétonitrile a également son importance à cette étape. En effet, son absence provoque la précipitation rapide du peptide et conduit à une diminution drastique du rendement. De plus, la solubilisation de la Hm1a(SAcm_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) brute a également une forte influence sur la précipitation du milieu. La solubilisation du peptide brut dans un mélange eau/acétonitrile 50:50, par exemple, conduit à une solution très légèrement trouble, laissant penser que la grande majorité du produit est soluble. Son addition au tampon de repliement conduit cependant à une forte précipitation du peptide une fois dans ce tampon, même en présence d'un pourcentage élevé d'acétonitrile. Ce phénomène a été constaté à plusieurs reprises au laboratoire, si bien que de manière générale, dans le cas de peptides ayant tendance à s'agréger durant le repliement, une solubilisation irréprochable du brut semble être un facteur clé pour obtenir des résultats satisfaisants, que ce soit pour le repliement oxydation direct ou régiosélectif. Ici, la Hm1a(SAcm_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) a pu être solubilisée correctement dans du TFA, puis diluée avec une solution de guanidine avant ajout au tampon de repliement. Dans ces conditions, et en combinaison avec la présence d'acétonitrile dans le tampon, aucune précipitation du peptide n'a été observée. A noter que le peptide brut était également soluble dans une solution ammoniacale à pH 9,5-10, mais conduisait à des résultats peu satisfaisants, certainement dus à la formation d'aspartimide dans ces conditions basiques. Avec ces

optimisations, la Hm1a(SAcm_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) **62** a pu être obtenue avec un rendement de 26 % basé sur le taux de substitution de la résine utilisée pour la synthèse par SPPS (Figure 98).

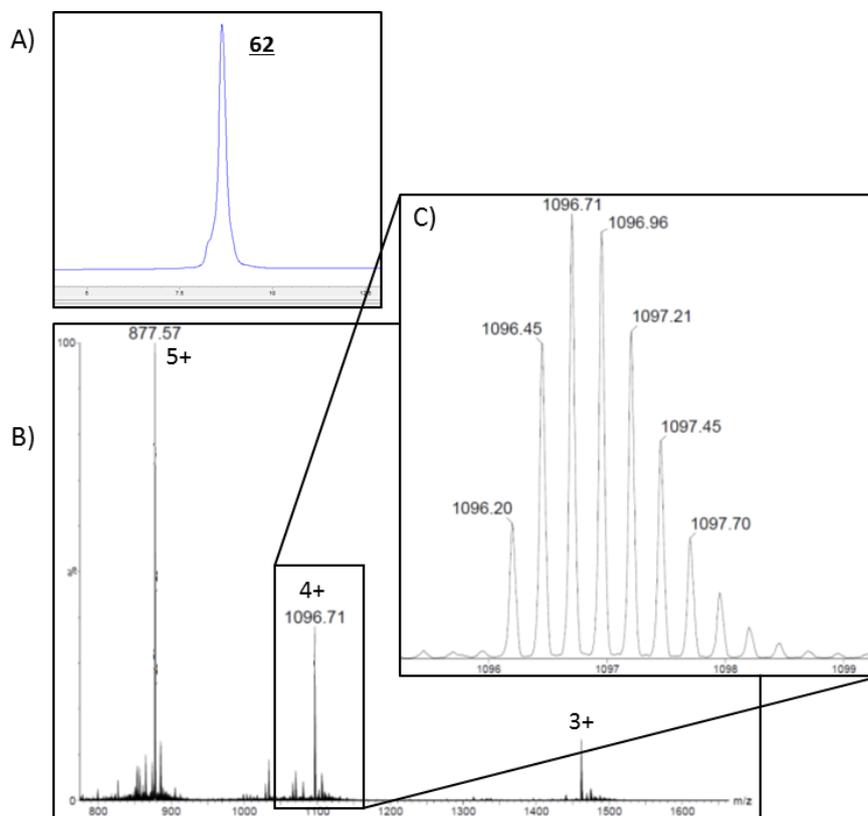


Figure 98 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la Hm1a(SAcm_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) **62**. A) Analyse RP-HPLC de **62** purifiée ($t_R = 8,6$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **62** purifiée. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 4+ de **62** purifiée. M_{mono} calculée : 4380,80 Da ; observée : 4380,77 Da.

La formation du second pont a donc été entreprise en déprotégeant les groupements protecteurs Acm. La Hm1a(SAcm_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) **62** a été placée dans un tampon composé d'acide citrique et de guanidine, et plusieurs ajouts successifs de diiode ont été réalisés. Quatre ajouts ont permis de déprotéger la totalité des groupements Acm et de former le pont correspondant. De manière intéressante, comme lors de la formation du premier pont, nous avons constaté à cette étape que l'absence d'une forte concentration de guanidine dans le milieu réactionnel bloquait rapidement la déprotection des groupements Acm et la formation du pont, malgré de nombreux ajouts de diiode. Il semblerait ici que l'explication précédente reste valable. L'intermédiaire iodure de sulfényle formé en présence de diiode serait incapable d'attaquer le second thiol, trop éloigné. Celui-ci réagirait donc de nouveau avec le cation iminium issu de la déprotection de l'Acm, pour redonner une cystéine protégée par ce groupement. En présence de guanidine cependant, la réaction d'oxydation des résidus Cys(Acm) pour former le pont correspondant se déroule proprement, et la Hm1a(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) **63** a été obtenue après purification avec un rendement de 42 % (Figure 99).

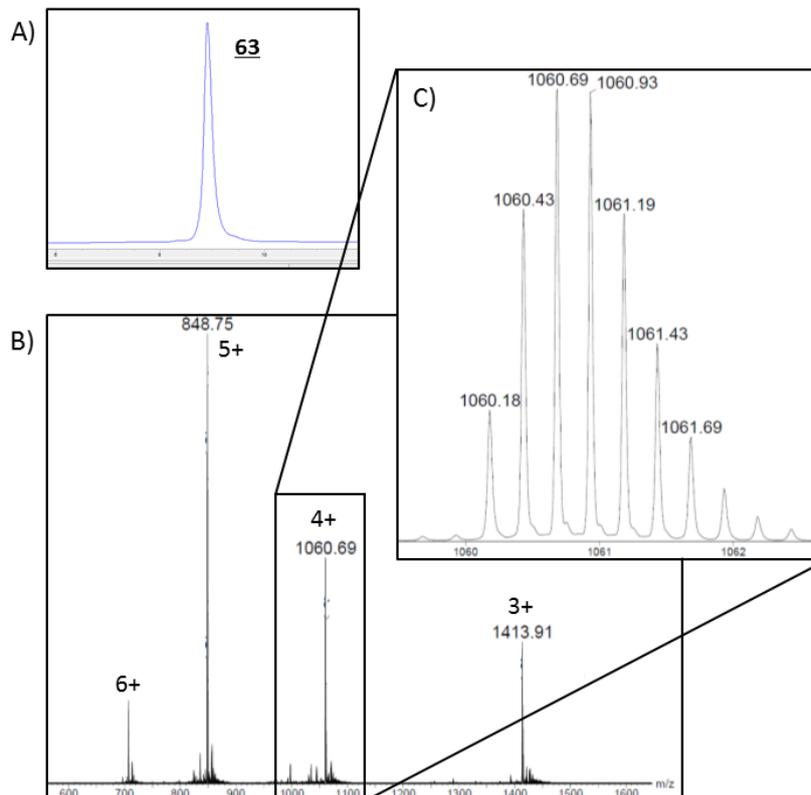


Figure 99 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la Hm1a(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) **63**. A) Analyse RP-HPLC de **63** purifiée ($t_R = 8,9$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **63** purifiée. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 4+ de **63** purifiée. M_{mono} calculée : 4236,70 Da ; observée : 4236,69 Da.

Enfin, la déprotection des groupements Mob et l'oxydation de la dernière paire de cystéines ont été réalisées. Les groupements protecteurs Mob ont donc été retirés par traitement du peptide avec du TFMSA avant de placer le peptide dans un tampon oxydant acide contenant de la guanidine. Après une nuit, un suivi de la réaction par analyses RP-HPLC et HRMS a permis de constater que la réaction n'était pas totale. En particulier, l'analyse HRMS a révélé la présence d'une quantité importante de Hm1a dont la paire de résidus Cys(Mob) avait bien été déprotégée, mais dont le pont correspondant n'avait pas encore été formé. Le temps de repliement minimum a donc été estimé à 48 heures. Après purification du milieu réactionnel, trois pics possédant la masse recherchée ont pu être isolés (P1, P2 et P4, Figure 100A), dont un (P4) majoritairement présent lors de la purification. Parmi ces trois pics, deux (P2 et P4) se rééquilibrent partiellement lorsqu'ils sont réinjectés en RP-HPLC analytique pour redonner en partie le second. Cependant, cette rééquilibration n'est pas totale, si bien que les deux pics n'ont pas rigoureusement le même profil analytique, même après un temps prolongé en solution (Figure 100B). Le pic P2 va par exemple rester majoritaire lorsqu'il est réinjecté en HPLC analytique, avec le pic P4 présent minoritairement, et inversement lorsque le pic P4 est réinjecté en HPLC analytique. Ce comportement laisse penser que ces deux espèces sont donc des isomères topologiques, de la même manière que la Phlotoxine-1. La rééquilibration semble cependant particulièrement lente entre les deux espèces. L'évaluation de l'activité biologique des composés P2 et P4 a révélé que les deux espèces étaient actives,

avec cependant le composé P4 plus actif que le composé P2. Ainsi, seul le composé P4 a été considéré comme la toxine recherchée. Le pic P1 a quant à lui été attribué à la racémisation de l'acide aspartique impliqué dans le motif Asp-Gly, ou à la formation de l'isopeptide correspondant. En effet, le pic P3 correspond à une espèce ayant la masse recherchée moins 18 Da, typique de la formation d'aspartimide. La réouverture du cycle peut donc conduire à une espèce possédant la même masse moléculaire que le produit recherché, celle-ci étant probablement P1 ici. La formation d'aspartimide à cette étape peut être expliquée par le temps prolongé passé en solution. De plus, il a été constaté à cette étape que le chauffage de la colonne utilisée pour les analyses et les purifications conduisait à une dégradation importante des produits présents, si bien que les étapes chromatographiques ont par la suite été réalisées à température ambiante.

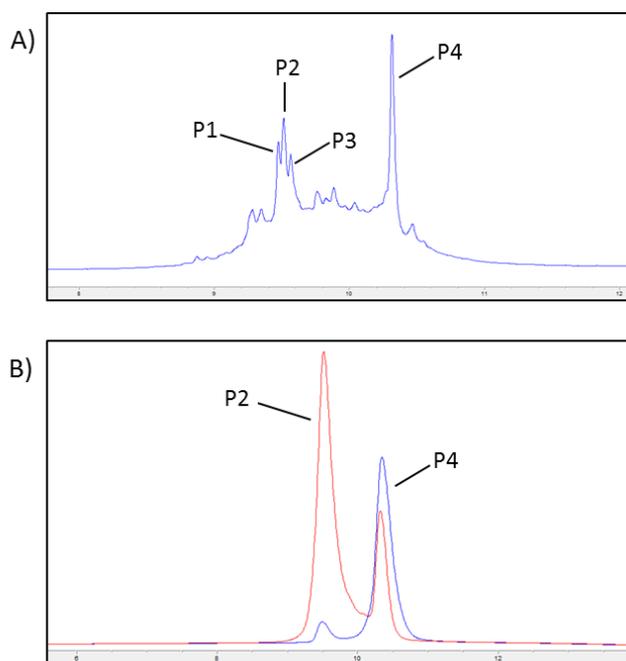


Figure 100 : Analyses RP-HPLC des composés issus de la réaction de formation du troisième pont disulfure de la Hm1a. A) Analyse RP-HPLC du milieu réactionnel après 48 h (Chromolith® High Resolution RP-18e, 214 nm, 5-60 % B en 15 min). B) Analyses RP-HPLC des composés P2 et P4 isolés (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min).

En ne collectant que le composé correspondant au pic majoritaire, la Hm1a repliée **64** a été obtenue avec un rendement de 13 % sur les étapes de déprotection des groupements Mob et formation du pont disulfure (Figure 101).

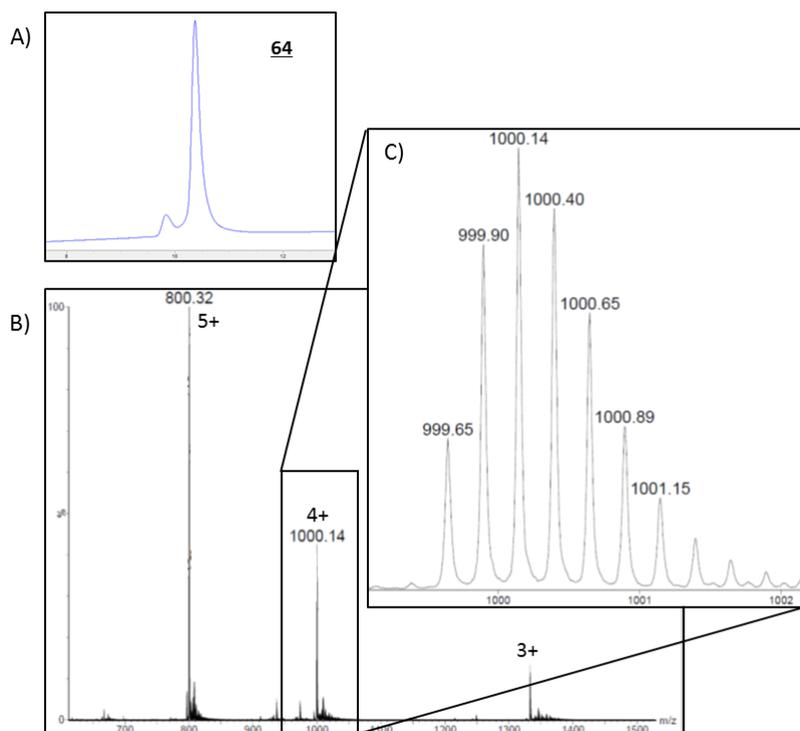


Figure 101 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la Hm1a repliée **64**. A) Analyse RP-HPLC de **64** purifiée ($t_R = 10,4$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **64** purifiée. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 4+ de **64** purifiée. M_{mono} calculée : 3994,57 Da ; observée : 3994,57 Da.

En conclusion, la δ -theraphotoxine-Hm1a a été obtenue avec un rendement total de 1,4 % sur 5 étapes dont la synthèse par SPPS. Bien que non décrit ici, un travail similaire de formation dirigée de ponts disulfures a été effectué sur la δ -theraphotoxine-Hm1b, toxine également décrite dans l'article d'Osteen *et coll.* et très proche de la Hm1a, avec des résultats semblables à ceux obtenus ci-dessus.

2. Hanatoxine-1

L'Hanatoxine-1 (HaTx1), ou κ -theraphotoxine-Gr1a, est une toxine de 35 acides aminés issue du venin de la tarantule *Grammostola spatulata* et a été isolée en 1995 (Figure 102).²⁹⁴ Cette toxine comporte trois ponts disulfures formant un motif ICK²⁹⁵ et se montre homologue à la Hm1a à 77%. Ainsi, comme on pouvait s'y attendre, l'HaTx1 est décrite comme une toxine formant deux pics par analyse RP-HPLC, à l'image de ce que nous avons pu constater avec la Hm1a. Cette toxine inhibe les canaux potassiques $K_v2.1$ et $K_v4.2$, et son mécanisme d'action particulier en fait un outil d'étude intéressant de ces canaux.²⁹⁶

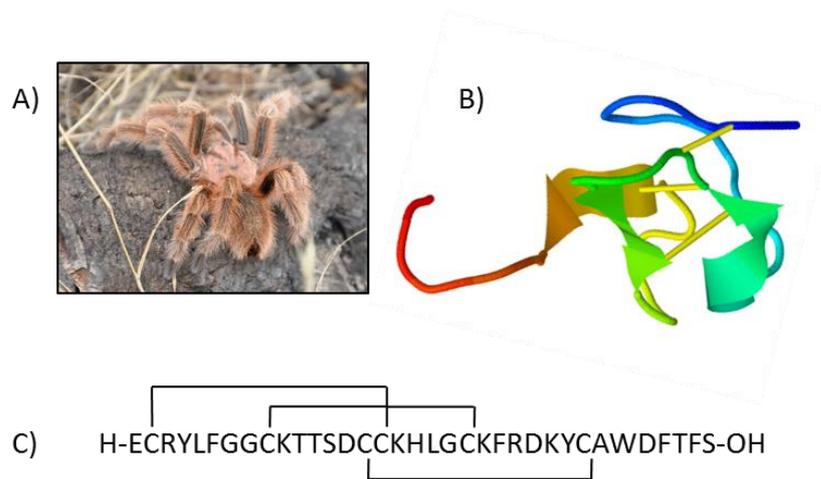


Figure 102 : Hanatoxine-1. A) *Grammostola spatulata* ; B) structure tridimensionnelle de l'Hanatoxine-1 (PDB : 1D1H) ; les ponts disulfures sont représentés en jaune. C) Séquence peptidique et ponts disulfures de l'Hanatoxine-1

Bien que la synthèse de l'HaTx1 native soit décrite dans l'article étudiant sa structure, son repliement par oxydation directe ne semble pas évident à en juger par les différents isomères obtenus par les auteurs.²⁹⁵ Des essais de repliement direct sur l'HaTx1 ne nous ont en effet pas permis d'isoler facilement la toxine désirée. Puisque cette toxine est proche de la Hm1a, nous avons donc décidé de tirer profit du développement réalisé sur cette dernière pour tenter d'obtenir l'HaTx1 native par formation dirigée de ponts disulfures. Au vu de la similitude entre la Hm1a et l'HaTx1, le même schéma de protection des cystéines avec les groupements protecteurs Trt, Acn et Mob a été appliqué. La synthèse par SPPS de l'HaTx1(SAcn_{1,4} ; STrt_{2,5} ; SMob_{3,6}) a donc été réalisée, et l'HaTx1(SAcn_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) **65** a été obtenue majoritairement après séparation de la résine et déprotection. La formation des deux premiers ponts a donc été réalisée par une réaction *one-pot* directement sur la toxine brute. Comme la Hm1a, l'agrégation de la toxine durant la formation du premier pont a initialement été observée. Cependant, en appliquant les conditions de solubilisation et de formation du premier pont utilisées pour la Hm1a, notamment en présence d'un certain pourcentage d'acétonitrile, la précipitation du peptide a pu être efficacement supprimée. Après avoir constaté la formation du premier pont par analyses RP-HPLC et HRMS, le milieu a été acidifié pour traiter l'HaTx1 contenant un pont avec du diiode. La formation du second pont disulfure a été particulièrement lente, si bien que six ajouts d'un équivalent de diiode et un temps de réaction prolongé ont été nécessaires. Avec ces conditions, l'HaTx1(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) **66** a été obtenue après purification avec un rendement de 19 % sur les étapes de synthèse par SPPS et formation des deux premiers ponts (Figure 103).

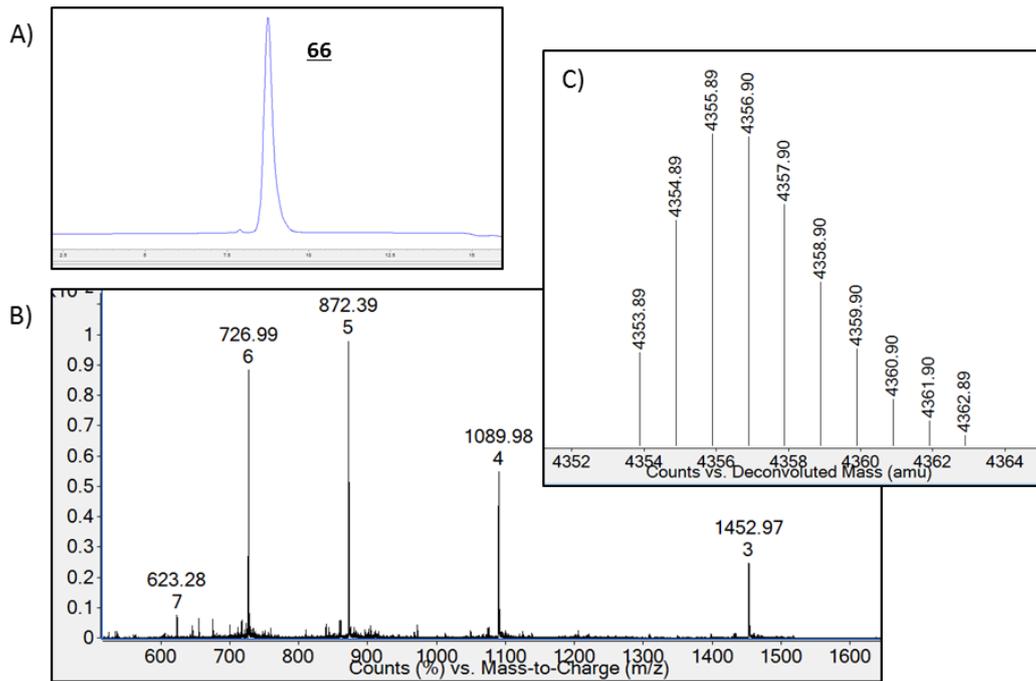


Figure 103 : Analyses RP-HPLC et HRMS de l'HaTx1(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) **66**. A) Analyse RP-HPLC de **66** purifiée ($t_R = 8,8$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **66** purifiée. Le nombre indiqué en-dessous du m/z correspond à l'état de charge. C) Déconvolution de l'analyse HRMS B. M_{mono} calculée : 4353,87 Da ; observée : 4353,89 Da.

Le dernier pont a alors été formé après avoir enlevé les groupements protecteurs Mob avec du TFMSA. 48 heures dans un tampon oxydant acide ont été nécessaires pour former totalement ce pont. La purification du milieu réactionnel a été complexifiée par la propriété de la toxine à former deux pics une fois totalement repliée, augmentant ainsi les chances qu'un des deux pics co-élue avec des impuretés minoritaires du milieu. Deux purifications successives ont donc été requises pour obtenir l'HaTx1 repliée **67** avec un rendement de 4 % déterminé par dosage du produit final à 280 nm (Figure 104). En utilisant la colonne et le gradient de routine, et en menant l'analyse RP-HPLC à 50°C, l'HaTx1 a été obtenue sous forme d'un pic comportant un épaulement plutôt que deux pics.

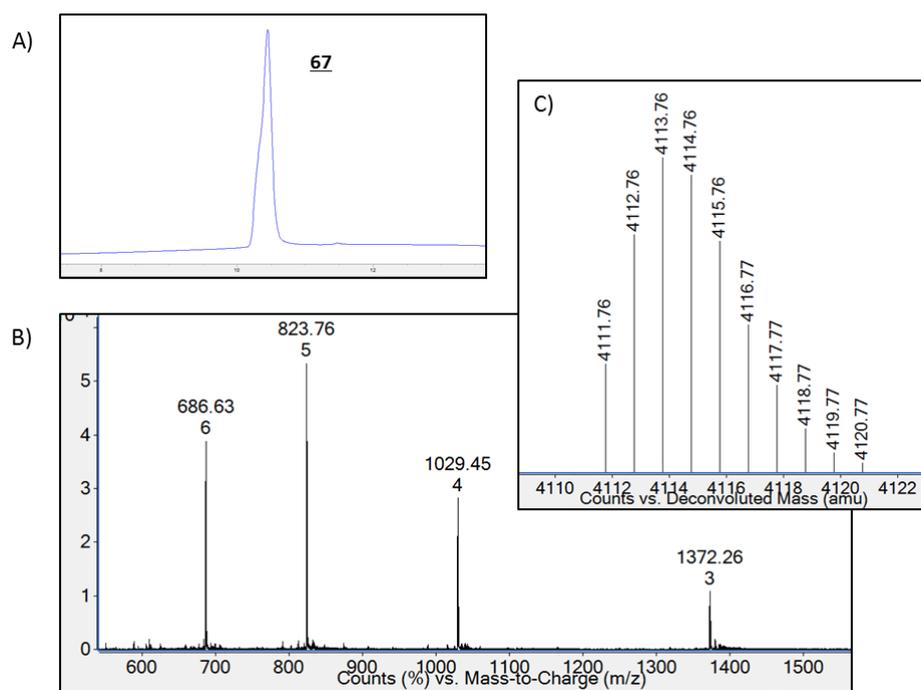


Figure 104 : Analyses RP-HPLC et HRMS de l'HaTx1 repliée **67**. A) Analyse RP-HPLC de **67** purifiée ($t_R = 10,4$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 1-65 % B en 12 min). B) Analyse HRMS de **67** purifiée. Le nombre indiqué en-dessous du m/z correspond à l'état de charge. C) Déconvolution de l'analyse HRMS B. M_{mono} calculée : 4111,74 Da ; observée : 4111,76 Da.

Ainsi, l'HaTx1 a été obtenue avec un rendement total de 1 % en prenant en compte la synthèse par SPPS. Cette stratégie de repliement régiosélectif nous a ainsi donné l'accès à l'HaTx1 native synthétique, ce qui n'a pas été faisable par une stratégie de repliement oxydatif direct.

D. Utilisation du groupement protecteur Hmb^{off/on}

Plusieurs difficultés pouvant être rencontrées avec la stratégie Trt/Acm/Mob ont été illustrées avec les exemples décrits ci-dessus. Comme nous l'avons vu, le groupement protecteur Acm est particulièrement contraignant vis-à-vis de son positionnement dans une séquence donnée, et limite donc le choix dans l'ordre de formation des ponts disulfures. En effet, lorsque les réactions de formation du premier et deuxième pont sont réalisées successivement au cours d'une même étape, le deuxième pont sera forcément formé à partir des cystéines portant les groupements Acm. De plus, la formation d'un pont disulfure à partir d'une paire de résidus Cys(Acm) avec du diiode doit être réalisée avec précautions pour éviter les réactions secondaires associées à l'utilisation de ce réactif. En ce qui concerne le groupement protecteur Mob, sa déprotection est généralement réalisée dans un milieu fortement concentré en TFA. Il est donc quasiment impossible d'imaginer la formation de deux ponts régiosélectivement en une seule réaction avec ce groupement protecteur, le rendant donc moins flexible dans son utilisation que le groupement Acm par exemple.

Afin de diversifier les jeux de groupements protecteurs pouvant être utilisés pour le repliement dirigé de ponts disulfures, nous avons voulu introduire l'utilisation d'un nouveau groupement protecteur de la cystéine. Celui-ci devait être résistant aux conditions de synthèse par SPPS en stratégie Fmoc, mais également au TFA utilisé pour la séparation finale de la résine et la déprotection du peptide. De plus, il devait être orthogonal à nos groupements protecteurs de référence AcM et Mob pour pouvoir être combiné avec ceux-ci. Pour finir, l'objectif était de trouver un groupement protecteur pouvant être ôté dans des conditions classiquement utilisées dans la chimie des peptides et suffisamment douces pour ne pas dégrader les peptides.

Au cours de recherches bibliographiques sur la NCL, la description d'un nouveau groupement protecteur de la cystéine a attiré notre attention.²⁹⁷ Ce groupement protecteur est un dérivé du *N*-(2-hydroxy-4-méthoxy benzyle) (Hmb) utilisé initialement pour la modification de squelettes peptidiques. Ce groupement, sensible au TFA, est à l'origine utilisé pour la synthèse de séquences difficiles à obtenir par SPPS.²⁹⁸ Il empêche en effet l'agrégation des chaînes peptidiques entre elles au cours de la SPPS, et facilite donc leur élongation. Par la suite, sa fonction alcool libre a été dérivé par un groupe *N*-méthyl-*N*-[2-(méthylamino)-éthyl]carbamoyle, ce qui permet de le rendre initialement résistant au TFA pour l'application d'un principe *safety-catch*.²⁹⁹ En gardant ce dérivé de Hmb sur le squelette peptidique après synthèse par SPPS, celui-ci rend les peptides hydrophobes et ayant tendance à s'agréger plus facilement manipulables. Un traitement du peptide à pH neutre ou basique provoque une cyclisation spontanée du groupement *N*-méthyl-*N*-[2-(méthylamino)-éthyl]carbamoyle et son élimination. Le groupement Hmb peut alors être éliminé par simple traitement avec du TFA. Pour aller plus loin, il a également été montré que le groupement méthoxy du Hmb pouvait être modifié avec un tag solubilisant de type poly-arginines pour rendre les peptides portant ce groupement encore plus solubles.³⁰⁰ Les auteurs de ce dernier article ont par la suite adapté le Hmb modifié avec le groupe *N*-méthyl-*N*-[2-(méthylamino)-éthyl]carbamoyle, alors appelé Hmb^{off/on}, pour la protection de cystéines intrachaînes. Ceci permet l'élaboration de stratégies de synthèses par NCL et désulfuration (Figure 105).²⁹⁷ Les cystéines initialement introduites par SPPS avec le groupement Hmb^{off}, c'est-à-dire portant le groupe *N*-méthyl-*N*-[2-(méthylamino)-éthyl]carbamoyle, sont converties en Cys(Hmb^{on}) lors de la NCL à pH neutre. Celles-ci sont alors résistantes aux conditions utilisées pour la désulfuration d'une alanine mutée en cystéine pour les besoins de la ligation. Après la désulfuration, un traitement avec du TFA permet de déprotéger les cystéines natives.

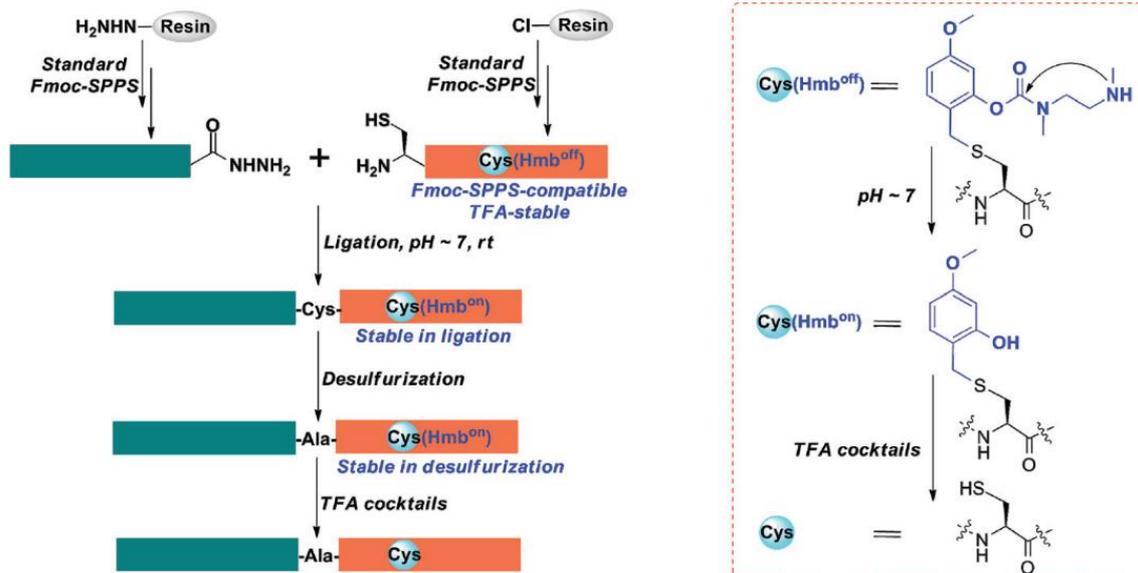
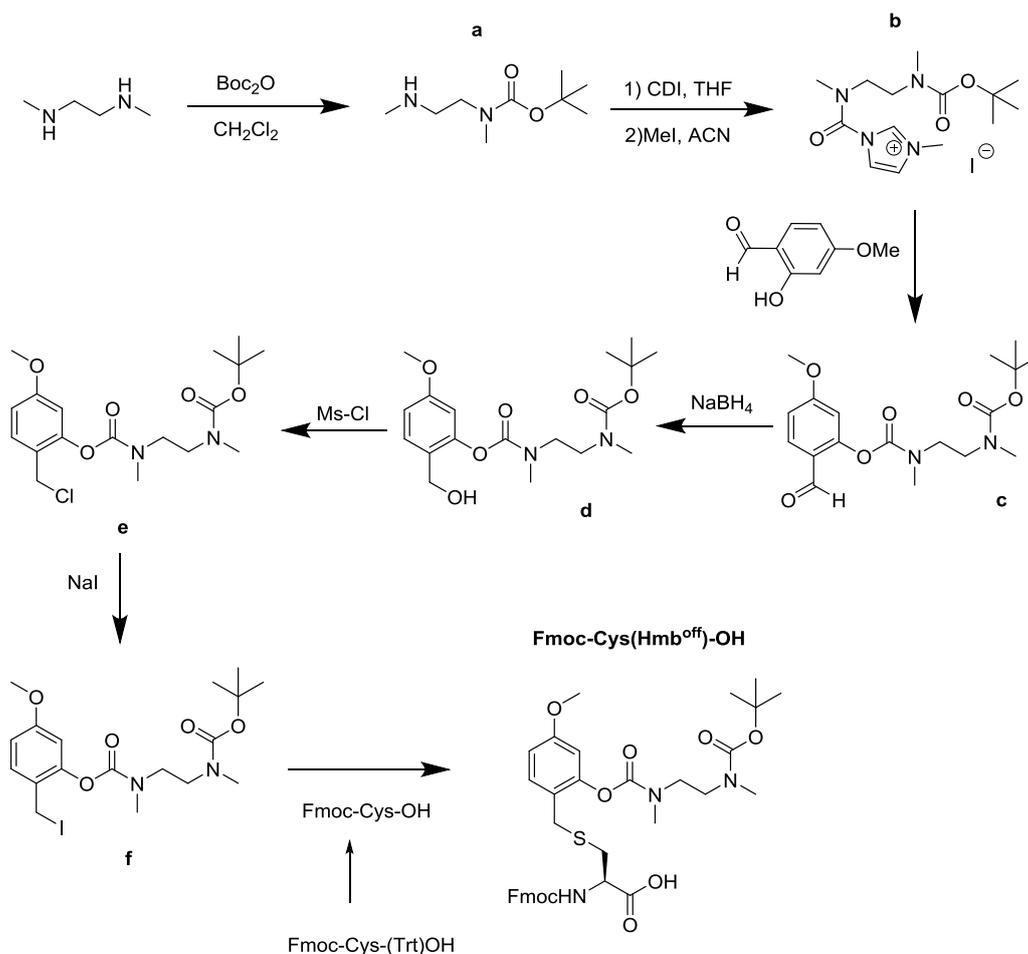


Figure 105 : principe général du groupement Hmb^{off/on} dans le cas d'une stratégie de ligation-désulfuration.²⁹⁷

Dans le cadre de notre recherche d'un nouveau groupement protecteur de la cystéine pour le repliement régiosélectif, cette cystéine Cys(Hmb^{off/on}) semblait répondre à plusieurs des critères exposés ci-dessus. En effet, le groupement Hmb^{off} est résistant au TFA, et reste donc sur les cystéines après séparation de la résine et déprotection du peptide. Il peut donc être combiné avec les groupements Trt pour une stratégie Trt/Hmb^{off/on} adaptée aux toxines à deux ponts. De plus, une fois converti en Hmb^{on}, ce groupement est ôté par traitement avec du TFA, conditions déjà classiquement utilisées lors des synthèses par SPPS, et donc connues pour ne pas être particulièrement dégradantes pour les peptides. Il restait donc à évaluer l'orthogonalité de cette protection avec les groupements Acn et Mob, pour pouvoir établir une stratégie de repliement dirigé de trois ponts disulfures Trt/Hmb^{off/on}/Acn ou Trt/Hmb^{off/on}/Mob. Pour cela, la synthèse organique de la cystéine Fmoc-Cys(Hmb^{off})-OH a été réalisée au sein du plateau « Synthèse organique » du département de chimie moléculaire de l'Université de Grenoble. Bien que les dernières étapes de la synthèse de ce composé soient décrites dans l'article de Liu *et coll.*, la synthèse d'un des précurseurs n'est pas expliquée. La stratégie de synthèse de ce précurseur a donc été déterminée par nos soins (Figure 106). En bref, une des amines de la *N,N'*-diméthyléthylènediamine a été protégée par un groupement Boc par traitement avec un défaut de dicarbonate de di-*tert*-butyle, puis la seconde amine a été activée sous forme de carbamide portant un iodure d'imidazolium (**b**). Ceci permet ainsi la formation du carbamate **c** par réaction avec la fonction alcool du 4-méthoxy-2-hydroxybenzaldéhyde.³⁰¹ Cette stratégie a été choisie comme alternative à l'utilisation de la diamine **a** activée par un chlorure d'acyle, comme décrit dans la publication de Liu *et coll.*, nécessitant généralement du phosgène pour générer cette espèce.³⁰² Par la suite, l'aldéhyde a été réduit en l'alcool primaire **d** par traitement avec du borohydrure de sodium, puis celui-ci a été activé sous la forme de l'iodure **f** par réaction avec du chlorure de mésyle puis de l'iodure de sodium. Enfin, ce composé a été mis en réaction avec de la Fmoc-Cys-OH pour donner la Fmoc-Cys(Hmb^{off})-OH recherchée.

Figure 106 : stratégie de synthèse de la Fmoc-Cys(Hmb^{off})-OH

Avec ce composé en main, nous avons pu réaliser différentes études dans le cadre de la formation régiosélective de ponts disulfures. Tout d'abord, nous avons démontré son utilité pour la formation dirigée de deux ponts disulfures avec une stratégie Trt/Hmb^{off/on}. Par la suite, nous avons mené les études concernant son orthogonalité avec les groupements protecteurs Acn et Mob, aussi bien sous sa forme *off* que *on*. Pour finir, son utilité pour le repliement régiosélectif d'une toxine à trois ponts a été démontrée.

1. Mise au point de la stratégie Trt/Hmb^{off/on}

Afin d'établir la faisabilité de la stratégie Trt/Hmb^{off/on}, nous avons repris l'exemple de la NMB-1. Nous avons de plus choisi de garder le même ordre de formation des deux ponts disulfures. Les cystéines C1 et C4 ont ainsi été protégées avec des groupements Trt, tandis que les cystéines C2 et C3 ont été introduites lors de la synthèse par SPPS protégées avec des groupements Hmb^{off}. Après séparation de la résine et déprotection, les analyses par RP-HPLC et HRMS ont permis d'observer l'obtention de la NMB-1(SH_{1,4}; SHmb^{off}_{2,3}) **68**. Plusieurs autres composés, correspondants aux peptides acétylés avant et après les deux cystéines

Cys(Hmb^{off}), ont également été observés en quantités non négligeables. Cela laissait penser que l'introduction de ces deux cystéines et des acides aminés suivants respectifs posait problème lors de la SPPS, et que l'étape de *capping* réalisée après chaque couplage était responsable de l'acétylation. Cependant, la purification chromatographique finale de la Fmoc-Cys(Hmb^{off})-OH utilisée pour cette synthèse avait été réalisée en présence d'acide acétique. Ainsi, des traces de cet acide encore présentes pouvaient également être responsables de ces produits secondaires. Et en effet, la suppression de cette étape finale de purification, qui dégradait la Fmoc-Cys(Hmb^{off})-OH, a permis de résoudre ce problème lors des synthèses peptidiques réalisées pour les études suivantes. La NMB-1(SH_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) ayant tout de même été obtenue ici, et sachant qu'il s'agit d'une preuve de concept, la suite de l'étude a tout de même été réalisée avec cette toxine brute, malgré le fait que les rendements seraient affectés de manière négative. Une purification par RP-HPLC a ainsi permis d'obtenir la NMB-1(SH_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **68** avec un rendement de 7%. Il faut noter ici que la purification de la toxine brute a été réalisée à cause de la présence des produits indésirables et pour une interprétation claire des résultats. En pratique cependant, la formation du premier pont disulfure à partir d'une toxine présente majoritairement dans le brut de la synthèse par SPPS pourrait tout à fait être réalisée sans purification intermédiaire, comme cela a été fait précédemment.

La formation du premier pont a ensuite été initiée dans un tampon oxydatif basique contenant du Tris et du DMSO. La présence ou non de guanidine à une concentration dénaturante a également été évaluée à cette étape. Dans les deux cas, la formation du premier pont a été constatée après une nuit par analyses RP-HPLC et HRMS. En l'absence de guanidine cependant, l'oxydation de la paire de cystéines libres en cystine n'était pas totale, au contraire du milieu en contenant. De plus, l'oxydation ayant été conduite à pH basique, c'est avec satisfaction que nous avons pu constater la conversion totale des deux groupements Hmb^{off} en Hmb^{on}. Bien qu'ici la réaction ait été réalisée pendant une nuit, les auteurs de la publication d'origine décrivent une conversion de leur peptide modèle en seulement 5 heures. Après purification, la NMB-1(SS_{1,4} ; SHmb^{on}_{2,3}) **69** a été obtenue avec un rendement de 65 %, contre 56 % pour la réaction ne contenant pas de guanidine (Figure 107).

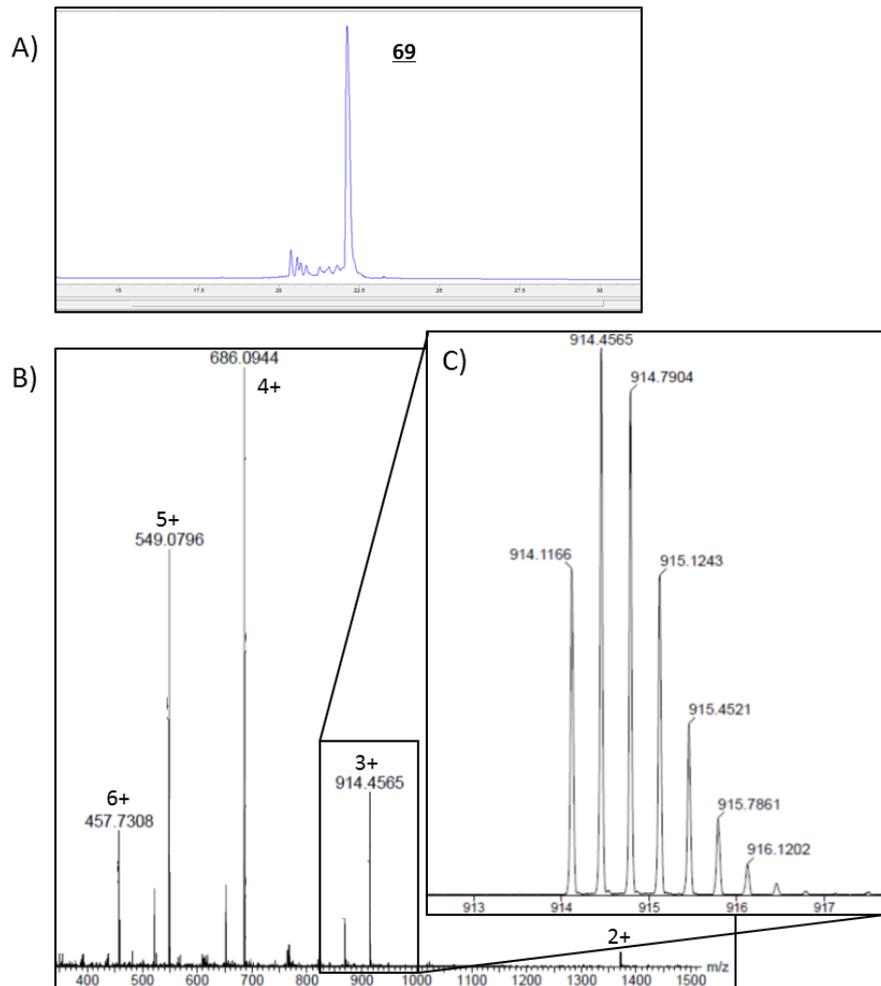


Figure 107 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la NMB-1(SS_{1,4} ; SHmb^{on}_{2,3}) **69**. A) Analyse RP-HPLC de **69** purifiée ($t_R = 22,0$ min, AdvanceBio Peptide C18 25 cm, 214 nm, 15-65 % B en 25 min). B) Analyse HRMS de **69** purifiée. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 3+ de **69** purifiée. M_{mono} calculée : 2739,30 Da ; observée : 2739,33 Da.

Par la suite, la déprotection des cystéines Cys(Hmb^{on}) a été entreprise dans les conditions décrites dans la littérature. La toxine lyophilisée a été directement solubilisée dans du TFA contenant du triisopropyl silane et de l'eau en tant que *scavengers* et agitée pendant 2 heures. La NMB-1(SS_{1,4} ; SH_{2,3}) a alors été récupérée sous forme solide par précipitation avec de l'éther diéthylique et centrifugation. Des analyses par RP-HPLC et HRMS ont effectivement montré la conversion des Cys(Hmb^{on}) en cystéines libres, mais également la présence minoritaire de deux produits aux masses correspondant à la NMB-1 portant un unique groupement protecteur Hmb^{on} (Figure 108A). Cela laissait penser que l'étape de déprotection n'était pas totale, et qu'un temps de réaction plus long aurait pu être bénéfique. Les deux pics correspondraient donc à la NMB-1 dont l'une ou l'autre des cystéines n'a pas été correctement déprotégée. Malgré tout, la formation du deuxième pont disulfure a été réalisée à partir de ce produit. Pour cela, la toxine a été placée dans un tampon oxydant acide contenant du DMSO et de la guanidine. Après une nuit et purification, trois espèces ont été isolées. De manière satisfaisante, la première, très majoritaire, était la NMB-1 repliée. Après analyse par HRMS, les deux autres s'avéraient être les dérivés de la NMB-1 portant un

groupement Hmb^{on} identifiés précédemment, avec cependant des masses moléculaires inférieures de 2 Da, typique de la formation d'un pont disulfure. L'hypothèse émise précédemment d'une mauvaise déprotection des cystéines semble donc erronée, puisqu'un pont disulfure entre ces cystéines a pu être formé. Une nouvelle hypothèse serait que les groupements Hmb^{on} ont effectivement été ôtés des chaînes latérales des cystéines, mais que ceux-ci aient par la suite réagi avec une autre chaîne latérale présente dans le peptide. Il semblerait donc que d'autres *scavengers* soient nécessaires à l'étape de déprotection des groupements Hmb^{on}, bien que ceci ne soit pas décrit dans l'article d'origine. Cette étape a donc été de nouveau réalisée à partir de la NMB-1(SS_{1,4} ; SHmb^{on}_{2,3}) **69** avec cette fois-ci le mélange classiquement utilisé pour la déprotection des peptides, contenant en plus du TFA, du triisopropyle silane et de l'eau, du 1,3-diméthoxybenzène et du 2,2'-(éthylènedioxy)diéthanethiol. Ceci a permis d'améliorer sensiblement la qualité de l'étape en question, sans pour autant supprimer totalement les produits secondaires observés. A partir de ce produit, la NMB-1 repliée **51** a été isolée avec un rendement de 41 % (Figure 108). Ainsi, avec la stratégie Trt/Hmb^{off/on}, cette toxine a pu être obtenue avec un rendement de 27 % sur les étapes de formation des deux ponts disulfures et de déprotection des cystéines Cys(Hmb^{on}). Ce rendement, affecté par la mauvaise neutralisation des groupements Hmb^{on} lors de l'étape de déprotection, s'avère donc inférieur aux rendements d'environ 50% obtenus avec les stratégies Trt/Acm et Trt/Mob. L'étape de déprotection doit donc encore être améliorée pour supprimer totalement les produits secondaires formés.

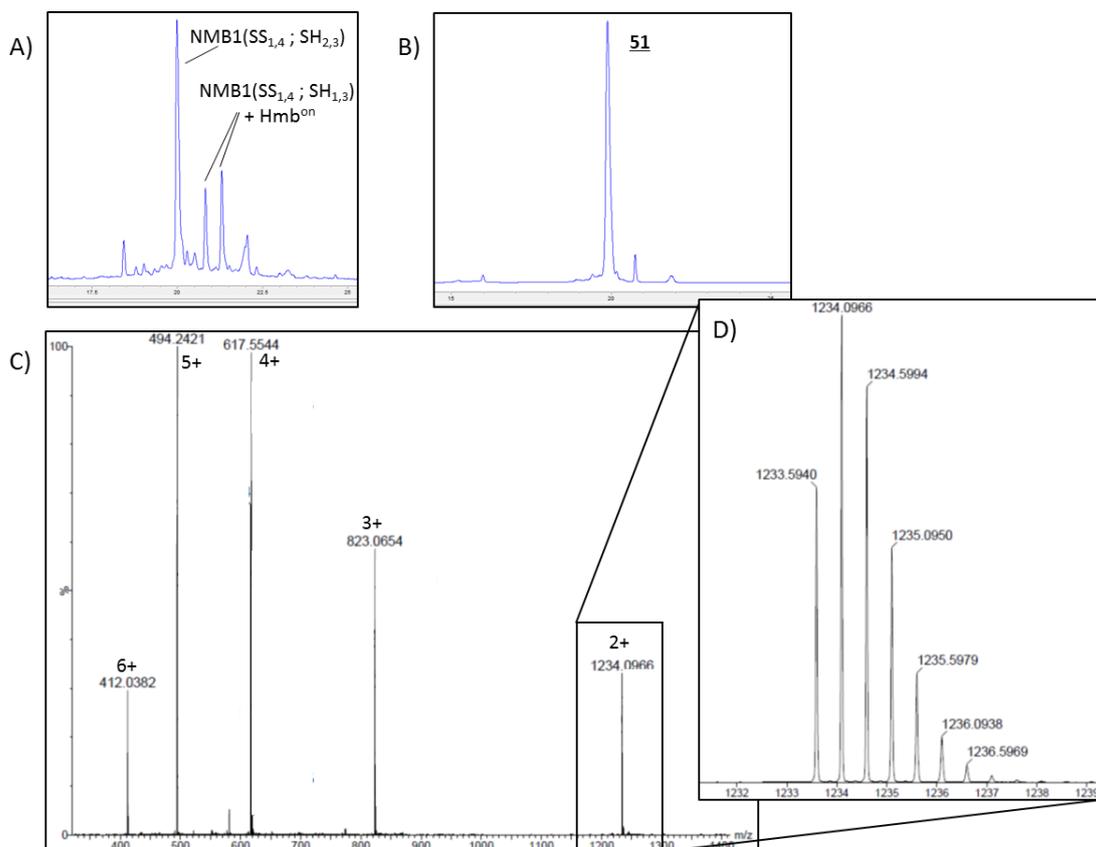


Figure 108 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la NMB-1(SS_{1,4} ; SH_{2,3}) et de la NMB-1 repliée **51**. A) Analyse RP-HPLC de la NMB-1(SS_{1,4} ; SH_{2,3}) après déprotection des Cys(Hmb^{on}). B) Analyse RP-HPLC de **51** purifiée ($t_R = 19,9$ min, AdvanceBio Peptide C18 25 cm, 214 nm, 15-65 % B en 25 min). C) Analyse HRMS de **51** purifiée. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. D) Zoom sur l'état de charge 2+ de **51** purifiée. M_{mono} calculée : 2465,17 Da ; observée : 2465,17 Da.

Afin d'optimiser cette stratégie et d'améliorer les rendements, des études préliminaires ont été réalisées pour évaluer la faisabilité d'une réaction *one-pot* pour la formation des deux ponts. La difficulté ici est que les groupements Hmb^{on} sont normalement ôtés dans du TFA concentré, alors que le peptide est dans une solution aqueuse à l'issue de la formation du premier pont. De plus, celle-ci implique une dilution importante de la toxine pour former des ponts intramoléculaires et non intermoléculaires, et donc un volume réactionnel important. Rajouter du TFA après la formation du premier pont pour atteindre un pourcentage suffisant à la déprotection ne semble pas faisable à grande échelle. Nous avons donc supposé qu'un acide plus fort que le TFA pourrait être employé à une concentration moins importante pour réaliser la déprotection des cystéines portant les groupements Hmb^{on}. Dans ce but, le TFMSA semblait être un bon candidat au vu de son efficacité pour ôter les groupements protecteurs Mob. Le premier pont de la NMB-1(SH_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) a donc été formé dans les mêmes conditions que précédemment, dans un tampon oxydant basique contenant du Tris, 20 %v/v de DMSO et de la guanidine, à une concentration en peptide de 0,1 mg/mL. Une fois le premier pont formé, plusieurs essais ont été réalisés en ajoutant du TFA et du TFMSA pour atteindre différentes concentrations : 1 %v/v, 10 %v/v ou 20 %v/v de TFA, et 1 %v/v ou 10 %v/v de TFMSA. Les réactions ont alors été agitées pendant 24 heures, et leurs avancements suivis par analyses HRMS. Après 24 heures, la réaction contenant 1 %v/v de TFA et 1 %v/v de TFMSA n'a que très peu avancé, si bien que le produit majoritairement présent est toujours la NMB-1(SS_{1,4} ; SHmb^{on}_{2,3}) (Figure 109A). La réaction contenant 10 %v/v de TFA et 1 %v/v de TFMSA a progressé davantage, bien que la NMB-1(SS_{1,4} ; SHmb^{on}_{2,3}) soit toujours majoritaire (Figure 109B). Les résultats les plus satisfaisants ont été obtenus avec les réactions contenant 10 ou 20 %v/v de TFA et 10 %v/v de TFMSA (Figure 109C et D). En effet, dans ces cas-là, la NMB-1 contenant deux ponts disulfures a été majoritairement obtenue. Cependant, de telles conditions ont provoqué l'oxydation d'une chaîne latérale, donnant un adduit de +16 Da en analyses HRMS. Malgré tout, ces résultats, encourageants, montrent qu'il est effectivement possible de déprotéger des cys(Hmb^{on}) directement après la formation du premier pont. Afin d'éliminer l'oxydation non désirée, ces essais devront être de nouveau réalisés en menant les réactions sous atmosphère inerte. Nous supposons ici que le DMSO permet d'améliorer la déprotection des groupements protecteurs Hmb^{on}, de la même manière qu'il permet de déprotéger des Cys(Mob) dans du TFA, sans TFMSA, et en formant le pont disulfure de manière concomitante.²⁴⁸

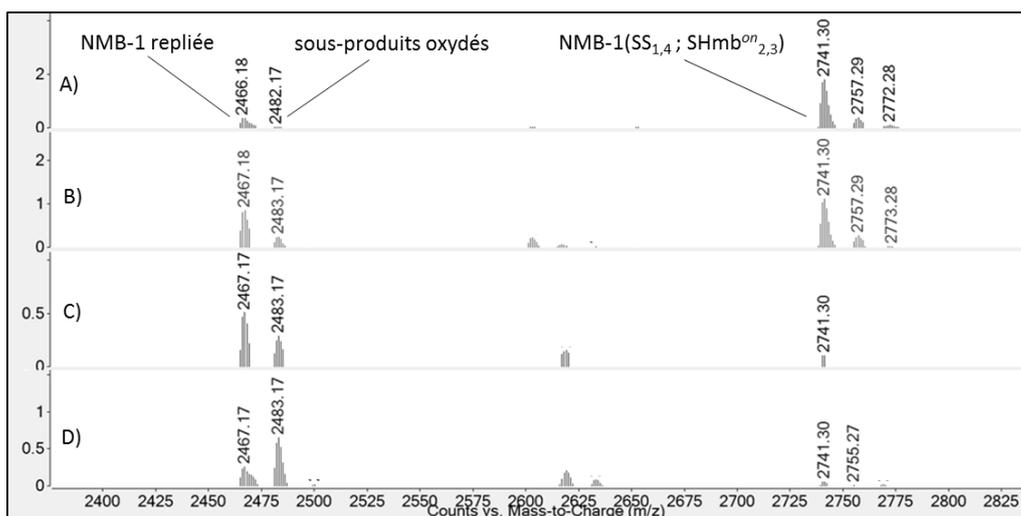


Figure 109 : Analyses HRMS des milieux réactionnels de déprotection des Cys(Hmb^{on}) après 24 h. Les tests A à D ont été réalisés à partir du tampon d'oxydation de la NMB-1(SH_{1,4}; SHmb^{off}_{2,3}) composé de 0,1 M de Tris à pH 8,2 avec 20 %v/v de DMSO et 2M de Gn.HCl. A) 1 %v/v de TFA et 1 %v/v de TFMSA. B) 10 %v/v de TFA et 1 %v/v de TFMSA. C) 10 %v/v de TFA et 10 %v/v de TFMSA. D) 20 %v/v de TFA et 10 %v/v de TFMSA.

2. Evaluation de l'orthogonalité du groupement Hmb^{off/on}

Afin d'évaluer l'orthogonalité du groupement Hmb^{off/on} avec les groupements protecteurs AcM et Mob, deux nouvelles synthèses de la NMB-1 ont été réalisées, la première combinant les groupements Hmb^{off} et AcM, et la seconde les groupements Hmb^{off} et Mob. Les NMB-1(SAcM_{1,4}; SHmb^{off}_{2,3}) **70** et NMB-1(SMob_{1,4}; SHmb^{off}_{2,3}) **71** ont ainsi été obtenues après purification par RP-HPLC. Dans le cas de la NMB-1(SAcM_{1,4}; SHmb^{off}_{2,3}), bien qu'une cystéine Cys(AcM) soit présente à l'extrémité C-terminale du peptide, aucune β -élimination du thiol protégé n'a été observée, probablement car un linker RAM a été introduit sur la résine avant synthèse par SPPS pour obtenir le peptide amidé. Dans un premier temps, la compatibilité des groupements Hmb^{off} avec les conditions de déprotection des cystéines Cys(AcM) a été testée. Pour cela, la NMB-1(SAcM_{1,4}; SHmb^{off}_{2,3}) a été dissoute dans un tampon acide contenant de l'acide citrique et de la guanidine, et la toxine a été traitée avec quatre ajouts successifs d'un équivalent de diiode, et la réaction a été suivie par HRMS. Après l'ajout du quatrième équivalent, c'est avec satisfaction que nous avons constaté la formation de la NMB-1(SS_{1,4}; SHmb^{off}_{2,3}) **72** désirée, sans déprotection apparente des cystéines Cys(Hmb^{off}) (Figure 110). Ainsi, un pont peut être formé à partir d'une paire de cystéines Cys(AcM) avec du diiode en présence des groupements Hmb^{off}. Pour aller plus loin, les mêmes conditions ont été appliquées en présence des groupements Hmb^{on}. La NMB-1(SAcM_{1,4}; SHmb^{off}_{2,3}) a donc été solubilisée dans un tampon basique et agitée pendant 30 minutes. Après avoir vérifié la conversion des Hmb^{off} en Hmb^{on}, la toxine a été diluée dans un tampon acide contenant de l'acide citrique et de la guanidine, et traitée comme précédemment avec quatre équivalents de diiode. Après analyses RP-HPLC et HRMS, nous avons constaté la formation des différents isomères de la NMB-1 à deux ponts disulfures. Ainsi, le groupement Hmb^{on} n'est pas orthogonal au groupement AcM dans ces conditions. Ces résultats sont tout de même intéressants puisqu'ils montrent que les groupements Hmb^{on} peuvent être ôtés dans ces

conditions, et qu'un pont peut donc être formé à partir d'une paire de cystéines Cys(Hmb^{on}) de manière concomitante avec leurs déprotections. Nous nous sommes également demandé si une paire de cystéines Cys(Hmb^{on}) pouvait être déprotégée et le pont correspondant formé en présence des groupements Acm. Cela implique de traiter la toxine portant ces différents groupements avec du TFA concentré, comme c'est le cas lors d'une stratégie Trt/Acm. Puisque les groupements Acm sont connus pour ne pas être labile au TFA, la compatibilité des groupements Acm avec les conditions de déprotection des groupements Hmb^{on} a été considérée comme acquise, si bien que ces conditions n'ont pas été de nouveau testées.

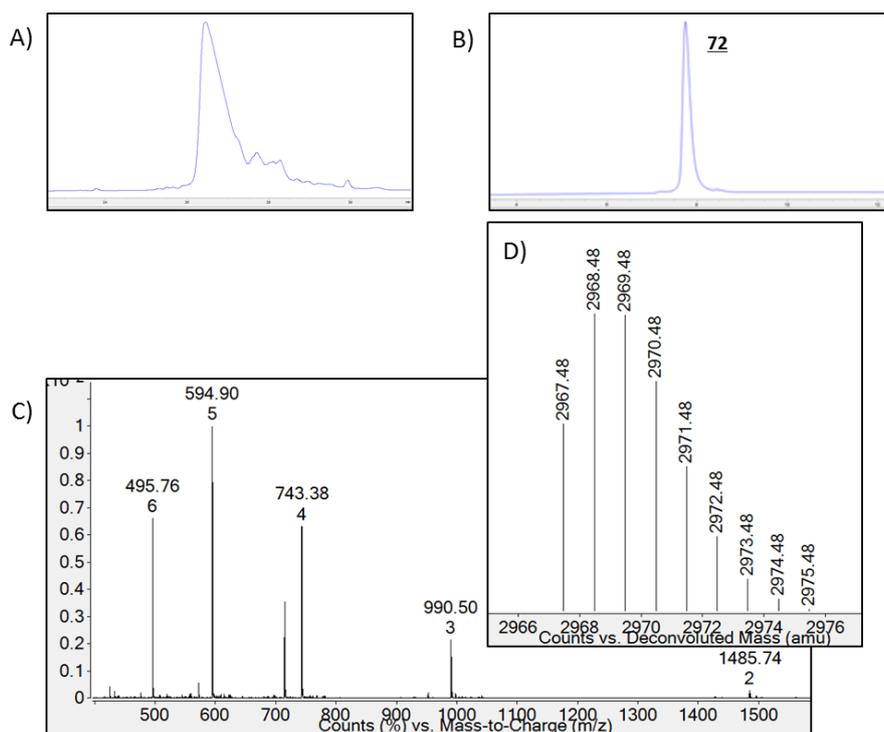


Figure 110 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la NMB-1(SS_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **72**. A) Purification par RP-HPLC semi-préparative de la NMB-1(SS_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **72**. B) Analyse RP-HPLC de **72** purifiée ($t_R = 7,7$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). C) Analyse HRMS de **72** purifiée. Le nombre indiqué en-dessous du m/z correspond à l'état de charge. D) Déconvolution de l'analyse HRMS C. M_{mono} calculée : 2967,45 Da ; observée : 2967,48 Da.

Enfin, la déprotection d'une paire de cystéines Cys(Mob) en présence des groupements Hmb^{off} a également été testé. Pour cela, la NMB-1(SMob_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) a été solubilisée dans du TFA contenant du phénol, et du TFMSA a été ajouté pour atteindre une concentration de 10 %v/v. Après 10 minutes à 0°C, le peptide a été précipité et lavé avec de l'éther diéthylique. Une analyse par HRMS a montré la formation de la NMB-1(SH_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) désirée, mais a également mis en évidence la présence minoritaire de la NMB-1 avec un ou deux groupements Hmb^{off} manquants. La toxine a ensuite été ajoutée à un tampon oxydant basique contenant de la guanidine et du DMSO. Après une nuit, un suivi de la réaction par analyses RP-HPLC et HRMS a permis de constater la formation de la NMB-1(SS_{1,4} ; SHmb^{on}_{2,3}) **69** désirée de manière majoritaire (Figure 111). La formation de la NMB-1 totalement repliée, qui témoigne ici aussi d'une certaine labilité des groupements Hmb^{off} en présence de TFMSA, a été observée en tant que produit minoritaire. Malgré tout, on peut affirmer que les groupements Hmb^{off} sont, dans une certaine mesure, orthogonaux aux groupements Mob dans les conditions de déprotection

utilisant du TFMSA. Afin de diminuer davantage la faible labilité des groupements Hmb^{off} dans ces conditions, il pourrait être intéressant de diminuer le temps de réaction, le pourcentage de TFMSA, ou de mener la réaction à moins de 0°C. La déprotection des Cys(Mob) en présence des groupements Hmb^{on} n'a pas été testée puisque les groupements Hmb^{on} sont décrits pour être sensible au TFA. De même, les groupements Mob sont connus pour ne pas être sensible au TFA seul, si bien que ceux-ci sont orthogonaux aux groupements Hmb^{on} dans les conditions de déprotection des cystéines Cys(Hmb^{on}).

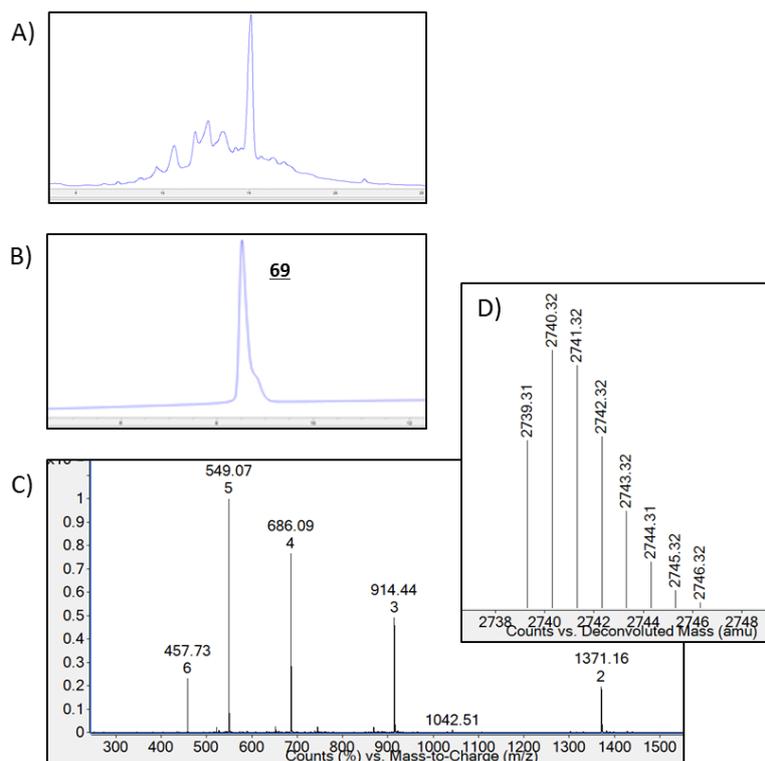


Figure 111 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la NMB-1(SS_{1,4} ; SHmb^{on}_{2,3}) **69**. A) Analyse par RP-HPLC du milieu réactionnel d'oxydation de la NMB-1(SH_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) obtenue par déprotection des Cys(Mob) après 24 h. B) Analyse RP-HPLC de **69** purifiée ($t_R = 8,5$ min, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min). C) Analyse HRMS de **69** purifiée. Le nombre indiqué en-dessous du m/z correspond à l'état de charge. D) Déconvolution de l'analyse HRMS C. M_{mono} calculée : 2739,30 Da ; observée : 2739,31 Da.

3. Mise au point des stratégies Trt/Hmb^{off/on}/Acm et Trt/Hmb^{off/on}/Mob

Au vu de ces résultats, il existe une certaine orthogonalité entre les groupements Hmb^{off/on} et Acm, et Hmb^{off/on} et Mob. Cela permet ainsi d'envisager des stratégies de repliement dirigé de trois ponts disulfures avec une combinaison ces groupements protecteurs. Nous avons alors décidé de reprendre l'exemple de la SGTx1 afin de mettre au point deux stratégies : Trt/Hmb^{off/on}/Acm et Trt/Hmb^{off/on}/Mob.

a) Stratégie Trt/Hmb^{off/on}/Acm

Pour cette étude, la synthèse de la SGTx1 a été réalisée avec une paire de cystéines portant des groupements Hmb^{off/on} et une paire de cystéines portant des groupements Acm. Après purification, la SGTx1(SH_{1,4}; SAcm_{2,5}; SHmb^{off}_{3,6}) **73** a été isolée avec un rendement de 13 %. Après formation du premier pont dans les conditions basiques oxydantes classiquement utilisées, la déprotection des cystéines Cys(Hmb^{on}) de la SGTx1(SS_{1,4}; SAcm_{2,5}; SHmb^{on}_{3,6}) **74** a été entreprise. Pour cela, le peptide a été dissous dans un mélange contenant du TFA, du triisopropyle silane, de l'eau, du 1,3-diméthoxybenzène et du 2,2'-(éthylènedioxy)diéthanethiol et agité pendant 3 heures avant précipitation avec de l'éther diéthylique. L'analyse par HRMS du produit obtenu a montré la déprotection totale des groupements Hmb^{on}, mais également un produit ayant une masse supérieure de 138 Da, cohérente avec la formation d'un adduit de 1,3-diméthoxybenzène. Ce type d'adduits a été régulièrement rencontré au laboratoire sur différents peptides et toxines bruts obtenus après SPPS. Le point commun de ces produits est la présence de tryptophanes dans leurs séquences. Des analyses par MS/MS sur différents peptides ont par la suite confirmé que l'adduit se formait effectivement sur les tryptophanes. Ce type de réactions secondaires sur les tryptophanes a été plusieurs fois décrit dans la littérature, à l'image de l'adduit formé avec le *linker* de la résine Wang.³⁰³ Dans notre cas, la différence de masse observée serait cohérente avec une réduction simultanée de l'indole en indoline, certainement à cause du triisopropylsilane.^{304,153} Malgré tout, le produit a par la suite été ajouté à un tampon oxydant acide contenant du DMSO et de la guanidine. Un suivi par analyse HRMS a révélé la formation du produit recherché contenant deux ponts, mais de manière minoritaire. En effet, plusieurs produits indésirables ont majoritairement été formés, correspondant à la SGTx1 contenant 3 ponts disulfures et au produit contenant 1 pont disulfure et un unique groupement Acm. Il semblerait donc, dans le cas de la SGTx1, que les groupements Acm soient partiellement ôtés des cystéines durant le repliement oxydatif en conditions acides. Cette stratégie Trt/Hmb^{off/on}/Acm étant problématique, nous avons décidé de nous orienter principalement sur la seconde stratégie utilisant les groupements protecteurs Mob.

b) Stratégie Trt/Hmb^{off/on}/Mob

La stratégie Trt/Hmb^{off/on}/Mob a été évaluée en synthétisant la SGTx1 contenant une paire de cystéines Cys(Hmb^{off}) et une paire de cystéines Cys(Mob). Après séparation de la résine de la SGTx1(SH_{1,4}; SHmb^{off}_{2,5}; SMob_{3,6}) **75**, les analyses par RP-HPLC et HRMS ont révélé une qualité de synthèse meilleure que la stratégie précédente, si bien qu'une purification du peptide brut n'a pas été jugée nécessaire. Le premier pont a donc directement été formé dans un tampon basique oxydant pour donner la SGTx1(SS_{1,4}; SHmb^{on}_{2,5}; SMob_{3,6}) **76**. A cette étape, une précipitation de la toxine a été observée, certainement due à la présence des groupements Hmb et Mob sur la chaîne peptidique. L'ajout d'un co-solvant organique semble donc nécessaire. Malgré tout, les cystéines Cys(Hmb^{on}) ont par la suite été déprotégées avec du TFA contenant du triisopropyle silane, de l'eau et du 2,2'-(éthylènedioxy)diéthanethiol,

cette fois-ci sans 1,3-diméthoxybenzène pour éviter les adduits observés précédemment. La qualité de la déprotection, évaluée par RP-HPLC et HRMS, a effectivement été nettement améliorée par rapport à la stratégie précédente. Le produit a été ajouté à un tampon oxydant acide contenant de la guanidine. Après 24 heures, la formation du second pont disulfure n'était pas complète. Après 48 heures, la formation du pont semblait complète, mais l'analyse par HRMS du milieu a également révélé la formation non négligeable de la toxine contenant trois ponts disulfures, qui n'a pas été observée après 24 heures de réaction. Il semblerait donc que pour la SGTx1, les groupements protecteurs Mob soient sensibles aux conditions oxydantes acides utilisées pour la formation du second pont disulfure. Ce phénomène, également observé dans le cas de la SGTx1 avec la stratégie Trt/Acm/Mob lors de la formation du second pont avec du diode, semble témoigner d'une catalyse de la formation du troisième pont disulfure propre à la séquence peptidique de cette toxine. Malgré tout, la SGTx1(SS_{1,4}; SS_{2,5}; SMob_{3,6}) **77** a pu être obtenue en tant que produit majoritaire et isolé, bien qu'en quantités trop faibles pour déterminer un rendement (Figure 112).

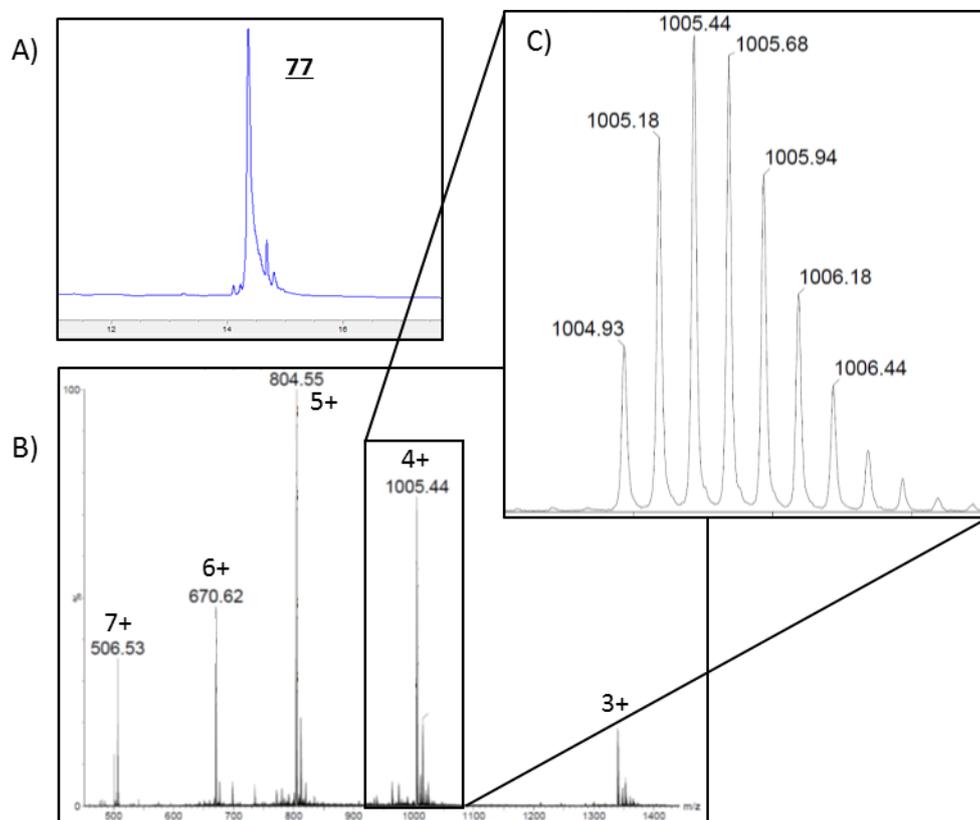


Figure 112 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la SGTx1(SS_{1,4}; SS_{2,5}; SMob_{3,6}) **77**. A) Analyse RP-HPLC de **77** purifiée ($t_R = 14,1$ min, XSelect Peptide CSH C18, 214 nm, 5-60 % B en 20 min). B) Analyse HRMS de **77** purifiée. Le nombre indiqué au-dessus du m/z correspond à l'état de charge. C) Zoom sur l'état de charge 4+ de **77** purifiée. M_{mono} calculée : 4015,71 Da ; observée : 4015,69 Da.

Pour finir, les cystéines Cys(Mob) ont été déprotégées avec du TFMSA, et le dernier pont formé dans un tampon oxydant acide contenant de la guanidine. Après 24 heures, la purification du milieu réactionnel a permis d'isoler la SGTx1 repliée **56**. Une comparaison des temps de rétention a permis de montrer l'obtention de la même toxine que celle obtenue

avec la stratégie Trt/Acm/Mob, montrant ainsi qu'une toxine à trois ponts peut être obtenue par repliement régiosélectif avec la stratégie Trt/Hmb^{off/on}/Mob. De manière intéressante, le produit secondaire contenant trois ponts disulfures obtenu à l'étape précédente possède un temps de rétention différent de la SGTx1 obtenue ici, ce qui laisse penser que ce produit secondaire ne possède pas la bonne configuration de ponts disulfures.

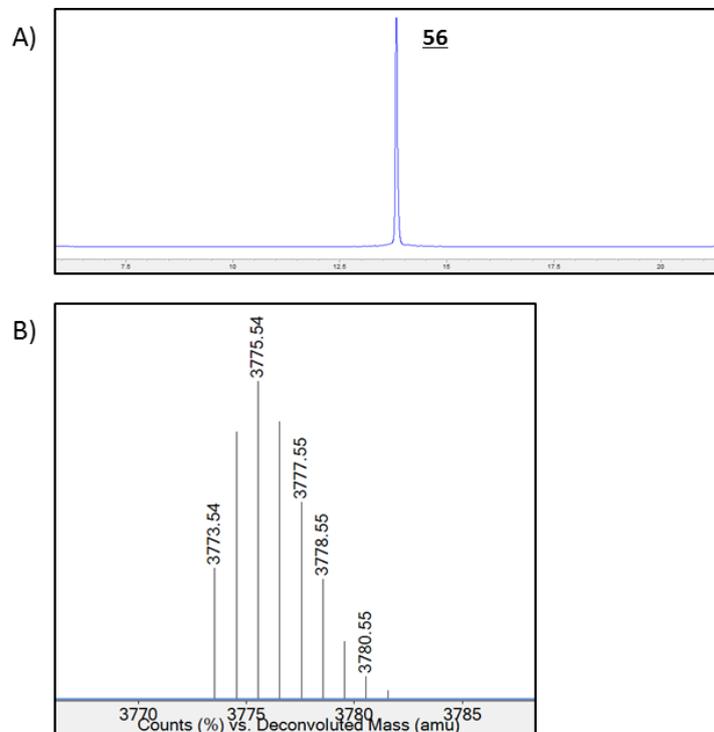


Figure 113 : Analyses RP-HPLC et HRMS de la SGTx1 repliée **56** obtenue avec la stratégie Trt/Hmb^{off/on}/Mob. A) Analyse RP-HPLC de **56** purifiée ($t_R = 13,8$ min, XSelect Peptide CSH C18, 214 nm, 5-60 % B en 20 min). B) Déconvolution de l'analyse HRMS de **56** purifiée. M_{mono} calculée : 3773,58 Da ; observée : 3773,54 Da.

Ainsi, l'utilisation du groupement protecteur Hmb^{off/on} dans le cadre du repliement régiosélectif de toxines semble prometteur. Sa pertinence pour ce type de repliement en combinaison avec les groupements protecteurs Acm et Mob mérite cependant d'être exploré plus en profondeur. Les stratégies Trt/Hmb^{off/on}/Acm et Trt/Hmb^{off/on}/Mob devront donc être éprouvées sur l'exemple de nouvelles toxines, et leurs efficacités comparées à celle des stratégies déjà décrites dans la littérature.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ces travaux de recherches était la mise au point de la synthèse de peptides et de toxines complexes. Plusieurs difficultés avaient en effet été identifiées pour certains composés. La première limitation correspondait à la longueur de certains peptides et toxines, trop importante pour pouvoir obtenir les séquences entières par synthèse sur support solide. La seconde limitation était liée à la difficulté de synthèse de différents peptides, dont les séquences sont pourtant de longueurs raisonnables. Pour ces molécules, la problématique provient de la tendance des chaînes peptidiques à s'agréger entre elles et/ou avec le support au cours de la synthèse par SPPS.

Pour répondre à ces deux limitations, nous nous sommes intéressés à la ligation par NCL. Cette méthode permet de former régiosélectivement un lien amide entre deux fragments peptidiques. Cette technique s'appuyant sur une cystéine au point de ligation, elle est particulièrement adaptée à l'obtention de toxines, naturellement riches en cystéines. Dans le cas de peptides difficiles à obtenir par synthèse SPPS, la NCL permet d'assembler des fragments plus courts obtenus sans les problèmes d'agrégation. Ceci a par exemple été réalisé avec l'AmmTx3, dont la synthèse a montré certaines difficultés. Sa séquence native a ainsi pu être obtenue par la ligation de deux fragments facilement synthétisés. Son repliement oxydatif direct a par la suite donné la structure naturelle de la toxine, comme cela a été vérifié par détermination structurale par RMN. L'AmmTx3 présentait de plus une activité identique à celle décrite dans la littérature. Cette méthode de ligation peut également être appliquée dans le cas de peptides et toxines longs pour obtenir leurs séquences entières, en réalisant une ou plusieurs ligations. Cette stratégie de synthèse a été appliquée avec succès à l' α -Bungarotoxine, toxine de serpent présentant un intérêt dans la caractérisation des récepteurs nAChRs, à partir de trois fragments. De manière étonnante, la ligation des deux premiers fragments dans la direction *N*-terminale vers *C*-terminale a conduit à une séquence peptidique ayant tendance à se dégrader par hydrolyse. En revanche, la séquence native de cette toxine a pu être obtenue lorsque les ligations ont été réalisées de l'extrémité *C*-terminale vers l'extrémité *N*-terminale. Cette stratégie a également permis de mettre en œuvre une méthode récemment décrite de déprotection d'une cystéine portant un groupement Acm. Le repliement oxydatif direct de la toxine a finalement permis d'obtenir la structure tridimensionnelle native voulue. De plus, une modification de son extrémité *N*-terminale avec une fonction alcyne a permis, après repliement, son marquage régiosélectif avec un fluorophore par une réaction de CuAAC. Comparée à la toxine obtenue par expression recombinante, dont le marquage proposé commercialement n'est pas régiosélectif et donc multiple, cette stratégie de synthèse devrait permettre une meilleure affinité de l' α -Bungarotoxine modifiée pour ses récepteurs. Différents tests biologiques sont donc en cours pour montrer la pertinence d'une telle stratégie de synthèse.

Par la suite, la maîtrise de cette technique a été appliquée à la production de deux autres toxines : l'U1-Cyrtautoxine-As1c et la Notexine. Ces deux toxines, issue respectivement d'un venin d'araignée et de serpent, constituaient un défi au vu de leurs tailles conséquentes. La structure native de l'U1-Cyrtautoxine-As1c a été obtenue par deux ligations successives et repliement oxydatif direct. La séquence linéaire de la Notexine a également été obtenue par

deux ligations successives, après optimisation des points de ligation. Son repliement oxydatif a cependant mis en évidence certaines difficultés, puisque la toxine semble s'agréger au cours de la formation des ponts disulfures. Cette étape nécessite donc encore certaines optimisations pour obtenir la structure naturelle de la toxine avec des rendements corrects.

Le domaine d'application de la NCL ne se limitant pas aux toxines, nous avons tiré profit d'une méthode de désulfuration radicalaire pour pouvoir synthétiser différents peptides longs ne contenant pas de cystéine. La progastrine, peptide de 80 acides aminés, a ainsi été synthétisée à partir de trois fragments peptidiques, en mutant temporairement deux alanines en cystéines. La séquence native du peptide a été obtenue en réalisant la désulfuration simultanée des deux cystéines pour récupérer les alanines natives. Cette technique de désulfuration étant particulièrement efficace, nous l'avons par la suite appliquée à la synthèse d'un fragment d'immunoglobuline E de 115 acides aminés. Bien que sa séquence contienne trois cystéines, la nécessité de former sélectivement un pont disulfure a imposé leur protection par des groupements protecteurs orthogonaux, empêchant donc leur exploitation en tant que points de ligations. Pour cela, trois alanines ont été mutées en cystéines pour permettre l'obtention de la séquence recherchée par trois ligations successives. Par la suite, les cystéines libres ont été simultanément désulfurées pour obtenir la séquence voulue. Malheureusement, une modification de l'extrémité C-terminale du peptide avec un azoture a perturbé le bon déroulement de cette stratégie de synthèse. En effet, cette fonction s'avère peu stable dans les conditions de ligation et de désulfuration employées et se réduit en amine. Malgré tout, nous avons pu montrer que sans cette modification, le fragment d'immunoglobuline E recherché aurait pu être obtenu par plusieurs ligations.

Les différentes techniques employées au cours de ces travaux, dont la NCL et la désulfuration, mais également l'utilisation de protections orthogonales des cystéines pour des stratégies plus complexes, n'avaient encore jamais été utilisées à Smartox Biotechnology avant ces recherches. Celles-ci sont désormais couramment mises en œuvre lorsque des projets de production le nécessitent. L'ensemble des résultats obtenus ont ainsi permis l'acquisition d'un savoir-faire solide dans le domaine de la synthèse de peptides longs et difficiles à synthétiser par SPPS, dont bénéficie tout autant le Département de Chimie Moléculaire que l'entreprise.

Au cours de ces travaux de recherche, une autre problématique a été abordée. Celle-ci provenait de la difficulté à obtenir certaines toxines dans leurs configurations natives par repliement oxydatif direct. En effet, ce dernier conduisait soit à des mélanges complexes d'espèces à différents stades d'oxydation et ayant des appariements de cystéines corrects ou non, soit à la formation majoritaire d'une espèce ne présentant pas la configuration de ponts disulfures recherchée. Dans ces cas-là, nous nous sommes tournés vers la formation dirigée de ponts disulfures. Cette méthode consiste à former régiosélectivement chaque pont de manière successive en exploitant différents groupements orthogonaux de la cystéine. En particulier, nous nous sommes intéressés à la combinaison des groupements protecteurs Trt, AcM et Mob. Dans un premier temps, les stratégies Trt/AcM et Trt/Mob ont été éprouvées sur l'exemple de la NMB-1, un analogue de conotoxine contenant deux ponts disulfures. Parmi les

résultats intéressants obtenus au cours de ce développement, on peut citer la mise au point de la formation successive de deux ponts disulfures au cours d'une réaction dite *one-pot*, permettant d'augmenter sensiblement les rendements d'obtention de la NMB-1. Par la suite, la stratégie Trt/Acm/Mob a été évaluée sur les exemples de la SGTx1 et de la Phlotoxine-1. Ces deux toxines d'araignées n'ont pas pu être obtenues par repliement oxydatif direct avec des rendements satisfaisants, et constituaient donc des supports adaptés à la mise au point de cette stratégie. La formation des deux premiers ponts de la SGTx1 à l'aide de la réaction *one-pot* mise au point précédemment, plutôt qu'avec les mêmes réactions réalisées séparément, a montré une nette amélioration des rendements. De même, les deux premiers ponts de la Phlotoxine-1 formés avec cette méthode ont été obtenus avec des rendements plutôt satisfaisants pour ce type de repliements. Le dernier pont de chaque toxine a enfin été formé à partir d'une paire de cystéines portant des groupements protecteurs Mob, après avoir ôté ces derniers. Ainsi, cette stratégie de repliement régiosélectif a permis l'obtention de ces deux toxines, là où le repliement oxydatif direct n'avait pas donné de résultats satisfaisants. Ce développement a par la suite été appliqué à la production de plusieurs toxines, dont la δ -theraphotoxine-Hm1a et l'Hanatoxine-1, également très difficiles à obtenir par repliement direct.

Malgré ces succès, la formation régiosélective de ponts disulfures reste un processus laborieux et chronophage, et se solde bien souvent, dans le cas des toxines contenant trois ponts disulfures, par des rendements relativement faibles. Pour ces raisons, cette méthode est à réserver aux toxines et peptides ne pouvant être obtenus par repliement oxydatif direct. Parmi les difficultés rencontrées au cours de ces travaux, nous avons pu constater que la formation du dernier pont disulfure est souvent la plus problématique, et constitue donc l'étape clé pour obtenir de bons rendements. Une des hypothèses avancées pour expliquer cette difficulté est l'obtention de différents isomères topologiques, qui présentent la configuration de ponts disulfures correcte mais qui, dans certains cas, restent bloqués dans une conformation non-native. Ce phénomène a par exemple déjà été observé dans le cas du repliement régiosélectif de l'enterotoxine STa.²⁶⁴ L'ordre d'enchaînement des ponts disulfures semble donc être un paramètre majeur dans le bon déroulement du repliement régiosélectif. Afin d'étudier cette problématique, il est intéressant de réaliser tous les enchaînements de ponts différents possibles pour une même toxine, soit six pour une toxine à trois ponts. Cela implique d'invertir la position des groupements Trt, Acm et Mob pour chaque synthèse peptidique. Ce type d'études a été réalisé sur une toxine d'araignée identifiée par Smartox Biotechnology. Malheureusement, comme nous l'avons vu, le positionnement des groupements Acm est souvent contraint par le risque de réactions secondaires, ce qui a conduit à des résultats décevants. Pour cette raison, nous avons cherché un groupement protecteur pouvant se substituer efficacement au groupement Acm.

Dans ce but, le groupement Hmb^{off/on} a été identifié comme un candidat potentiel. Son utilité pour la formation dirigée de ponts disulfures a été montrée sur l'exemple de la NMB-1 avec la stratégie Trt/Hmb^{off/on}. Au cours de cette étude, nous avons montré que l'étape de déprotection des cystéines portant le groupement Hmb^{on} pouvait être problématique puisque celui-ci semble difficile à neutraliser et réagit avec certaines chaînes latérales présentes. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour identifier sur quel(s) résidu(s) le Hmb^{on}

vient réagir, en particulier pour identifier un *scavenger* efficace. Malgré tout, la NMB-1 a pu être obtenue avec cette stratégie, ce qui montre l'utilité de ce groupement pour le repliement régiosélectif. Par la suite, son orthogonalité avec les groupements protecteurs Acn et Mob a été étudié. Ces recherches ont montré que le groupement Hmb^{off} était orthogonal à ces groupements, mais qu'il était labile sous sa forme *on* dans les conditions de déprotection des cystéines Cys(Acn) et Cys(Mob). Pour finir, les deux stratégies Trt/Hmb^{off/on}/Acn et Trt/Hmb^{off/on}/Mob ont été évaluées sur l'exemple de la SGTx1. La première a malheureusement échoué dans le cas de cette toxine, avec notamment l'observation d'une déprotection précoce des cystéines Cys(Acn). Le même phénomène a pu être observé dans le cas de la seconde stratégie avec les cystéines Cys(Mob), dans une moindre mesure. La SGTx1 a donc pu être obtenue par repliement régiosélectif avec la stratégie Trt/Hmb^{off/on}/Mob. Ce groupement protecteur peut ainsi s'avérer utile dans le cas de certaines toxines se dégradant en présence de diiode, qui ne peuvent donc pas être repliées régiosélectivement en utilisant les groupements Acn. De manière générale, l'optimisation de ces deux stratégies mérite d'être de nouveau réalisée sur d'autres toxines, puisque la déprotection précoce des cystéines portant les groupements Acn et Mob semble être une particularité de la toxine SGTx1. De plus, la déprotection des cystéines Cys(Hmb^{on}) et la formation concomitante du pont disulfure avec du diiode pourrait être exploitée pour optimiser la stratégie Trt/Hmb^{off/on}/Acn.

Ces recherches sur la formation dirigée de ponts disulfures ont permis de mettre au point une alternative au repliement oxydatif direct qui n'avait jusqu'alors jamais été exploitée au Département de Chimie Moléculaire de Grenoble ou à Smartox Biotechnology. Dans le cas de toxines à deux ponts, la stratégie Trt/Acn optimisée par une réaction *one-pot* s'avère particulièrement efficace puisqu'elle garantit l'obtention de la configuration recherchée, avec de plus des rendements très satisfaisants pour ce type de repliement. Celle-ci est désormais utilisée de manière routinière pour la production de telles toxines à Smartox Biotechnology. Dans le cas de toxines à trois ponts, la formation dirigée de ponts disulfures est employée lorsque le repliement oxydatif direct est problématique. Cette stratégie nécessite une optimisation propre à chaque toxine, en particulier en ce qui concerne l'ordre d'enchaînement des ponts disulfures. De plus, la production de toxines par cette méthode est particulièrement longue et laborieuse comparée au repliement oxydatif direct, et se conclue généralement par des rendements assez faibles. Malgré tout, là où le repliement direct échoue, cette méthode a bien souvent l'avantage de permettre la formation de la structure tridimensionnelle native des toxines. Des optimisations sur l'utilisation du groupement protecteur Hmb^{off/on} vont ainsi être réalisées afin de proposer une stratégie alternative pouvant se substituer efficacement aux stratégies de formation dirigée de ponts disulfures classiquement employées.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Instrumentation

- Les analyses par HPLC en phase inverse ont été réalisées sur des systèmes Agilent Technologies 1260 Infinity ou 1260 Infinity II, constitués d'un passeur d'échantillon *VialSampler* ou ALS, d'une pompe quaternaire *QuatPump*, d'un four à colonne MCT ou TCC, d'un détecteur VWD ou MWD-VL, et d'un collecteur FC-AS. Les colonnes analytiques utilisées sont une colonne Chromolith® High Resolution RP-18e, 150 Å, 100 x 4,6 mm à un débit de 2 mL/min avec un gradient linéaire classique 5-60 % de B en 15 min à 40°C, une colonne Agilent Technologies AdvanceBio Peptide C18, 120 Å, 2,7 µm, 100 x 2,1 mm à un débit de 1 mL/min avec un gradient linéaire classique 5-65 % de B en 12 min à 50°C, une colonne Agilent Technologies AdvanceBio Peptide C18, 120 Å, 2,7 µm, 250 x 2,1 mm à un débit de 0,4 mL/min avec un gradient linéaire classique 15-65 % de B en 25 min à 55°C ou une colonne Waters XSelect Peptide CSH C18 XP, 130 Å, 2,5 µm, 150 x 4,6 mm à un débit de 1 mL/min avec un gradient linéaire classique 5-60 % de B en 20 min à 40°C. Les acquisitions ont été réalisées à 214 nm et 280 nm. Chaque analyse débute avec un temps d'équilibration de la colonne à 5 % de tampon B pendant 3 min pour les colonnes Chromolith, AdvanceBio 10 cm et CSH, et 5 min pour la colonne AdvanceBio 25 cm. Les tampons A et B sont des solutions à 0,1% de TFA dans H₂O et CH₃CN, respectivement. L'eau, de qualité Milli-Q, a été obtenue par filtration sur un appareil Millipore Elix Essential Milli-Q.
- Les analyses par LC-HRMS ont été réalisées sur un système Waters Xevo G2S Q –TOF muni d'une source électrospray ZSpray et couplé avec un système UPLC Acquity I, ou un système Agilent Technologies G6530A Accurate-Mass Q-TOF LC/MS muni d'une source électrospray et couplé à un système UPLC 1290 Infinity II. Lorsque les échantillons le nécessitaient, un dessalage sur colonne Waters Acquity UPLC BEH300 C18, 1,7 µm, 2,1 x 150 mm était réalisé avant un gradient 5-90 % de B en 3 min à 40°C. Les tampons A et B sont des solutions à 0,1% d'acide formique dans H₂O et CH₃CN, respectivement. Sauf indication contraire, les analyses ont été faites en mode positif. Les masses théoriques et observées données dans ce manuscrit sont les masses monoisotopiques.
- Les purifications par HPLC en phase inverse à l'échelle préparative ont été réalisées sur des systèmes Agilent Technologies 1260 Infinity munis de deux pompes *Prep Pump*, d'un détecteur VWD VL et d'un collecteur FC-PS. Les colonnes préparatives utilisées sont une colonne Phenomenex Jupiter Proteo C12, 90 Å, 4 µm, 250 x 21,2 mm à un débit de 20 mL/min ou une colonne préparée avec une station Agilent Technologies Load & Lock MultiPacker dans un tube 27 x 500 mm avec de la phase Waters XSelect Peptide CSH C18 XP, 130 Å, 2,5 µm à un débit de 30 ou 50 mL/min. Les purifications ont généralement été réalisées avec un gradient linéaire de 40 min. Les tampons A et B sont des solutions à 0,1% de TFA dans H₂O et CH₃CN/H₂O 90 :10, respectivement.
- Les purifications par HPLC en phase inverse à l'échelle semi-préparative ont été réalisées sur des systèmes Agilent Technologies 1260 Infinity munis d'une pompe quaternaire *Quat Pump* VL, d'un four à colonnes TCC, d'un détecteur MWD VL et d'un collecteur FC-AS. Les colonnes semi-préparatives utilisées sont une colonne Agilent

Technologies Poroshell EC-C18, 120 Å, 4 µm, 250 x 9.4 mm à un débit de 4,5 mL/min, une colonne Phenomenex Jupiter Proteo C12, 90 Å, 4 µm, 250 x 10 mm à un débit de 4,5 mL/min, ou une colonne Waters XSelect Peptide CSH C18 OBD, 130 Å, 5 µm, 250 x 10 mm à un débit de 4 mL/min. Les purifications ont généralement été réalisées avec un gradient linéaire de 30 min. Les tampons A et B sont des solutions à 0,1% de TFA dans H₂O et CH₃CN/H₂O 90 :10, respectivement.

II. Procédures générales de synthèse

Tous les acides aminés utilisés dans les procédures décrites ci-dessous sont utilisés protégés sur le N α par un Fmoc et sur la chaîne latérale si nécessaire. Les groupements protecteurs des chaînes latérales classiquement utilisés sont Arg(Pbf), Asn(Trt), Asp(OtBu), Cys(Trt), Gln(Trt), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(OtBu), Thr(OtBu), Trp(Boc) et Tyr(OtBu). Pour la partie formation dirigée de ponts disulfures, les cystéines Cys(Acm), Cys(Mob) et Cys(Hmb^{off/on}) ont également été utilisées.

Les réactions sur résine effectuées manuellement sont typiquement réalisées dans des seringues de 20 ou 50 mL munies d'un fritté et d'un robinet en PTFE. L'agitation est réalisée sur un moulin.

A. Chargement de la résine 2-chlorotriyl chloride pour les peptides carboxylés à l'extrémité C-terminale

1 g de résine polystyrène 1% divinylbenzène 2-chlorotriyl chloride (100-200 mesh, 1,6 mmol/g) est mis à gonfler 30 min dans du dichlorométhane (DCM) pendant 30 min puis lavé avec 2 x 10 mL de DCM. Le premier acide aminé est chargé manuellement sur la résine en la traitant avec une solution de 0,6 mmol (ou 1,2 mmol pour Arg) d'acide aminé et 1 mL de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) dans 5 mL de DCM pendant 1 h (ou 4 h pour Arg). L'excès de fonction chlorure est bloqué par ajout de 5 mL de MeOH suivi de 1 h d'agitation. Le milieu réactionnel est filtré et la résine lavée 2 fois avec du DCM et deux fois avec du *N,N*-diméthylformamide (DMF). Le N α est déprotégé par traitement de la résine avec 3 x 10 mL d'une solution à 20 % de pipéridine dans le DMF pendant 3 x 5 min en filtrant le milieu réactionnel entre chaque ajout, et la résine est lavée avec 3 x 15 mL de DMF. Les phases liquides contenant le pipéridinyldibenzofulvène sont réunies dans une fiole jaugée de 250 mL, le volume complété avec du DMF, et l'absorbance de cette solution mesurée à 299 nm ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) pour déterminer le taux de substitution de la résine. Si nécessaire, une dilution est appliquée pour obtenir une absorbance comprise entre 0,5 et 1,5. La résine est utilisée directement en SPPS, ou lavée avec 3x 10 mL de DCM puis 3 x 10 mL d'Et₂O et séchée sous-vide.

B. Chargement de la résine 2-chlorotriyl chloride pour les peptides amidés à l'extrémité C-terminale

1 g de résine polystyrène 1% divinylbenzène 2-chlorotriyl chloride (100-200 mesh, 1,6 mmol/g) est mis à gonfler dans du DCM pendant 30 min puis lavé avec 2 x 10 mL de DCM. Le *linker* Rink amide modifié (RAM) est chargé manuellement sur la résine en la traitant avec une solution de 0,6 mmol d'acide 4-[(2,4-diméthoxyphényl)(Fmoc-amino)méthyl]

phénoxyacétique et 1 mL de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) dans 5 mL de DCM pendant 4 h. L'excès de fonction chlorure est bloqué par ajout de 5 mL de MeOH suivi de 1 h d'agitation. Le milieu réactionnel est filtré et la résine lavée 2 fois avec du DCM et deux fois avec du *N,N*-diméthylformamide (DMF). Le Fmoc est déprotégé par traitement de la résine avec 3 x 10 mL d'une solution à 20 % de pipéridine dans le DMF pendant 3 x 5 min en filtrant le milieu réactionnel entre chaque ajout, et la résine est lavée avec 3 x 15 mL de DMF. Les phases liquides contenant le pipéridinyldibenzofulvène sont réunies dans une fiole jaugée de 250 mL, le volume complété avec du DMF, et l'absorbance de cette solution mesurée à 299 nm ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) pour déterminer le taux de substitution de la résine. Si nécessaire, une dilution est appliquée pour obtenir une absorbance comprise entre 0,5 et 1,5. La résine est utilisée directement en SPPS, ou lavée avec 3 x 10 mL de DCM puis 3 x 10 mL d'Et₂O et séchée sous-vide.

C. Chargement de la résine 2-chlorotriptyl chloride pour les peptides hydrazide à l'extrémité C-terminale

1 g de résine polystyrène 1% divinylbenzène 2-chlorotriptyl chloride (100-200 mesh, 1,6 mmol/g) est mis à gonfler dans du DCM pendant 30 min puis lavé avec 2 x 10 mL de DCM et 2 x 10 mL de NMP. La résine est traitée avec 10 mL d'une solution à 5% d'hydrazine hydrate dans de la NMP pendant 1 h. Le milieu réactionnel est filtré et la résine est traitée avec un mélange MeOH/NH₂NH₂/NMP 10:5:85 pendant 30 min. Le milieu réactionnel est filtré et la résine est lavée avec 2 x 10 mL de NMP, 2 x 10 mL de DCM et de nouveau 2 x 10 mL de NMP. Le premier acide aminé est chargé manuellement sur la résine en la traitant avec une solution de 0,6 mmol (ou 1,2 mmol pour Arg) d'acide aminé, 0,57 mmol de HCTU et 1,2 mmol de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) dans 5 mL de NMP pendant 1 h (ou 4 h pour Arg). Le milieu réactionnel est filtré et l'excès de fonction hydrazine bloqué en traitant la résine avec 10 mL d'une solution Ac₂O/DIPEA/NMP 10:5:85 pendant 15 min. Le milieu réactionnel est filtré et la résine est lavée avec 2 x 10 mL de DCM et 2 x 10 mL de DMF. Le N α est déprotégé par traitement de la résine avec 3 x 10 mL d'une solution à 20 % de pipéridine dans le DMF pendant 3 x 5 min, et la résine est lavée avec 3 x 15 mL de DMF. Les phases liquides contenant le pipéridinyldibenzofulvène sont réunies dans une fiole jaugée de 250 mL, le volume complété avec du DMF, et l'absorbance de cette solution mesurée à 299 nm ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) pour déterminer le taux de substitution de la résine. Si nécessaire, une dilution est appliquée pour obtenir une absorbance comprise entre 0,5 et 1,5. La résine est utilisée directement en SPPS, ou lavée avec 3 x 10 mL de DCM puis 3 x 10 mL d'Et₂O et séchée sous-vide.

D. Synthèse de peptides linéaires par SPPS

Les synthèses de tous les peptides linéaires ont été réalisées par SPPS automatisée en utilisant la stratégie Fmoc standard sur les synthétiseurs automatiques Gyros Protein Technologies (auparavant Protein Technologies, Inc.) Symphony et Symphony X. L'échelle classique de

synthèse est 0,1 mmol. Les solutions de réactifs utilisées sont les suivantes : 0,2 M d'acide aminé dans la NMP, sauf pour Cys et Ser dans le DMF, 0,39 M de HCTU dans la NMP, 1,2 M de DIPEA dans la NMP, 10 % v/v d'anhydride acétique dans la NMP, et 20 % v/v de pipéridine dans le DMF. Chaque synthèse débute avec une étape de gonflage de la résine de 30 min dans 5 mL de DCM, suivie d'un lavage dans 5 mL de DMF, un lavage dans 5 mL de DCM et 3 lavages dans 2 mL de DMF. Le couplage des acides aminés est répété 3 fois avant déprotection du Fmoc pour augmenter les rendements de couplage. Une étape de *capping* est systématiquement appliquée après chaque couplage pour bloquer les chaînes n'ayant pas réagi. Chaque cycle couplage/déprotection est réalisé de la manière suivante : 10 éq. d'acide aminé, 9,75 éq. de HCTU et 20 éq. de DIPEA sont ajoutés successivement à la résine et le milieu réactionnel est agité 15 min à température ambiante. Le milieu réactionnel est filtré et le couplage répété deux fois de plus. Après filtration du milieu réactionnel du troisième couplage, 5 mL de la solution d'anhydride acétique et 1,5 mL de la solution de DIPEA sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité pendant 15 min pour une étape de *capping*, puis filtré. La résine est lavée avec 5 mL de DMF, 5 mL de DCM et 3 x 3 mL de DMF. La déprotection du Fmoc est réalisée avec 3 x 5 mL de la solution de pipéridine pendant 3 x 3 min, puis la résine est lavée avec 5 mL de DMF, 5 mL de DCM et 3 x 2 mL de DMF. Un nouveau cycle couplage/déprotection peut alors débiter.

Une fois l'élongation de la chaîne peptidique terminée, La résine est lavée manuellement avec 3 x 5 mL de DCM puis traitée avec 20 mL d'une solution TFA/*i*Pr₃SiH/1,3-diméthoxybenzène/2,2'-(éthylènedioxy)diéthanethiol/H₂O 85:2,5:3,75:3,75:5 pendant 3h pour détacher le peptide de la résine et déprotéger les chaînes latérales. Le milieu réactionnel est filtré et la résine lavée avec 3 mL de TFA. Les phases liquides contenant le peptide sont récupérées et le peptide est précipité par ajout de 70 mL d'Et₂O à 4°C. Le milieu est centrifugé 3 min à 4000 tr/min et le culot est lavé avec 2 x 30 mL d'Et₂O. Après centrifugation, le culot est séché à l'air libre pendant une nuit. Des analyses du peptide brut par HPLC et LC-MS sont réalisées avant purification.

E. Protocole de *Native Chemical Ligation* avec un fragment hydrazide

Le tampon utilisé pour la NCL est une solution de 200 mM Na₂HPO₄·H₂O et 6 M Gn.HCl dans H₂O. Le pH de la solution stock est ajusté à 3 avec une solution de HCl 1 M ou 37% v/v et la solution est stockée à 4°C. Le protocole ci-dessous décrit la ligation par NCL d'un fragment fonctionnalisé en C-terminal avec un hydrazide, appelé fragment hydrazide, avec un peptide présentant une cystéine à son extrémité N-terminale, appelé fragment cystéinyle. Chacun des fragments est préalablement purifié par HPLC en phase inverse pour obtenir une pureté minimum déterminée par HPLC analytique de 90 %. La réaction de NCL est réalisée avec un léger excès (1,1-1,5 éq.) d'un des deux fragments. Le choix du fragment introduit en excès est déterminé par la difficulté relative d'obtention de chaque fragment. De plus, le produit de ligation aura généralement un temps de rétention en HPLC en phase inverse proche du fragment le plus hydrophobe. Afin de faciliter la purification, le fragment ayant le temps de

réaction le plus faible pourra donc être introduit en excès. Les nombres d'équivalents de NaNO_2 , MPAA et TCEP sont donnés par rapport au fragment hydrazide.

Le fragment hydrazide est dissout dans le tampon de NCL à une concentration de 5 mM, le pH est réajusté si nécessaire à 3 avec une solution de HCl 1 M ou une solution de NaOH 1 M, et la solution est refroidie entre -15°C et -20°C dans un bain glace/NaCl pendant 10 min. 10 éq. de NaNO_2 en solution dans H_2O à 0,5 M sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité 20 min à -15°C . Pendant ce temps, 100 éq. de MPAA sont dissous à 1 M dans le tampon de NCL et le pH est ajusté à 6-7 avec une solution de NaOH 6M. Le fragment cystéinyle est dissout dans le tampon de NCL à pH 3 à une concentration de 10 mM. A la fin des 20min, les solutions de MPAA et de fragment cystéinyle sont successivement ajoutées au fragment hydrazide, le milieu réactionnel est rapidement réchauffé à température ambiante et le pH ajusté à 6,8 avec des solutions de NaOH à 6 M puis 1 M. La réaction est mise sous atmosphère inerte avec 5 cycles vide-argon et agitée à température ambiante. La fin de la réaction est déterminée par un suivi de l'avancement par analyse HPLC et LC-MS. Alternativement, le milieu réactionnel est agité une nuit à température ambiante et la réaction est considérée comme terminée le lendemain matin. 100 éq. de TCEP sont dissous à 20 mg/mL dans une solution de Gn.HCl à 6 M, le pH est ajusté à 4-5 avec une solution de NaOH 6M, et cette solution est ajoutée au milieu réactionnel et agitée pendant 30 min. Le pH est diminué en ajoutant 500 μL de TFA et le milieu réactionnel est lavé quatre fois avec Et_2O . Les traces d' Et_2O sont éliminées par évaporation et le milieu réactionnel est analysé par HPLC en phase inverse et LC-MS, puis purifié par HPLC préparative ou semi-préparative. Le produit de liaison isolé est congelé à -80°C et lyophilisé.

III. Protocoles de synthèses des composés

A. AmmTx3

AmmTx3 linéaire 1

pGlu-IETNKKCQGSCASVCRKVGVAAGKCIINGRCVCYP-OH (pGlu = acide L-pyroglutamique)

- Synthèse par SPPS :

l'AmmTx3 linéaire 1 a été synthétisée sur une résine 2-CTC (330 mg, taux de substitution $\tau = 0,3$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Pro-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,3 mmol/g. L'acide pyroglutamique à l'extrémité *N*-terminale a été introduit comme un résidu classique à partir du composé commercial acide L-pyroglutamique. 655 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O.

RP-HPLC : $t_R = 8,2$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₅₈H₂₆₈N₅₀O₄₈S₆ M_{mono} calculée : 3825,83 Da ; observée : 3825,87 Da

- Synthèse par NCL :

l'AmmTx3 linéaire 1 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL **E** à partir de 20 mg (1,3 éq.) de fragment hydrazide AmmTx3(1-12) 3 et 29,6 mg (1 éq.) de fragment cystéinyne AmmTx3(13-37) 4. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 30 min et lyophilisation, 20,1 mg d'AmmTx3 linéaire 1 pure ont été obtenus.

Rendement : 46 %

RP-HPLC : $t_R = 8,2$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₅₈H₂₆₈N₅₀O₄₈S₆ M_{mono} calculée : 3825,83 Da ; observée : 3825,83 Da

AmmTx3 repliée 2

- A partir de 1 obtenu par NCL :

6,8 mg de 1 ont été dissous dans 2 mL de tampon A et ajoutés goutte-à-goutte dans 35 mL d'un tampon 0,2 M Tris.HCl à pH 8,2 sous agitation. Après agitation douce pendant 48 h à température ambiante, le milieu a été acidifié avec 1 mL d'acide formique, filtré, et purifié par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 10-60 % de B en 30 min à 40°C. Après lyophilisation, 3,2 mg d'AmmTx3 repliée 2 ont été obtenus.

Rendement : 48 %

RP-HPLC : $t_R = 7,0$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₅₈H₂₆₂N₅₀O₄₈S₆ M_{mono} calculée : 3819,79 Da ; observée : 3819,77 Da

- A partir de **1** obtenu par SPPS :

50 mg de **1** brut ont été dissous dans 6 mL de tampon A/CH₃CN 5:1 et ajoutés goutte-à-goutte dans 250 mL d'un tampon 0,2 M Tris.HCl à pH 8,3 sous agitation. Après agitation douce pendant 48 h à température ambiante, le milieu a été acidifié avec 3 mL d'acide formique, filtré, et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 30 min. La pureté du produit n'étant pas satisfaisante, une seconde purification par RP-HPLC semi-préparative a été réalisée avec un gradient 10-45 % de B en 30 min à 45°C. Après lyophilisation, 1,9 mg d'AmmTx3 repliée **2** ont été obtenus.

Rendement : 4 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 7,0$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₅₈H₂₆₂N₅₀O₄₈S₆ M_{mono} calculée : 3819,79 Da ; observée : 3819,77 Da

Synthèse par SPPS du fragment hydrazide AmmTx3(1-12) **3**

pGlu-IETNKKCQGGG-NHNH₂

Le fragment hydrazide AmmTx3(1-12) **3** a été synthétisé sur une résine 2-CTC (357 mg, $\tau = 0,28$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Ser(OtBu)-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,28 mmol/g. L'acide pyroglutamique à l'extrémité N-terminale a été introduit comme un résidu classique à partir du composé commercial acide L-pyroglutamique. 273 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 30 min. Après lyophilisation, 112 mg de fragment hydrazide AmmTx3(1-12) **3** pur ont été obtenus.

Rendement : 87 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 4,5$ min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₅₁H₈₈N₁₈O₁₉S M_{mono} calculée : 1288,62 Da ; observée : 1288,63 Da

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle AmmTx3(13-37) **4**

H-CASVCRKVIQVAAGKINGRCVCYP-OH

Le fragment cystéinyle AmmTx3(13-37) **4** a été synthétisé sur une résine 2-CTC (330 mg, $\tau = 0,3$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Pro-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,3 mmol/g. 551 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 86 mg de fragment cystéinyle AmmTx3(13-37) **4** pur ont été obtenus.

Rendement : 33 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 7,9$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₀₇H₁₈₄N₃₄O₂₉S₅ M_{mono} calculée : 2569,26 Da ; observée : 2569,26 Da

B. α -Bungarotoxine

Synthèse par SPPS du fragment hydrazide α -BgTx(1-28) 5

Ap-IVCHTTATSPISAVTCPPGENLCYRKMW-NHNH₂ (Ap = acide pentynoïque)

Le fragment hydrazide α -BgTx(1-28) 5 a été synthétisé sur une résine 2-CTC (294 mg, $\tau = 0,34$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Trp(Boc)-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,34 mmol/g. L'acide pentynoïque à l'extrémité *N*-terminale a été introduit comme un résidu classique à partir du composé commercial. 600 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 82 mg de fragment hydrazide α -BgTx(1-28) 5 pur ont été obtenus.

Rendement : 26 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 22,3$ min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 25 cm, 214 nm, 15-65 % B en 25 min)

ESI-HRMS : C₁₃₉H₂₁₈N₃₈O₃₉S₄ M_{mono} calculée : 3171,51 Da ; observée : 3171.52 Da

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle hydrazide α -BgTx(29-43) 6

H-CDAFCSSRGKVVVELG-NHNH₂

Le fragment cystéinyle hydrazide α -BgTx(29-43) 6 a été synthétisé sur une résine 2-CTC (278 mg, $\tau = 0,36$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Gly-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,36 mmol/g. 345 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 90 mg de fragment hydrazide α -BgTx(29-43) 6 pur ont été obtenus.

Rendement : 57 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 16,9$ min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 25 cm, 214 nm, 15-65 % B en 25 min)

ESI-HRMS : C₆₅H₁₀₉N₂₁O₂₁S₂ M_{mono} calculée : 1583,75 Da ; observée : 1583,96 Da

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle α -BgTx(44-74) 7

H-CAATCPSKKPYEEVTCCSTDKCNPHPKQRPQ-OH

Le fragment cystéinyle α -BgTx(44-74) 7 a été synthétisé sur une résine 2-CTC (303 mg, $\tau = 0,33$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Gly-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,33 mmol/g. 530 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 150 mg de fragment cystéinyle α -BgTx(44-74) 7 pur ont été obtenus.

Rendement : 44 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 14,1$ min (AdvanceBio Peptide C18 25 cm, 214 nm, 15-65 % B en 25 min)

ESI-HRMS : C₁₃₉H₂₂₄N₄₂O₄₆S₅ M_{mono} calculée : 3377,51 Da ; observée : 3377,55 Da

α -BgTx(1-43) 8

Ap-IVCHTTATSPISAVTCPPGENLCYRKMWCDAFCSSRGKVVELG-NH₂

L' α -BgTx(1-43) 8 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL **E** à partir de 10 mg (1 éq.) de fragment hydrazide α -BgTx(1-28) 5 et 6,6 mg (1,3 éq.) de fragment cystéinyle hydrazide α -BgTx(29-43) 6. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min et lyophilisation, L' α -BgTx(1-43) 8 été obtenue impur.

RP-HPLC : $t_R = 22,5$ min et 23,0 min dans un amas (AdvanceBio Peptide C18 25 cm, 214 nm, 15-65 % B en 25 min)

ESI-HRMS : C₂₀₄H₃₂₃N₅₇O₆₀S₆ M_{mono} calculée : 4723,23 Da ; observée : 4723,23 Da / 2971,52 Da / 3375,67 Da / 3446,69 Da

α -BgTx(1-28,44-74) 9

Ap-IVCHTTATSPISAVTCPPGENLCYRKMWCAATCPSKKPYEEVTCCSTDKCNPHPKQRPQ-OH

L' α -BgTx(1-28,44-74) 9 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL **E** à partir de 5,0 mg (1 éq.) de fragment hydrazide α -BgTx(1-28) 5 et 6,8 mg (1,2 éq.) de fragment cystéinyle α -BgTx(44-74) 7. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 20-70 % de B en 30 min à 40°C et lyophilisation, 4,7 mg d' α -BgTx(1-28,44-74) 9 pure ont été obtenus.

Rendement : 42 %

RP-HPLC : $t_R = 8,3$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₂₇₈H₄₃₈N₇₈O₈₅S₉ M_{mono} calculée : 6516,98 Da ; observée : 6516,95 Da

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle hydrazide Acm- α -BgTx(29-43) 10

H-C(Acm)DAFCSSRGKVVELG-NHNH₂

Le fragment cystéinyle hydrazide Acm- α -BgTx(29-43) 10 a été synthétisé sur une résine 2-CTC (278 mg, τ = 0,36 mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Gly-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,36 mmol/g. Le résidu Cys(Acm) a été introduit comme un résidu classique à partir du composé commercial Fmoc-L-Cys(Acm)-OH. 182 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 28 mg de fragment cystéinyle hydrazide Acm- α -BgTx(29-43) 10 pur ont été obtenus.

Rendement : 17 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : t_R = 6,8 min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₆₈H₁₁₄N₂₂O₂₂S₂ M_{mono} calculée : 1654,79 Da ; observée : 1654,79 Da

Acm- α -BgTx(29-74) 11

H-C(Acm)DAFCSSRGKVVELGCAATCPSKKPYEEVTCCSTDKCNPHPKQRPG-OH

L'Acm- α -BgTx(29-74) 11 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL **E** à partir de 18,2 mg (1 éq.) de fragment cystéinyle hydrazide Acm- α -BgTx(29-43) 10 et 43 mg (1,1 éq.) de fragment cystéinyle α -BgTx(44-74) 7. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min et lyophilisation, 33,2 mg d'Acm- α -BgTx(29-74) 11 pure ont été obtenus.

Rendement : 60 %

RP-HPLC : t_R = 6,5 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₂₀₇H₃₃₄N₆₂O₆₈S₇ M_{mono} calculée : 5000,26 Da ; observée : 5000,29 Da

α -BgTx(29-74) 12

H-CDAFCSRGKVVELGCAATCPSKKPYEEVTCCSTDKCNPHPKQRPG-OH

27,5 mg d'Acm- α -BgTx(29-74) 11 ont été solubilisés dans 1 mL de tampon de NCL et 10 mg (10 éq.) de PdCl₂ dans 200 μ L de tampon de NCL ont été ajoutés. Après 10 min d'agitation à 37°C, 85 mg (100 éq.) de DTT solubilisés dans 200 μ L d'H₂O ont été ajoutés. Les phases liquide et solide ont été séparées par centrifugation, le culot lavé avec 200 μ L de tampon de NCL, et les phases liquides ont été réunies, acidifiées avec quelques gouttes d'acide formique et purifiées par HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 14,5 mg d' α -BgTx(29-74) 12 ont été obtenus.

Rendement : 53 %

RP-HPLC : t_R = 7,2 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₂₀₄H₃₂₉N₆₁O₆₇S₇ M_{mono} calculée : 4929,23 Da ; observée : 4929,16 Da

α-BgTx linéaire 13

H-IVCHTTATSPISAVTCPPGENLCYRKMW-
CDAFCSSRGKVVELGCAATCPSKKPYEEVTCCSTDKCNPHPKQRPG-OH

L'α-BgTx linéaire **13** a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL **E** à partir de 16,8 mg (1,5 équ.) de fragment hydrazide α-BgTx(1-28) **5** et 18,0 mg (1 équ.) de fragment cystéinyne α-BgTx(29-74) **12**. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min et lyophilisation, 12,3 mg d'α-BgTx linéaire **13** pure ont été obtenus.

Rendement : 42 %

RP-HPLC : $t_R = 9,1$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : $C_{343}H_{543}N_{97}O_{106}S_{11}$ M_{mono} calculée : 8068,70 Da ; observée : 8068,68 Da

α-BgTx repliée 14

3,0 mg d'α-BgTx linéaire **13** ont été dissous dans 3 mL d'H₂O et ajoutés goutte-à-goutte sous agitation dans 30 mL d'un tampon 0,1 M Tris.HCl à pH 8,2 contenant 5 mM de GSH et 0,5 mM de GSSG. Après agitation douce pendant 48 h à température ambiante, le milieu a été acidifié avec 1 mL d'acide formique, filtré, et purifié par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 20-40 % de B en 30 min à 40°C. Après lyophilisation, 680 µg d'α-BgTx repliée **14** ont été obtenus.

Rendement : 23 %

RP-HPLC : $t_R = 21,1$ min (AdvanceBio Peptide C18 25 cm, 214 nm, 15-65 % B en 25 min)

ESI-HRMS : $C_{343}H_{533}N_{97}O_{106}S_{11}$ M_{mono} calculée : 8058,62 Da ; observée : 8058,60 Da

Cy5-α-BgTx repliée 15

Composition du tampon de CuAAC : 0,4 M acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) et 50 mM d'aminoguanidine hydrochloride

110µg d'α-BgTx repliée **14** ont été dissous dans 12µL d'une solution (N-méthyl-2-pyrrolidinone (NMP)/*t*BuOH 9:1)/H₂O/Tampon de CuAAC 1:1:1 et 0,1 mg de Cy5-N₃ dans 10 µL de NMP/*t*BuOH 9:1 ont été ajoutés. 2,8 mg de complexe CuBr.(CH₃)₂S et 3mg de THPTA ont été dissous dans 1 mL de NMP/*t*BuOH 9:1, et 10 µL de cette solution ont été ajoutés au milieu réactionnel, soit 10 équ. de complexe CuBr.(CH₃)₂S et 5 équ. de THPTA. Après une nuit d'agitation à température ambiante et sous atmosphère inerte, le milieu a été acidifié avec une goutte d'acide formique et purifié par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 20-70 % de B en 30 min à 40°C. Après lyophilisation, 25 µg de Cy5-α-BgTx repliée **15** ont été obtenus par dosage à 646 nm ($\epsilon = 250000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

Rendement : 21 %

RP-HPLC : $t_R = 16,9$ min (XSelect Peptide CSH C18, 214 nm, 5-60 % B en 20 min)

ESI-HRMS : $C_{378}H_{578}N_{103}O_{107}S_{11}$ M_{mono} calculée : 8623,99 Da ; observée : 8623,98 Da

C. Notexine

Synthèse par SPPS du fragment hydrazide NTX(1-43) **16**

H-NLVQFSYLIQCANHGKRPTRHYMDYGICYCGWGGSGTPVDELDR-NHNH₂

Le fragment hydrazide NTX(1-43) **16** a été synthétisé sur une résine 2-CTC (370 mg, $\tau = 0,27$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,27 mmol/g. Les acides aminés R17 à Y22 ont été couplés cinq fois pour augmenter les rendements de couplage. 742 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 58 mg de fragment hydrazide NTX(1-43) **16** pur ont été obtenus.

Rendement : 12 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 8,9$ min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₂₁₄H₃₁₈N₆₄O₆₃S₄ M_{mono} calculée : 4920,25 Da ; observée : 4920,21 Da

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle hydrazide NTX(44-84) **17**

H-CCKIHDDCYSDAEKKGCSPKMSAYDYCYGGENGPYCRNIKKK-NHNH₂

Le fragment cystéinyle hydrazide NTX(44-84) **17** a été synthétisé sur une résine 2-CTC (330 mg, $\tau = 0,30$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Lys(Boc)-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,30 mmol/g. 680 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. La pureté n'étant pas satisfaisante, les fractions collectées ont été de nouveau purifiées par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-40 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 43 mg de fragment cystéinyle hydrazide NTX(44-84) **17** pur ont été obtenus.

Rendement : 9 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 6,3$ min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₉₉H₃₀₇N₅₇O₆₃S₇ M_{mono} calculée : 4727,06 Da ; observée : 4727,02 Da

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle NTX(85-119) 18

H-CLRFVCDVCEAAFCFAKAPYNNANWNIDTKKRCQ-OH

Le fragment cystéinyle NTX(85-119) 18 a été synthétisé sur une résine 2-CTC (323 mg, $\tau = 0,31$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Gln(Trt)-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,31 mmol/g. 692 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et dessalés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 482 mg de fragment cystéinyle NTX(85-119) 18 dessalés ont été obtenus.

RP-HPLC : $t_R = 8,7$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₇₆H₂₆₆N₅₀O₅₁S₅ M_{mono} calculée : 4055,84 Da ; observée : 4055,83 Da

NTX(1-84) 19

H-NLVQFSYLIQCANHGKRPTRHYMDYGCYCGWGGSGTPVDELDR-
CCKIHDDCYSDAEKKGCSPKMSAYDYCYGGENGPYCRNIKKK-NHNH₂

La NTX(1-84) 19 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL **E** à partir de 22,5 mg (1 éq.) de fragment hydrazide NTX(1-43) 16 et 33,2 mg (1,5 éq.) de fragment cystéinyle hydrazide NTX(44-84) 17. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min et lyophilisation, 14,6 mg de NTX(1-84) 19 pure ont été obtenus.

Rendement : 33 %

RP-HPLC : $t_R = 8,5$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₄₁₃H₆₂₁N₁₁₉O₁₂₆S₁₁ M_{mono} calculée : 9615,28 Da ; observée : 9615,19 Da

NTX linéaire 20

H-NLVQFSYLIQCANHGKRPTRHYMDYGCYCGWGGSGTPVDELDR-
CCKIHDDCYSDAEKKGCSPKMSAYDYCYGGENGPYCRNIKKK-
CLRFVCDVCEAAFCFAKAPYNNANWNIDTKKRCQ-OH

- A partir de NTX(1-84) 19 et NTX(85-119) 18 :

La NTX linéaire 20 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL **E** à partir de 14,6 mg (1 éq.) de fragment hydrazide NTX(1-84) 19 et 8,7 mg (1,4 éq.) de fragment cystéinyle NTX(85-119) 18. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 40 min et lyophilisation, 2,6 mg de NTX linéaire 20 pure ont été obtenus.

Rendement : 12 %

RP-HPLC : $t_R = 9,6$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₅₈₉H₈₈₃N₁₆₇O₁₇₇S₁₆ M_{mono} calculée : 13639,08 Da ; observée : 13642,01 Da (intensité de la masse monoisotopique trop faible)

- A partir de NTX(1-77) **23** et NTX(78-119) **22** :

La NTX linéaire **20** a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL **E** à partir de 22,3 mg (1 équ.) de fragment hydrazide NTX(1-77) **23** et 19 mg (1,5 équ.) de fragment cystéinyle NTX(78-119) **22**. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min et lyophilisation, 12,0 mg de NTX linéaire **20** pure ont été obtenus.

Rendement : 35 %

RP-HPLC : $t_R = 9,3$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : $C_{589}H_{883}N_{167}O_{177}S_{16}$ M_{mono} calculée : 13639,08 Da ; observée : 13640,11 Da (intensité de la masse monoisotopique trop faible)

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle hydrazide NTX(44-77) **21**

H-CCKIHDDCYSDAEKKGCSPKMSAYDYCYGGENGPY-NH₂

Le fragment cystéinyle hydrazide NTX(44-77) **21** a été synthétisé sur une résine 2-CTC (400 mg, $\tau = 0,25$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Tyr(OtBu)-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,25 mmol/g. 680 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 63 mg de fragment cystéinyle hydrazide NTX(44-77) **21** ont été obtenus.

Rendement : 16 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 6,7$ min et $t_R = 6,9$ min (2 pics, ratio 2:1, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : $C_{162}H_{237}N_{43}O_{55}S_6$ M_{mono} calculée : 3856,54 Da ; observée : 3856,55 Da majoritaire ; 2818,17 Da minoritaire (Ac-SDAEKKGCSPKMSAYDYCYGGENGPY-NH₂)

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle NTX(78-119) **22**

H-CRNIKKKCLRFVCDVDVEAAFCFAKAPYNNANWNIDTKKRCQ-OH

Le fragment cystéinyle NTX(78-119) **22** a été synthétisé sur une résine 2-CTC (323 mg, $\tau = 0,31$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Gln(Trt)-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,31 mmol/g. 983 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et dessalés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 94 mg de fragment cystéinyle NTX(78-119) **22** pur ont été obtenus.

Rendement : 19 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 8,3$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : $C_{213}H_{336}N_{64}O_{59}S_6$ M_{mono} calculée : 4926,36 Da ; observée : 4926,38 Da

NTX(1-77) 23

H-NLVQFSYLIQCANHGKRPTRHVMDYGCYCGWGGSGTPVDELDR-
CCKIHDDCYSDAEKKGCSPKMSAYDYCYGGENGPY-NH₂

La NTX(1-77) 23 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL **E** à partir de 58,0 mg (1 éq.) de fragment hydrazide NTX(1-43) 16 et 63,0 mg (1,5 éq.) de fragment cystéinyle hydrazide NTX(44-77) 21. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min et lyophilisation, 22,3 mg de NTX(1-84) 19 pure ont été obtenus.

Rendement : 22 %

RP-HPLC : t_R = 9,0 min (épaulement gauche, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₃₇₆H₅₅₁N₁₀₅O₁₁₈S₁₀ M_{mono} calculée : 8744,75 Da ; observée : 8746,78 Da (intensité de la masse monoisotopique trop faible) ; 4906,24 Da (NTX(1-43) hydrolysé)

D. U1-Cyrtautoxine-As1c

Synthèse par SPPS du fragment hydrazide CUTX(1-36) 24

H-EIPQNLGSGIPHDKIKLPNGQWCKTPGDLCSSSSEC-NH₂

Le fragment hydrazide CUTX(1-36) 24 a été synthétisé sur une résine 2-CTC (345 mg, τ = 0,29 mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Cys(Trt)-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,29 mmol/g. L'acide aminé E1 a été couplé cinq fois pour augmenter les rendements de couplage. 685 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 87 mg de fragment hydrazide CUTX(1-36) 24 pur ont été obtenus.

Rendement : 23 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : t_R = 8,0 min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₆₃H₂₆₂N₄₈O₅₄S₃ M_{mono} calculée : 3851,84 Da ; observée : 3851,82 Da

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyne CUTX(37-76) 25

H-CKAKHSNSVTYASFCRQWSGQQALFINQCRTCNESSMC-OH

Le fragment cystéinyne CUTX(37-76) 25 a été synthétisé sur une résine 2-CTC (277 mg, $\tau = 0,36$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Cys(Trt)-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,36 mmol/g. 924 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 19 mg de fragment cystéinyne CUTX(37-76) 25 pur ont été obtenus.

Rendement : 4 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 8,3$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₈₇H₂₉₂N₅₈O₆₀S₆ M_{mono} calculée : 4501,99 Da ; observée : 4502,00 Da

CUTX linéaire 26

H- EIPQNLGSGIPHDKIKLPNGQWCKTPGDLCSSSSEC-
CKAKHSNSVTYASFCRQWSGQQALFINQCRTCNESSMC-OH

- A partir de CUTX(1-36) 24 et CUTX(37-76) 25 :

La CUTX linéaire 26 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL **E** à partir de 11,0 mg (1,3 éq.) de fragment hydrazide CUTX(1-36) 24 et 10,0 mg (1 éq.) de fragment cystéinyne CUTX(37-76) 25. Pour améliorer sa solubilisation, 20 % v/v de NMP ont été ajoutée pour dissoudre 25. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. La purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min n'a pas permis d'isoler la CUTX linéaire 26, du fragment CUTX(37-76) 25.

RP-HPLC : $t_R = 8,1$ min et $t_R = 8,4$ min (2 pics, ratio 1:2, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₃₅₀H₅₅₀N₁₀₄O₁₁₄S₉ M_{mono} calculée : 8321,79 Da ; observée : 8321,76 Da majoritaire ; 4502,03 Da minoritaire (CUTX(37-76) 25)

- A partir de CUTX(1-50) 29 et CUTX(51-76) 28 :

La CUTX linéaire 26 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL à partir de 14,0 mg (1 éq.) de fragment hydrazide CUTX(1-50) 29 et 11,3 mg (1,5 éq.) de fragment cystéinyne CUTX(51-76) 28. La réaction de ligation a duré une nuit à 37°C. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min et lyophilisation, 6,0 mg de CUTX linéaire 26 pure ont été obtenus.

Rendement : 28 %

RP-HPLC : $t_R = 8,4$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₃₅₀H₅₅₀N₁₀₄O₁₁₄S₉ M_{mono} calculée : 8321,79 Da ; observée : 8321,81 Da

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle hydrazide CUTX(37-50) 27

H-CKAKHSNSVTYASF-NH₂

Le fragment cystéinyle hydrazide CUTX(37-50) 27 a été synthétisé sur une résine 2-CTC (385 mg, $\tau = 0,26$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Phe-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,26 mmol/g. 280 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 140 mg de fragment cystéinyle hydrazide CUTX(37-50) 27 ont été obtenus.

Rendement : 90 % basé sur le taux de chargement de la résine (produit hygroscopique).

RP-HPLC : $t_R = 6,2$ min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₆₇H₁₀₅N₂₁O₂₀S M_{mono} calculée : 1555,76 Da ; observée : 1555,76 Da

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle CUTX(51-76) 28

H-CSRQWSGQQALFINQCRTCNESSMC-OH

Le fragment cystéinyle CUTX(51-76) 28 a été synthétisé sur une résine 2-CTC (277 mg, $\tau = 0,36$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Cys(Trt)-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,36 mmol/g. 590 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 55 mg de fragment cystéinyle CUTX(51-76) 28 pur ont été obtenus.

Rendement : 18 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 7,5$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₂₀H₁₉₁N₃₉O₄₀S₅ M_{mono} calculée : 2978,27 Da ; observée : 2978,44 Da

CUTX(1-50) 29

H-EIPQNLGSGIPHDKIKLPNGQWCKTPGDLCSSESSECKAKHSNSVTYASF-NH₂

La CUTX(1-50) 29 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL **E** à partir de 87 mg (1 éq.) de fragment hydrazide CUTX(1-36) 24 et 115 mg (3 éq.) de fragment cystéinyle hydrazide CUTX(37-50) 27. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min et lyophilisation, 55,5 mg de CUTX(1-50) 29 pure ont été obtenus.

Rendement : 46 %

RP-HPLC : $t_R = 7,7$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₂₃₀H₃₆₃N₆₇O₇₄S₄ M_{mono} calculée : 5375,56 Da ; observée : 5375,52 Da

CUTX repliée **30**

13,5 mg de CUTX linéaire **26** ont été dissous dans 1 mL d'H₂O et ajoutés goutte-à-goutte sous agitation dans 135 mL d'un tampon 0,1 M Tris.HCl à pH 8,2 contenant 5 mM de cystéine et 0,5 mM de cystine. Après agitation douce pendant 48 h à température ambiante, le milieu a été acidifié avec 1 mL d'acide formique, filtré, et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 5 mg de CUTX repliée **30** ont été obtenus.

Rendement : 37 %

RP-HPLC : $t_R = 8,0$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 15-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₃₅₀H₅₄₂N₁₀₄O₁₁₄S₉ M_{mono} calculée : 8313,73 Da ; observée : 8313,69 Da

E. Progastrine

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle hydrazide ProG*(17-48) **31**

H-C*NRDLELPWLEQQGPASHHRRQLGPQGPPLV-NHNH₂ (C* représente les cysteines non-natives)

Le fragment cystéinyle hydrazide ProG*(17-48) **31** a été synthétisé sur une résine 2-CTC (417 mg, $\tau = 0,24$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Val-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,24 mmol/g. 385 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lyophilisation, et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 25 mg de fragment cystéinyle hydrazide ProG*(17-48) **31** ont été obtenus.

Rendement : 7 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 13,4$ min (Waters XSelect Peptide CSH C18 XP, 214 nm, 5-60 % B en 20 min)

ESI-HRMS : C₁₆₀H₂₅₁N₅₅O₄₄S M_{mono} calculée : 3678,88 Da ; observée : 3678,90 Da

Synthèse par SPPS du fragment hydrazide ProG(1-16) **32**

H-SWKPRSQQPDAPLGTG -NHNH₂

Le fragment hydrazide ProG(1-16) **32** a été synthétisé sur une résine 2-CTC (286 mg, $\tau = 0,35$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Gly-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,35 mmol/g. 190 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lyophilisation, et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-40 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 70 mg de fragment hydrazide ProG(1-16) **32** ont été obtenus.

Rendement : 40 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 10,4$ min (Waters XSelect Peptide CSH C18 XP, 214 nm, 5-60 % B en 20 min)

ESI-HRMS : C₇₅H₁₁₉N₂₅O₂₃ M_{mono} calculée : 1737,89 Da ; observée : 1737,91 Da

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle ProG*(49-80) **33**

H-C*DPSKKQGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN-OH

Le fragment cystéinyle ProG*(49-80) **33** a été synthétisé sur une résine 2-CTC (313 mg, $\tau = 0,32$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Asn(Trt)-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,32 mmol/g. 400 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-50 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 58 mg de fragment cystéinyle ProG*(49-80) **33** pur ont été obtenus.

Rendement : 15 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 14,7$ min (Waters XSelect Peptide CSH C18 XP, 214 nm, 5-60 % B en 20 min)

ESI-HRMS : C₁₆₂H₂₃₄N₄₄O₅₈S₂ M_{mono} calculée : 3787,62 Da ; observée : 3787,62 Da

ProG*(1-48) **34**

H-SWKPRSQQPDAPLGTGC*NRDLELPWLEQQGPASHHRRQLGPQGPPLV-NHNH₂

La ProG*(1-48) **34** a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL **E** à partir de 11,4 mg (1,3 éq.) de fragment hydrazide ProG(1-16) **32** et 20 mg (1 éq.) de fragment cystéinyle hydrazide ProG*(17-48) **31**. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-50 % de B en 40 min et lyophilisation, 14,7 mg de ProG*(1-48) **34** pure ont été obtenus.

Rendement : 50 %

RP-HPLC : $t_R = 13,6$ min (Waters XSelect Peptide CSH C18 XP, 214 nm, 5-60 % B en 20 min)

ESI-HRMS : C₂₃₅H₃₆₆N₇₈O₆₇S M_{mono} calculée : 5384,74 Da ; observée : 5384,75 Da

ProG* linéaire 35

H-SWKPRSQQPDAPLGTGC*NRDLELPWLEQQGPASHHRRQLGPQGPPHLV-
C*DPSKKQGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN-OH

La ProG* linéaire 35 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL E à partir de 14,7 mg (1 éq.) de fragment hydrazide ProG*(1-48) 34 et 15,5 mg (1,5 éq.) de fragment cystéinyne ProG*(49-80) 33. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-50 % de B en 40 min et lyophilisation, 13,1 mg de ProG* linéaire 35 pure ont été obtenus.

Rendement : 52 %

RP-HPLC : t_R = 14,6 min (Waters XSelect Peptide CSH C18 XP, 214 nm, 5-60 % B en 20 min)

ESI-HRMS : $C_{397}H_{596}N_{120}O_{125}S_3$ M_{mono} calculée : 9140,31 Da ; observée : 9140,28 Da

ProG linéaire 36

H-SWKPRSQQPDAPLGTGANRDLELPWLEQQGPASHHRRQLGPQGPPHLV-
ADPSKKQGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN-OH

13,1 mg de ProG* linéaire 35 ont été dissout à une concentration de 5mM dans du tampon de NCL à pH 6,8 et le milieu placé sous atmosphère inerte avec 5 cycles vide-argon. 41 mg (100 éq.) de TCEP dans 300 μ L de tampon de NCL à pH 6,3, 20 μ L de *t*BuSH et 143 μ L d'une solution de VA-044 à 0,5 M dans H₂O (50éq.) ont successivement été ajoutés. La réaction a été agitée 4 h à 37°C sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel a été acidifié avec quelques gouttes d'acide formique et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-50 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 4,5 mg de ProG linéaire 36 pur ont été obtenus.

Rendement : 35 %

RP-HPLC : t_R = 14,7 min (Waters XSelect Peptide CSH C18 XP, 214 nm, 5-60 % B en 20 min)

ESI-HRMS : $C_{397}H_{596}N_{120}O_{125}S$ M_{mono} calculée : 9076,37 Da ; observée : 9076,41 Da

F. Fragment d'immunoglobuline E

Synthèse par SPPS du fragment hydrazide IgE(1-35) **37**

H-ADSNPRC(Mob)VSAYLSRPSFDLFIKSPITTC(Acm)LVVDL-NH₂

Le fragment hydrazide IgE(1-35) **37** a été synthétisé sur une résine 2-CTC (333 mg, $\tau = 0,30$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Leu-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,30 mmol/g. Les résidus Cys(Mob) et Cys(Acm) ont été introduits comme des résidus classiques à partir des composés commerciaux Fmoc-L-Cys(Mob)-OH et Fmoc-L-Cys(Acm)-OH. 465 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lyophilisation, et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 120 mg de fragment hydrazide IgE(1-35) **37** ont été obtenus.

Rendement : 29 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 10,8$ min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₈₄H₂₉₃N₄₉O₅₂S₂ M_{mono} calculée : 4085,12 Da ; observée : 4085,18 Da

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle hydrazide IgE*(36-48) **38**

H-C*PSKGTVNLTWSR-NH₂

Le fragment cystéinyle hydrazide IgE*(36-48) **38** a été synthétisé sur une résine 2-CTC (385 mg, $\tau = 0,26$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,26 mmol/g. 287 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lyophilisation, et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 94 mg de fragment cystéinyle hydrazide IgE*(36-48) **38** ont été obtenus.

Rendement : 64 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 6,8$ min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₆₂H₁₀₃N₂₁O₁₈S M_{mono} calculée : 1461,75 Da ; observée : 1461,75 Da

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle hydrazide IgE*(49-99) **39**

H-C*SGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGTRDWIEGETYQC(Acm)RVTHPHLPR-NH₂

Le fragment cystéinyle hydrazide IgE*(49-99) **39** a été synthétisé sur une résine 2-CTC (385 mg, $\tau = 0,26$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. La fonctionnalisation de la résine avec de l'hydrazine et le couplage du premier acide aminé (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) ont été réalisés manuellement sur la résine en suivant le protocole général **C**, donnant un taux de substitution de 0,26 mmol/g. Le résidu Cys(Acm) a été introduite comme un résidu classique à partir du composé commercial Fmoc-L-Cys(Acm)-OH. Les pseudoprolines ST et ET ont été introduites aux positions 25-26 et 38-39 comme des résidus classique en ne répétant le couplages que deux fois à partir des composés commerciaux Fmoc-Ser-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH et Fmoc-Glu-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH. 770 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lyophilisation, et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 124 mg de fragment cystéinyle hydrazide IgE*(49-99) **39** ont été obtenus.

Rendement : 21 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 7,5$ min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₂₅₀H₄₀₇N₈₃O₇₈S₂ M_{mono} calculée : 5883,99 Da ; observée : 5883,96 Da

Synthèse par SPPS du fragment cystéinyle IgE*(100-115) **40**

H-C*LMRSTTKTSGPRAAZ-OH (Z = Aha)

Le fragment cystéinyle IgE*(100-115) **40** a été synthétisé sur une résine 2-CTC (345 mg, $\tau = 0,29$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Aha-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,29 mmol/g. 226 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 90 mg de fragment cystéinyle IgE*(100-115) **40** pur ont été obtenus.

Rendement : 53 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 5,4$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₆₇H₁₂₀N₂₆O₂₂S₂ M_{mono} calculée : 1704,85 Da ; observée : 1704,85 Da

IgE*(1-48) 41

H-ADSNPRC(Mob)VSAYLSRSPFDLFIKRSPTITC(Acm)LVVDLC*PSKGTVNLTWSR-NH₂

IgE*(1-48) 41 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL E à partir de 61 mg (1 éq.) de fragment hydrazide IgE(1-35) 37 et 30,8 mg (1,3 éq.) de fragment cystéinyle hydrazide IgE*(36-48) 38. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min et lyophilisation, 25 mg d'IgE*(1-48) 41 pur ont été obtenus.

Rendement : 31 %

RP-HPLC : t_R = 10,2 min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₂₄₆H₃₉₂N₆₈O₇₀S₃ M_{mono} calculée : 5514,84 Da ; observée : 5514,80 Da

IgE*(1-99) 42

H-ADSNPRC(Mob)VSAYLSRSPFDLFIKRSPTITC(Acm)LVVDLC*PSKGTVNLTWSR-C*SGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGTTRDWIEGETYQC(Acm)RVTHPHLPR-NH₂

IgE*(1-99) 42 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL E à partir de 11 mg (1 éq.) de fragment hydrazide IgE*(1-48) 41 et 23,5 mg (2 éq.) de fragment cystéinyle hydrazide IgE*(49-99) 39. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min et lyophilisation, 5,7 mg d'IgE*(1-99) 42 pur ont été obtenus.

Rendement : 25 %

RP-HPLC : t_R = 9,6 min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₄₉₆H₇₉₅N₁₄₉O₁₄₈S₅ M_{mono} calculée : 11366,79 Da ; observée : 11366,63 Da

IgE*(Mob, Acm) linéaire 43

H-ADSNPRC(Mob)VSAYLSRSPFDLFIKRSPTITC(Acm)LVVDLC*PSKGTVNLTWSR-C*SGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGTTRDWIEGETYQC(Acm)RVTHPHLPR-C*LMRSTTKTSGPRAAZ-OH

L'IgE*(Mob, Acm) linéaire 43 a été obtenue par NCL en suivant le protocole général de NCL E à partir de 8,1 mg (1 éq.) de fragment hydrazide IgE*(1-99) 42 et 2,5 mg (2 éq.) de fragment cystéinyle IgE*(100-115) 40. La réaction de ligation a duré une nuit à température ambiante. Après purification par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 20-70 % de B en 30 min à 40°C et lyophilisation, 3,5 mg d'IgE*(Mob, Acm) linéaire 43 ont été obtenus.

RP-HPLC : t_R = 9,5 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₅₆₃H₉₁₁N₁₇₃O₁₇₀S₇ M_{mono} calculée : 13039,60 Da ; observée : 13042,53 Da ; 13016,46 Da ; 12999,43 Da (intensité des masses monoisotopiques trop faibles)

IgE(Mob, Acm) linéaire 44

H-ADSNPRC(Mob)VSAYLSRPSFDLFIKRSPTITC(Acm)LVVDLAPSKGTVNLTWSR-
ASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGTRDWIEGETYQC(Acm)RVTHPHLPR-
ALMRSTTKTSGPRAAZ-OH

3,5 mg d'IgE*(Mob, Acm) linéaire 43 et 7,7 mg (100 éq.) de TCEP ont été dissout dans 500 µL tampon de NCL à pH 6,8 et le milieu placé sous atmosphère inerte avec 5 cycles vide-argon. 10µL de tBuSH et 27 µL d'une solution de VA-044 à 0,5 M dans H₂O (50éq.) ont successivement été ajoutés. La réaction a été agitée une nuit à 37°C sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel a été acidifié avec quelques gouttes d'acide formique et purifié par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 30-70 % de B en 30 min à 40°C. Après lyophilisation, 1,5 mg d'IgE(Mob, Acm) linéaire 44 ont été obtenus.

RP-HPLC : t_R = 9,3 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₅₆₃H₉₁₁N₁₇₃O₁₇₀S₄ M_{mono} calculée : 12943,68 Da ; observée : 12944,73 Da et co-produits (intensité des masses monoisotopiques trop faibles)

IgE(Mob, S-S) 45

H-ADSNPRC(Mob)VSAYLSRPSFDLFIKRSPTITCLVVDLAPSKGTVNLTWSR-
ASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGTRDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRSTTKTSGPRAAZ-OH

1 pont disulfure C30-C90

2,1 mg d'IgE(Mob, Acm) linéaire 44 ont été dissous dans 20 mL d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 2 contenant 2 M de Gn.HCl. 18 µL (1éq.) de I₂ à 10 mM dans CH₃CN ont été ajoutés toutes les 5 min pendant 15 min, soit 4 ajouts. 5 min après le dernier ajout, une pointe de spatule d'ascorbate de sodium a été ajoutée, puis le milieu a été filtré et purifié par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 20-70 % de B en 30 min à 40°C. Après lyophilisation, 1,4 mg d'IgE(Mob, S-S) 45 ont été obtenus.

RP-HPLC : t_R = 9,3 min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₅₅₇H₈₉₉N₁₇₁O₁₆₈S₄ M_{mono} calculée : 12799,59 Da ; observée : 12802,78 Da et co-produits (intensité des masses monoisotopiques trop faibles)

IgE(S-S) 46

H-ADSNPRCVSAYLSRPSPFDLFIKRSPTITCLVVDLAPSKGTVNLTWSR-
ASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGTRDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRSTTKTSGPRAAZ-OH

1 pont disulfure C30-C90

5,5 mg d'IgE(Mob, S-S) 45 ont été dissous dans 900µL d'une solution TFA/phénol 8:1 à 0°C, puis 100µL de TFMSA ont été ajoutés. Le milieu réactionnel a été agité 10 min à 0°C, puis le peptide a été précipité par ajout de 40 mL d'Et₂O à 4°C. Le milieu a été centrifugé et le culot lavé avec 2 fois 30 mL d'Et₂O. Après évaporation des traces d'Et₂O, 2,7 mg d'IgE(S-S) 46 ont été obtenus.

RP-HPLC : t_R = 9,3 min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₅₄₉H₈₉₁N₁₇₁O₁₆₇S₄ M_{mono} calculée : 12679,54 Da ; observée : 12654,52 Da (azoture du Aha réduit en amine, intensité des masses monoisotopiques trop faibles) et co-produits

IgE(BMOE, S-S) 47

H-ADSNPRC(BMOE)VSAYLSRPSPFDLFIKRSPTITCLVVDLAPSKGTVNLTWSR-
ASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGTRDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRSTTKTSGPRAAZ-OH

1,4 mg d'IgE(S-S) 46 ont été dissous dans 10,9 µL de bismaléimidoéthane à 5mM dans le DMF et le milieu a été dilué à une concentration finale en peptide de 1 µM avec du tampon de NCL à pH 5. Après 2 h d'agitation, le milieu a été purifié par RP-HPLC semi préparative avec un gradient 20-70 % de B en 30 min à 40°C. Après lyophilisation, 1mg d'IgE(BMOE, S-S) 47 a été obtenu.

RP-HPLC : t_R = 9,3 min (pic large, AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₅₅₉H₈₉₉N₁₇₃O₁₇₁S₄ M_{mono} calculée : 12899,59 Da ; observée : 12873,43 Da (azoture du Aha réduit en amine) et co-produits

G. Formation dirigée de ponts disulfures

Synthèse par SPPS de la NMB-1(SH_{1,4} ; SAcm_{2,3}) **48**

H-FNWRCC(Acm)LIPC(Acm)RRNHKKFFC-NH₂

la NMB-1(SH_{1,4} ; SAcm_{2,3}) **48** a été synthétisée sur une résine 2-CTC (323 mg, $\tau = 0,31$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le *linker* Fmoc-RAM-OH a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **B**, donnant un taux de substitution de 0,31 mmol/g. Les résidus Cys(Acm) ont été introduits comme des résidus classiques en ne répétant le couplage que deux fois à partir du composé commercial Fmoc-L-Cys(Acm)-OH. 240 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 92 mg de NMB-1(SH_{1,4} ; SAcm_{2,3}) **48** pure ont été obtenus.

Rendement : 35 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 7,6$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₁₇H₁₇₈N₃₈O₂₃S₄ M_{mono} calculée : 2611,28 Da ; observée : 2611,30 Da

Synthèse par SPPS de la NMB-1(SH_{1,4} ; SMob_{2,3}) **49**

H-FNWRCC(Mob)LIPC(Mob)RRNHKKFFC-NH₂

La NMB-1(SH_{1,4} ; SMob_{2,3}) **49** a été synthétisée sur une résine 2-CTC (323 mg, $\tau = 0,31$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D** à une échelle 0,05 mmol. Le *linker* Fmoc-RAM-OH a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **B**, donnant un taux de substitution de 0,31 mmol/g. Les résidus Cys(Mob) ont été introduits comme des résidus classiques en ne répétant le couplage que deux fois à partir du composé commercial Fmoc-L-Cys(Mob)-OH. 100 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 29,5 mg de NMB-1(SH_{1,4} ; SMob_{2,3}) **49** pure ont été obtenus.

Rendement : 22 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : $t_R = 9,2$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₂₇H₁₈₄N₃₆O₂₃S₄ M_{mono} calculée : 2709,32 Da ; observée : 2709,31 Da

NMB-1(SS_{1,4}; SAc_{m2,3}) 50

10 mg de NMB-1(SH_{1,4}; SAc_{m2,3}) **48** ont été dissous dans 1 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés goutte-à-goutte sous agitation à 100 mL d'une solution à 0,1 M de Tris à pH 8,2 contenant 20 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl. Après une nuit d'agitation, le milieu a été acidifié avec 1 mL d'acide formique, filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 7,6 mg de NMB-1(SS_{1,4}; SAc_{m2,3}) **50** pure ont été obtenus.

Rendement : 76 %

RP-HPLC : t_R = 7,5 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₁₇H₁₇₆N₃₈O₂₃S₄ M_{mono} calculée : 2609,27 Da ; observée : 2609,23 Da

NMB-1 repliée 51

- A partir de NMB-1(SS_{1,4}; SAc_{m2,3}) **50** :

7,6 mg de NMB-1(SS_{1,4}; SAc_{m2,3}) **50** ont été dissous dans 1 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés à 80 mL d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 2 contenant 2 M de Gn.HCl. 291 µL (1éq.) de I₂ à 10 mM dans CH₃CN ont été ajoutés toutes les 5 min pendant 15 min, soit 4 ajouts. 5 min après le dernier ajout, plusieurs pointes de spatule d'ascorbate de sodium ont été ajoutées jusqu'à décoloration totale du milieu réactionnel, puis le milieu a été filtré et purifié par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 10-50 % de B en 30 min à 40°C. Après lyophilisation, 4,6 mg de NMB-1 repliée **51** pure ont été obtenus.

Rendement : 64 %

RP-HPLC : t_R = 7,6 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₁₁H₁₆₄N₃₆O₂₁S₄ M_{mono} calculée : 2465,17 Da ; observée : 2465,17 Da

- A partir de NMB-1(SH_{1,4}; SAc_{m2,3}) **48** :

10 mg de NMB-1(SH_{1,4}; SAc_{m2,3}) **48** ont été dissous dans 1 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés goutte-à-goutte sous agitation à 100 mL d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 7 contenant 5 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl. Après une nuit d'agitation, la formation du premier pont a été confirmée par analyse ESI-HRMS, puis le milieu a été acidifié à pH 2 avec une solution de HCl à 1 M. 383 µL (1éq.) de I₂ à 10 mM dans CH₃CN ont été ajoutés toutes les 5 min pendant 15 min, soit 4 ajouts. 5 min après le dernier ajout, plusieurs pointes de spatule d'ascorbate de sodium ont été ajoutées jusqu'à décoloration totale du milieu réactionnel, puis le milieu a été filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 5,4 mg de NMB-1 repliée **51** pure ont été obtenus.

Rendement : 57 %

RP-HPLC : t_R = 7,6 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₁₁H₁₆₄N₃₆O₂₁S₄ M_{mono} calculée : 2465,17 Da ; observée : 2465,18 Da

- A partir de NMB-1(SS_{1,4}; SMob_{2,3}) **52** :

5,1 mg de NMB-1(SS_{1,4}; SMob_{2,3}) **52** ont été dissous dans 900 µL d'une solution TFA/phénol 8:1 à 0°C, puis 100µL de TFMSA ont été ajoutés. Le milieu réactionnel a été agité 10 min à 0°C, puis le peptide a été précipité par ajout de 40 mL d'Et₂O à 4°C. Le milieu a été centrifugé et le culot lavé avec 2 fois avec 30 mL d'Et₂O. Après évaporation des traces d'Et₂O, le culot a été dissous dans 1 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés sous agitation à 50 mL d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 2 contenant 20 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl. Après une nuit d'agitation, le milieu a été acidifié avec 1 mL d'acide formique, filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 4,7 mg de NMB-1 repliée **51** pure ont été obtenus.

Rendement : quantitatif

RP-HPLC : t_R = 7,6 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₁₁H₁₆₄N₃₆O₂₁S₄ M_{mono} calculée : 2465,17 Da ; observée : 2465,17 Da

- A partir de NMB-1(SS_{1,4}; SHmb^{on}_{2,3}) **69**

4,6 mg de NMB-1(SS_{1,4}; SHmb^{on}_{2,3}) **69** ont été dissous dans 1 mL d'une solution TFA/*i*Pr₃SiH/1,3-diméthoxybenzène/2,2'-(éthylènedioxy)diéthanethiol/H₂O 85:2,5:3,75:3,75:5 et agités pendant 2 h à température ambiante, puis le peptide a été précipité par ajout de 40 mL d'Et₂O à 4°C. Le milieu a été centrifugé et le culot lavé avec 2 fois avec 30 mL d'Et₂O. Après évaporation des traces d'Et₂O, le culot a été dissous dans 1 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés sous agitation à 50 mL d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 2 contenant 20 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl. Après une nuit d'agitation, le milieu a été acidifié avec 1 mL d'acide formique, filtré et purifié par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 20-70 % de B en 30 min. Après lyophilisation, 1,7 mg de NMB-1 repliée **51** pure ont été obtenus.

Rendement : 41 %

RP-HPLC : t_R = 19,9 min (AdvanceBio Peptide C18 25 cm, 214 nm, 15-65 % B en 25 min)

ESI-HRMS : C₁₁₁H₁₆₄N₃₆O₂₁S₄ M_{mono} calculée : 2465,17 Da ; observée : 2465,17 Da

NMB-1(SS_{1,4}; SMob_{2,3}) **52**

10 mg de NMB-1(SH_{1,4}; Mob_{2,3}) **49** ont été dissous dans 1 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés goutte-à-goutte sous agitation à 100 mL d'une solution à 0,1 M de Tris à pH 8,2 contenant 20 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl. Après une nuit d'agitation, le milieu a été acidifié avec 1 mL d'acide formique, filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 5,1 mg de NMB-1(SS_{1,4}; SMob_{2,3}) **50** pure ont été obtenus.

Rendement : 51 %

RP-HPLC : t_R = 9,1 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₂₇H₁₈₂N₃₆O₂₃S₄ M_{mono} calculée : 2707,31 Da ; observée : 2707,30 Da

Synthèse par SPPS de la SGTx1(SH_{1,4} ; SAc_{m2,5} ; SMob_{3,6}) 53

H-TCRYLFGGC(Acm)KTTADC(Mob)CKHLAC(Acm)RSDGKYC(Mob)AWDGTF-OH

La SGTx1(SH_{1,4} ; SAc_{m2,5} ; SMob_{3,6}) 53 a été synthétisée sur une résine 2-CTC (357 mg, $\tau = 0,28$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Phe-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,28 mmol/g. Les résidus Cys(Acm) et Cys(Mob) ont été introduits comme des résidus classiques en ne répétant le couplage que deux fois à partir des composés commerciaux Fmoc-L-Cys(Acm)-OH et Fmoc-L-Cys(Mob)-OH, respectivement. Les deux motifs DG en positions 24-25 et 31-32 ont été introduit par couplage du composé commercial Fmoc-Asp(OtBu)-N(Dmb)Gly-OH comme des résidus classiques en ne répétant le couplage que deux fois. 490 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O.

RP-HPLC : $t_R = 10,6$ min (Chromolith® High Resolution RP-18e, 214 nm, 5-60 % B en 15 min)

ESI-HRMS : C₁₈₃H₂₆₈N₄₈O₅₂S₆ M_{mono} calculée : 4161,81 Da ; observée : 4161,84 Da

SGTx1(SS_{1,4} ; SAc_{m2,5} ; SMob_{3,6}) 54

100 mg de SGTx1(SH_{1,4} ; SAc_{m2,5} ; SMob_{3,6}) 53 ont été dissous dans 2 mL de TFA après addition d'une goutte d'eau, puis le milieu a été dilué avec 10mL d'une solution de Gn.HCl à 6M et ajoutés goutte-à-goutte sous agitation à 1 L d'une solution à 0,1 M de Tris à pH 8,2 contenant 10 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl, et le pH a été réajusté à 8 avec une solution de NaOH 6 M. Après une nuit d'agitation, le milieu a été acidifié avec 5 mL d'acide formique, filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 15,8 mg de SGTx1(SS_{1,4} ; SAc_{m2,5} ; SMob_{3,6}) 54 pure ont été obtenus.

Rendement : 16 % basé sur le taux de chargement de la résine utilisée pour la synthèse

RP-HPLC : $t_R = 8,5$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₈₃H₂₆₆N₄₈O₅₂S₆ M_{mono} calculée : 4159,80 Da ; observée : 4159,82 Da

SGTx1(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) 55

- A partir de SGTx1(SS_{1,4} ; SAc_{m2,5} ; SMob_{3,6}) 54

41,8 mg de SGTx1(SS_{1,4} ; SAc_{m2,5} ; SMob_{3,6}) 54 ont été dissous dans 4 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés à 420 mL d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 2 contenant 2 M de Gn.HCl. 1 mL (1éq.) de I₂ à 10 mM dans CH₃CN ont été ajoutés toutes les 5 min pendant 15 min, soit 4 ajouts. 5 min après le dernier ajout, plusieurs pointes de spatule d'ascorbate de sodium ont été ajoutées jusqu'à décoloration totale du milieu réactionnel, puis le milieu a été filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 8,0 mg de SGTx1(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) 55 pure ont été obtenus.

Rendement : 20 %

RP-HPLC : $t_R = 8,3$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₇₇H₂₅₄N₄₆O₅₀S₆ M_{mono} calculée : 4015,71 Da ; observée : 4015,73 Da

- A partir de SGTx1(SH_{1,4}; SAc_{m2,5}; SMob_{3,6}) **53**

410 mg de SGTx1(SH_{1,4}; SAc_{m2,5}; SMob_{3,6}) **53** ont été dissous dans 4 mL de TFA après addition d'une goutte d'eau, puis le milieu a été dilué avec 30 mL d'une solution de Gn.HCl à 6 M et ajoutés goutte-à-goutte sous agitation à 2 L d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 7 contenant 10 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl, et le pH réajusté à 7 avec une solution de NaOH 6 M. Après une nuit d'agitation, la formation du premier pont a été confirmée par analyse ESI-HRMS, puis le milieu a été acidifié à pH 2 avec une solution de HCl à 1 M. 2 mL (1éq.) de I₂ à 50 mM dans CH₃CN ont été ajoutés toutes les 5 min pendant 15 min, soit 4 ajouts. 5 min après le dernier ajout, plusieurs pointes de spatule d'ascorbate de sodium ont été ajoutées jusqu'à décoloration totale du milieu réactionnel, puis le milieu a été filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 77 mg de SGTx1(SS_{1,4}; SS_{2,5}; SMob_{3,6}) **55** pure ont été obtenus.

Rendement : 19 % basé sur le taux de chargement de la résine utilisée pour la synthèse

RP-HPLC : t_R = 8,3 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₇₇H₂₅₄N₄₆O₅₀S₆ M_{mono} calculée : 4015,71 Da ; observée : 4015,73 Da

SGTx1 repliée **56**

10 mg de SGTx1(SS_{1,4}; SAc_{m2,5}; SMob_{3,6}) **54** ont été dissous dans 1,8 mL d'une solution TFA/phénol 8:1 à 0°C, puis 200 µL de TFMSA ont été ajoutés. Le milieu réactionnel a été agité 10 min à 0°C, puis le peptide a été précipité par ajout de 40 mL d'Et₂O à 4°C. Le milieu a été centrifugé et le culot lavé avec 2 fois avec 30 mL d'Et₂O. Après évaporation des traces d'Et₂O, le culot a été dissous dans 1 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés sous agitation à 100 mL d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 2 contenant 10 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl. Après 48 h d'agitation, le milieu a été acidifié avec 1 mL d'acide formique, filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 1,3 mg de SGTx1 repliée **56** pure ont été obtenus.

Rendement : 14 %

RP-HPLC : t_R = 8,3 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₆₁H₂₃₆N₄₆O₄₈S₆ M_{mono} calculée : 3773,58 Da ; observée : 3773,60 Da

Synthèse par SPPS de la PhITx1 linéaire 57

H-ACLGQWDSCDPKASKCCPNYACEWKYPWCRYKLF-OH

La PhITx1 linéaire 57 a été synthétisée sur une résine 2-CTC (357 mg, $\tau = 0,28$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Phe-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,28 mmol/g. 454 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 38 mg de PhITx1 linéaire 57 pure ont été obtenus.

Rendement : 7% basé sur le taux de substitution de la résine

RP-HPLC : $t_R = 8,5$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₈₃H₂₆₀N₄₆O₄₈S₆ M_{mono} calculée : 4061,76 Da ; observée : 4061,79 Da

PhITx1 repliée 58

- A partir de PhITx1 linéaire 57

30 mg de PhITx1 linéaire 57 ont été dissous dans 3 mL d'H₂O et ajoutés goutte-à-goutte sous agitation dans 300 mL d'un tampon 0,1 M Tris.HCl à pH 8,4 contenant 5 mM de GSH, 0,5 mM de GSSG et 2 M de Gn.HCl. Après agitation douce pendant 72 h à température ambiante, le milieu a été acidifié avec 1 mL d'acide formique, filtré, et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 40 min. La pureté n'étant pas satisfaisante, les fractions collectées ont été de nouveau purifiées par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 10-50 % de B en 30 min à 40°C. Après lyophilisation, 0.8 mg de PhITx1 repliée 58 ont été obtenus.

Rendement : 3 %

RP-HPLC : $t_R = 8,1$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 15-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₈₃H₂₅₄N₄₆O₄₈S₆ M_{mono} calculée : 4055,72 Da ; observée : 4055,74 Da

- A partir de PhITx1(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) 60

110 mg de PhITx1(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) 60 ont été dissous dans 19,8 mL d'une solution TFA/phénol 8:1 à 0°C, puis 2,2 mL de TFMSA ont été ajoutés. Le milieu réactionnel a été agité 10 min à 0°C, puis le peptide a été précipité par ajout de 80 mL d'Et₂O à 4°C. Le milieu a été centrifugé et le culot lavé avec 2 fois avec 30 mL d'Et₂O. Après évaporation des traces d'Et₂O, le culot a été dissous dans 10 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés sous agitation à 1,1 L d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 2 contenant 15 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl. Après 48 h d'agitation, le milieu a été acidifié avec 3 mL d'acide formique, filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 40 min. La pureté n'étant pas satisfaisante, les fractions collectées ont été de nouveau purifiées par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 20-50 % de B en 30 min. Après lyophilisation, 3,6 mg de PhITx1 repliée 58 pure ont été obtenus.

Rendement : 3 %

RP-HPLC : $t_R = 8,1$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₈₃H₂₅₄N₄₆O₄₈S₆ M_{mono} calculée : 4055,72 Da ; observée : 4055,73 Da

Synthèse par SPPS de la PhITx1(SAcm_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) 59

H-AC(Acm)LGQWDSCDPKASKC(Mob)C(Acm)PNYACEWKYPWC(Mob)RYKLF-OH

La PhITx1(SAcm_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) 59 a été synthétisée sur une résine 2-CTC (357 mg, $\tau = 0,28$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Phe-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,28 mmol/g. Les résidus Cys(Acm) et Cys(Mob) ont été introduits comme des résidus classiques en ne répétant le couplage que deux fois à partir des composés commerciaux Fmoc-L-Cys(Acm)-OH et Fmoc-L-Cys(Mob)-OH, respectivement. 487 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O.

RP-HPLC : $t_R = 11,2$ min (Chromolith® High Resolution RP-18e, 214 nm, 5-60 % B en 15 min)

ESI-HRMS : C₂₀₅H₂₈₆N₄₈O₅₂S₆ M_{mono} calculée : 4443,95 Da ; observée : 4443,97 Da

PhITx1(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) 60

220 mg de PhITx1(SAcm_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) 59 ont été dissous dans 20 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés goutte-à-goutte sous agitation à 2 L d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 7 contenant 10 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl. Après une nuit d'agitation, la formation du premier pont a été confirmée par analyse ESI-HRMS, puis le milieu a été acidifié à pH 2 avec une solution de HCl à 1 M. 0,5 mL (1éq.) de I₂ à 50 mM dans CH₃CN ont été ajoutés toutes les 5 min pendant 20 min, soit 5 ajouts. 5 min après le dernier ajout, plusieurs pointes de spatule d'ascorbate de sodium ont été ajoutées jusqu'à décoloration totale du milieu réactionnel, puis le milieu a été filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 100 mg de PhITx1(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) 60 pure ont été obtenus.

Rendement : 47 % basé sur le taux de chargement de la résine utilisée pour la synthèse

RP-HPLC : $t_R = 9,2$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₉₉H₂₇₂N₄₆O₅₀S₆ M_{mono} calculée : 4297,85 Da ; observée : 4297,85 Da

Synthèse par SPPS de la Hm1a(SAcm_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) 61

H-EC(Acm)RYLFGGCSSTSDC(Mob)C(Acm)KHLSCRSDWKYC(Mob)AWDGTFS-OH

La Hm1a(SAcm_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) 61 a été synthétisée sur une résine 2-CTC (286 mg, $\tau = 0,35$ mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Ser(OtBu)-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,35 mmol/g. Les résidus Cys(Acm) et Cys(Mob) ont été introduits comme des résidus classiques en ne répétant le couplage que deux fois à partir des composés commerciaux Fmoc-L-Cys(Acm)-OH et Fmoc-L-Cys(Mob)-OH, respectivement. Le motif DG en position 31-32 a été introduit par couplage du composé commercial Fmoc-Asp(OtBu)-N(Dmb)Gly-OH comme un résidu classique en ne répétant le couplage que deux fois. Le motif SS en position 10-11 a été introduit par couplage du composé commercial Fmoc-Ser-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH comme un résidu classique en ne répétant le couplage que deux fois. 512 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O.

RP-HPLC : $t_R = 10,7$ min (Chromolith® High Resolution RP-18e, 214 nm, 5-60 % B en 15 min)

ESI-HRMS : C₁₉₂H₂₇₁N₄₉O₅₈S₆ M_{mono} calculée : 4382,81 Da ; observée : 4382,83 Da

Hm1a(SAcm_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) 62

440 mg de Hm1a(SAcm_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) 61 ont été dissous dans 4 mL de TFA après addition d'une goutte d'eau, puis le milieu a été dilué avec 30mL d'une solution de Gn.HCl à 6M et ajoutés goutte-à-goutte sous agitation à 1 L d'une solution à 0,1 M de Tris à pH 8,2 contenant 20 %v/v de DMSO, 30%v/v de CH₃CN et 4,6 M de Gn.HCl, et le pH a été réajusté à 8 avec une solution de NaOH 6 M. Après une nuit d'agitation, le milieu a été acidifié avec 5 mL d'acide formique, filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 112 mg de Hm1a(SAcm_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) 62 pure ont été obtenus.

Rendement : 26 % basé sur le taux de chargement de la résine utilisée pour la synthèse

RP-HPLC : $t_R = 8,6$ min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₉₂H₂₆₉N₄₉O₅₈S₆ M_{mono} calculée : 4380,80 Da ; observée : 4380,77 Da

Hm1a(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) 63

112 mg de Hm1a(SAcm_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) 62 ont été dissous dans 10 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés à 1,1 L d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 2 contenant 2 M de Gn.HCl. 2,56 mL (1éq.) de I₂ à 10 mM dans CH₃CN ont été ajoutés toutes les 5 min pendant 15 min, soit 4 ajouts. 5 min après le dernier ajout, plusieurs pointes de spatule d'ascorbate de sodium ont été ajoutées jusqu'à décoloration totale du milieu réactionnel, puis le milieu a été filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 45 mg de Hm1a(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) 63 pure ont été obtenus.

Rendement : 42 %

RP-HPLC : t_R = 8,9 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₈₆H₂₅₇N₄₇O₅₆S₆ M_{mono} calculée : 4236,70 Da ; observée : 4236,69 Da

Hm1a repliée 64

45 mg de Hm1a(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) 63 ont été dissous dans 8,1 mL d'une solution TFA/phénol 8:1 à 0°C, puis 900 µL de TFMSA ont été ajoutés. Le milieu réactionnel a été agité 10 min à 0°C, puis le peptide a été précipité par ajout de 40 mL d'Et₂O à 4°C. Le milieu a été centrifugé et le culot lavé avec 2 fois avec 30 mL d'Et₂O. Après évaporation des traces d'Et₂O, le culot a été dissous dans 4 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés sous agitation à 450 mL d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 2 contenant 20 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl. Après 48 h d'agitation, le milieu a été acidifié avec 3 mL d'acide formique, filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-50 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 5,6 mg de Hm1a repliée 64 pure ont été obtenus.

Rendement : 13 %

RP-HPLC : t_R = 10,4 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min, 30°C)

ESI-HRMS : C₁₇₀H₂₃₉N₄₇O₅₄S₆ M_{mono} calculée : 3994,57 Da ; observée : 3994,57 Da

Synthèse par SPPS de l'HaTx1(SAcm_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) 65

H-EC(Acm)RYLFGGCKTTSDC(Mob)C(Acm)KHLGCKFRDKYC(Mob)AWDFTF-S-OH

L'HaTx1(SAcm_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) 65 a été synthétisée sur une résine 2-CTC (286 mg, τ = 0,35 mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D**. Le premier acide aminé (Fmoc-Ser(OtBu)-OH) a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **A**, donnant un taux de substitution de 0,35 mmol/g. Les résidus Cys(Acm) et Cys(Mob) ont été introduits comme des résidus classiques en ne répétant le couplage que deux fois à partir des composés commerciaux Fmoc-L-Cys(Acm)-OH et Fmoc-L-Cys(Mob)-OH, respectivement. 487 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O.

RP-HPLC : t_R = 10,8 min (Chromolith® High Resolution RP-18e, 214 nm, 5-60 % B en 15 min)

ESI-HRMS : C₂₀₃H₂₉₀N₅₀O₅₅S₆ M_{mono} calculée : 4499,98 Da ; observée : 4500,01 Da

HaTx1(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) **66**

450 mg d'HaTx1(SAcm_{1,4} ; SH_{2,5} ; SMob_{3,6}) **65** ont été dissous dans 4 mL de TFA après addition d'une goutte d'eau, puis le milieu a été dilué avec 30 mL d'une solution de Gn.HCl à 6M et ajoutés goutte-à-goutte sous agitation à 2 L d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 7,5 contenant 10 %v/v de DMSO, 10 %v/v de CH₃CN et 2 M de Gn.HCl. Après une nuit d'agitation, la formation du premier pont a été confirmée par analyse ESI-HRMS, puis le milieu a été acidifié à pH 1,5 avec une solution de HCl à 1 M. 2 mL (1éq.) de I₂ à 50 mM dans CH₃CN ont été ajoutés toutes les 5 min pendant 25 min, soit 6 ajouts. 25 min après le dernier ajout, plusieurs pointes de spatule d'ascorbate de sodium ont été ajoutées jusqu'à décoloration totale du milieu réactionnel, puis le milieu a été filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 81 mg d'HaTx1(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) **66** pure ont été obtenus.

Rendement : 19 % basé sur le taux de chargement de la résine utilisée pour la synthèse

RP-HPLC : t_R = 8,8 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₉₇H₂₇₆N₄₈O₅₃S₆ M_{mono} calculée : 4353,87 Da ; observée : 4353,89 Da

HaTx1 repliée **67**

81 mg de HaTx1(SS_{1,4} ; SS_{2,5} ; SMob_{3,6}) **66** ont été dissous dans 14,4 mL d'une solution TFA/phénol 8:1 à 0°C, puis 1,6 mL de TFMSA ont été ajoutés. Le milieu réactionnel a été agité 10 min à 0°C, puis le peptide a été précipité par ajout de 80 mL d'Et₂O à 4°C. Le milieu a été centrifugé et le culot lavé avec 2 fois avec 30 mL d'Et₂O. Après évaporation des traces d'Et₂O, le culot a été dissous dans 8 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés sous agitation à 800 mL d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 2 contenant 10 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl. Après 48 h d'agitation, le milieu a été acidifié avec 3 mL d'acide formique, filtré et purifié par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. La pureté n'étant pas satisfaisante, les fractions collectées ont été de nouveau purifiées par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-50 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 3,3 mg de HaTx1 repliée **67** pure ont été obtenus.

Rendement : 4 %

RP-HPLC : t_R = 10,4 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 1-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₈₁H₂₅₈N₄₈O₅₁S₆ M_{mono} calculée : 4111,74 Da ; observée : 4111,76 Da

Synthèse par SPPS de la NMB-1(SH_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **68**

H-FNWRCC(Hmb^{off})LIPC(Hmb^{off})RRNHKKFFC-NH₂

La NMB-1(SH_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **68** a été synthétisée sur une résine 2-CTC (323 mg, τ = 0,31 mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D** à une échelle 0,05 mmol. Le *linker* Fmoc-RAM-OH a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **B**, donnant un taux de substitution de 0,31 mmol/g. Les résidus Cys(Hmb^{off}) ont été introduits comme des résidus classiques en ne répétant le couplage que deux fois à partir du composé Fmoc-L-Cys(Hmb^{off})-OH. 295 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 20 mg de NMB-1(SH_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **68** pure ont été obtenus.

Rendement : 7 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : t_R = 8,3 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₃₇H₂₀₄N₄₀O₂₇S₄ M_{mono} calculée : 2969,47 Da ; observée : 2969,51 Da

NMB-1(SS_{1,4} ; SHmb^{on}_{2,3}) **69**

- A partir de NMB-1(SH_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **68**

2,5 mg de NMB-1(SH_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **68** ont été dissous dans 1 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés goutte-à-goutte sous agitation à 100 mL d'une solution à 0,1 M de Tris à pH 8,2 contenant 20 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl. Après une nuit d'agitation, le milieu a été acidifié avec 1 mL d'acide formique, filtré et purifié par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 20-70 % de B en 30 min. Après lyophilisation, 1,5 mg de NMB-1(SS_{1,4} ; SAc_m_{2,3}) **50** pure ont été obtenus.

Rendement : 65 %

RP-HPLC : t_R = 22,0 min (AdvanceBio Peptide C18 25 cm, 214 nm, 15-65 % B en 25 min)

ESI-HRMS : C₁₂₇H₁₈₂N₃₆O₂₅S₄ M_{mono} calculée : 2739,30 Da ; observée : 2739,33 Da

- A partir de NMB-1(SMob_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **71**

5 mg de NMB-1(SMob_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **71** ont été dissous dans 900 µL d'une solution TFA/phénol 8:1 à 0°C, puis 100 µL de TFMSA ont été ajoutés. Le milieu réactionnel a été agité 10 min à 0°C, puis le peptide a été précipité par ajout de 40 mL d'Et₂O à 4°C. Le milieu a été centrifugé et le culot lavé avec 2 fois avec 30 mL d'Et₂O. Après évaporation des traces d'Et₂O, le culot a été dissous dans 1 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés sous agitation à 50 mL d'une solution à 0,1 M de Tris à pH 8,2 contenant 10 %v/v de DMSO et 2 M de Gn.HCl. Après 24 h d'agitation, le milieu a été acidifié avec 2 mL d'acide formique, filtré et purifié par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 20-50 % de B en 30 min à 40°C. Après lyophilisation, 0,4 mg de NMB-1(SS_{1,4} ; SHmb^{on}_{2,3}) **69** pure ont été obtenus.

Rendement : 4 %

RP-HPLC : t_R = 8,5 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 1-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₂₇H₁₈₂N₃₆O₂₅S₄ M_{mono} calculée : 2739,30 Da ; observée : 2739,31 Da

Synthèse par SPPS de la NMB-1(SAcm_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **70**

H-FNWRC(Acm)C(Hmb^{off})LIPC(Hmb^{off})RRNHKKFFC(Acm)-NH₂

La NMB-1(SH_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **70** a été synthétisée sur une résine 2-CTC (323 mg, τ = 0,31 mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D** à une échelle 0,05 mmol. Le *linker* Fmoc-RAM-OH a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **B**, donnant un taux de substitution de 0,31 mmol/g. Les résidus Cys(Hmb^{off}) et Cys(Acm) ont été introduits comme des résidus classiques en ne répétant le couplage que deux fois à partir des composés Fmoc-L-Cys(Hmb^{off})-OH et Fmoc-L-Cys(Mob)-OH. 262 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 10-60 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 15 mg de NMB-1(SAcm_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **70** pure ont été obtenus.

Rendement : 10 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : t_R = 7,7 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₄₃H₂₁₄N₄₂O₂₉S₄ M_{mono} calculée : 3111,54 Da ; observée : 3111,56 Da

Synthèse par SPPS de la NMB-1(SMob_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **71**

H-FNWRC(Mob)C(Hmb^{off})LIPC(Hmb^{off})RRNHKKFFC(Mob)-NH₂

La NMB-1(SMob_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **71** a été synthétisée sur une résine 2-CTC (323 mg, τ = 0,31 mmol/g) en suivant le protocole général de synthèse par SPPS **D** à une échelle 0,05 mmol. Le *linker* Fmoc-RAM-OH a été accroché manuellement sur la résine en suivant le protocole général **B**, donnant un taux de substitution de 0,31 mmol/g. Les résidus Cys(Hmb^{off}) et Cys(Mob) ont été introduits comme des résidus classiques en ne répétant le couplage que deux fois à partir des composés Fmoc-L-Cys(Hmb^{off})-OH et Fmoc-L-Cys(Mob)-OH. 140 mg de peptide brut ont été obtenus après précipitation et lavages avec Et₂O et purifiés par RP-HPLC préparative avec un gradient 20-70 % de B en 40 min. Après lyophilisation, 15 mg de NMB-1(SMob_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **71** pure ont été obtenus.

Rendement : 9 % basé sur le taux de chargement de la résine.

RP-HPLC : t_R = 8,9 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₅₃H₂₂₀N₄₀O₂₉S₄ M_{mono} calculée : 3209,59 Da ; observée : 3209,60 Da

NMB-1(SS_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) 72

5,4 mg de NMB-1(SAc_m_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **70** ont été dissous dans 1 mL de H₂O/CH₃CN 50:50 et ajoutés à 50 mL d'une solution à 0,1 M d'acide citrique à pH 2 contenant 2 M de Gn.HCl. 162 µL (1éq.) de I₂ à 10 mM dans CH₃CN ont été ajoutés toutes les 5 min pendant 15 min, soit 4 ajouts. 5 min après le dernier ajout, plusieurs pointes de spatule d'ascorbate de sodium ont été ajoutées jusqu'à décoloration totale du milieu réactionnel, puis le milieu a été filtré et purifié par RP-HPLC semi-préparative avec un gradient 10-50 % de B en 30 min à 40°C. Après lyophilisation, 2,9 mg de NMB-1(SS_{1,4} ; SHmb^{off}_{2,3}) **72** pure ont été obtenus.

Rendement : 56 %

RP-HPLC : t_R = 7,7 min (AdvanceBio Peptide C18 10 cm, 214 nm, 5-65 % B en 12 min)

ESI-HRMS : C₁₃₇H₂₀₂N₄₀O₂₇S₄ M_{mono} calculée : 2967,45 Da ; observée : 2967,48 Da

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ¹ Ho, B.; Baryshnikova, A.; Brown, G. W., Unification of Protein Abundance Datasets Yields a Quantitative *Saccharomyces cerevisiae* Proteome. *Cell Syst* **2018**, *6* (2), 192-205 e3.
- ² Banting, F. G.; Best, C. H.; Collip, J. B.; Campbell, W. R.; Fletcher, A. A., Pancreatic Extracts in The Treatment of Diabetes Mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* **1922**, *12* (3), 141-146.
- ³ Collip, J. B.; Anderson, E.; Thomson, D. L., The Adrenotropic Hormone of the Anterior Pituitary Lobe. *The Lancet* **1933**, *222* (5737), 347-348.
- ⁴ Edman, P.; Högfeltdt, E.; Sillén, L. G.; Kinell, P.-O., Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *Acta Chemica Scandinavica* **1950**, *4*, 283-293.
- ⁵ Du Vigneaud, V.; Ressler, C.; Swan, C. J. M.; Roberts, C. W.; Katsoyannis, P. G.; Gordon, S., The Synthesis of an Octapeptide Amide with the Hormonal Activity of Oxytocin. *Journal of the American Chemical Society* **1953**, *75* (19), 4879-4880.
- ⁶ Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85* (14), 2149-2154.
- ⁷ Merrifield, R. B.; Stewart, J. M., Automated peptide synthesis. *Nature* **1965**, *207* (996), 522-3.
- ⁸ Matthews, T.; Salgo, M.; Greenberg, M.; Chung, J.; DeMasi, R.; Bolognesi, D., Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3* (3), 215-25.
- ⁹ Bray, B. L., Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2* (7), 587-93.
- ¹⁰ Goodwin, D.; Simerska, P.; Toth, I., Peptides as therapeutics with enhanced bioactivity. *Curr Med Chem* **2012**, *19* (26), 4451-61.
- ¹¹ Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatsky, M., Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today* **2010**, *15* (1-2), 40-56.
- ¹² Lau, J. L.; Dunn, M. K., Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem* **2017**, *26* (10), 2700-2707.
- ¹³ Henninot, A.; Collins, J. C.; Nuss, J. M., The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? *J Med Chem* **2018**, *61* (4), 1382-1414.
- ¹⁴ Tsomaia, N., Peptide therapeutics: targeting the undruggable space. *Eur J Med Chem* **2015**, *94*, 459-70.
- ¹⁵ Insel, P. A.; Wilderman, A.; Zambon, A. C.; Snead, A. N.; Murray, F.; Aroonsakool, N.; McDonald, D. S.; Zhou, S.; McCann, T.; Zhang, L.; Sriram, K.; Chinn, A. M.; Michkov, A. V.; Lynch, R. M.; Overland, A. C.; Corriden, R., G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Expression in Native Cells: "Novel" endoGPCRs as Physiologic Regulators and Therapeutic Targets. *Mol Pharmacol* **2015**, *88* (1), 181-7.
- ¹⁶ du Vigneaud, V.; Ressler, C.; Swan, J. M.; Roberts, C. W.; Katsoyannis, P. G., The Synthesis of Oxytocin. *Journal of the American Chemical Society* **1954**, *76* (12), 3115-3121.
- ¹⁷ Kimball, C. P.; Murlin, J. R., Aqueous extracts of pancreas. *J. Biol. Chem.* **1923**, *58*, 337-346
- ¹⁸ Staub, A.; Sinn, L.; Behrens, O. K., Purification and crystallization of hyperglycemic glycogenolytic factor (HGF). *Science* **1953**, *117* (3049), 628-9.
- ¹⁹ Copp, D. H.; Cheney, B., Calcitonin-a hormone from the parathyroid which lowers the calcium-level of the blood. *Nature* **1962**, *193*, 381-2.
- ²⁰ Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M., Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, *289* (5480), 739-45.
- ²¹ Kroeze, W. K.; Sheffler, D. J.; Roth, B. L., G-protein-coupled receptors at a glance. *J Cell Sci* **2003**, *116* (Pt 24), 4867-9.
- ²² Shad, K. F.; Salman, S.; Afridi, S.; Tariq, M.; Asghar, S., Introductory Chapter: Ion Channels. In *Ion Channels in Health and Sickness*, 2018.
- ²³ Bezanilla, F., Voltage-Gated Ion Channels. *IEEE Transactions on Nanobioscience* **2005**, *4* (1), 34-48.
- ²⁴ Gouaux, E.; Mackinnon, R., Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* **2005**, *310* (5753), 1461-5.
- ²⁵ Tovar, K. R.; Westbrook, G. L., Ligand-Gated Ion Channels. In *Cell Physiology Source Book*, 2012; pp 549-562.
- ²⁶ Miljanich, G. P., Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr Med Chem* **2004**, *11* (23), 3029-40.
- ²⁷ Tarcha, E. J.; Olsen, C. M.; Probst, P.; Peckham, D.; Munoz-Elias, E. J.; Kruger, J. G.; Iadonato, S. P., Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial. *PLoS One* **2017**, *12* (7), e0180762.

- ²⁸ Castañeda, O.; Sotolongo, V.; Amor, A. M.; Stöcklin, R.; Anderson, A. J.; Harvey, A. L.; Engström, Å.; Wernstedt, C.; Karlsson, E., Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* **1995**, *33* (5), 603-613.
- ²⁹ Dubos, R. J., Studies on a Bactericidal Agent Extracted from a Soil Bacillus : li. Protective Effect of the Bactericidal Agent against Experimental Pneumococcus Infections in Mice. *J Exp Med* **1939**, *70* (1), 11-7.
- ³⁰ Van Epps, H. L., Rene Dubos: unearthing antibiotics. *J Exp Med* **2006**, *203* (2), 259.
- ³¹ Phoenix, D. A.; Dennison, S. R.; Harris, F., Antimicrobial Peptides: Their History, Evolution, and Functional Promiscuity. In *Antimicrobial Peptides*, 2013; pp 1-37.
- ³² Gomes, B.; Augusto, M. T.; Felicio, M. R.; Hollmann, A.; Franco, O. L.; Goncalves, S.; Santos, N. C., Designing improved active peptides for therapeutic approaches against infectious diseases. *Biotechnol Adv* **2018**, *36* (2), 415-429.
- ³³ Mahlapuu, M.; Hakansson, J.; Ringstad, L.; Bjorn, C., Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol* **2016**, *6*, 194.
- ³⁴ Neduva, V.; Linding, R.; Su-Angrand, I.; Stark, A.; de Masi, F.; Gibson, T. J.; Lewis, J.; Serrano, L.; Russell, R. B., Systematic discovery of new recognition peptides mediating protein interaction networks. *PLoS Biol* **2005**, *3* (12), e405.
- ³⁵ Petsalaki, E.; Russell, R. B., Peptide-mediated interactions in biological systems: new discoveries and applications. *Curr Opin Biotechnol* **2008**, *19* (4), 344-50.
- ³⁶ De Las Rivas, J.; Fontanillo, C., Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks. *PLoS Comput Biol* **2010**, *6* (6), e1000807.
- ³⁷ Yan, C.; Wu, F.; Jernigan, R. L.; Dobbs, D.; Honavar, V., Characterization of protein-protein interfaces. *Protein J* **2008**, *27* (1), 59-70.
- ³⁸ Lee, A. C.; Harris, J. L.; Khanna, K. K.; Hong, J. H., A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (10).
- ³⁹ Siu, F. Y.; He, M.; de Graaf, C.; Han, G. W.; Yang, D.; Zhang, Z.; Zhou, C.; Xu, Q.; Wacker, D.; Joseph, J. S.; Liu, W.; Lau, J.; Cherezov, V.; Katritch, V.; Wang, M. W.; Stevens, R. C., Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature* **2013**, *499* (7459), 444-9.
- ⁴⁰ Koth, C. M.; Murray, J. M.; Mukund, S.; Madjidi, A.; Minn, A.; Clarke, H. J.; Wong, T.; Chiang, V.; Luis, E.; Estevez, A.; Rondon, J.; Zhang, Y.; Hotzel, I.; Allan, B. B., Molecular basis for negative regulation of the glucagon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109* (36), 14393-8.
- ⁴¹ Bruzzoni-Giovanelli, H.; Alezra, V.; Wolff, N.; Dong, C. Z.; Tuffery, P.; Rebollo, A., Interfering peptides targeting protein-protein interactions: the next generation of drugs? *Drug Discov Today* **2018**, *23* (2), 272-285.
- ⁴² Kastiritis, P. L.; Bonvin, A. M., On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. *J R Soc Interface* **2013**, *10* (79), 20120835.
- ⁴³ Olivera, B. M.; Miljanich, G. P.; Ramachandran, J.; Adams, M. E., Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem* **1994**, *63*, 823-67.
- ⁴⁴ Arkin, M. R.; Wells, J. A., Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3* (4), 301-17.
- ⁴⁵ Fosgerau, K.; Hoffmann, T., Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today* **2015**, *20* (1), 122-8.
- ⁴⁶ Di, L., Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties. *AAPS J* **2015**, *17* (1), 134-43.
- ⁴⁷ Hruby, V. J., Designing peptide receptor agonists and antagonists. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1* (11), 847-58.
- ⁴⁸ Borel, J. F.; Feurer, C.; Gubler, H. U.; Stahelin, H., Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. 1976. *Agents Actions* **1994**, *43* (3-4), 179-86.
- ⁴⁹ Ferdinandi, E. S.; Brazeau, P.; High, K.; Procter, B.; Fennell, S.; Dubreuil, P., Non-clinical pharmacology and safety evaluation of TH9507, a human growth hormone-releasing factor analogue. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2007**, *100* (1), 49-58.
- ⁵⁰ Yudin, A. K., Macrocycles: lessons from the distant past, recent developments, and future directions. *Chem Sci* **2015**, *6* (1), 30-49.
- ⁵¹ Kerns, E. H.; Di, L., Pharmaceutical profiling in drug discovery. *Drug Discov Today* **2003**, *8* (7), 316-23.
- ⁵² Rohloff, C. M.; Alessi, T. R.; Yang, B.; Dahms, J.; Carr, J. P.; Lautenbach, S. D., DUROS technology delivers peptides and proteins at consistent rate continuously for 3 to 12 months. *J Diabetes Sci Technol* **2008**, *2* (3), 461-7.
- ⁵³ Henry, R. R.; Rosenstock, J.; Logan, D.; Alessi, T.; Luskey, K.; Baron, M. A., Continuous subcutaneous delivery of exenatide via ITCA 650 leads to sustained glycemic control and weight loss for 48 weeks in metformin-treated subjects with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* **2014**, *28* (3), 393-8.

- ⁵⁴ Uhlig, T.; Kyprianou, T.; Martinelli, F. G.; Oppici, C. A.; Heiligers, D.; Hills, D.; Calvo, X. R.; Verhaert, P., The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EuPA Open Proteomics* **2014**, *4*, 58-69.
- ⁵⁵ Bhattacharjee, P.; Bhattacharyya, D., Therapeutic Use of Snake Venom Components: A Voyage from Ancient to Modern India. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **2014**, *11* (1), 45-54.
- ⁵⁶ Meng, Z.; Yang, P.; Shen, Y.; Bei, W.; Zhang, Y.; Ge, Y.; Newman, R. A.; Cohen, L.; Liu, L.; Thornton, B.; Chang, D. Z.; Liao, Z.; Kurzrock, R., Pilot study of huachansu in patients with hepatocellular carcinoma, nonsmall-cell lung cancer, or pancreatic cancer. *Cancer* **2009**, *115* (22), 5309-5318.
- ⁵⁷ Harvey, A. L., Toxins and drug discovery. *Toxicon* **2014**, *92*, 193-200.
- ⁵⁸ Vetter, I.; Davis, J. L.; Rash, L. D.; Anangi, R.; Mobli, M.; Alewood, P. F.; Lewis, R. J.; King, G. F., Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. *Amino Acids* **2011**, *40* (1), 15-28.
- ⁵⁹ King, G. F., Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* **2011**, *11* (11), 1469-84.
- ⁶⁰ Escoubas, P.; King, G. F., Venomics as a drug discovery platform. *Expert Rev Proteomics* **2009**, *6* (3), 221-4.
- ⁶¹ Rodriguez de la Vega, R. C.; Schwartz, E. F.; Possani, L. D., Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon* **2010**, *56* (7), 1155-61.
- ⁶² Davis, J.; Jones, A.; Lewis, R. J., Remarkable inter- and intra-species complexity of conotoxins revealed by LC/MS. *Peptides* **2009**, *30* (7), 1222-7.
- ⁶³ Escoubas, P.; Sollod, B.; King, G. F., Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon* **2006**, *47* (6), 650-63.
- ⁶⁴ Pennington, M. W.; Czerwinski, A.; Norton, R. S., Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorg Med Chem* **2018**, *26* (10), 2738-2758.
- ⁶⁵ Prashanth, J. R.; Lewis, R. J.; Dutertre, S., Towards an integrated venomics approach for accelerated conopeptide discovery. *Toxicon* **2012**, *60* (4), 470-7.
- ⁶⁶ Escoubas, P.; Quinton, L.; Nicholson, G. M., Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **2008**, *43* (3), 279-95.
- ⁶⁷ Biass, D.; Dutertre, S.; Gerbault, A.; Menou, J. L.; Offord, R.; Favreau, P.; Stocklin, R., Comparative proteomic study of the venom of the piscivorous cone snail *Conus consors*. *J Proteomics* **2009**, *72* (2), 210-8.
- ⁶⁸ Kaas, Q.; Yu, R.; Jin, A. H.; Dutertre, S.; Craik, D. J., ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (Database issue), D325-30.
- ⁶⁹ Pineda, S. S.; Chaumeil, P. A.; Kunert, A.; Kaas, Q.; Thang, M. W. C.; Le, L.; Nuhn, M.; Herzig, V.; Saez, N. J.; Cristofori-Armstrong, B.; Anangi, R.; Senff, S.; Gorse, D.; King, G. F., ArachnoServer 3.0: an online resource for automated discovery, analysis and annotation of spider toxins. *Bioinformatics* **2018**, *34* (6), 1074-1076.
- ⁷⁰ Pallaghy, P. K.; Nielsen, K. J.; Craik, D. J.; Norton, R. S., A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci* **1994**, *3* (10), 1833-9.
- ⁷¹ Klint, J. K.; Senff, S.; Rupasinghe, D. B.; Er, S. Y.; Herzig, V.; Nicholson, G. M.; King, G. F., Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: pharmacological tools and potential therapeutic leads. *Toxicon* **2012**, *60* (4), 478-91.
- ⁷² Gao, B.; Harvey, P. J.; Craik, D. J.; Ronjat, M.; De Waard, M.; Zhu, S., Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cystine knot fold. *Biosci Rep* **2013**, *33* (3).
- ⁷³ Nielsen, K. J.; Thomas, L.; Lewis, R. J.; Alewood, P. F.; Craik, D. J., A consensus structure for omega-conotoxins with different selectivities for voltage-sensitive calcium channel subtypes: comparison of MVIIA, SVIB and SNX-202. *J Mol Biol* **1996**, *263* (2), 297-310.
- ⁷⁴ Saez, N. J.; Senff, S.; Jensen, J. E.; Er, S. Y.; Herzig, V.; Rash, L. D.; King, G. F., Spider-venom peptides as therapeutics. *Toxins (Basel)* **2010**, *2* (12), 2851-71.
- ⁷⁵ Cestèle, S., Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* **2000**, *82* (9-10), 883-892.
- ⁷⁶ Middleton, R. E.; Warren, V. A.; Kraus, R. L.; Hwang, J. C.; Liu, C. J.; Dai, G.; Brochu, R. M.; Kohler, M. G.; Gao, Y. D.; Garsky, V. M.; Bogusky, M. J.; Mehl, J. T.; Cohen, C. J.; Smith, M. M., Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. *Biochemistry* **2002**, *41* (50), 14734-47.
- ⁷⁷ Schmalhofer, W. A.; Calhoun, J.; Burrows, R.; Bailey, T.; Kohler, M. G.; Weinglass, A. B.; Kaczorowski, G. J.; Garcia, M. L.; Koltzenburg, M.; Priest, B. T., ProTx-II, a selective inhibitor of NaV1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors. *Mol Pharmacol* **2008**, *74* (5), 1476-84.
- ⁷⁸ Akondi, K. B.; Muttenthaler, M.; Dutertre, S.; Kaas, Q.; Craik, D. J.; Lewis, R. J.; Alewood, P. F., Discovery, synthesis, and structure-activity relationships of conotoxins. *Chem Rev* **2014**, *114* (11), 5815-47.
- ⁷⁹ Morales Duque, H.; Campos Dias, S.; Franco, O. L., Structural and Functional Analyses of Cone Snail Toxins. *Mar Drugs* **2019**, *17* (6).

- ⁸⁰ Cornet, B.; Bonmatin, J.-M.; Hetru, C.; Hoffmann, J. A.; Ptak, M.; Vovelle, F., Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure* **1995**, *3* (5), 435-448.
- ⁸¹ Rodriguez de la Vega, R. C.; Possani, L. D., Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon* **2004**, *43* (8), 865-75.
- ⁸² Almasy, R. J.; Fontecilla-Camps, J. C.; Suddath, F. L.; Bugg, C. E., Structure of variant-3 scorpion neurotoxin from *Centruroides sculpturatus ewing*, refined at 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **1983**, *170* (2), 497-527.
- ⁸³ Fontecilla-Camps, J. C.; Habersetzer-Rochat, C.; Rochat, H., Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis Hector*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85* (20), 7443-7.
- ⁸⁴ Zoukimian, C.; Meudal, H.; De Waard, S.; Ouares, K. A.; Nicolas, S.; Canepari, M.; Beroud, R.; Landon, C.; De Waard, M.; Boturyn, D., Synthesis by native chemical ligation and characterization of the scorpion toxin AmmTx3. *Bioorg Med Chem* **2019**, *27* (1), 247-253.
- ⁸⁵ Quintero-Hernandez, V.; Jimenez-Vargas, J. M.; Gurrola, G. B.; Valdivia, H. H.; Possani, L. D., Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon* **2013**, *76*, 328-42.
- ⁸⁶ Gurrola, G. B.; Hernandez-Lopez, R. A.; Rodriguez de la Vega, R. C.; Varga, Z.; Batista, C. V.; Salas-Castillo, S. P.; Panyi, G.; del Rio-Portilla, F.; Possani, L. D., Structure, function, and chemical synthesis of Vaejovis mexicanus peptide 24: a novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes. *Biochemistry* **2012**, *51* (19), 4049-61.
- ⁸⁷ Galat, A., The three-fingered protein domain of the human genome. *Cell Mol Life Sci* **2008**, *65* (21), 3481-93.
- ⁸⁸ Kessler, P.; Marchot, P.; Silva, M.; Servent, D., The three-finger toxin fold: a multifunctional structural scaffold able to modulate cholinergic functions. *J Neurochem* **2017**, *142 Suppl 2*, 7-18.
- ⁸⁹ Sanz, L.; Pla, D.; Perez, A.; Rodriguez, Y.; Zavaleta, A.; Salas, M.; Lomonte, B.; Calvete, J. J., Venomic Analysis of the Poorly Studied Desert Coral Snake, *Micrurus tschudii tschudii*, Supports the 3FTx/PLA(2) Dichotomy across *Micrurus* Venoms. *Toxins (Basel)* **2016**, *8* (6).
- ⁹⁰ Chang, C. C.; Lee, C. Y., Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **1963**, *144*, 241-257.
- ⁹¹ Love, R. A.; Stroud, R. M., The crystal structure of alpha-bungarotoxin at 2.5 Å resolution: relation to solution structure and binding to acetylcholine receptor. *Protein Eng* **1986**, *1* (1), 37-46.
- ⁹² Low, B. W.; Preston, H. S.; Sato, A.; Rosen, L. S.; Searl, J. E.; Rudko, A. D.; Richardson, J. S., Three dimensional structure of erabutoxin b neurotoxic protein: inhibitor of acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1976**, *73* (9), 2991-4.
- ⁹³ Tsernoglou, D.; Petsko, G. A., The crystal structure of a post-synaptic neurotoxin from sea snake at 2.2 Å resolution. *FEBS Letters* **1976**, *68* (1), 1-4.
- ⁹⁴ Kini, R. M.; Doley, R., Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon* **2010**, *56* (6), 855-67.
- ⁹⁵ Tsetlin, V., Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins. *Eur J Biochem* **1999**, *264* (2), 281-6.
- ⁹⁶ Grant, G. A.; Chiappinelli, V. A., kappa-Bungarotoxin: complete amino acid sequence of a neuronal nicotinic receptor probe. *Biochemistry* **1985**, *24* (6), 1532-7.
- ⁹⁷ Jerusalinsky, D.; Harvey, A. L., Toxins from mamba venoms: small proteins with selectivities for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **1994**, *15* (11), 424-430.
- ⁹⁸ Jerusalinsky, D.; Kornisiuk, E.; Alfaro, P.; Quillfeldt, J.; Ferreira, A.; Rial, V. E.; Durán, R.; Cerveñansky, C., Muscarinic toxins: novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxicon* **2000**, *38* (6), 747-761.
- ⁹⁹ Karlsson, E.; Jolkkonen, M.; Mulugeta, E.; Onali, P.; Adem, A., Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie* **2000**, *82* (9-10), 793-806.
- ¹⁰⁰ Changeux, J. P.; Kasai, M.; Lee, C. Y., Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1970**, *67* (3), 1241-7.
- ¹⁰¹ Guan, Z.-Z.; Nordberg, A.; Mousavi, M.; Rinne, J. O.; Hellström-Lindahl, E., Selective changes in the levels of nicotinic acetylcholine receptor protein and of corresponding mRNA species in the brains of patients with Parkinson's disease. *Brain Research* **2002**, *956* (2), 358-366.
- ¹⁰² de Weille, J. R.; Schweitz, H.; Maes, P.; Tartar, A.; Lazdunski, M., Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88* (6), 2437-40.
- ¹⁰³ Dufton, M. J.; Hider, R. C., Structure and pharmacology of elapid cytotoxins. *Pharmacology & Therapeutics* **1988**, *36* (1), 1-40.

- ¹⁰⁴ Mouhat, S.; Jouirou, B.; Mosbah, A.; De Waard, M.; Sabatier, J. M., Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem J* **2004**, *378* (Pt 3), 717-26.
- ¹⁰⁵ Colgrave, M. L.; Craik, D. J., Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry* **2004**, *43* (20), 5965-75.
- ¹⁰⁶ Ferreira, S. H.; Greene, L. J.; Alabaster, V. A.; Bakhle, Y. S.; Vane, J. R., Activity of Various Fractions of Bradykinin Potentiating Factor against Angiotensin I Converting Enzyme. *Nature* **1970**, *225* (5230), 379-380.
- ¹⁰⁷ Rocha, E. S. M.; Beraldo, W. T.; Rosenfeld, G., Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* **1949**, *156* (2), 261-73.
- ¹⁰⁸ Cushman, D. W.; Ondetti, M. A., History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension* **1991**, *17* (4), 589-92.
- ¹⁰⁹ Laffan, R. J.; Goldberg, M. E.; High, J. P.; Schaeffer, T. R.; Waugh, M. H.; Rubin, B., Antihypertensive activity in rats for SQ 14,225, an orally active inhibitor of angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1978**, *204* (2), 281-288.
- ¹¹⁰ Scarborough, R. M., Development of eptifibatid. *American Heart Journal* **1999**, *138* (6), 1093-1104.
- ¹¹¹ Pytela, R.; Pierschbacher, M. D.; Ginsberg, M. H.; Plow, E. F.; Ruoslahti, E., Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp--specific adhesion receptors. *Science* **1986**, *231* (4745), 1559-62.
- ¹¹² Gan, Z. R.; Gould, R. J.; Jacobs, J. W.; Friedman, P. A.; Polokoff, M. A., Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263* (36), 19827-19832.
- ¹¹³ Barrett, J. S.; Murphy, G.; Peerlinck, K.; De Lepeleire, I.; Gould, R. J.; Panebianco, D.; Hand, E.; Deckmyn, H.; Vermynen, J.; Arnout, J., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of MK-383, a selective non-peptide platelet glycoprotein-IIb/IIIa receptor antagonist, in healthy men. *Clin Pharmacol Ther* **1994**, *56* (4), 377-88.
- ¹¹⁴ Warkentin, T. E.; Greinacher, A.; Koster, A., Bivalirudin. *Thromb Haemost* **2008**, *99* (5), 830-9.
- ¹¹⁵ Olivera, B. M.; McIntosh, J. M.; Cruz, L. J.; Luque, F. A.; Gray, W. R., Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry* **1984**, *23* (22), 5087-90.
- ¹¹⁶ Basus, V. J.; Nadasdi, L.; Ramachandran, J.; Miljanich, G. P., Solution structure of ω -conotoxin MVIIA using 2D NMR spectroscopy. *FEBS Letters* **1995**, *370* (3), 163-169.
- ¹¹⁷ Kohno, T.; Kim, J. I.; Kobayashi, K.; Kodera, Y.; Maeda, T.; Sato, K., Three-dimensional structure in solution of the calcium channel blocker omega-conotoxin MVIIA. *Biochemistry* **1995**, *34* (32), 10256-65.
- ¹¹⁸ Kristipati, R.; Nadasdi, L.; Tarczy-Hornoch, K.; Lau, K.; Miljanich, G. P.; Ramachandran, J.; Bell, J. R., Characterization of the binding of omega-conopeptides to different classes of non-L-type neuronal calcium channels. *Mol Cell Neurosci* **1994**, *5* (3), 219-28.
- ¹¹⁹ White, D. M.; Cousins, M. J., Effect of subcutaneous administration of calcium channel blockers on nerve injury-induced hyperalgesia. *Brain Research* **1998**, *801* (1-2), 50-58.
- ¹²⁰ Pope, J. E.; Deer, T. R., Ziconotide: a clinical update and pharmacologic review. *Expert Opin Pharmacother* **2013**, *14* (7), 957-66.
- ¹²¹ Eng, J.; Kleinman, W. A.; Singh, L.; Singh, G.; Raufman, J. P., Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267* (11), 7402-5.
- ¹²² Thum, A.; Hupe-Sodmann, K.; Goke, R.; Voigt, K.; Goke, B.; McGregor, G. P., Endoproteolysis by isolated membrane peptidases reveal metabolic stability of glucagon-like peptide-1 analogs, exendins-3 and -4. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **2002**, *110* (3), 113-8.
- ¹²³ Furman, B. L., The development of Byetta (exenatide) from the venom of the Gila monster as an anti-diabetic agent. *Toxicol* **2012**, *59* (4), 464-71.
- ¹²⁴ Revell, J. D.; Lund, P. E.; Linley, J. E.; Metcalfe, J.; Burmeister, N.; Sridharan, S.; Jones, C.; Jermutus, L.; Bednarek, M. A., Potency optimization of Huwentoxin-IV on hNav1.7: a neurotoxin TTX-S sodium-channel antagonist from the venom of the Chinese bird-eating spider *Selenocosmia huwena*. *Peptides* **2013**, *44*, 40-6.
- ¹²⁵ Murray, J. K.; Long, J.; Zou, A.; Ligutti, J.; Andrews, K. L.; Poppe, L.; Biswas, K.; Moyer, B. D.; McDonough, S. I.; Miranda, L. P., Single Residue Substitutions That Confer Voltage-Gated Sodium Ion Channel Subtype Selectivity in the NaV1.7 Inhibitory Peptide GpTx-1. *J Med Chem* **2016**, *59* (6), 2704-17.
- ¹²⁶ Yang, S.; Xiao, Y.; Kang, D.; Liu, J.; Li, Y.; Undheim, E. A.; Klint, J. K.; Rong, M.; Lai, R.; King, G. F., Discovery of a selective NaV1.7 inhibitor from centipede venom with analgesic efficacy exceeding morphine in rodent pain models. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (43), 17534-9.
- ¹²⁷ Essack, M.; Bajic, V. B.; Archer, J. A., Conotoxins that confer therapeutic possibilities. *Mar Drugs* **2012**, *10* (6), 1244-65.
- ¹²⁸ Beyermann, M.; Bienert, M., Synthesis of difficult peptide sequences: A comparison of Fmoc-and BOC-technique. *Tetrahedron Letters* **1992**, *33* (26), 3745-3748.

- ¹²⁹ Chang, C. D.; Meienhofer, J., Solid-phase peptide synthesis using mild base cleavage of N alpha-fluorenylmethoxycarbonylamino acids, exemplified by a synthesis of dihydrosomatostatin. *Int J Pept Protein Res* **1978**, *11* (3), 246-9.
- ¹³⁰ Carpino, L. A.; Han, G. Y., 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92* (19), 5748-5749.
- ¹³¹ El-Faham, A.; Albericio, F., Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem Rev* **2011**, *111* (11), 6557-602.
- ¹³² Paul, R.; Anderson, G. W., N,N'-Carbonyldiimidazole, a New Peptide Forming Reagent1. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, *82* (17), 4596-4600.
- ¹³³ Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C., Reactifs de couplage peptidique I (1) - l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylamino phosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Letters* **1975**, *16* (14), 1219-1222.
- ¹³⁴ Frérot, E.; Coste, J.; Pantaloni, A.; Dufour, M.-N.; Jouin, P., PyBOP® and PyBroP: Two reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid, *Aib. Tetrahedron* **1991**, *47* (2), 259-270.
- ¹³⁵ Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B., PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Letters* **1990**, *31* (2), 205-208.
- ¹³⁶ Coste, J.; Frerot, E.; Jouin, P., Coupling N-Methylated Amino Acids Using PyBroP and PyCloP Halogenophosphonium Salts: Mechanism and Fields of Application. *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59* (9), 2437-2446.
- ¹³⁷ Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillissen, D., New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Letters* **1989**, *30* (15), 1927-1930.
- ¹³⁸ Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A., Use of Onium Salt-Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63* (26), 9678-9683.
- ¹³⁹ Kent, S. B., Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem* **1988**, *57*, 957-89.
- ¹⁴⁰ Atherton, E.; Woolley, V.; Sheppard, R. C., Internal association in solid phase peptide synthesis. Synthesis of cytochrome C residues 66–104 on polyamide supports. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, (20), 970-971.
- ¹⁴¹ Paradis-Bas, M.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F., The road to the synthesis of "difficult peptides". *Chem Soc Rev* **2016**, *45* (3), 631-54.
- ¹⁴² Peptide Companion. <https://www.eurpepsoc.com/peptide-companion-excel-version-community-project/>.
- ¹⁴³ Haack, T.; Mutter, M., Serine derived oxazolidines as secondary structure disrupting, solubilizing building blocks in peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **1992**, *33* (12), 1589-1592.
- ¹⁴⁴ Abedini, A.; Raleigh, D. P., Incorporation of pseudoproline derivatives allows the facile synthesis of human IAPP, a highly amyloidogenic and aggregation-prone polypeptide. *Org Lett* **2005**, *7* (4), 693-6.
- ¹⁴⁵ Palasek, S. A.; Cox, Z. J.; Collins, J. M., Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc solid phase peptide synthesis. *J Pept Sci* **2007**, *13* (3), 143-8.
- ¹⁴⁶ Jones, J. H.; Ramage, W. I.; Witty, M. J., Mechanism of racemisation of histidine derivatives in peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res* **1980**, *15* (3), 301-3.
- ¹⁴⁷ Kaiser, T.; Nicholson, G. J.; Kohlbau, H. J.; Voelter, W., Racemization studies of Fmoc-Cys(Trt)-OH during stepwise Fmoc-Solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37* (8), 1187-1190.
- ¹⁴⁸ Han, Y.; Albericio, F.; Barany, G., Occurrence and Minimization of Cysteine Racemization during Stepwise Solid-Phase Peptide Synthesis. *J Org Chem* **1997**, *62* (13), 4307-4312.
- ¹⁴⁹ Goodman, M.; Levine, L., Peptide Synthesis via Active Esters. IV. Racemization and Ring-Opening Reactions of Optically Active Oxazolones. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86* (14), 2918-2922.
- ¹⁵⁰ Subirós-Funosas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F., Aspartimide formation in peptide chemistry: occurrence, prevention strategies and the role of N-hydroxylamines. *Tetrahedron* **2011**, *67* (45), 8595-8606.
- ¹⁵¹ Radkiewicz, J. L.; Zipse, H.; Clarke, S.; Houk, K. N., Accelerated Racemization of Aspartic Acid and Asparagine Residues via Succinimide Intermediates: An ab Initio Theoretical Exploration of Mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (38), 9148-9155.
- ¹⁵² Zahariev, S.; Guarnaccia, C.; Pongor, C. I.; Quaroni, L.; Čemažar, M.; Pongor, S., Synthesis of 'difficult' peptides free of aspartimide and related products, using peptoid methodology. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47* (25), 4121-4124.
- ¹⁵³ Yang, Y., *Side Reactions in Peptide Synthesis*. Academic Press 2015.
- ¹⁵⁴ Nyfeler, R., Peptide Synthesis via Fragment Condensation. In *Peptide Synthesis Protocols*, Pennington and Dunn, Eds. Humana Press: Totowa, NJ, 1995; pp 303-316.
- ¹⁵⁵ Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E., Convergent solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron* **1993**, *49* (48), 11065-11133.
- ¹⁵⁶ Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B., Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **1994**, *266* (5186), 776-9.

- ¹⁵⁷ Bang, D.; Kent, S. B., A one-pot total synthesis of crambin. *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43* (19), 2534-8.
- ¹⁵⁸ Cistrone, P. A.; Bird, M. J.; Flood, D. T.; Silvestri, A. P.; Hintzen, J. C. J.; Thompson, D. A.; Dawson, P. E., Native Chemical Ligation of Peptides and Proteins. *Curr Protoc Chem Biol* **2019**, *11* (1), e61.
- ¹⁵⁹ Hackeng, T. M.; Griffin, J. H.; Dawson, P. E., Protein synthesis by native chemical ligation: expanded scope by using straightforward methodology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96* (18), 10068-73.
- ¹⁶⁰ Dang, B.; Kubota, T.; Mandal, K.; Bezanilla, F.; Kent, S. B., Native chemical ligation at Asx-Cys, Glx-Cys: chemical synthesis and high-resolution X-ray structure of ShK toxin by racemic protein crystallography. *J Am Chem Soc* **2013**, *135* (32), 11911-9.
- ¹⁶¹ Villain, M.; Gaertner, H.; Botti, P., Native Chemical Ligation with Aspartic and Glutamic Acids as C-Terminal Residues: Scope and Limitations. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, *2003* (17), 3267-3272.
- ¹⁶² Siman, P.; Karthikeyan, S. V.; Nikolov, M.; Fischle, W.; Brik, A., Convergent chemical synthesis of histone H2B protein for the site-specific ubiquitination at Lys34. *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, *52* (31), 8059-63.
- ¹⁶³ Dawson, P. E.; Churchill, M. J.; Ghadiri, M. R.; Kent, S. B. H., Modulation of Reactivity in Native Chemical Ligation through the Use of Thiol Additives. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (19), 4325-4329.
- ¹⁶⁴ Johnson, E. C.; Kent, S. B., Insights into the mechanism and catalysis of the native chemical ligation reaction. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (20), 6640-6.
- ¹⁶⁵ Lu, W.; Qasim, M. A.; Kent, S. B. H., Comparative Total Syntheses of Turkey Ovomuroid Third Domain by Both Stepwise Solid Phase Peptide Synthesis and Native Chemical Ligation. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (36), 8518-8523.
- ¹⁶⁶ Snella, B.; Diemer, V.; Drobecq, H.; Agouridas, V.; Melnyk, O., Native Chemical Ligation at Serine Revisited. *Org Lett* **2018**, *20* (23), 7616-7619.
- ¹⁶⁷ Rohde, H.; Seitz, O., Ligation-desulfurization: a powerful combination in the synthesis of peptides and glycopeptides. *Biopolymers* **2010**, *94* (4), 551-9.
- ¹⁶⁸ Yan, L. Z.; Dawson, P. E., Synthesis of peptides and proteins without cysteine residues by native chemical ligation combined with desulfurization. *J Am Chem Soc* **2001**, *123* (4), 526-33.
- ¹⁶⁹ Wan, Q.; Danishefsky, S. J., Free-radical-based, specific desulfurization of cysteine: a powerful advance in the synthesis of polypeptides and glycopolypeptides. *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, *46* (48), 9248-52.
- ¹⁷⁰ Moyal, T.; Hemantha, H. P.; Siman, P.; Refua, M.; Brik, A., Highly efficient one-pot ligation and desulfurization. *Chemical Science* **2013**, *4* (6).
- ¹⁷¹ Malins, L. R.; Cergol, K. M.; Payne, R. J., Peptide ligation-desulfurization chemistry at arginine. *Chembiochem* **2013**, *14* (5), 559-63.
- ¹⁷² Sayers, J.; Thompson, R. E.; Perry, K. J.; Malins, L. R.; Payne, R. J., Thiazolidine-Protected beta-Thiol Asparagine: Applications in One-Pot Ligation-Desulfurization Chemistry. *Org Lett* **2015**, *17* (19), 4902-5.
- ¹⁷³ Thompson, R. E.; Chan, B.; Radom, L.; Jolliffe, K. A.; Payne, R. J., Chemoselective Peptide Ligation-Desulfurization at Aspartate. *Angewandte Chemie* **2013**, *125* (37), 9905-9909.
- ¹⁷⁴ Siman, P.; Karthikeyan, S. V.; Brik, A., Native chemical ligation at glutamine. *Org Lett* **2012**, *14* (6), 1520-3.
- ¹⁷⁵ Cergol, K. M.; Thompson, R. E.; Malins, L. R.; Turner, P.; Payne, R. J., One-pot peptide ligation-desulfurization at glutamate. *Org Lett* **2014**, *16* (1), 290-3.
- ¹⁷⁶ Pasunooti, K. K.; Yang, R.; Banerjee, B.; Yap, T.; Liu, C. F., 5-Methylisoxazole-3-carboxamide-Directed Palladium-Catalyzed gamma-C(sp³)-H Acetoxylation and Application to the Synthesis of gamma-Mercapto Amino Acids for Native Chemical Ligation. *Org Lett* **2016**, *18* (11), 2696-9.
- ¹⁷⁷ Harpaz, Z.; Siman, P.; Kumar, K. S.; Brik, A., Protein synthesis assisted by native chemical ligation at leucine. *Chembiochem* **2010**, *11* (9), 1232-5.
- ¹⁷⁸ Tan, Z.; Shang, S.; Danishefsky, S. J., Insights into the finer issues of native chemical ligation: an approach to cascade ligations. *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, *49* (49), 9500-3.
- ¹⁷⁹ Yang, R.; Pasunooti, K. K.; Li, F.; Liu, X. W.; Liu, C. F., Dual native chemical ligation at lysine. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (38), 13592-3.
- ¹⁸⁰ Crich, D.; Banerjee, A., Native chemical ligation at phenylalanine. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (33), 10064-5.
- ¹⁸¹ Shang, S.; Tan, Z.; Dong, S.; Danishefsky, S. J., An advance in proline ligation. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (28), 10784-6.
- ¹⁸² Chen, J.; Wang, P.; Zhu, J.; Wan, Q.; Danishefsky, S. J., A program for ligation at threonine sites: application to the controlled total synthesis of glycopeptides. *Tetrahedron* **2010**, *66* (13), 2277-2283.
- ¹⁸³ Malins, L. R.; Cergol, K. M.; Payne, R. J., Chemoselective sulfenylation and peptide ligation at tryptophan. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (1), 260-266.
- ¹⁸⁴ Haase, C.; Rohde, H.; Seitz, O., Native chemical ligation at valine. *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47* (36), 6807-10.

- ¹⁸⁵ Camarero, J. A.; Mitchell, A. R., Synthesis of proteins by native chemical ligation using Fmoc-based chemistry. *Protein Pept Lett* **2005**, *12* (8), 723-8.
- ¹⁸⁶ Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E., An efficient Fmoc-SPPS approach for the generation of thioester peptide precursors for use in native chemical ligation. *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47* (36), 6851-5.
- ¹⁸⁷ Bondalapati, S.; Eid, E.; Mali, S. M.; Wolberger, C.; Brik, A., Total chemical synthesis of SUMO-2-Lys63-linked diubiquitin hybrid chains assisted by removable solubilizing tags. *Chem Sci* **2017**, *8* (5), 4027-4034.
- ¹⁸⁸ Mahto, S. K.; Howard, C. J.; Shimko, J. C.; Ottesen, J. J., A reversible protection strategy to improve Fmoc-SPPS of peptide thioesters by the N-Acylurea approach. *Chembiochem* **2011**, *12* (16), 2488-94.
- ¹⁸⁹ Blanco-Canosa, J. B.; Nardone, B.; Albericio, F.; Dawson, P. E., Chemical Protein Synthesis Using a Second-Generation N-Acylurea Linker for the Preparation of Peptide-Thioester Precursors. *J Am Chem Soc* **2015**, *137* (22), 7197-209.
- ¹⁹⁰ Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhida, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O., Bis(2-sulfanylethyl)amino native peptide ligation. *Org Lett* **2010**, *12* (22), 5238-41.
- ¹⁹¹ Ollivier, N.; Vicogne, J.; Vallin, A.; Drobecq, H.; Desmet, R.; El Mahdi, O.; Leclercq, B.; Goormachtigh, G.; Fafeur, V.; Melnyk, O., A One-Pot Three-Segment Ligation Strategy for Protein Chemical Synthesis. *Angewandte Chemie* **2012**, *124* (1), 213-217.
- ¹⁹² Raibaut, L.; Vicogne, J.; Leclercq, B.; Drobecq, H.; Desmet, R.; Melnyk, O., Total synthesis of biotinylated N domain of human hepatocyte growth factor. *Bioorg Med Chem* **2013**, *21* (12), 3486-94.
- ¹⁹³ Raibaut, L.; Adihou, H.; Desmet, R.; Delmas, A. F.; Aucagne, V.; Melnyk, O., Highly efficient solid phase synthesis of large polypeptides by iterative ligations of bis(2-sulfanylethyl)amido (SEA) peptide segments. *Chemical Science* **2013**, *4* (10).
- ¹⁹⁴ Aucagne, V.; Valverde, I. E.; Marceau, P.; Galibert, M.; Dendane, N.; Delmas, A. F., Towards the Simplification of Protein Synthesis: Iterative Solid-Supported Ligations with Concomitant Purifications. *Angewandte Chemie* **2012**, *124* (45), 11482-11486.
- ¹⁹⁵ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67* (9), 3057-3064.
- ¹⁹⁶ Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L., Readily Accessible Bicyclononynes for Bioorthogonal Labeling and Three-Dimensional Imaging of Living Cells. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (49), 9422-9425.
- ¹⁹⁷ Ollivier, N.; Desmet, R.; Drobecq, H.; Blanpain, A.; Boll, E.; Leclercq, B.; Mougel, A.; Vicogne, J.; Melnyk, O., A simple and traceless solid phase method simplifies the assembly of large peptides and the access to challenging proteins. *Chem Sci* **2017**, *8* (8), 5362-5370.
- ¹⁹⁸ Fang, G. M.; Li, Y. M.; Shen, F.; Huang, Y. C.; Li, J. B.; Lin, Y.; Cui, H. K.; Liu, L., Protein chemical synthesis by ligation of peptide hydrazides. *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50* (33), 7645-9.
- ¹⁹⁹ Zheng, J. S.; Tang, S.; Huang, Y. C.; Liu, L., Development of new thioester equivalents for protein chemical synthesis. *Acc Chem Res* **2013**, *46* (11), 2475-84.
- ²⁰⁰ Zheng, J. S.; Tang, S.; Guo, Y.; Chang, H. N.; Liu, L., Synthesis of cyclic peptides and cyclic proteins via ligation of peptide hydrazides. *Chembiochem* **2012**, *13* (4), 542-6.
- ²⁰¹ Fang, G. M.; Wang, J. X.; Liu, L., Convergent chemical synthesis of proteins by ligation of peptide hydrazides. *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51* (41), 10347-50.
- ²⁰² Jbara, M.; Eid, E.; Brik, A., Palladium mediated deallylation in fully aqueous conditions for native chemical ligation at aspartic and glutamic acid sites. *Org Biomol Chem* **2018**, *16* (22), 4061-4064.
- ²⁰³ Zheng, J. S.; Tang, S.; Qi, Y. K.; Wang, Z. P.; Liu, L., Chemical synthesis of proteins using peptide hydrazides as thioester surrogates. *Nat Protoc* **2013**, *8* (12), 2483-95.
- ²⁰⁴ Wang, J. X.; Fang, G. M.; He, Y.; Qu, D. L.; Yu, M.; Hong, Z. Y.; Liu, L., Peptide o-aminoanilides as crypto-thioesters for protein chemical synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, *54* (7), 2194-8.
- ²⁰⁵ Terrier, V. P.; Adihou, H.; Arnould, M.; Delmas, A. F.; Aucagne, V., A straightforward method for automated Fmoc-based synthesis of bio-inspired peptide crypto-thioesters. *Chem Sci* **2016**, *7* (1), 339-345.
- ²⁰⁶ Lukszo, J.; Patterson, D.; Albericio, F.; Kates, S. A., 3-(1-Piperidinyl)alanine formation during the preparation of C-terminal cysteine peptides with the Fmoc/t-Bu strategy. *Letters in Peptide Science* **1996**, *3* (3), 157-166.
- ²⁰⁷ Miranda, L. P.; Meutermans, W. D.; Smythe, M. L.; Alewood, P. F., An activated O → N acyl transfer auxiliary: efficient amide-backbone substitution of hindered "difficult" peptides. *J Org Chem* **2000**, *65* (18), 5460-8.
- ²⁰⁸ Bi, S.; Liu, P.; Ling, B.; Yuan, X.; Jiang, Y., Mechanism of N-to-S acyl transfer of N-(2-hydroxybenzyl) cysteine derivatives and origin of phenol acceleration effect. *Chinese Chemical Letters* **2018**, *29* (8), 1264-1268.

- ²⁰⁹ Terrier, V. P.; Delmas, A. F.; Aucagne, V., Efficient synthesis of cysteine-rich cyclic peptides through intramolecular native chemical ligation of N-Hnb-Cys peptide crypto-thioesters. *Org Biomol Chem* **2017**, *15* (2), 316-319.
- ²¹⁰ Lelievre, D.; Terrier, V. P.; Delmas, A. F.; Aucagne, V., Native Chemical Ligation Strategy to Overcome Side Reactions during Fmoc-Based Synthesis of C-Terminal Cysteine-Containing Peptides. *Org Lett* **2016**, *18* (5), 920-3.
- ²¹¹ De Rosa, L.; Di Stasi, R.; D'Andrea, L. D., Total chemical synthesis by native chemical ligation of the all-D immunoglobulin-like domain 2 of Axl. *Tetrahedron* **2019**, *75* (7), 894-905.
- ²¹² Bingham, J. P.; Chun, J. B.; Ruzicka, M. R.; Li, Q. X.; Tan, Z. Y.; Kaulin, Y. A.; Englebretsen, D. R.; Moczydlowski, E. G., Synthesis of an iberiotoxin derivative by chemical ligation: a method for improved yields of cysteine-rich scorpion toxin peptides. *Peptides* **2009**, *30* (6), 1049-57.
- ²¹³ Heimer, P.; Tietze, A. A.; Bauml, C. A.; Resemann, A.; Mayer, F. J.; Suckau, D.; Ohlenschlager, O.; Tietze, D.; Imhof, D., Conformational mu-Conotoxin PIIIA Isomers Revisited: Impact of Cysteine Pairing on Disulfide-Bond Assignment and Structure Elucidation. *Anal Chem* **2018**, *90* (5), 3321-3327.
- ²¹⁴ Gongora-Benitez, M.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F., Multifaceted roles of disulfide bonds. Peptides as therapeutics. *Chem Rev* **2014**, *114* (2), 901-26.
- ²¹⁵ Narayan, M.; Welker, E.; Wedemeyer, W. J.; Scheraga, H. A., Oxidative folding of proteins. *Acc Chem Res* **2000**, *33* (11), 805-12.
- ²¹⁶ Creighton, T. E.; Zapun, A.; Darby, N. J., Mechanisms and catalysts of disulphide bond formation in proteins. *Trends in Biotechnology* **1995**, *13* (1), 18-23.
- ²¹⁷ Arolas, J. L.; Aviles, F. X.; Chang, J. Y.; Ventura, S., Folding of small disulfide-rich proteins: clarifying the puzzle. *Trends Biochem Sci* **2006**, *31* (5), 292-301.
- ²¹⁸ Creighton, T. E., Protein folding. *Biochem J* **1990**, *270* (1), 1-16.
- ²¹⁹ Chatrenet, B.; Chang, J. Y., The disulfide folding pathway of hirudin elucidated by stop/go folding experiments. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268* (28), 20988-96.
- ²²⁰ Bulaj, G., Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnol Adv* **2005**, *23* (1), 87-92.
- ²²¹ Mamathambika, B. S.; Bardwell, J. C., Disulfide-linked protein folding pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2008**, *24*, 211-35.
- ²²² Hidaka, Y.; Shimamoto, S., Folding of peptides and proteins: role of disulfide bonds, recent developments. *Biomol Concepts* **2013**, *4* (6), 597-604.
- ²²³ Gongora-Benitez, M.; Tulla-Puche, J.; Paradis-Bas, M.; Werbitzky, O.; Giraud, M.; Albericio, F., Optimized Fmoc solid-phase synthesis of the cysteine-rich peptide linaclotide. *Biopolymers* **2011**, *96* (1), 69-80.
- ²²⁴ Boulegue, C.; Musiol, H.-J.; Prasad, V.; Moroder, L., Synthesis of Cystine-Rich Peptides. *ChemInform* **2007**, *38* (40).
- ²²⁵ Adermann, K.; Barlos, K., Chapter 6.2 Regioselective Disulfide Formation. In *Oxidative Folding of Peptides and Proteins*, The Royal Society of Chemistry: 2009; pp 297-317.
- ²²⁶ Munson, M. C.; Barany, G., Synthesis of alpha-conotoxin SI, a bicyclic tridecapeptide amide with two disulfide bridges: illustration of novel protection schemes and oxidation strategies. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (22), 10203-10210.
- ²²⁷ Postma, T. M.; Albericio, F., N-Chlorosuccinimide, an efficient reagent for on-resin disulfide formation in solid-phase peptide synthesis. *Org Lett* **2013**, *15* (3), 616-9.
- ²²⁸ Tam, J. P.; Wu, C. R.; Liu, W.; Zhang, J. W., Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (17), 6657-6662.
- ²²⁹ Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F., Amino acid-protecting groups. In *Chem Rev*, 2009/04/15 ed.; 2009; Vol. 109, pp 2455-504.
- ²³⁰ Postma, T. M.; Albericio, F., Disulfide Formation Strategies in Peptide Synthesis. *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, *2014* (17), 3519-3530.
- ²³¹ Mergler, M.; Dick, F.; Sax, B.; Stahelin, C.; Vorherr, T., The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part II. *J Pept Sci* **2003**, *9* (8), 518-26.
- ²³² Maruyama, K.; Nagasawa, H.; Suzuki, A., 2,2'-Bispyridyl disulfide rapidly induces intramolecular disulfide bonds in peptides. *Peptides* **1999**, *20* (7), 881-884.
- ²³³ Postma, T. M.; Albericio, F., N-chlorosuccinimide, an efficient peptide disulfide bond-forming reagent in aqueous solution. *RSC Advances* **2013**, *3* (34).
- ²³⁴ Giribaldi, J.; Wilson, D.; Nicke, A.; El Hamdaoui, Y.; Laconde, G.; Faucherre, A.; Moha Ou Maati, H.; Daly, N. L.; Enjalbal, C.; Dutertre, S., Synthesis, Structure and Biological Activity of CIA and CIB, Two alpha-Conotoxins from the Predation-Evoked Venom of *Conus catus*. *Toxins (Basel)* **2018**, *10* (6).

- ²³⁵ Eritja, R.; Ziehler-Martin, J. P.; Walker, P. A.; Lee, T. D.; Legesse, K.; Albericio, F.; Kaplan, B. E., On the use of s-t-butylsulphenyl group for protection of cysteine in solid-phase peptide synthesis using fmoc-amino acids. *Tetrahedron* **1987**, *43* (12), 2675-2680.
- ²³⁶ Barlos, K.; Gatos, D.; Hatzi, O.; Koch, N.; Koutsogianni, S., Synthesis of the very acid-sensitive Fmoc-Cys(Mmt)-OH and its application in solid-phase peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res* **1996**, *47* (3), 148-53.
- ²³⁷ Annis, I.; Chen, L.; Barany, G., Novel Solid-Phase Reagents for Facile Formation of Intramolecular Disulfide Bridges in Peptides under Mild Conditions^{1,2}. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (29), 7226-7238.
- ²³⁸ Veber, D. F.; Milkowski, J. D.; Varga, S. L.; Denkwalter, R. G.; Hirschmann, R., Acetamidomethyl. A novel thiol protecting group for cysteine. *J Am Chem Soc* **1972**, *94* (15), 5456-61.
- ²³⁹ Kamber, B.; Hartmann, A.; Eisler, K.; Riniker, B.; Rink, H.; Sieber, P.; Rittel, W., The Synthesis of Cystine Peptides by Iodine Oxidation of S-Trityl-cysteine and S-Acetamidomethyl-cysteine Peptides. *Helvetica Chimica Acta* **1980**, *63* (4), 899-915.
- ²⁴⁰ Moroder, L.; Besse, D.; Musiol, H.-J.; Rudolph-Böhner, S.; Siedler, F., Oxidative folding of cystine-rich peptides vs regioselective cysteine pairing strategies. *Biopolymers* **1996**, *40* (2), 207-234.
- ²⁴¹ Wu, F.; Mayer, J. P.; Zaykov, A. N.; Zhang, F.; Liu, F.; DiMarchi, R. D., Chemical Synthesis of Human Insulin-Like Peptide-6. *Chemistry* **2016**, *22* (28), 9777-83.
- ²⁴² Bathgate, R. A.; Lin, F.; Hanson, N. F.; Otvos, L., Jr.; Guidolin, A.; Giannakis, C.; Bastiras, S.; Layfield, S. L.; Ferraro, T.; Ma, S.; Zhao, C.; Gundlach, A. L.; Samuel, C. S.; Tregear, G. W.; Wade, J. D., Relaxin-3: improved synthesis strategy and demonstration of its high-affinity interaction with the relaxin receptor LGR7 both in vitro and in vivo. *Biochemistry* **2006**, *45* (3), 1043-53.
- ²⁴³ Sieber, P.; Kamber, B.; Riniker, B.; Rittel, W., Iodine Oxidation of S-Trityl- and S-Acetamidomethyl-cysteine-peptides Containing Tryptophan: Conditions Leading to the Formation of Tryptophan-2-thioethers. *Helvetica Chimica Acta* **1980**, *63* (8), 2358-2363.
- ²⁴⁴ Lamthanh, H.; Roumestand, C.; Deprun, C.; Menez, A., Side reaction during the deprotection of (S-acetamidomethyl)cysteine in a peptide with a high serine and threonine content. *Int J Pept Protein Res* **1993**, *41* (1), 85-95.
- ²⁴⁵ Lamthanh, H.; Virelizier, H.; Frayssinhes, D., Side reaction of S-to-N acetamidomethyl shift during disulfide bond formation by iodine oxidation of S-acetamidomethyl-cysteine in a glutamine-containing peptide. *Peptide research* **1995**, *8* (6), 316-20.
- ²⁴⁶ Engebretsen, M.; Agner, E.; Sandosham, J.; Fischer, P. M., Unexpected lability of cysteine acetamidomethyl thiol protecting group. Tyrosine ring alkylation and disulfide bond formation upon acidolysis. *J Pept Res* **1997**, *49* (4), 341-6.
- ²⁴⁷ Yajima, H.; Fujii, N.; Ogawa, H.; Kawatani, H., Trifluoromethanesulphonic acid, as a deprotecting reagent in peptide chemistry. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1974**, (3).
- ²⁴⁸ Otaka, A.; Koide, T.; Shide, A.; Fujii, N., Application of dimethylsulphoxide(DMSO) / trifluoroacetic acid(TFA) oxidation to the synthesis of cystine-containing peptide. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32* (9), 1223-1226.
- ²⁴⁹ Cuthbertson, A.; Indrevoll, B., A method for the one-pot regioselective formation of the two disulfide bonds of α -conotoxin SI. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41* (19), 3661-3663.
- ²⁵⁰ Harris, K. M.; Flemer, S., Jr.; Hondal, R. J., Studies on deprotection of cysteine and selenocysteine side-chain protecting groups. *J Pept Sci* **2007**, *13* (2), 81-93.
- ²⁵¹ Schulz, A.; Kluver, E.; Schulz-Maronde, S.; Adermann, K., Engineering disulfide bonds of the novel human beta-defensins hBD-27 and hBD-28: differences in disulfide formation and biological activity among human beta-defensins. *Biopolymers* **2005**, *80* (1), 34-49.
- ²⁵² Dekan, Z.; Mobli, M.; Pennington, M. W.; Fung, E.; Nemeth, E.; Alewood, P. F., Total synthesis of human hepcidin through regioselective disulfide-bond formation by using the safety-catch cysteine protecting group 4,4'-dimethylsulfinylbenzhydryl. *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, *53* (11), 2931-4.
- ²⁵³ Kenner, G. W.; McDermott, J. R.; Sheppard, R. C., The safety catch principle in solid phase peptide synthesis. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications* **1971**, (12).
- ²⁵⁴ Vilaseca, M.; Nicolás, E.; Capdevila, F.; Giralt, E., Reduction of methionine sulfoxide with : Compatibility with peptides containing cysteine and aromatic amino acids. *Tetrahedron* **1998**, *54* (50), 15273-15286.
- ²⁵⁵ Peng, C.; Chen, W.; Sanders, T.; Chew, G.; Liu, J.; Hawrot, E.; Chi, C., Chemical synthesis and characterization of two α 4/7-conotoxins. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2010**, *42* (10), 745-53.
- ²⁵⁶ Söll, R.; Beck-Sickinger, A. G., On the synthesis of orexin A: a novel one-step procedure to obtain peptides with two intramolecular disulphide bonds. *J Pept Sci* **2000**, *6* (8), 387-397.
- ²⁵⁷ Hargittai, B.; Barany, G., Controlled syntheses of natural and disulfide-mispaired regioisomers of α -conotoxin SI. *J Pept Res* **1999**, *54* (6), 468-79.

- ²⁵⁸ Schroll, A. L.; Hondal, R. J.; Flemer, S., Jr., 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridine) (DTNP) as an effective and gentle deprotectant for common cysteine protecting groups. *J Pept Sci* **2012**, *18* (1), 1-9.
- ²⁵⁹ Cuthbertson, A.; Jarnæss, E.; Pullan, S., A method for the one-pot regioselective folding of the heat-stable bacterial enterotoxin ST peptide residues 5–18. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42* (52), 9257-9259.
- ²⁶⁰ Cuthbertson, A.; Indrevoll, B., Regioselective formation, using orthogonal cysteine protection, of an alpha-conotoxin dimer peptide containing four disulfide bonds. *Org Lett* **2003**, *5* (16), 2955-7.s
- ²⁶¹ Jin, A. H.; Dekan, Z.; Smout, M. J.; Wilson, D.; Dutertre, S.; Vetter, I.; Lewis, R. J.; Loukas, A.; Daly, N. L.; Alewood, P. F., Conotoxin Phi-MiXXVIIA from the Superfamily G2 Employs a Novel Cysteine Framework that Mimics Granulin and Displays Anti-Apoptotic Activity. *Angew Chem Int Ed Engl* **2017**, *56* (47), 14973-14976.
- ²⁶² Mochizuki, M.; Tsuda, S.; Tanimura, K.; Nishiuchi, Y., Regioselective formation of multiple disulfide bonds with the aid of postsynthetic S-tritylation. *Org Lett* **2015**, *17* (9), 2202-5.
- ²⁶³ Yang, Y.; Sweeney, W. V.; Schneider, K.; Chait, B. T.; Tam, J. P., Two-step selective formation of three disulfide bridges in the synthesis of the C-terminal epidermal growth factor-like domain in human blood coagulation factor IX. *Protein Sci* **1994**, *3* (8), 1267-75.
- ²⁶⁴ Okumura, M.; Shimamoto, S.; Hidaka, Y., A chemical method for investigating disulfide-coupled peptide and protein folding. *FEBS J* **2012**, *279* (13), 2283-95.
- ²⁶⁵ Vacher, H.; Alami, M.; Crest, M.; Possani, L. D.; Bougis, P. E.; Martin-Eauclaire, M.-F., Expanding the scorpion toxin α -KTX 15 family with AmmTX3 from *Androctonus mauretanicus*. *European Journal of Biochemistry* **2002**, *269* (24), 6037–6041.
- ²⁶⁶ Brady, M. L.; Moon, C. E.; Jacob, T. C., Using an alpha-bungarotoxin binding site tag to study GABA A receptor membrane localization and trafficking. *J Vis Exp* **2014**, (85).
- ²⁶⁷ Anderson, M. J.; Cohen, M. W., Fluorescent staining of acetylcholine receptors in vertebrate skeletal muscle. *J Physiol* **1974**, *237* (2), 385-400.
- ²⁶⁸ Xu, J.; Li, J.; Wu, X.; Song, C.; Lin, Y.; Shen, Y.; Ye, W.; Sun, C.; Wang, X.; Li, Z.; Liu, Y.; Wei, L.; Li, Z.; Xu, Z., Expression and refolding of bioactive alpha-bungarotoxin V31 in *E. coli*. *Protein Expr Purif* **2015**, *110*, 30-6.
- ²⁶⁹ Maity, S. K.; Jbara, M.; Laps, S.; Brik, A., Efficient Palladium-Assisted One-Pot Deprotection of (Acetamidomethyl)Cysteine Following Native Chemical Ligation and/or Desulfurization To Expedite Chemical Protein Synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55* (28), 8108-12.
- ²⁷⁰ Maity, S. K.; Jbara, M.; Mann, G.; Kamnesky, G.; Brik, A., Total chemical synthesis of histones and their analogs, assisted by native chemical ligation and palladium complexes. *Nat Protoc* **2017**, *12* (11), 2293-2322.
- ²⁷¹ Guo, X.-Q.; Liang, J.; Li, Y.; Zhang, Y.; Huang, D.; Tian, C., Total synthesis of snake toxin α -bungarotoxin and its analogues by hydrazide-based native chemical ligation. *Chinese Chemical Letters* **2018**, *29* (7), 1139-1142.
- ²⁷² Karlsson, E.; Eaker, D.; Rydén, L., Purification of a presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. *Toxicon* **1972**, *10* (4).
- ²⁷³ Halpert, J.; Eaker, D., Amino acid sequence of a presynaptic neurotoxin from the venom of *Notechis scutatus scutatus* (Australian tiger snake). *Journal of Biological Chemistry* **1975**, *250* (17), 6990-7.
- ²⁷⁴ Westerlund, B.; Nordlund, P.; Uhlin, U.; Eaker, D.; Eklund, H., The three-dimensional structure of notexin, a presynaptic neurotoxic phospholipase A2 at 2.0 Å resolution. *FEBS Letters* **1992**, *301* (2), 159-164.
- ²⁷⁵ Jacobsen, M. T.; Erickson, P. W.; Kay, M. S., Aligator: A computational tool for optimizing total chemical synthesis of large proteins. *Bioorg Med Chem* **2017**, *25* (18), 4946-4952.
- ²⁷⁶ Skinner, W. S.; Dennis, P. A.; Li, J. P.; Quistad, G. B., Identification of insecticidal peptides from venom of the trap-door spider, *Aptostichus schlingeri* (Ctenizidae). *Toxicon* **1992**, *30* (9), 1043-1050.
- ²⁷⁷ Bond, J. E., Systematics of the Californian euctenizine spider genus *Apomastus* (Araneae : Mygalomorphae : Cyrtaucheniidae): the relationship between molecular and morphological taxonomy. *Invertebrate Systematics* **2004**, *18* (4).
- ²⁷⁸ Jacobsen, M. T.; Petersen, M. E.; Ye, X.; Galibert, M.; Lorimer, G. H.; Aucagne, V.; Kay, M. S., A Helping Hand to Overcome Solubility Challenges in Chemical Protein Synthesis. *J Am Chem Soc* **2016**, *138* (36), 11775-82.
- ²⁷⁹ Boel, E.; Vuust, J.; Norris, F.; Norris, K.; Wind, A.; Rehfeld, J. F.; Marcker, K. A., Molecular cloning of human gastrin cDNA: evidence for evolution of gastrin by gene duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1983**, *80* (10), 2866-9.
- ²⁸⁰ Rehfeld, J. F.; Johnsen, A. H., Identification of gastrin component I as gastrin-71. The largest possible bioactive progastrin product. *Eur J Biochem* **1994**, *223* (3), 765-73.
- ²⁸¹ Kim, Y. H.; Stites, W. E., Effects of excluded volume upon protein stability in covalently cross-linked proteins with variable linker lengths. *Biochemistry* **2008**, *47* (33), 8804-14.
- ²⁸² Izumi, M.; Komaki, S.; Okamoto, R.; Seko, A.; Takeda, Y.; Ito, Y.; Kajihara, Y., Synthesis of misfolded glycoprotein dimers through native chemical ligation of a dimeric peptide thioester. *Org Biomol Chem* **2016**, *14* (25), 6088-94.

- ²⁸³ Drew, L. J.; Rugiero, F.; Cesare, P.; Gale, J. E.; Abrahamsen, B.; Bowden, S.; Heinzmann, S.; Robinson, M.; Brust, A.; Colless, B.; Lewis, R. J.; Wood, J. N., High-threshold mechanosensitive ion channels blocked by a novel conopeptide mediate pressure-evoked pain. *PLoS One* **2007**, *2* (6), e515.
- ²⁸⁴ Marvin, L.; De, E.; Cosette, P.; Gagnon, J.; Molle, G.; Lange, C., Isolation, amino acid sequence and functional assays of SGTx1. The first toxin purified from the venom of the spider *scodra griseipes*. *Eur J Biochem* **1999**, *265* (2), 572-9.
- ²⁸⁵ Lee, C. W.; Kim, S.; Roh, S. H.; Endoh, H.; Kodera, Y.; Maeda, T.; Kohno, T.; Wang, J. M.; Swartz, K. J.; Kim, J. I., Solution structure and functional characterization of SGTx1, a modifier of Kv2.1 channel gating. *Biochemistry* **2004**, *43* (4), 890-7.
- ²⁸⁶ Wang, J. M.; Roh, S. H.; Kim, S.; Lee, C. W.; Kim, J. I.; Swartz, K. J., Molecular surface of tarantula toxins interacting with voltage sensors in K(v) channels. *J Gen Physiol* **2004**, *123* (4), 455-67.
- ²⁸⁷ Bosmans, F.; Escoubas, P.; Diochot, S.; Mebs, D.; Craik, D.; Hill, J.; Nakajima, T.; Lazdunski, M.; Tytgat, J. In *Isolation and characterization of phlotoxin 1 (PhlTx1), a novel peptide active on voltage-gated sodium channels*, 13ème Rencontres en Toxinologie "Toxines et douleur", Paris, France, Paris, France, 2005.
- ²⁸⁸ Schulz, A.; Marx, U. C.; Tidten, N.; Lauber, T.; Hidaka, Y.; Adermann, K., Side chain contributions to the interconversion of the topological isomers of guanylin-like peptides. *J Pept Sci* **2005**, *11* (6), 319-30.
- ²⁸⁹ Craik, D. J.; Daly, N. L.; Waite, C., The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon* **2001**, *39* (1), 43-60.
- ²⁹⁰ Nicolas, S.; Zoukianian, C.; Bosmans, F.; Montnach, J.; Diochot, S.; Cuypers, E.; De Waard, S.; Beroud, R.; Mebs, D.; Craik, D.; Boturyn, D.; Lazdunski, M.; Tytgat, J.; De Waard, M., Chemical Synthesis, Proper Folding, Nav Channel Selectivity Profile and Analgesic Properties of the Spider Peptide Phlotoxin 1. *Toxins (Basel)* **2019**, *11* (6).
- ²⁹¹ Goncalves, T. C.; Lesport, P.; Kuyllé, S.; Stura, E.; Ciolek, J.; Mourier, G.; Servent, D.; Bourinet, E.; Benoit, E.; Gilles, N., Evaluation of the Spider (Phlogiellus genus) Phlotoxin 1 and Synthetic Variants as Antinociceptive Drug Candidates. *Toxins (Basel)* **2019**, *11* (9).
- ²⁹² Escoubas, P.; Diochot, S.; Celerier, M. L.; Nakajima, T.; Lazdunski, M., Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies. *Mol Pharmacol* **2002**, *62* (1), 48-57.
- ²⁹³ Osteen, J. D.; Herzig, V.; Gilchrist, J.; Emrick, J. J.; Zhang, C.; Wang, X.; Castro, J.; Garcia-Caraballo, S.; Grundy, L.; Rychkov, G. Y.; Weyer, A. D.; Dekan, Z.; Undheim, E. A.; Alewood, P.; Stucky, C. L.; Brierley, S. M.; Basbaum, A. I.; Bosmans, F.; King, G. F.; Julius, D., Selective spider toxins reveal a role for the Nav1.1 channel in mechanical pain. *Nature* **2016**, *534* (7608), 494-9.
- ²⁹⁴ Swartz, K. J.; MacKinnon, R., An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron* **1995**, *15* (4), 941-949.
- ²⁹⁵ Takahashi, H.; Kim, J. I.; Min, H. J.; Sato, K.; Swartz, K. J.; Shimada, I., Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K(+) channels: common surface features of gating modifier toxins. *J Mol Biol* **2000**, *297* (3), 771-80.
- ²⁹⁶ Swartz, K. J.; MacKinnon, R., Hanatoxin Modifies the Gating of a Voltage-Dependent K+ Channel through Multiple Binding Sites. *Neuron* **1997**, *18* (4), 665-673.
- ²⁹⁷ Qi, Y. K.; Tang, S.; Huang, Y. C.; Pan, M.; Zheng, J. S.; Liu, L., Hmb(off/on) as a switchable thiol protecting group for native chemical ligation. *Org Biomol Chem* **2016**, *14* (18), 4194-8.
- ²⁹⁸ Simmonds, R. G., Use of the Hmb backbone-protecting group in the synthesis of difficult sequences. *Int J Pept Protein Res* **1996**, *47* (1-2), 36-41.
- ²⁹⁹ Wahlström, K.; Planstedt, O.; Undén, A., Synthesis and purification of aggregation-prone hydrophobic peptides by the incorporation of an Fmoc dipeptide with the peptide bond protected with a modified 2-hydroxy-4-methoxybenzyl (Hmb) group. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49* (24), 3921-3924.
- ³⁰⁰ Zheng, J. S.; Yu, M.; Qi, Y. K.; Tang, S.; Shen, F.; Wang, Z. P.; Xiao, L.; Zhang, L.; Tian, C. L.; Liu, L., Expedient total synthesis of small to medium-sized membrane proteins via Fmoc chemistry. *J Am Chem Soc* **2014**, *136* (9), 3695-704.
- ³⁰¹ Batey, R. A.; Yoshina-Ishii, C.; Taylor, S. D.; Santhakumar, V., A new protocol for the formation of carbamates and thiocarbamates using carbamoyl imidazolium salts. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40* (14), 2669-2672.
- ³⁰² Meyer, Y.; Richard, J. A.; Delest, B.; Noack, P.; Renard, P. Y.; Romieu, A., A comparative study of the self-immolation of para-aminobenzylalcohol and hemithioaminal-based linkers in the context of protease-sensitive fluorogenic probes. *Org Biomol Chem* **2010**, *8* (8), 1777-80.
- ³⁰³ Giraud, M.; Cavelier, F.; Martinez, J., A side-reaction in the SPPS of Trp-containing peptides. *Journal of Peptide Science* **1999**, *5* (10), 457-461.
- ³⁰⁴ Lanzilotti, A. E.; Littell, R.; Fanshawe, W. J.; McKenzie, T. C.; Lovell, F. M., Stereoselective reduction of some indoles with triethylsilane-trifluoroacetic acid. *The Journal of Organic Chemistry* **1979**, *44* (26), 4809-4813.

Résumé

Les peptides montrent un potentiel thérapeutique important à ce jour relativement peu exploité. Dans ce contexte, les venins d'animaux représentent un sujet d'étude particulièrement intéressant puisque ceux-ci ont la particularité de contenir plusieurs centaines de toxines peptidiques structurées par un ou plusieurs ponts disulfures. Dans un premier temps isolées et identifiées à partir des venins, l'enjeu réside ensuite dans la capacité à synthétiser ces toxines par voie chimique. Cette thèse financée par l'« Association Nationale Recherche Technologie » s'inscrit dans ce contexte et a pour objectif le développement de peptides complexes, en particulier des toxines, pour leur commercialisation. Deux problématiques principales ressortent : une limitation concernant la taille des peptides désirés, ainsi que leur structuration après synthèse chimique.

La synthèse peptidique sur support solide, ou SPPS, trouve généralement sa limite dans les synthèses de peptides de plus d'une cinquantaine d'acides aminés, pour lesquels les rendements diminuent inexorablement avec l'augmentation du nombre de résidus. Afin d'accéder à des peptides et toxines plus longs, la première partie de cette thèse a été consacrée à l'étude de la *native chemical ligation*. Au travers de cette étude, divers peptides et toxines ne pouvant être obtenus directement par SPPS ont été synthétisés.

La deuxième difficulté lors de la synthèse de toxines par voie chimique réside dans le repliement de la molécule dans sa conformation native. Les différents ponts disulfures des toxines doivent être reproduits à l'identique pour obtenir l'activité biologique attendue. Une des méthodes pour y parvenir consiste à utiliser un jeu de groupements protecteurs orthogonaux de la cystéine permettant de former les ponts disulfures un par un à travers une succession d'oxydations et de déprotections : c'est la formation dirigée de ponts disulfures. La deuxième partie de cette thèse a été consacrée à l'étude de cette méthode, son optimisation et son adaptation à différentes toxines d'intérêt. Pour ce faire, une nouvelle combinaison de groupements protecteurs a été utilisée afin de pallier aux différentes difficultés rencontrées au cours des travaux effectués.

Abstract

To date, Peptides present an important therapeutic potential that is poorly exploited. In this context, animal venoms are particularly interesting since they contain several hundreds of peptide toxins that are structured by one or more disulfide bridges. Initially isolated and identified from venoms, the challenge then lies in the ability to synthesize these toxins via chemical means. This thesis, supported by the "Association Nationale Recherche Technologie" aims to develop complex peptides, in particular toxins, for commercialization. Two main problems emerge: a limitation concerning the size of the desired peptides and the folding of these synthetic peptides.

Solid phase peptide synthesis, or SPPS, generally finds its limit in the synthesis of peptides containing more than fifty amino acids, for which the yields decrease dramatically with the increase in the number of residues. In order to access the longest peptides and toxins, the first part of this thesis was devoted to the study of the Native Chemical Ligation. Through this study, various peptides and toxins that cannot be obtained directly by SPPS have been synthesized.

The second difficulty during the synthesis of toxins by chemical means lies in the folding of the molecule into its native conformation. The natural disulfide bridges of toxins must be reproduced to obtain the expected biological activity. A method consists in the use of orthogonal protecting groups of cysteine, allowing successive disulfide bridge formations through a sequence of oxidation and deprotection steps, named directed disulfide bond formation. The second part of this thesis was therefore devoted to the study of this method, its optimization and its adaptation to various toxins of interest. For this purpose, a new combination of protecting groups was used to overcome the drawbacks encountered in these studies.