



Développement d'architectures foldamères comme systèmes de transport originaux de biomolécules.

Megane Bornerie

► To cite this version:

Megane Bornerie. Développement d'architectures foldamères comme systèmes de transport originaux de biomolécules.. Chimie organique. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0210 . tel-03331631

HAL Id: tel-03331631

<https://theses.hal.science/tel-03331631>

Submitted on 2 Sep 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 PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE Sciences Chimiques

SPÉCIALITÉ Chimie Organique

Par Mégane BORNERIE

**DEVELOPPEMENT D'ARCHITECTURES FOLDAMERES
COMME SYSTEMES DE TRANSPORT ORIGINAUX DE
BIOMOLECULES**

Sous la direction de : Dr. Céline DOUAT
(co-directeur : Dr. Gilles GUICHARD)

Soutenue le 08 novembre 2019

Membres du jury :

M. KICHLER Antoine
Mme PENG Ling
M. RENAUDET Olivier
Mme DESVERGNES Valérie

Directeur de recherche CNRS, Université Strasbourg
Directrice de recherche CNRS, Université Aix-Marseille
Professeur, Université Grenoble-Alpes
Chargée de recherche CNRS

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

Titre : Développement d'architectures foldamères comme systèmes de transport originaux de biomolécules

Résumé :

Les foldamères peptidomimétiques à base d'urées (oligourées) sont aujourd'hui utilisés pour mimer la composition et le repliement en hélice des peptides pénétrant les cellules (CPPs) afin d'évaluer leur capacité à transporter des biomolécules à l'intérieur de lignées cellulaires ciblées. Il a en effet récemment été mis en évidence que la dimérisation de courtes séquences d'oligourées amphipatiques permettait de transporter efficacement des acides nucléiques comme les plasmides d'ADN. Dans ce contexte, un hybride urée-peptide a été conçu capable d'acheminer des plasmides d'ADN dans différentes lignées cellulaires avec une efficacité comparable à celle d'agents de transport commerciaux. De plus, ce foldamère pénétrant les cellules (CPF) présente une stabilité accrue en milieu enrichi en sérum. Ce projet s'est aussi intéressé à concevoir des CPFs capables d'acheminer de petits ARNs interférents (siARN) dans diverses lignées cellulaires. En effet, il est maintenant connu que l'utilisation de ces petits ARNs permet de bloquer l'expression d'une protéine cible et cette nouvelle stratégie thérapeutique est aujourd'hui en plein essor. De nouvelles séquences CPFs ont été identifiées et ont permis d'acheminer efficacement deux siARNs différents : l'un ciblant un gène rapporteur et l'autre un gène endogène. Au cours de ce projet, il a aussi été montré que les CPFs à base d'urées sont capables de transporter efficacement et via la formation d'un complexe non covalent des protéines de taille et de charge variées dans différentes lignées cellulaires. Enfin, des études de modulation de l'hélicité des foldamères oligourées ont été réalisées afin d'étendre le champ d'application des foldamères à base d'urées.

Mots clés : Agents de transfection, oligourées, foldamères, ADN, siARN, protéine



CBMN

Institut de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets-UMR5248

IECB-Institut Européen de Chimie et Biologie

2, rue Robert Escarpit-33600 Pessac

Title :Design of cell penetrating foldamers for the intracellular delivery of biomolecules

Abstract :

Peptidomimetic oligoureia foldamers are now used to mimic the composition and the structure of cell-penetrating peptides (CPPs) to deliver biomolecules (i.e nucleic acids) into cells. It has been recently shown that dimerisation of short amphipatic oligoureias enables to efficiently deliver nucleic acids (i.e plasmid DNA) into different cell lines. In this context, a new hybrid urea-peptide cell penetrating foldamer (CPF) has been designed and was shown to be able to deliver pDNA into different cell lines with comparable efficiency than commercially available delivery agents. Moreover, this new CPF exhibits a high stability in serum-rich media. In this project, other CPFs have been developed to specifically deliver small interfering RNAs (siRNAs) into cells. Indeed, small RNAs can be used to inhibit the expression of a targeted protein and their therapeutic potential has drawn significant interest over the past 10 years. In this work, two different siRNAs have been successively delivered: one targeting a reporter gene and the other one an endogenous gene. During this thesis, it has been shown that oligoureia CPFs can also be used to deliver proteins with various size and charge into different cell lines. Finally, this study also tried to modulate the helicity of oligoureia foldamers to extend their biomimetic applications.

Keywords : Delivery agent, oligoureia, foldamer, DNA, siRNA, protein



CBMN

Institut de Chimie et de Biologie des Membranes et des Nano-objets-UMR5248

IECB-Institut Européen de Chimie et Biologie

2, rue Robert Escarpit-33600 Pessac

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN) à l'Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB) et ont été financés par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche ainsi que par le CNRS. Je souhaiterais donc dans un premier temps remercier les organismes financeurs de mon projet de thèse.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Olivier Renaudet ainsi que le Dr. Ling Peng qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse en qualité de rapporteurs. Je remercie également le Dr. Valérie Desvergues et le Dr. Antoine Kichler d'avoir accepté d'examiner mon travail. Je les remercie pour l'attention qu'ils ont porté à la lecture de mon manuscrit et à l'examen de ma soutenance de thèse.

Je remercie tout particulièrement le Dr. Céline Douat et le Dr. Gilles Guichard pour avoir été d'excellents directeurs de thèse. J'ai eu la chance de participer à un projet de recherche multidisciplinaire passionnant et très enrichissant, qui m'a énormément appris tant sur le plan professionnel que personnel.

Céline, j'ai énormément appris à vos côtés et je vous remercie pour votre encadrement mais aussi pour la liberté et la confiance que vous m'avez accordées durant ces trois ans et qui m'ont permis de gagner en autonomie et en connaissances. Malgré la distance, vous avez su rester très présente et très à l'écoute de façon à m'accompagner parfaitement durant ces trois années de formation. Merci aussi pour votre gentillesse et votre bienveillance, cette thèse n'aurait pas été la même sans vous !

Gilles, vous m'avez accueilli dans un laboratoire doté d'excellents équipements et où chacun peut apprendre des autres grâce à une émulation de groupe très positive. Je vous remercie aussi pour vos enseignements et votre confiance dans mes projets de recherche. Votre disponibilité et vos conseils m'ont permis d'avancer sereinement dans ma recherche. Je ressors aujourd'hui grandie par cette expérience dans votre équipe.

J'aimerais aussi exprimer ma gratitude au Dr. Antoine Kichler qui m'a gentiment accueillie dans son laboratoire et m'a initiée aux joies de la biologie. Merci aussi pour ton investissement sans relâche dans ce projet de thèse et ta collaboration qui nous a permis d'obtenir de nombreux résultats.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe du Dr. Gilles Guichard pour leur aide précieuse et pour avoir rendu ces trois années agréables à vivre au quotidien. Je pense tout spécialement à Jérémie Buratto (le biologiste parmi les chimistes) qui a su m'aider au quotidien pour comprendre la biologie pour ensuite devenir un ami, à Christophe André qui m'a transmis ses connaissances et ses conseils mais aussi à Guillaume Compain pour ses connaissances et son aide au laboratoire. Je remercie aussi Morgane, Christel, Camille, Antoine, Maxime, Clément, Aline, Sung Hyun, François, Johanne, Diane, Julien pour leur bonne humeur au laboratoire.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce projet. Merci à Estelle Morvan et Axelle Grelard pour vos conseils et votre aide précieuse en RMN. Merci à Brice Kauffmann et Stéphane Massip pour avoir résolu les structures cristallographiques. Merci aussi à Frédéric Rosu pour sa formation et les analyses de masse.

Il est maintenant temps de remercier celui qui a eu le courage de me supporter durant ces trois années de travail, de stress, de pleurs, de déceptions, de joies et d'euphorie. Ton soutien et ta présence me sont essentiels au quotidien et tu as su comprendre les enjeux et les difficultés de ce travail de thèse avec patience et encouragements. Merci donc à Yann Fers qui a su m'apporter un soutien et une source de motivation quotidienne. Merci tout simplement d'être toi et de m'accompagner aujourd'hui encore dans les joies et les difficultés du quotidien.

Je remercie évidemment aussi mes parents et ma sœur pour leur présence de loin ou de près tout au long de ces trois années.

Abréviations

2D	deux dimensions
3D	trois dimensions
ACN	acétonitrile
ADN	acide désoxyribonucléique
Alloc	allyloxycarbonyl
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASU	unité asymétrique
Boc	<i>tert</i> -butylcarbonyl
BSA	bovine serum albumin
CCDC	Cambridge crystallographic data center
CD	dichroïsme circulaire
CD₃OH	methanol deutéré
CDCl₃	chloroforme deutéré
CH₃CN	acétonitrile
COSY	correlated spectroscopy
CPF	foldamère pénétrant les cellules
CPP	peptide pénétrant les cellules
cryoTEM	cryomicroscopie électronique à transmission
CTC	2-chlorotriylchloride résine
DCM	dichlorométhane
DIC	diisopropylcarbodiimide
DIEA	diisopropyléthylamine
DLS	diffusion dynamique de la lumière
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DOTAP	N,N,N-triméthylammonium méthylsulfate
DTT	dithiothréitol
EDT	éthanedithiol
Et₂O	diéthylether
Et₃N	triéthylamine
EtOAc	éthyl acétate

EtOH	éthanol
FDA	Food and Drug Administration
FITC	fluorescéine isothiocyanate
Fmoc	fluorénylméthoxycarbonyl
GAG	glycoaminoglycans
GFP	green fluorescent protein
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GSH	glutathion
H₂O	eau
HBTU	tétraméthyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronihexafluorophosphate
HCl	acide chlorhydrique
HF	acide fluorhydrique
HOBt	hydroxybenzotriazole
HPLC	chromatographie en phase liquid haute performance
HRMS	spectrométrie de masse haute résolution
ITC	titration calorimétrique isotherme
kDa	kilo dalton
KHSO₄	potassium bisulfate
LDH	lactate déshydrogénase
MBHA	4-méthylbenzhydramine
MeOH	méthanol
MgSO₄	sulfate de magnésium
MS	spectrométrie de masse
MTS	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium)
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tétrazolium
mV	millivolt
NaCl	chlorure de sodium
NH₄OAc	ammonium acétate
nm	nanomètre
NOE	nuclear overhauser effect
NPys₂	bis(5-nitro-2-pyridyl)disulfide
Oxyrna	éthyl-2-cyano-2-(hydroximino)acétate
Pd(PPh₃)₄	palladium tétrakis triphénylphosphine
PDB	Protein Data Bank
PEG	polyéthylenglycol

PEI	polyéthylèneimine
pGFP	plasmide exprimant la GFP
pLuc	plasmide exprimant la luciférase
PMe₃	triméthylphosphine
PPI	polyproline I
PPII	polyproline II
ppm	partie par million
PTD	protein transduction domain
RCM	métathèse cyclisante
RISC	RNA silencing complex
RMN	résonnance magnétique nucléaire
siARN	petits ARN interférent
siCTRL	siARN contrôle
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
siPlk1	siARN ciblant l'expression de la Polo-like kinase 1
SLN	signal de localisation nucléaire
S_N	substitution nucléophile
S_NAr	substitution nucléophile aromatique
TAT	trans activateur de transcription du VIH
TBAOAc	acétate de tétra-N-butylammonium
TFA	acide trifluoroacétique
TFE	2,2,2-trifluoroéthanol
THF	tétrahydrofurane
TIS	triisopropylsilane
TOCSY	total correlated spectroscopy
VIH	virus d'immunodéficience humaine
Z	benzyloxycarbonyle
ZnCl₂	chlorure de zinc
δ	déplacement chimique (ppm)
μg	microgramme
μL	microlitre
μM	micromolaire

Nomenclature utilisée

Les acides aminés seront indifféremment désignés sous leur nom complet ou sous leur code à trois lettres ou une lettre. Par exemple, l'alanine sera nommée Ala ou A.

Les résidus de type urée seront désignés par le code à trois lettres de l'acide aminé dont ils sont issus suivi en exposant de la lettre « u ». Ainsi le résidu dérivé de l'alanine sera nommé Ala^u.

Les atomes de carbone de la chaîne principale seront désignés par des lettres grecques α , β , γ , δ et ϵ comme présenté sur la Figure 1.

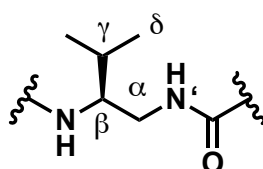


Figure 1 : exemple de notation des résidus de type urée.

Afin de désigner les séquences des oligourées synthétisées dans ce manuscrit, une notation spécifique a été utilisée. Par analogie avec la synthèse peptidique, les résidus des oligourées seront numérotés de l'extrémité « C-terminale » à l'extrémité « N- terminale » (Figure 2).

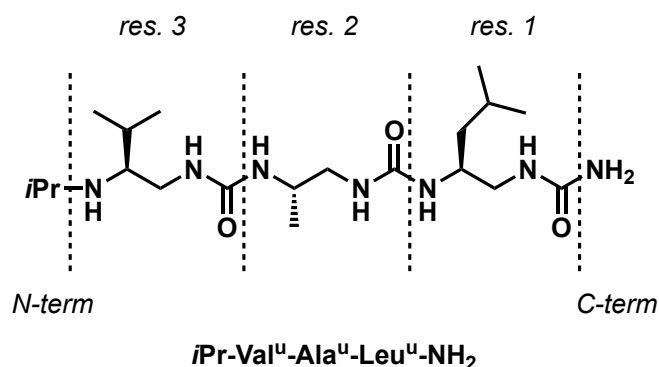


Figure 2 : Notation des oligourées et numérotation des résidus.

Les composés rapportés dans cette thèse font l'objet d'une numérotation systématique, suivant leur ordre d'apparition dans ce manuscrit. Les monomères classiquement utilisés en synthèse d'oligourée seront désignés par la lettre **M** suivi en exposant de la lettre correspond au code à une lettre de l'acide aminé dont ils sont issus. Par exemple, le monomère dérivé de la valine sera nommé **M^V**.

En ce qui concerne les nouveaux monomères protégés par un groupement benzyloxycarbonyl (Z) présentés dans le chapitre 3, ils seront dénommés par **Z-M** suivi en exposant par le code à une lettre de l'acide aminé dont ils sont issus et en indice par la position de la chaîne latérale dans le résidu urée formé. Il faut noter que pour ces résidus particuliers une chaîne latérale sur le motif éthylène diamine présente sur le carbone α sera toujours de stéréochimie (R) et une chaîne latérale présente sur le carbone β sera toujours de stéréochimie (S) (Figure 3).

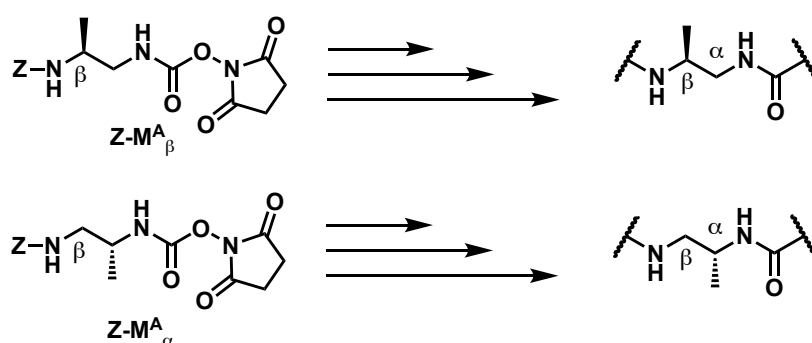


Figure 3 : Notation des monomères de type $\mathbf{Z-M^X_{\alpha/\beta}}$ et structure chimique du résidu urée résultant.

Sommaire

CHAPITRE 1 Conception de nouveaux mimes de peptide pénétrant les cellules et leurs applications thérapeutiques		1
1)	<i>Les peptides pénétrant les cellules (CPPs)</i>	5
a)	Caractéristiques des séquences des CPPs	5
b)	Les modes d'internalisation des CPPs	13
c)	Activité biologique des CPPs	18
2)	<i>Les CPPs comme agent de transport</i>	19
a)	Transport d'acides nucléiques	20
b)	Transport de protéines	23
3)	<i>Les foldamères pénétrant les cellules (CPFs)</i>	28
a)	Les foldamères comme mimes de peptides	28
b)	Exemples de foldamères pénétrant les cellules (CPFs)	31
4)	<i>Les oligourées pénétrant les cellules</i>	32
a)	Présentation et caractérisation structurale	32
b)	Synthèse des oligourées	36
c)	Développement de séquences oligourées pénétrant les cellules capables de délivrer un cargo	38
5)	<i>Objectifs de la thèse</i>	44
	<i>Bibliographie</i>	45
CHAPITRE 2 Nouveaux foldamères d'oligourées pour le transport intracellulaire d'acides nucléiques et de protéines		56
1)	<i>Conception d'un nouveau système hybride foldamère-peptide : adressage cellulaire et stabilité accrue en milieu biologique</i>	58
a)	Développement d'une résine de type cystamine pour la synthèse de CPF	59
b)	Synthèse automatisée sur support solide de la version « cystéine » du peptide LAH4	62
c)	Homo- et Hétéro-dimérisation des séquences CPF et CPP en solution	65
d)	Détermination des propriétés de transfection des nouvelles architectures foldamères et peptidiques	68
2)	<i>Conception de nouvelles séquences CPF à base d'urée pour le transport de siARN</i>	76
a)	L'ARN interférence comme outil thérapeutique	76
b)	Séquence foldamères à base d'urée ciblant les siARN	78

c) Transport <i>in vitro</i> d'un siARN ciblant l'expression de la luciférase	80
3) Utilisation de CPF à base d'urées pour le transport intracellulaire de protéines	88
a) Les protéines comme outil thérapeutique	88
b) Transport <i>in vitro</i> de plusieurs protéines par un dimère d'oligourée	91
4) Conclusion et perspectives	98
Bibliographie	99
 Chapitre 3 Modulation de l'hélicité pour étendre les champs d'applications des foldamères d'oligourées	 104
1) Conception d'oligourées hydrosolubles cycliques et étude de leur repliement	106
a) Développement d'une nouvelle résine pour la synthèse d'oligourées bis-thiol	110
b) Macrocyclisation d'oligourées	113
c) Étude conformationnelle en solution	117
2) Dynamique de l'hélice oligourée et induction d'hélicité par reconnaissance d'anion	120
a) Synthèse en solution des nouvelles oligourées <i>meso</i>	123
b) Etude conformationnelle en solution et à l'état solide	127
c) Reconnaissance d'anion et inversion du sens d'hélice	132
3) Conclusion et perspectives	135
Bibliographie	136
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	 139
 Partie Expérimentale	 146

CHAPITRE 1

Conception de nouveaux mimes de peptide pénétrant les
cellules et leurs applications thérapeutiques

La membrane plasmique des cellules eucaryotes est essentielle au fonctionnement et à la survie de la cellule. Elle est un système complexe, barrière sélective à l'afflux non régulé de molécules au sein du milieu intracellulaire (Figure I.1). Elle est composée d'une bicouche phospholipidique et contient différents type de protéines (protéines intramembranaires, périphériques) dont certaines sont équipées de polysaccharides dirigés vers le milieu extracellulaire (glycoprotéine). Certaines petites molécules d'intérêt thérapeutique ont la capacité de spontanément diffuser à travers la bicouche phospholipidique pour atteindre leur cible biologique intracellulaire. D'autres agents thérapeutiques pénètrent dans la cellule grâce à des mécanismes de transport membranaire actifs impliquant leur reconnaissance par un récepteur membranaire.

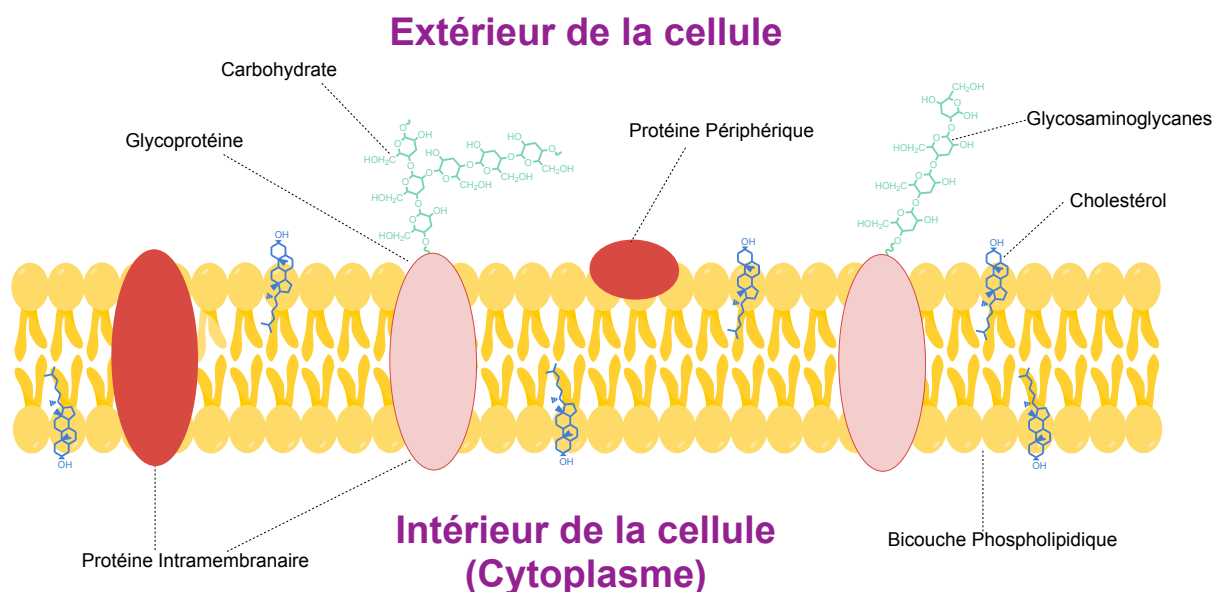


Figure I.1 : Représentation schématique de la membrane plasmique des cellules eucaryotes.

Néanmoins, beaucoup de composés ayant un fort potentiel thérapeutique ne possèdent pas les caractéristiques physiques et chimiques permettant leur diffusion efficace et sûre du milieu extra- vers le milieu intra-cellulaire. Au début des années 1980, la « Food and Drug Administration » (FDA) a pour la première fois autorisé, la mise sur le marché d'un produit pharmaceutique issu d'ADN recombinant : l'insuline humaine, une protéine utilisée pour le traitement du diabète.¹ Depuis, l'utilisation de biomolécules telles que les protéines, les peptides ou les oligonucléotides, s'est étendue à un large champ d'applications thérapeutiques.^{2,3} Les principaux avantages de ces biomolécules sont leur haute spécificité, leur tolérance et leur faible toxicité comparées aux petites molécules de synthèse.³ Cependant, leur nature hydrophile ainsi que dans le cas des acides nucléiques leur caractère anionique limitent fortement leur utilisation thérapeutique. Leur faible capacité à traverser la membrane plasmique hydrophobe les empêche d'accéder à leur cible intracellulaire ou nucléaire.⁴

Par conséquent, des systèmes de transport efficaces sont plus que jamais nécessaires pour pallier ce challenge thérapeutique. Plusieurs méthodes ont été développées pour acheminer des agents thérapeutiques dans les cellules à travers la membrane plasmique. On peut tout d'abord citer les méthodes physiques comme la micro-injection ou l'électroporation mais ces techniques ont essentiellement été utilisées pour un usage *in vitro*.⁵ Par ailleurs, l'utilisation de vecteurs viraux, bien que montrant une grande efficacité de transfection, soulève quant à elle des problèmes de toxicité car ces vecteurs peuvent induire une réponse immunitaire et sont potentiellement mutagènes.⁵

En 1988, une alternative pour pallier ces contraintes a émergé d'une découverte faite indépendamment par deux groupes de recherche.^{6,7} Ils ont montré que le trans-activateur de transcription (TAT) du VIH était capable de pénétrer les cellules mammifères et d'activer la réplication du virus *in vitro*. Peu de temps après, en 1991, il a été décrit que l'homéodomaine du gène *Antennapedia*, une homeoprotéine de *Drosophila melanogaster*, était aussi capable de passer la membrane cellulaire.⁸ L'étude de ces deux protéines a permis d'identifier de courtes séquences d'acides aminés capables de pénétrer les cellules. Ainsi, en 1997, Eric Vivès *et al.* ont identifié un segment peptidique de la protéine TAT correspondant à une région basique de celle-ci, constitué de 13 acides aminés, des résidus 48 à 60, responsable de l'activité de pénétration cellulaire.⁹ Par la suite, Park *et al.* ont pu raccourcir cette séquence à neuf acides aminés, comprenant les résidus 49 à 57.¹⁰ Dans la continuité de ces travaux, Derossi *et al.* ont isolés la séquence de l'homéodomaine du gène d'*Antennapedia* responsable de son activité de pénétration cellulaire. Cette séquence constituée de seize résidus est plus communément appelée pénétratine.¹¹ Ces peptides capables de s'auto-intérioriser dans les cellules sont nommés « peptides pénétrants les cellules (CPPs) » ou « domaine de transduction protéique (PTDs) ».

A la suite de ces découvertes fondatrices dans le domaine des CPPs avec les séquences du peptide TAT et de la pénétratine, de nombreux autres CPPs ont été rapportés dans la littérature. On peut par exemple citer le VP22 de l'herpès,¹² le transportan,¹³ les polyarginines,¹⁴ les CPPs riches en résidus proline¹⁵ et les CPPs dérivés de peptides antimicrobiens naturels¹⁶. Aujourd'hui, selon la base de données des CPPs établie en 2012 par G.P.S. Raghava et récemment mise à jour à sa version 2.0, il y aurait 1855 séquences de CPPs identifiées et la majorité d'entre elles seraient linéaires (94.5 %).¹⁷

Bien que le domaine de recherche sur les CPPs ait évolué très rapidement depuis l'identification de la première séquence, offrant aujourd'hui une grande variété de composés, ces peptides partagent des caractéristiques communes. Ce sont généralement de

courtes séquences d'acides aminés (< 30 résidus) qui ont la capacité intrinsèque de pénétrer les cellules avec une faible toxicité *via* différents mécanismes cellulaires. Leur modes d'internalisation sont énergie indépendants, et n'impliquent pas la reconnaissance de ligands de surface. Ces peptides présentent une grande variété en termes de composition. La majorité des CPPs sont cationiques bien qu'il existe quelques CPPs anioniques ou neutres. Leur séquence est la plupart du temps amphiphile et leur structure tridimensionnelle est en hélice alpha à l'exception de rares exemples de CPPs ayant une structure en feuillets beta.¹⁸

Comparés à d'autres agents de transfection de synthèse comme les lipides cationiques¹⁹⁻²² ou les polyéthylèneimines (PEI),²³⁻²⁵ les CPPs montrent une haute biocompatibilité, une plus faible toxicité et leur activité peut être facilement optimisée par de simples modifications de séquence. De plus, leur efficacité est dose-dépendante et ils sont capables de transporter une grande variété de molécules sans restriction de taille (agents d'imagerie, acides nucléiques, protéines...).

Cependant et malgré d'importantes avancées, les CPPs présentent des inconvénients majeurs limitant aujourd'hui encore leur développement pharmaceutique. En particulier, ils montrent une faible stabilité aux protéases présentes dans le sérum humain et possèdent un temps de demi-vie de seulement quelques minutes dans le sang, empêchant toute administration par voie intraveineuse. Afin de pallier leur faible biostabilité, plusieurs stratégies ont été développées et de nouveaux mimes de peptides susceptibles de résoudre ce problème ont été élaborés.²⁶

Ce champ de recherche a bénéficié d'un intérêt croissant dans la conception de nouvelles architectures synthétiques capables d'adopter une conformation définie et contrôlée, plus connues aujourd'hui sous le terme des foldamères.²⁷ L'essor de la chimie des foldamères a en effet ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine thérapeutique. Des progrès remarquables ont été réalisés ces quinze dernières années pour utiliser les foldamères comme molécules bioactives, notamment parce que leur structure secondaire est stable dans un grand nombre de solvants incluant pour certaines familles de foldamères l'eau mais aussi parce qu'ils sont stables face à la dégradation enzymatique. La conception de foldamères capables de reproduire la structure et la fonction des peptides, tout en augmentant leur potentiel thérapeutique a été initiée par S. Gellmann and J.S. Moore.^{27,28} On peut notamment citer l'utilisation des β -peptides,²⁹ des peptoïdes,³⁰ des γ -peptides³¹ ou des oligourées³² dont on retrouve des applications englobant les mimes de peptides antimicrobiens, le design d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine, le mime d'hormones jusqu'au développement de ligands d'ADNs.³³ Bien que ces mimes de peptides répondent à

la question de la biostabilité (protéolyse), leur utilisation en tant que mimes de CPPs n'a été que très peu étudiée. Néanmoins, l'étude de leur fonction biologique est en plein essor.

Dans ce chapitre, nous dresserons un état de l'art des CPPs les plus connus, leur classification, leurs caractéristiques et leurs mécanismes de pénétration cellulaire en essayant de corréler leurs propriétés avec les spécificités de leur séquence. Nous détaillerons leurs applications avec un intérêt particulier pour leur utilisation comme agent de transfection. Enfin, nous présenterons les récentes avancées réalisées sur l'utilisation de foldamères comme mimes de CPPs.

1) Les peptides pénétrant les cellules (CPPs)

a) Caractéristiques des séquences des CPPs

La classification des CPPs peut être faite selon différents critères. Les CPPs peuvent par exemple être classés en différents sous-groupes selon leur origine, composition, mode de pénétration cellulaire ou bien leurs applications. La Table I-1 montre un aperçu des différents types de CPPs en fonction de leur origine et leur séquence en acide aminés.

Table I-1: Exemples de CPPs (caractéristique physico-chimique, séquence et origine).

CPP	Caractéristique principale	Séquence	Origine
TAT (48-60)	Cationique	GRKKRRQRRPPQ	Virus d'immunodéficience humaine Type I (VIH)
Pénétratine		RQIKIWFQNRRMKWKK	Homéodomaine de <i>Drosophila Antennapedia</i>
R9		RRRRRRRRR	Synthétique
VP22		NAKTRRHERRRKLAIER	Virus de l'herpès
R6H4		RRRRRRHHHH	Synthétique
PFV	Hydrophobe	PFVYLI	synthétique
Pep7		SDLWEMMMVSLACQY	Synthétique
SG3		RLSGMNEVLSFRWL	Synthétique
hLF	Amphiphile	KCFQWQRNMRRKVRGPPVSCIQR	Peptide antimicrobiens
ARF (1-22)		MVRRFLVTLRIRACGPPRVRV	Protéine P14ARF
vT5		DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD	Protéine virale
LAH4		KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA	Synthétique

Aujourd'hui, il est encore difficile de prédire les propriétés de transport d'un CPP en considérant uniquement sa composition en acides aminés. Plusieurs propriétés chimiques et physico-chimiques telles que la charge, la chiralité, la structuration, le nombre de groupements aromatiques, le taux de résidus hydrophobes, jouent un rôle dans l'internalisation cellulaire des CPPs. Bien que ces peptides présentent une grande variété de séquences, les caractéristiques suivantes sont essentielles à leur pénétration cellulaire : présence de résidus chargés, hydrophobie et par voie de conséquence nature amphiphile.¹⁸

i) Les CPPs cationiques

Les CPPs dits cationiques se définissent par une charge nette positive et présentant peu, voire aucun, résidus acides.³⁴ Cette classe de CPPs est d'une importance majeure car le premier CPP découvert, le TAT (Table I-1), est lui-même cationique. On peut aussi citer d'autres CPPs cationiques très connus comme le R₉ (polyarginine composé de 9 résidus), le VP22 issu du virus de l'herpès (Table I-1) et le (RXR)₄ où X correspond à l'acide 6-aminohexanoïque, un acide aminé non naturel.³⁵

La surface de la membrane cellulaire est chargée négativement, il semble donc logique que la première interaction entre un CPP et cette dernière soit de nature électrostatique. En effet, le CPP, grâce à ses résidus chargés positivement interagit avec les charges négatives des polysaccharides et des lipides situés à la surface de la membrane cellulaire. Le rôle des charges dans l'internalisation de macromolécules a été démontré il y a plus de cinquante ans par Ryser et Hancock, qui ont mis en évidence que la pénétration d'albumine dans des cellules tumorales était améliorée en présence de poly-lysines.³⁶ Plus tard, en 2000, l'équipe de P.A. Wender a établi que la substitution des résidus chargés du peptide TAT par des résidus alanine diminuait son efficacité de transfection.¹⁴ Pour cela, ils ont synthétisé des versions tronquées du peptide TAT (substitution d'un ou plusieurs acides aminés) mais aussi des analogues où un résidu a été muté par une alanine (stratégie Ala-scan). Chaque analogue tronqué ou muté a montré une diminution de la pénétration cellulaire. Ils ont ainsi conclu que la délétion d'une arginine, quelle que soit sa position dans la séquence, réduisait de près de 80% l'efficacité de pénétration du peptide. En revanche, la substitution d'acide aminé non chargé par une alanine n'a qu'un modeste impact sur l'internalisation cellulaire.

Suite à la découverte des premiers CPPs naturels, de nombreux peptides de synthèse ont été développés. On peut par exemple citer, les polyarginines, une famille de

CPPs de synthèse inspirée de la séquence du peptide TAT qui ont été très largement étudiées.³⁷ L'étude de leur propriété de pénétration a permis de montrer que l'efficacité de la pénétration cellulaire était dépendante du nombre et de la position des résidus arginines dans la séquence.³⁸

Les peptides riches en arginines présentent une meilleure capacité de pénétration cellulaire que leurs homologues contenant des lysines. En effet, le groupement guanidinium de l'arginine est capable de former des liaisons hydrogènes bidentées avec les phosphates, sulfates et carboxylates présents à la surface de la membrane cellulaire alors que l'ammonium du résidu lysine ne forme qu'une liaison monodentée (Figure I.2).³⁹ De manière générale, on peut noter que les peptides antimicrobiens seront plus généralement riches en résidus lysine tandis que les CPPs seront préférentiellement riches en résidus arginine (Table I-1).⁴

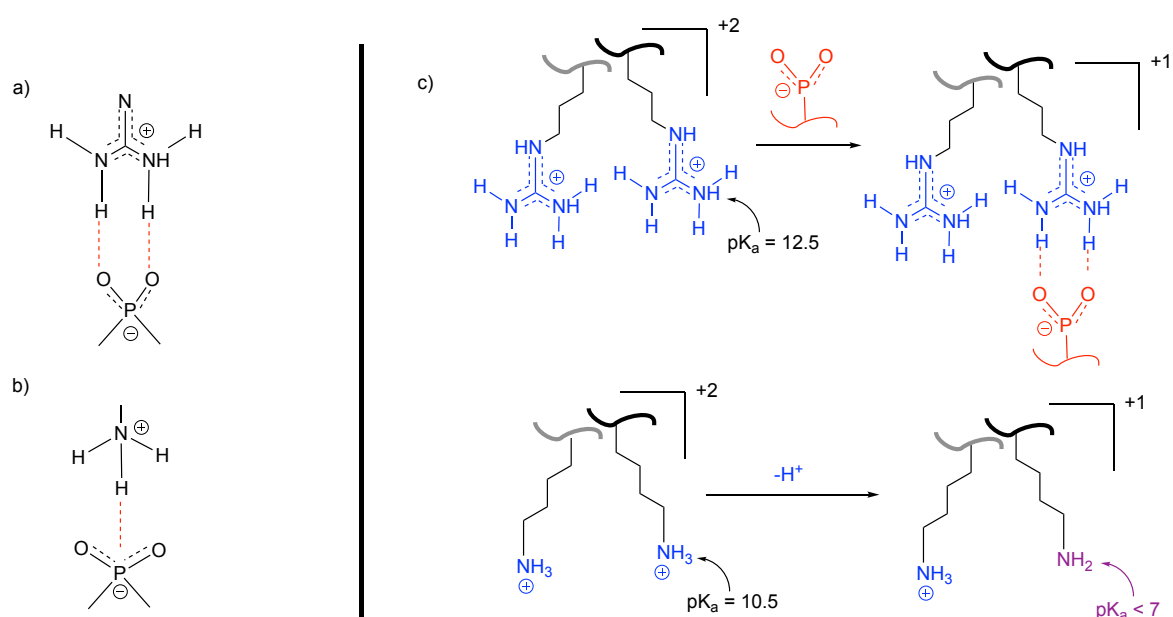


Figure I.2 : Représentation schématique des interactions a) bidentée et b) monodentée des résidus arginines et lysines avec les phosphates présents à la surface de la membrane cellulaire et c) schéma illustrant la compensation de la répulsion de charges dans le cas de polyarginines et de polylysines selon S. Matile.⁴⁰

L'équipe de S. Matile propose quant à elle une hypothèse supplémentaire à ce phénomène et suggère l'existence d'un effet de contre-ions. Le groupement guanidine de l'arginine possède une plus faible acidité comparée à l'ammonium de la lysine ($pK_a = 12,1$ contre $pK_a = 10,7$ pour la lysine). Les CPPs de type polylysines et polyarginines montrent des répulsions électrostatiques dues à la proximité de résidus de même charge. Pour les polylysines, cette répulsion peut être compensée par une déprotonation de l'un des

ammoniums qui voit alors son pKa chuter à une valeur de 7. Dans le cas des polyarginines, cette déprotonation ne peut avoir lieu du fait du pKa plus élevé des guanidines. Or comme évoqué précédemment, les guanidiniums des arginines sont capables de former des liaisons bidentées avec les phosphates, cette liaison permet alors au phosphate d'agir comme contre-ion afin de masquer la charge d'un des deux guanidiniums voisins (Figure I.2).⁴⁰

Toujours selon S. Matile, la complexation du guanidinium avec un contre-ion de type phosphate est thermodynamiquement très stable mais aussi cinétiquement très labile. Dans le cas des polyarginines cette capacité du complexe guanidinium/contre-ion à se lier et se délier rapidement jouerait un rôle dans le mode de pénétration de ces CPPs.⁴⁰

Le caractère cationique des CPPs joue un rôle essentiel dans la pénétration cellulaire. Au moment de leur découverte, ces CPPs étaient considérés comme des peptides « chevaux de Troie » car ils ont la capacité de diffuser à travers la membrane plasmique sans engendrer de réponse cellulaire.^{11,41} Néanmoins, il a ensuite été démontré que les CPPs « trop riches » en charges positives induisaient des effets non désirables sur les lignées cellulaires étudiées (toxicité, impact sur l'intégrité de la membrane plasmique).⁴² Aujourd'hui, les CPPs de synthèse les plus efficaces présentent un taux de charges judicieusement pondéré.

ii) Le rôle des résidus hydrophobes et aromatiques

Les résidus hydrophobes sont tout aussi importants que les résidus cationiques pour la pénétration cellulaire des CPPs car en interagissant avec les domaines hydrophobes de la membrane ils participent à l'amélioration de leur insertion dans la membrane.⁴¹ Il n'existe cependant que très peu d'exemples de CPPs purement hydrophobes : avec une charge nette comprise entre -2 et 1 (exemple : séquence PIEVCMYREP⁴³). Néanmoins il est intéressant de noter que ces peptides montrent une capacité particulière à s'insérer spontanément dans les cellules, les différenciant des autres CPPs qui sont pour la plupart internalisés par une voie d'endocytose.⁴⁴⁻⁴⁷

Parmi les résidus hydrophobes, les résidus aromatiques jouent un rôle particulier. L'équipe de S. Sagan a réalisé plusieurs études afin d'expliquer leur mécanisme d'interaction avec la membrane plasmique.⁴⁸ Les résidus tryptophane et tyrosine sont largement présents dans les protéines de surface membranaires. Il a été démontré que le tryptophane jouait un rôle dans le mécanisme d'internalisation des CPPs, de par sa capacité à former des interactions π - π avec les tryptophanes des protéines membranaires.⁴¹ De récents travaux

réalisés par l'équipe de S. Sagan ont par ailleurs montré un lien direct entre le nombre de tryptophanes et l'efficacité de transfection. Grâce à des études thermodynamiques (ITC) mais aussi structurales (RMN, dichroïsme circulaire, spectrométrie de masse), il a été établi que plus le nombre de résidus tryptophanes augmente plus l'affinité du peptide pour les glycoaminoglycans (GAGs), sucres présents à la surface de la membrane plasmique, est élevée. Le mécanisme d'interaction entre les peptides riches en tryptophanes et les GAGs impliquerait la formation d'une paire d'ions entre le peptide et les GAGs. Les résidus arginines et tryptophanes peuvent alors interagir avec les sucres soit *via* des interactions électrostatiques et la formation de liaisons hydrogène bidentées soit *via* des interactions de nature hydrophobes. Il est aussi envisageable que les tryptophanes interagissent avec les sucres de surface *via* la formation d'interactions π -anion. Enfin, des interactions de type π -cations entre les résidus arginines et tryptophanes peuvent modifier le pKa des motifs guanidiniums des arginines ce qui augmente le taux d'arginines protonées et améliore la facilité du peptide à interagir avec les sucres chargés négativement.^{18,48}

Lors de la conception d'une séquence CPP, il est toutefois important de contrôler son caractère hydrophobe car bien que celui-ci participe à améliorer la pénétration cellulaire il peut aussi la limiter. Certains peptides peuvent rester dans la membrane phospholipidique du fait d'une contribution lipophile trop élevée bloquant toute internalisation.⁴⁹

Néanmoins, augmenter le caractère hydrophobe d'un peptide est une méthode conventionnelle pour améliorer sa pénétration cellulaire. En plus des résidus aromatiques, il a été rapporté dans la littérature la conjugaison de séquences peptidiques avec des chaînes hydrocarbonées et cela à des fins de pénétration cellulaire.⁴⁵⁻⁴⁷

iii) Les CPPs amphiphiles

Les CPPs amphiphiles sont des peptides constitués d'une région chargée (hydrophile) et d'une région non polaire (hydrophobe). Il existe trois types de CPPs amphiphiles (Figure I.3). Les CPPs dits amphiphiles primaires sont des peptides hybrides issus du couplage covalent entre une séquence hydrophile et une séquence hydrophobe. Par exemple, le peptide MPG (séquence : GALFLGWLGAAGSTMGAPKKRKV) est issu du couplage entre une séquence SLN (Signal de Localisation Nucléaire : un peptide qui cible les pores nucléaires), ici PKKKRKV, et le domaine hydrophobe de MPG, une glycoprotéine du VIH (résidu 1 à 17 dans le peptide MPG).⁵⁰

Les CPPs amphiphiles secondaires montrent une amphiphilie *via* leur structure tridimensionnelle. Ces CPPs peuvent adopter une structure en hélice- α où les résidus hydrophiles sont répartis sur une face de l'hélice et les résidus hydrophobes sont répartis sur la face opposée. Les exemples de ces peptides incluent le Transportan¹³ et le peptide MAP⁵¹. Il existe aussi des CPPs amphiphiles secondaires qui s'organisent en feuillets- β lorsqu'ils interagissent avec une membrane phospholipidique. De la même façon que les CPPs en hélices α , les peptides feuillets amphiphiles comportent des faces hydrophiles et des faces hydrophobes. Leur capacité à s'organiser en feuillets β est alors essentielle à leur pénétration cellulaire puisque la simple mutation d'un résidu entraîne la perte de repliement et induit une chute de leur efficacité de transfection.⁴⁵

Enfin, les CPPs riches en résidus prolines constituent le troisième type de CPPs amphiphiles. En effet, le résidu proline se différencie des autres acides aminés naturels par une rigidité particulière du fait de son noyau pyrrolidine. Les peptides riches en prolines peuvent alors adopter deux types de structures particulières que l'on appelle respectivement PPI et PPII pour PolyProlines I et II (Figure 1.3). Des études ont montré qu'une composition à hauteur de 50% de la séquence en résidus proline est suffisante pour maintenir une structure secondaire en PPI ou PPII. Il est ainsi possible de concevoir des peptides riches en résidus prolines capables de pénétrer les cellules et présentant une structure secondaire définie. C'est le cas de la séquence (VRLPPP)₃ décrite et étudiée par Giralt *et al.*¹⁵

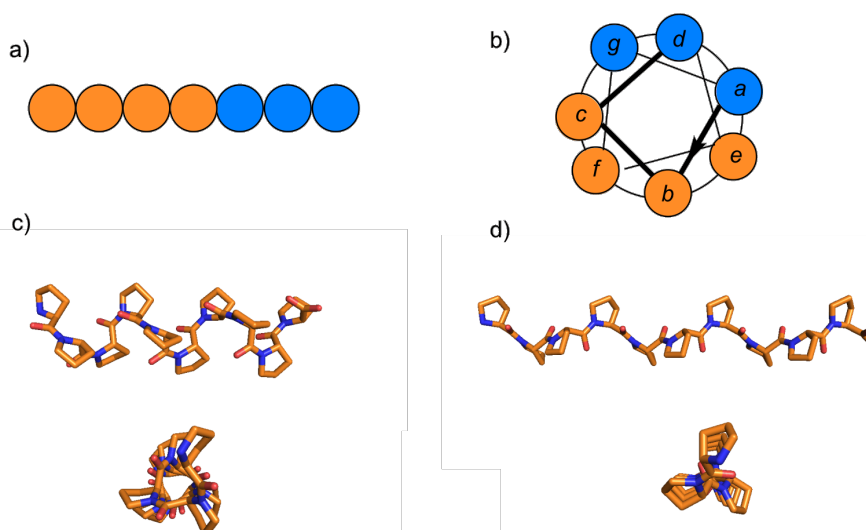


Figure 1.3 : a) Représentation schématique des CPPs amphiphiles primaires, résidus hydrophobes (orange), résidus hydrophiles (bleu) ; b) Représentation de la répartition spatiale des résidus sur la projection d'une hélice α -peptidique d'un CPP amphiphile secondaire c) Vue de dessus et de côté d'une hélice idéale de type PPI ; d) Vue de dessus et de côté d'une hélice idéale de type PPII.⁵²

Des études ont montré que l'amphiphilie est aussi importante que la présence de résidus chargés pour permettre la pénétration cellulaire des CPPs. Par exemple, l'équipe de M. Bienert a synthétisé un analogue du peptide MAP (KLALKLALKALKAALKLA) comportant les mêmes acides aminés et le même taux d'hélicité mais dont le caractère amphiphile a été supprimé (KALKLKLALALLAKLKLA). Cet analogue n'a montré aucune capacité à pénétrer les cellules bien qu'il comporte le même nombre de résidus chargés. Ce résultat souligne l'importance du caractère amphiphile dans la conception de nouveaux CPPs.⁵¹

Ainsi, l'amphiphilie s'avère être elle aussi une caractéristique partagée par de nombreux CPPs.

iv) Le rôle de la structure secondaire

La structure tridimensionnelle (3D) d'un peptide est fonction de l'environnement dans lequel il est. Ainsi, la structure d'un CPP peut être différente selon qu'il est dans l'eau, à proximité d'une membrane, dans une membrane ou encore s'il est lié à une protéine. Par ailleurs, la nature du peptide (cationique, hydrophobe ou amphiphile) influence elle aussi sa conformation tridimensionnelle.

En 2010, E. Eiríksdóttir *et al.*, ont étudié l'impact de la structure secondaire des CPPs sur leur capacité à pénétrer les cellules.⁵³ Cette étude a été réalisée sur dix des CPPs les plus connus. La plupart des CPPs ne montrent aucune conformation particulière en milieu aqueux mais certains d'entre eux adoptent une structure secondaire lorsqu'ils sont au contact d'une membrane. Pour cela, ils ont réalisé un classement des CPPs en trois groupes. Le premier groupe comporte le peptide TAT et ses dérivés ainsi que les polyarginines qui n'adoptent aucune structure secondaire particulière : leur repliement aléatoire n'a donc aucune influence sur leur propriété de pénétration cellulaires. Le second est constitué des peptides α -hélicoïdaux au contact de la membrane. Dans cette famille, on retrouve par exemple le peptide MAP et le TP10 (AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH₂). Enfin, le dernier groupe concerne les CPPs qui se replient en feuillets- β (ex : la pénétratine et le peptide pVec (LLIILRRRIRKQAHASK-NH₂)). Il a été montré que la plasticité structurale des CPPs est principalement due à des interactions de type électrostatiques avec la membrane qui induisent l'organisation structurale du CPP et donc sa structuration en hélice- α ou en feuillets- β . La structuration des CPPs permet alors de stabiliser les interactions avec la membrane et ainsi de promouvoir la pénétration cellulaire.⁴⁶ En 1997, J. Oehlke *et al.* avaient déjà observé ce phénomène. Ils avaient établi que le peptide amphiphile VT5

(séquence : DPKGDPKGVTVTVTVTGKGDPKPD) qui se structure en feuillets- β possède une très bonne capacité d'internalisation. En revanche, son analogue équipé des mutations D-Val¹³ et D-Thr¹⁴ dont la structure primaire est identique mais qui n'adopte pas de conformation en feuillets présente une perte d'efficacité de transfection.⁵³

Aujourd'hui, il est clairement admis que la première étape du processus de pénétration cellulaire des CPPs implique des interactions de nature électrostatiques avec les GAGs de la membrane cellulaire. Ces interactions induisent une accumulation du peptide à la surface cellulaire et activent les différents mécanismes de pénétration cellulaire.¹⁸ La seconde étape est déterminante et implique une interaction entre le peptide et les lipides membranaires qui peut conduire à un mécanisme d'endocytose ou à une perturbation de la membrane. Le changement conformationnel du peptide (formation d'hélice- α ou de feuillets- β) peut alors moduler l'interaction peptide/lipide. La force de cette interaction aura un impact sur la capacité du peptide à s'insérer dans la membrane cellulaire et à s'en échapper.⁵⁴

Comme mentionné précédemment, les polyarginines n'adoptent pas de conformation particulière. En revanche, des études récentes ont montré que lorsque la nature amphiphile et la structuration sont prises en compte dans le design d'un nouveau CPP, les CPPs riches en arginines et ayant une propension à se structurer en hélice- α montrent une efficacité de transfection deux fois supérieure à celle des polyarginines non structurées.^{55,56}

Augmenter la capacité d'un CPP à adopter une structure secondaire est aujourd'hui une méthode de choix pour améliorer son efficacité de pénétration cellulaire. Il a été rapporté dans la littérature, plusieurs stratégies pour stabiliser l'hélice- α de peptides afin d'améliorer leur pénétration cellulaire. Entre autre, il est possible de cycliser les peptides afin de stabiliser leur conformation, ces peptides sont alors appelés peptides agrafes. De plus, la structuration du peptide permet d'atteindre une distribution optimale des fonctions guanidines et aide à la formation d'interactions multivalentes avec la membrane plasmique. Récemment, S. Huyn *et al.* ont synthétisé une série de CPPs amphipathiques, dont ils ont stabilisé la conformation hélicoïdale grâce à la formation d'une agrafe fermée par un lien hydrocarboné. Ces mêmes auteurs ont établi un lien direct entre hélicité et efficacité de transfection.⁵⁷

En résumé, les CPPs présentent une grande variété de séquence et des propriétés physico-chimiques très différentes. Ils peuvent ainsi être linéaires, cycliques, cationiques, anioniques, hydrophobes, hydrophiles, amphiphiles et présenter ou non une structure

secondaire bien définie. Les CPPs très riches en résidus cationiques (*i.e* au moins huit charges positives) n'ont pas la capacité à adopter une conformation stable et définie en milieu physiologique. A l'opposé, les CPPs amphiphiles secondaires doivent se structurer au moins partiellement à l'interface de la membrane afin d'exposer leur face hydrophobe vers la membrane et pouvoir interagir avec celle-ci.

b) Les modes d'internalisation des CPPs

Le mode d'internalisation des CPPs dépend de plusieurs facteurs : la composition du peptide, la nature du cargo, le ratio CPP/cargo, la concentration du peptide, la taille du complexe peptide/cargo et la lignée cellulaire étudiée.^{58,59} Les premières études sur le mécanisme de translocation membranaire ont été réalisées sur les CPPs les plus représentatifs (TAT et polyarginines) et ont montré que ces peptides s'internalisaient *via* des processus passifs énergie indépendant.^{9,60}

Ces études ont été réalisées par microscopie confocale sur des cellules fixées. Or, il a été montré plus tard que la fixation des cellules avec un mélange formaldéhyde/méthanol altérerait la pénétration cellulaire des CPPs.⁶¹ Aujourd'hui, il existe un consensus général qui s'accorde sur la combinaison de mécanismes énergie-dépendants (endocytose) et de mécanismes énergie-indépendants (translocation directe).⁶²⁻⁶⁴ La concentration du peptide est un facteur déterminant car elle influence la nature de l'internalisation. A haute concentration ($> 10 \mu\text{M}$), la translocation directe est majoritaire alors qu'à plus faible concentration, la voie par endocytose est prédominante.⁶⁴ La Figure I.4 résume l'ensemble des voies d'internalisation possibles pour les CPPs. Dans ce mémoire, nous ne détaillerons que la voie d'endocytose, celle que nous pensons être empruntée par les foldamères pénétrant les cellules étudiés dans le contexte de cette thèse.

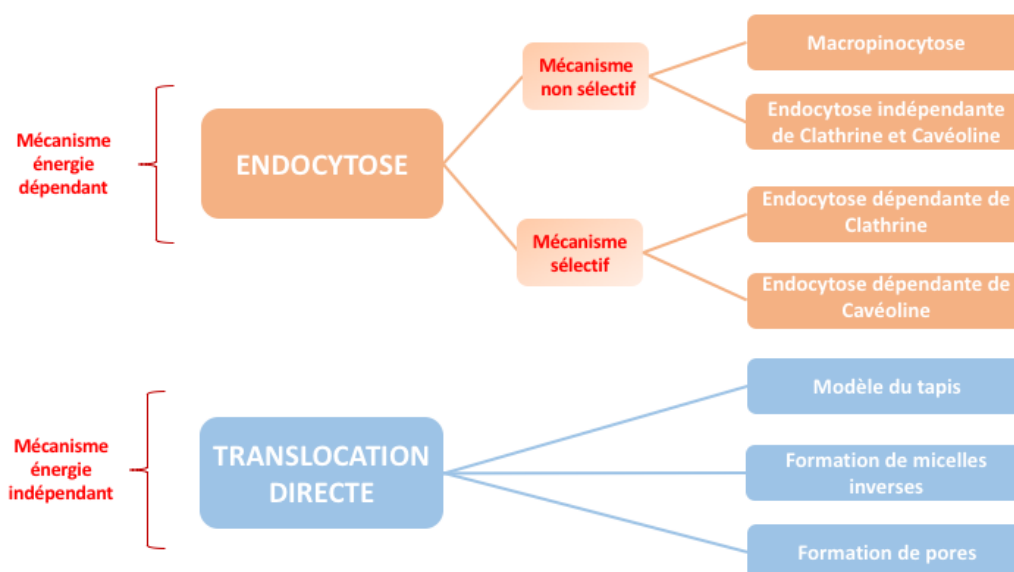


Figure I.4 : Schéma résumant les différents modes d'internalisation des CPPs.

i) La voie d'endocytose

L'endocytose est un système très régulé, énergie dépendant, d'internalisation de matrice extracellulaire dans la cellule. L'endocytose se compose de deux voies : la phagocytose et la pinocytose. La phagocytose n'ayant pas été décrite pour l'internalisation des CPPs, cette voie ne sera pas détaillée ici. La pinocytose est un mécanisme par lequel des substances extracellulaires sont incorporées dans la cellule *via* la formation d'une vésicule, appelée vésicule d'endocytose, qui fusionnera avec un endosome précoce pour y libérer son contenu. Le CPP et son cargo (*i.e* l'objet qu'il transporte) doivent ensuite être capable de s'échapper de l'endosome pour rejoindre le cytosol. En effet, une fois dans l'endosome, si le peptide ne parvient pas à se libérer, il sera transféré dans le lysosome pour y être digéré. Il existe au totale quatre voies d'entrée pinocytiques. Deux d'entre elles sont spécifiques et impliquent la reconnaissance d'un récepteur membranaire. Il s'agit de l'endocytose dépendante de la Clathrine et de l'endocytose dépendante de la Cavéoline. Les deux autres voies sont non spécifiques, il s'agit de l'endocytose indépendante de Clathrine et Cavéoline et de la macropinocytose. Ces voies diffèrent selon la taille de la vésicule endocytique formée, de la nature de la matrice internalisée et du mécanisme de formation de la vésicule (Figure I.5).⁶⁵

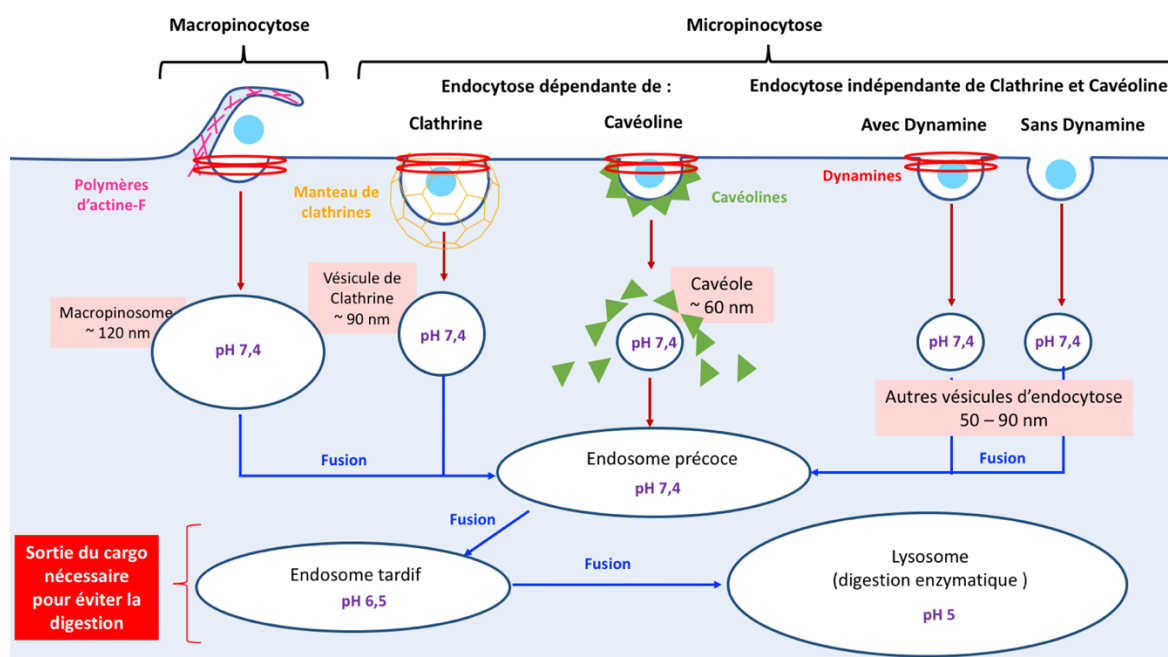


Figure 1.5: Schéma représentant les différentes voies d'endocytose.

Macropinocytose

La macropinocytose est une voie d'endocytose responsable de l'internalisation de grands volumes de milieu extracellulaire. Elle diffère des autres voies d'endocytose par le fait qu'elle est issue de la formation d'un lamellipode (large extension membranaire constituée de polymères d'actine F que la cellule utilise pour explorer son environnement à la recherche de matrice extracellulaire). Le lamellipode va ensuite fusionner avec la membrane cellulaire pour former une vésicule que l'on appelle macropinosome dont la taille est d'environ 120 nm. Le remplissage de cette vésicule par la matrice extracellulaire internalisée se fait de manière non spécifique. Le macropinosome ainsi formé fusionne avec un endosome précoce afin d'y libérer son contenu.^{66,67} Comme pour d'autres voies d'endocytose, la dynamine (une protéine de la famille des GTPases) permet la formation de la vésicule d'endocytose.⁶⁶ En 2007, Nakase *et al.*, ont montré que le traitement de cellules avec des peptides riches en arginines conduisait à l'activation de la protéine Rac nécessaire à l'organisation de l'actine et à la formation du lamellipode. En utilisant des cellules déficientes en protéoglycans, ils ont également mis en évidence que les protéoglycans membranaires jouaient un rôle essentiel dans l'activation de la polymérisation de l'actine F et donc dans la macropinocytose. Ces résultats suggèrent que les protéoglycans fonctionnent comme des récepteurs à l'activation de la macropinocytose par des peptides riches en arginines.⁶⁷ L'implication de la macropinocytose dans l'internalisation de CPPs a été prouvé pour le TAT, les polyarginines et la pénétratine.⁶⁸⁻⁷⁰

Endocytose dépendante de la Clathrine

L'endocytose par vésicules recouvertes de Clathrine est une voie d'endocytose sélective car elle implique la reconnaissance de récepteurs membranaires. Cette voie d'endocytose implique la formation d'un puit membranaire recouvert de Clathrine dont le diamètre est d'environ 90 nm. La Clathrine est une protéine structurelle présente en triskèle (*i.e* trois « bras » reliés entre eux en étoile) dont les branches s'assemblent pour former une structure polyhédrale. La formation de ces puits membranaires nécessite l'action concertée de plusieurs protéines. Les étapes nécessaires à la formation de ces puits sont la reconnaissance du ligand et sa concentration à la surface de la membrane, la déformation de la membrane plasmique, le recrutement de Clathrine, et enfin la scission de la vésicule de la surface cellulaire.⁷¹

Endocytose dépendante de cavéoles

Les cavéoles sont des puits ronds d'environ 50-80 nm situés à la surface de la membrane plasmique et enrichies en cholestérol. Ces puits sont recouverts côté cytosol d'un manteau protéique composé principalement de Cavéoline (une protéine membranaire). Bien que le rôle exact de la Cavéoline dans ce processus d'endocytose ne soit pas clairement établi, des études ont montré qu'elle jouait un rôle essentiel pour la formation et la stabilité des cavéoles.^{72,73}

Endocytose indépendante de la Clathrine et de la Cavéoline

Les cavéoles ne représentent qu'un seul type de microdomaines membranaires riches en cholestérol. Il en existe en réalité beaucoup d'autres que l'on appelle plus communément radeaux lipidiques. Ce sont de petites structures de 40-50 nm qui diffusent librement à la surface de la membrane cellulaire. Les radeaux lipidiques peuvent être internalisés dans n'importe quelle vésicule d'endocytose. Ces radeaux sont constitués de protéines qui s'insèrent dans la membrane plasmique grâce à une ancre lipidique de type glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ces protéines sont présentes sous forme monomérique ou assemblées en clusters eux-mêmes associés à des micro-domaines lipidiques riches en cholestérol.⁶⁶ Leur mécanisme d'internalisation est peu compris mais il semblerait que ce mécanisme varie par le mode de formation de la vésicule d'endocytose, le type de cargo à internaliser, la destination intracellulaire du cargo et comment leur internalisation est régulée.⁶⁵

ii) Le rôle clé des résidus Histidine dans la sortie de l'endosome

Quelle que soit la voie d'endocytose empruntée, le CPP se retrouve piégé dans une vésicule intracellulaire, dont il devra s'échapper afin que son cargo puisse exercer son activité biologique. L'échappée de l'endosome est l'étape limitante de la voie d'endocytose. Le mécanisme exact de cette sortie n'a pas été clairement identifié mais la chute de pH dans les endosomes tardifs apparaît comme un facteur déterminant et exploitable dans la conception de CPPs.⁷⁴

Après l'entrée endocytique selon l'une des quatre voies décrites précédemment, le complexe CPP/cargo se retrouve dans une vésicule d'endocytose (Figure I.5). Cette vésicule fusionne ensuite avec un endosome précoce dont le pH est de 7,4 pour y relâcher le CPP. A son tour, l'endosome précoce fusionne avec un endosome tardif dont le pH est cette fois de 6,5. C'est à ce moment-là que le CPP doit pouvoir s'extraire de l'endosome. L'endosome tardif fusionnera quant à lui avec un lysosome (pH 5) où aura lieu la digestion enzymatique du CPP par des hydrolases.⁷⁵

La plupart des agents de transfection, qu'il s'agisse de lipides, de polymères ou de CPPs pénètrent les cellules par la voie d'endocytose. Différentes méthodes ont été décrites dans la littérature pour permettre la sortie de l'endosome. On retrouve par exemple l'incorporation de lipides fusogéniques dans les liposomes cationiques, l'association de peptides fusogéniques avec des polyplexes et lipoplexes et l'activation de l'effet éponges à protons à l'intérieur de l'endosome.^{68,76}

L'effet éponge à protons a d'abord été décrit avec les polymères cationiques de types Polyéthylèneimines (PEIs), des agents de transfections polymériques. Ces polymères sont chargés positivement et se lient à la surface anionique de la membrane plasmique puis pénètrent les cellules par endocytose. Dans l'endosome, dont le pH est de 6,5, l'accumulation de protons, amenés à l'intérieur de la vésicule par l'ATPase endosomale, est couplée à un afflux d'anions chlorures. La protonation des amines des PEI induit une diminution de la pression osmotique qui résulte en un gonflement osmotique de la membrane endosomale jusqu'à sa rupture, libérant ainsi le PEI et son cargo dans le cytosol.⁷⁷ C'est ce phénomène que l'on appelle « effet éponge à protons ».

Dans le cas des CPPs, l'introduction de résidus histidines dans la séquence permet d'utiliser l'effet éponge à protons et donc améliore l'efficacité de pénétration cellulaire de certains peptides. Le noyau imidazole de l'histidine a un pKa d'environ 6. Selon son environnement, il peut donc se protoner au pH endosomale et est neutre au pH

physiologique (pH 7,4 : celui du milieu extracellulaire). Cette stratégie a été utilisée dans plusieurs études. Par exemple, les lysines du peptide K5 (séquence : GLFKAIKFIKGGWKGLIKG), ont été mutées par des histidines (séquence : GLFHAIHFIHGGWHGLIHG). P. Midoux *et al.*, ont observé que ce peptide riche en histidines devenait positivement chargé lorsque le pH était inférieur à 7 et permettait le transport d'ADN dans le cytosol.⁷⁸ En 2010, B. Langlet-Bertin *et al.*, ont décrit un nouveau peptide, LAH4 (séquence : KKALLALHHLAHLALHLALALKA) amphiphile et riche en résidus histidines qui possède une forte capacité à transporter des pADN dans les cellules. De plus, grâce à des expériences d'inhibition de l'acidification dans les endosomes en utilisant un inhibiteur de l'ATPase ils ont pu confirmer le rôle des résidus histidines. L'activité du peptide LAH4 dans ces cellules modifiées a chuté de façon significative et a permis de démontrer l'importance de la protonation des histidines dans l'efficacité de transfection du peptide LAH4.⁷⁹

Aujourd'hui, l'introduction de résidus susceptibles d'activer l'effet éponge à protons est largement employée dans le design de nouveaux CPPs. Les résidus histidines restent les plus utilisés mais d'autres résidus se sont montrés capables d'activer l'effet éponge à protons. Ainsi, en 2010, Yun Lan *et al.* ont rapporté que l'introduction de résidus non naturels de type acide 2,3-diaminopropionique permettait la conception de nouveaux CPPs sensibles aux variations de pH.⁸⁰

Il est important de noter que l'ensemble de ces mécanismes d'internalisation, qu'il s'agisse des voies d'endocytose ou de translocation directe ne sont pas isolés mais ont lieu simultanément. Il n'est aussi pas possible d'attribuer un mode de pénétration particulier pour un CPP donné. En effet, le mode de pénétration variera en fonction de la nature du CPP, de la taille du cargo internalisé et de la lignée cellulaire. De plus, l'implication de la translocation directe n'a été démontrée que pour l'internalisation de CPPs seuls (*i.e* sans cargo) ou bien attachés à de petits cargos (*i.e* fluorophores). La possibilité de transporter des biomacromolécules par translocation directe reste aujourd'hui incertaine.

c) Activité biologique des CPPs

Les CPPs utilisés pour acheminer des cargos dans les cellules sont généralement dépourvus d'activité biologique. Il existe cependant des exemples de CPPs intrinsèquement bioactifs.

En 2008, Langel *et al.*, ont identifié un CPP composé de 22 acides aminés ayant une activité pro-apoptotique. Ce CPP correspond au domaine N-terminal de la protéine p14ARF, une protéine dite « suppresseur de tumeur » capable d'inhiber la prolifération et d'induire

l'apoptose. Il s'agit là du premier exemple de CPP issu d'une protéine présentant une activité pro-apoptotique.⁸¹ Plus récemment, en 2012, Jones *et al.*, ont introduit le terme de bioportide pour désigner des CPPs intrinsèquement bioactifs et ainsi les différencier des CPPs qui seraient liés de façon covalente à un peptide bioactif.⁸² Différents bioportides ont alors été décrits. On retrouve par exemple le camptide, un CPP dérivé du récepteur humain de la calcitonine, capable de moduler la sécrétion d'insuline mais aussi le caractère contagieux de certains virus.⁸² Le peptide nosangiotide est lui un exemple de bioportide utilisé comme inhibiteur de l'angiogenèse.⁸³ On retrouve aussi chez les CPPs des applications antivirales. Par exemple, Debnath *et al.* ont synthétisé un CPP capable de se lier aux polyprotéines GAG du VIH permettant ainsi d'empêcher l'assemblage de nouvelles particules virales.⁸⁴

Les CPPs sont similaires par leur séquence à des peptides antimicrobiens, il est donc logique que certains présentent une activité antimicrobienne. Par exemple, il a été montré que les CPPs pVec (séquence : LLILRRRIRKQAHASK) et TP10 (séquence : AGYLLGKINLKALAALAKKIL) étaient capables de pénétrer des cellules bactériennes. TP10 est capable de pénétrer et de tuer *Staphylococcus aureus*. PVec peut pénétrer et tuer *Mycobacterium smegmatis* à des doses n'ayant aucune toxicité sur des cellules humaines.⁸⁵

2) Les CPPs comme agent de transport

La membrane plasmique des cellules eucaryotes contrôle l'afflux non régulé de molécules bioactives.⁸⁶ Bien que certaines petites molécules soient capables de s'internaliser *via* des processus cellulaires naturels, la plupart des composés pharmaceutiques peinent à pénétrer les cellules. Le rôle des agents de transfection est alors de promouvoir l'internalisation des agents pharmaceutiques dans la cellule afin qu'ils puissent atteindre leur cible intracellulaire ou nucléaire. De plus, l'utilisation d'agents de transport permet aussi d'améliorer la biostabilité du médicament et de limiter les effets secondaires dus au déclenchement d'une réponse immunitaire. Il existe de nombreux exemples d'agents de transfection (vecteurs viraux, polymères cationiques, nanovecteurs... etc.). Cependant, ils présentent certaines limites, comme leur haute toxicité (polymères cationiques), le déclenchement d'une réponse immunitaire (vecteurs viraux) ou leur difficulté à atteindre rapidement le cytosol car ils peuvent se retrouver piégés dans l'endosome.⁸⁷ Dans ce contexte, depuis une vingtaine d'années, un intérêt particulier pour les CPPs a émergé car ceux sont des outils moléculaires prometteurs pour pallier ces limitations. De nombreuses

études ont en effet montré la capacité des CPPs à délivrer une grande variété de cargos dans les cellules. Ils peuvent ainsi être utilisés pour le transport d'agents d'imagerie, d'agents thérapeutiques, d'acides nucléiques ou de protéines (Figure I.6).

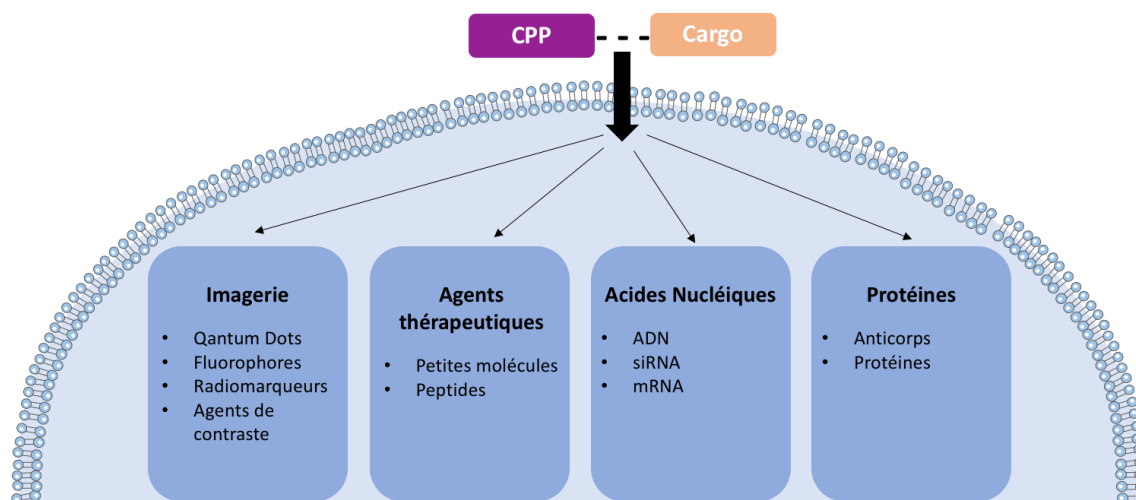


Figure I.6: Application des CPPs comme agents de transport.

Dans le contexte de cette thèse, seules les applications de transport d'acides nucléiques et de protéines seront discutées.

a) Transport d'acides nucléiques

La thérapie génique consiste à introduire du matériel génétique dans les cellules pour soigner une maladie. Initialement, cette approche a été destinée aux maladies monogéniques (*i.e* liées à la dysfonction d'un seul gène), en délivrant aux cellules un gène sain capable de suppléer au gène altéré. Aujourd'hui, avec l'évolution rapide des technologies, les indications se révèlent beaucoup plus larges. On peut par exemple incorporer un gène suppresseur de tumeur, produire des cellules thérapeutiques (exemple : cellules CAR T, des lymphocytes T modifiés pour éliminer les cellules malignes), modifier l'ARN pour obtenir une protéine fonctionnelle, éliminer ou réparer un gène altéré directement dans la cellule. L'utilisation d'ARN (messenger ou interférant) permet de réguler ou d'inhiber l'expression d'un gène défectueux. Ces nouvelles thérapies connaissent un fort intérêt depuis une vingtaine d'années et il existe aujourd'hui de nombreux médicaments en phase pré-clinique ou clinique. Ces technologies peuvent être utilisées pour toute maladie génétique héréditaire ou acquise (cancer, SIDA, asthme, hépatites, mucoviscidose...).

Cependant, les acides nucléiques ne sont pas stables dans le sang car ils sont très sensibles à la dégradation enzymatique par les nucléases, leur temps de demi-vie est

inférieur à 10 min dans le sérum humain. De plus, leur charge globale négative les empêche de traverser la membrane plasmique. Le recours à des agents de transfection est donc essentiel afin d'augmenter leur temps de demi-vie et de pouvoir les transporter efficacement dans les cellules cibles.⁸⁸

Les CPPs offrent une stratégie unique pour délivrer du matériel génétique dans les cellules avec une grande efficacité. Il existe plusieurs façons d'acheminer des acides nucléiques avec des CPPs. La première est la co-incubation de l'oligonucléotide avec le CPP. Cette méthode est issue de l'observation que l'interaction des CPPs à la surface cellulaire promeut une augmentation de l'endocytose qui pourrait induire l'absorption par la cellule des macromolécules présentes dans le milieu environnant. Ainsi, le CPP et les macromolécules pourraient s'accumuler ensemble dans les vésicules endocytiques.^{67,68,89} Une autre consiste à lier de façon covalente le CPP à l'oligonucléotide. Une dernière approche repose sur la formation d'un complexe non-covalent par interactions électrostatiques entre le CPP chargé positivement et les acides nucléiques chargés négativement (Figure I.7).

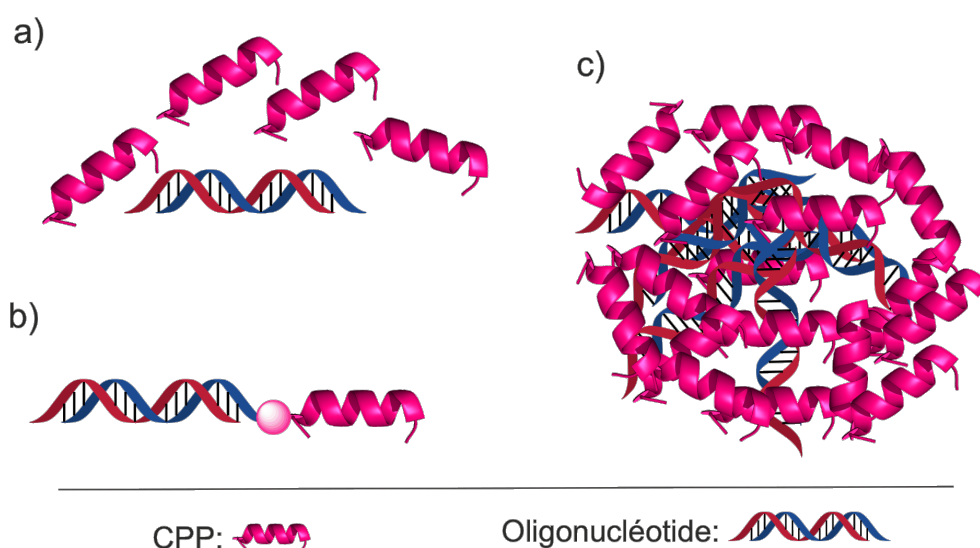


Figure I.7: Schéma représentatif des différentes stratégies de transport d'acides nucléiques par des CPPs : a) co-incubation, b) conjugaison directe et c) complexe non-covalent.

La synthèse du complexe covalent CPP-oligonucléotide peut se faire *via* différentes stratégies. La partie peptidique est assemblée par synthèse sur support solide en utilisant la stratégie Fmoc puis l'oligonucléotide est lié au peptide par son côté 3' en utilisant la stratégie phosphoramidite.⁹⁰ Une méthode alternative implique de synthétiser séparément le peptide et l'oligonucléotide, de les déprotéger et de les purifier puis de les conjuguer l'un

à l'autre par un pont disulfure ou par la formation d'un lien thioether.⁹¹ Par exemple, M. Pooga *et al.*, ont décrit en 1998 la synthèse d'un oligonucléotide de 21 résidus couplés au peptide Antp. Cet oligonucléotide est complémentaire de l'ARN messager du récepteur de la galanine (impliqué dans la modulation et l'inhibition des impulsions nerveuses dans le cerveau). Il a été délivré dans des cellules Bowes (cellules de mélanome) et a permis de bloquer efficacement le récepteur de la galanine.⁹²

Aujourd'hui, les CPPs sont principalement utilisés pour délivrer des acides nucléiques sous la forme de complexes non-covalents (Figure I.7.c). Ils permettent ainsi de masquer l'oligonucléotide par interactions électrostatiques pour le protéger de la dégradation enzymatique. Cette stratégie permet aussi d'éviter de modifier chimiquement l'oligonucléotide. Par exemple, le peptide LAH4, décrit pour la première fois par A. Kichler *et al.*, est un CPP amphipatique composés de 26 résidus et riche en histidines qui possède une grande efficacité pour le transport d'ADN et de siARN dans de nombreuses lignées cellulaires (Figure I.8).⁹³

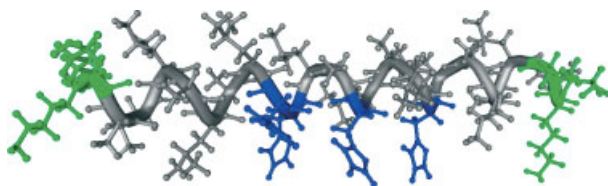


Figure I.8: Modélisation moléculaire du peptide LAH4 où les résidus lysines sont représentés en vert et les résidus histidines en bleu.

Il existe un très grand nombre d'exemples dans la littérature relatant l'utilisation de CPPs pour acheminer des plasmides d'ADN, des siARN ou des oligonucléotides antisens (Table I-2). Ceci souligne l'importance de ces composés pour transporter des acides nucléiques.

Table I-2 : Exemples d'assemblages non-covalents entre CPP et oligonucléotide.

CPP	Cargo	Ref
Poly-L-Lysine	p-Luc	94
ppTG20 (GLPRALLRLLRSLWRLLLRA)	P_Luc	95
MPG (GAAGSTMGAWSQPKKKRKV)	siARN	96
LAH4 (KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA)	siARN	79
WRAP (LLRLLRWWWWRLRLRL)	siARN	97

b) Transport de protéines

Ces vingt dernières années, les protéines thérapeutiques ont connu un succès important en tant qu'outil de recherche et sont parmi les nouvelles classes de médicaments en plein essor. Entre 2011 et 2016, la FDA (US Food and Drug Administration) a approuvé la mise sur le marché de 62 protéines thérapeutiques, notamment des anticorps monoclonaux, des facteurs de coagulation, des enzymes, des hormones, des facteurs de croissance ou encore des protéines plasmatiques.⁹⁸ Cependant, la plupart des protéines pharmaceutiques visent des cibles extracellulaires ou présentes sur la surface membranaire alors que de nombreuses cibles thérapeutiques se localisent à l'intérieur des cellules. Les protéines ne traversent pas spontanément la membrane cellulaire en raison de leur taille et/ou leurs propriétés biophysiques. Tout comme les acides nucléiques, elles sont aussi instables dans le sang car elles sont sensibles à la dégradation enzymatique par les protéases. Concevoir des agents de transport capables d'acheminer des protéines fonctionnelles dans les cellules constituerait un outil puissant tant pour sur le plan fondamental qu'appliqué. Les CPPs font partis des agents de transfection décrits dans la littérature comme étant capable de transporter des protéines.

Il a ainsi été montré que les CPPs peuvent transporter des protéines ayant des tailles allant de 30 kDa (GFP)⁹⁹ à 120-150 kDa (IgG).¹⁰⁰ Comme dans le cas des acides nucléiques, il existe deux méthodes pour former un complexe protéine/CPP, soit en les liant de façon covalente,⁹⁹ soit en formant un complexe non covalent entre la protéine et le CPP. Les complexes covalents ont prouvé leur efficacité pour l'internalisation de nombreuses protéines. Par exemple, le peptide Pep-1, a été utilisé pour transporter différentes protéines dans plusieurs lignées cellulaires en formant des complexes non-covalents entre le peptide et la protéine. Ce peptide a permis d'acheminer la GFP (30 kDa) et la β -galactosidase (119 kDa).¹⁰¹ Plus récemment, un CPP riche en résidus arginines a été utilisé pour transporter des anticorps monoclonaux dans des cellules. Acheminer des anticorps dans les cellules permet de marquer et de manipuler des antigènes intracellulaires. Ces anticorps ont été liés de façon covalente au CPP sur un site spécifique de l'anticorps.¹⁰²

Les multiples exemples décrits ci-dessus soulignent les nombreuses applications des CPPs comme agents de transport de biomolécules. Les CPPs permettent ainsi d'améliorer l'efficacité de médicaments et se sont montrés utiles pour délivrer des agents d'imagerie. Ils ont aussi pu prouver leur utilité pour transporter des acides nucléiques, des protéines et d'autres peptides.

Cependant, malgré leur grande efficacité *in vitro* et de grandes avancées, les CPPs présentent des inconvénients majeurs avec en particulier leur faible stabilité en milieu biologique qui limite aujourd'hui encore leur utilisation thérapeutique.

Différentes stratégies ont été décrites dans la littérature afin d'améliorer la stabilité et la biodisponibilité des peptides.²⁶ Ces méthodes consistent à modifier chimiquement les peptides, par exemple, en les cyclisant, en modifiant les extrémités N et C terminales, en alkylant certains azotes des fonctions amides (peptide N-méthylés) ou en remplaçant tous les résidus (L)-acides aminés par leur énantiomères (D). Une autre stratégie envisageable est de concevoir de nouveaux mimes synthétiques de CPPs. Cette approche consiste à reproduire les caractéristiques biophysiques essentielles des CPPs dans un oligomère possédant un squelette non-naturel.

Parmi les différentes approches biomimétiques de design de nouveaux agents de transfection, la multimérisation de peptides a été largement décrite dans la littérature pour acheminer des acides nucléiques par voie endocytose. Cette stratégie a été possible grâce à l'utilisation de dendrimères peptidiques équipés de terminaisons amines (Figure I.9). On peut citer par exemple les dendrimères Poly(propylèneimine) (PPI) ou Poly(amidoamine) (PAMAM).^{103,104}

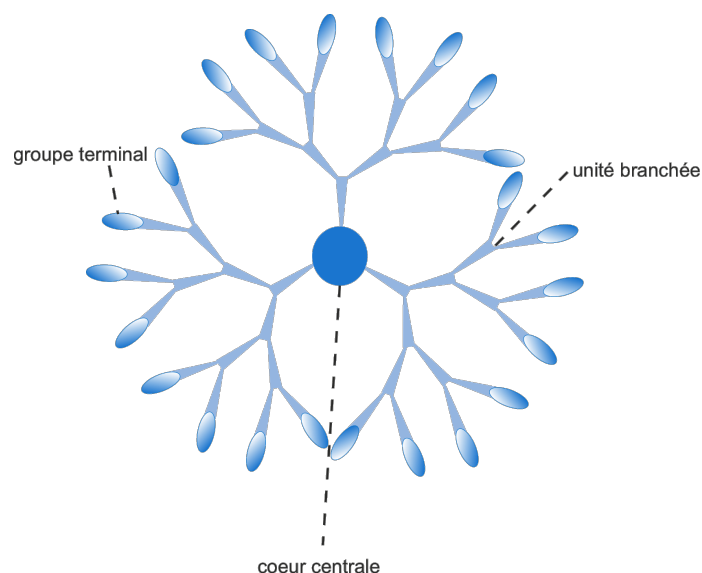


Figure I.9: Schéma général représentatif d'une structure dendrimère.

Ces macromolécules forment des structures globulaires qui comparées à leurs homologues monomériques, affichent une concentration plus localisée des unités chargées et permettent donc une efficacité accrue. De surcroît, ces objets de synthèse possèdent une

stabilité accrue face aux peptidases due à la ramification de leur squelette.¹⁰⁴ Par exemple, M. Ohsaki *et al.* ont décrits en 2002, l'utilisation de dendrimères Poly(L-lysines) (DPKs) (Figure I.10.a) pour acheminer des plasmides d'ADN dans différentes lignées cellulaires (CHO, COS-7, HeLa et Huh).¹⁰⁵ Ils ont criblés différentes tailles de dendrimères et ont observé que les deux générations les plus efficaces contenaient respectivement 64 et 128 acides aminés. De plus, l'efficacité de ces agents de transfection n'est pas réduite en présence de 50% de sérum. Les DPKs ont ensuite été largement décrits dans la littérature pour acheminer d'autres acides nucléiques tels que les siARN.^{106–109}

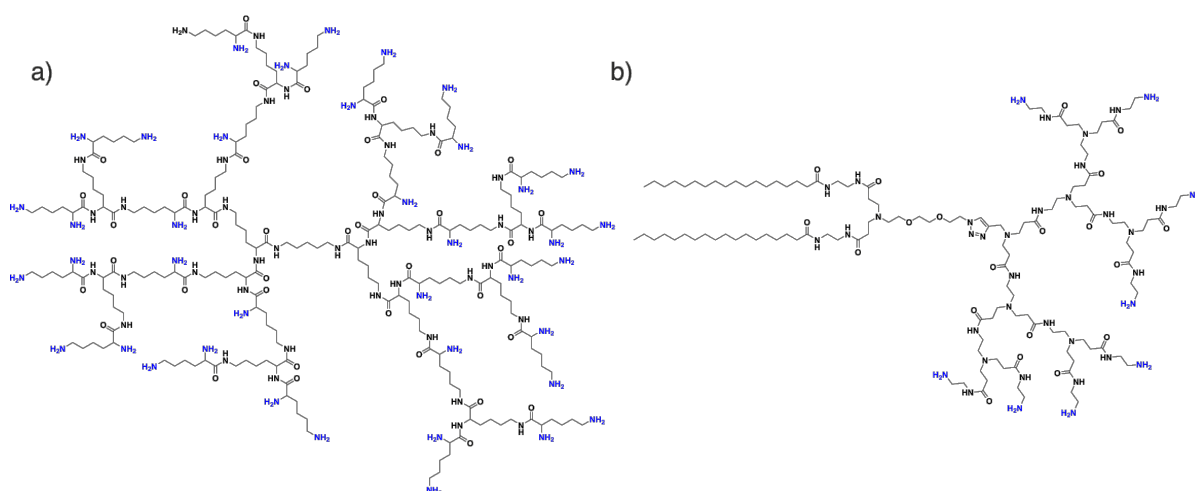


Figure I.10: Exemples de structures chimiques de dendrimères a) dendrimère Poly(L-lysine) de troisième génération et b) hétéro-dendrimère cationique amphiphile **AD** décrit par L. Peng *et al.*

Récemment, l'équipe de Ling Peng a développé de nouveaux dendrimères cationiques et amphiphiles pour le transport de siARN. Ces nouveaux dendrimères allient le caractère multivalents des vecteurs dendrimères avec la capacité d'auto-assemblage des vecteurs lipidiques.^{109,110} Pour cela, ils ont exploité la chimie click pour lier le dérivé poly-lysines équipés d'un linker alcène au dérivé lipidique équipé d'une fonction azoture. Cette nouvelle génération de dendrimères appelée **AD** (Figure I.10.b) présente une haute efficacité pour transporter des siARNs dans une grande variété de lignées cellulaires (dont des cellules souches humaines). De plus, l'activité de ces vecteurs dendrimères a été confirmée *in vivo* sur des modèles de souris.¹⁰⁹

Enfin, une autre approche biomimétique de design de nouveaux vecteurs a été décrite par T. Aida *et al.*¹¹¹ Ils ont synthétisé des « colles moléculaires » équipées d'un grand nombre d'unité guanidine sur le squelette de leurs oligomères. Ces colles moléculaires (**Gu₄**)

adhèrent fortement aux lipides membranaires en interagissant avec les phosphates des têtes anioniques des lipides membranaires. Plus récemment, T. Aida *et al.* ont équipé ces objets cationiques synthétiques de fonctions thiols sur chaque extrémité de leur oligomère (Figure I.11.a)¹¹². Ils ont alors réalisé une oxydation polymérisante des thiols en présence de siARN et ont montré qu'il était possible de former des objets de tailles nanométriques capables d'acheminer des siARNs dans les cellules (Figure I.11.b). Une fois dans la cellule, une dépolymérisation réductrice se fait grâce à la présence de glutathion permettant ainsi de libérer le siARN dans le cytoplasme. En effet, la concentration en glutathion (GSH) dans le cytosole est plus élevée en comparaison au milieu extra-cellulaire.

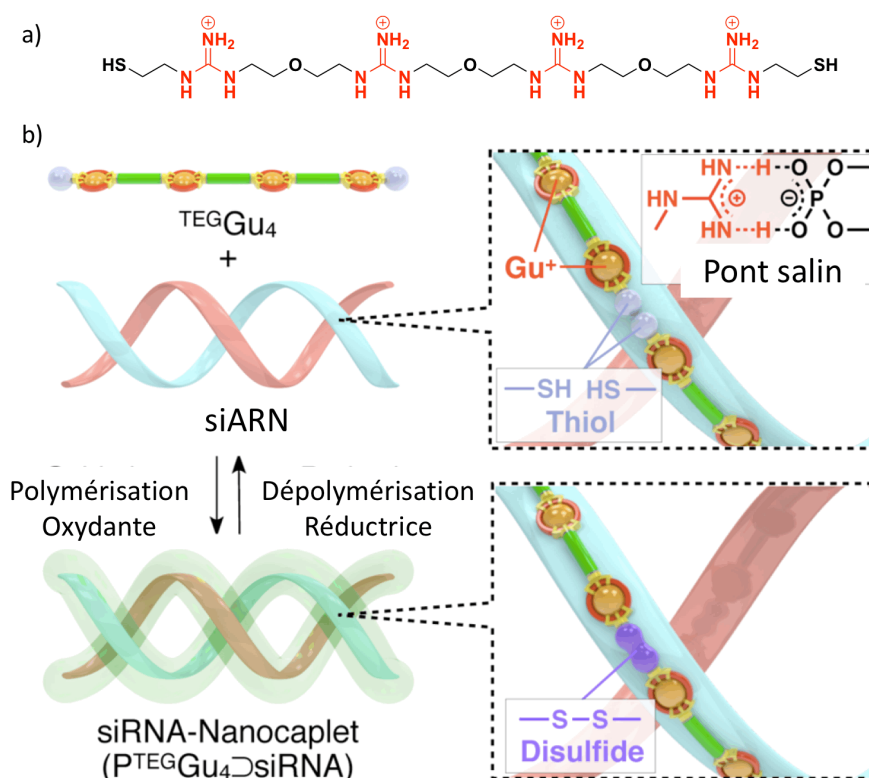


Figure I.11: Représentation schématique des « colles moléculaires » décrits par Aida *et al.* a) structure chimique des colles moléculaires Gu_4 et b) schéma de principe pour la formation de complexe siARN/poly Gu_4 .

En 2015, l'équipe d'O. Merkel en collaboration avec S. Gellman a décrit une approche similaire en utilisant une nouvelle classe d'agents de transport cationiques et amphiphiles. Il s'agit ici de co-polymères de nylon-3 (Figure I.12).¹¹³ Ces copolymères possèdent un squelette polyamide identique à celui des β -peptides. Leur séquence est irrégulière et hétérochirale. Ils sont synthétisés à partir d'une polymérisation par ouverture de cycle de β -lactames de façon à pouvoir incorporer à la fois des unités cationiques et des

unités hydrophobes. En jouant sur le ratio des différentes sous-unités, il est possible de moduler les propriétés physicochimiques de ces polymères (hydrophobicité, charge nette, amphiphilie). Le caractère hydrophobe a été introduit en incorporant des unités cyclohexyl ou cyclopropyl (Figure I.12). O. Merkel et S. Gellman ont alors évalué la capacité de ces polymères à acheminer des siARNs. Ces nouveaux polymères sont en effet capables de transporter efficacement des siARNs tout en ayant une relative faible toxicité comparée à d'autres vecteurs polymériques tels que les PEIs ou les polylysines.

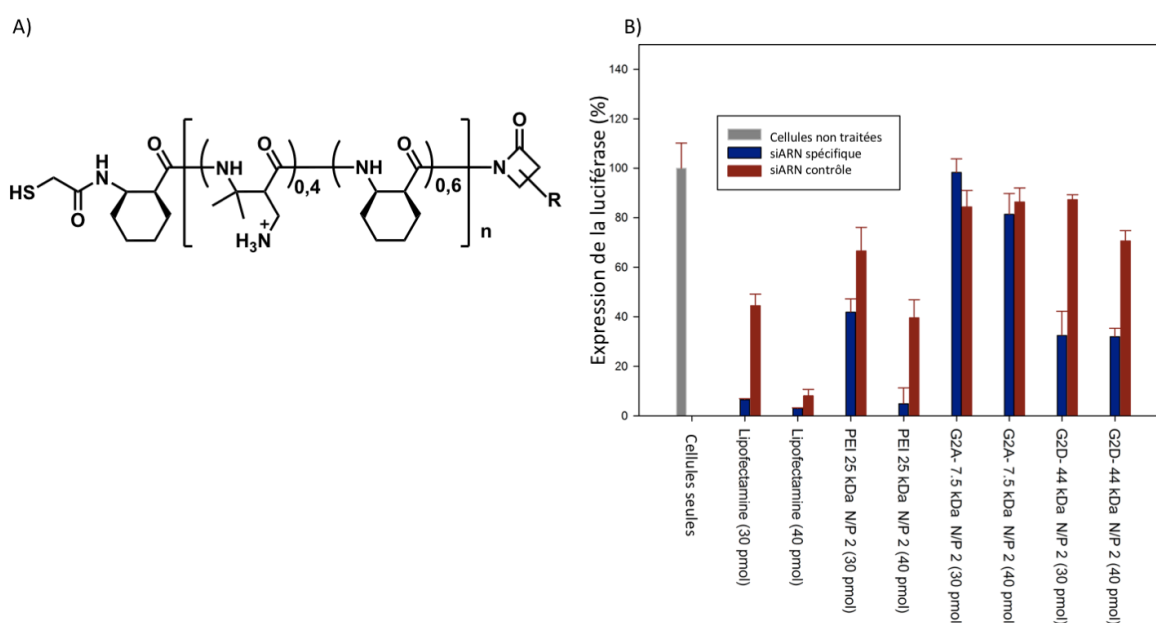


Figure I.12: (A) Structure chimique de polymères nylon-3 utilisés pour le transport de siARN avec R = diméthyl, cyclohexyle ou cyclopropyle et (B) transfection du siARN ciblant l'expression de la luciférase dans les cellules H1299-luc par le polymère nylon (G2A-D) à différents ratios N/P, en comparaison avec la lipofectamine et le PEI-25 kDa.¹¹³

En conclusion, ces exemples montrent qu'il est possible de mimer des CPPs avec des objets ne présentant pas une organisation structurale particulière mais qu'en revanche le caractère amphiphile du vecteur synthétique est important. Un ajustement précis du ratio hydrophobe/charge doit être réalisé afin d'obtenir la meilleure efficacité de transfection avec une faible toxicité.

Enfin, la recherche de mimes synthétiques de peptides a aussi bénéficié de l'intérêt croissant de la conception de nouvelles architectures moléculaires non naturelles présentant des conformations contrôlables et bien définies inspirées des biopolymères, que l'on appelle

aujourd'hui les foldamères.^{27,33,114} C'est cette dernière stratégie à laquelle nous allons nous intéresser dans la suite de ce chapitre.

3) Les foldamères pénétrant les cellules (CPFs)

a) Les foldamères comme mimes de peptides

La conception d'oligomères synthétiques capables d'adopter des structures secondaires repliées et stables a vu le jour dans les années 90 avec les travaux séminaux de S. Gellman²⁷ et D. Seebach¹¹⁵. Les foldamères montrent une grande diversité de composition chimique mais aussi de complexité structurale. Le squelette des foldamères peut être aliphatique (α -, β -, γ -peptides, peptoïdes ou N,N' -oligourées)¹¹⁴ (Figure I.13.a) ou constitué de sous-unités aromatiques (oligoaryles, oligoquinolines) (Figure I.13.b).

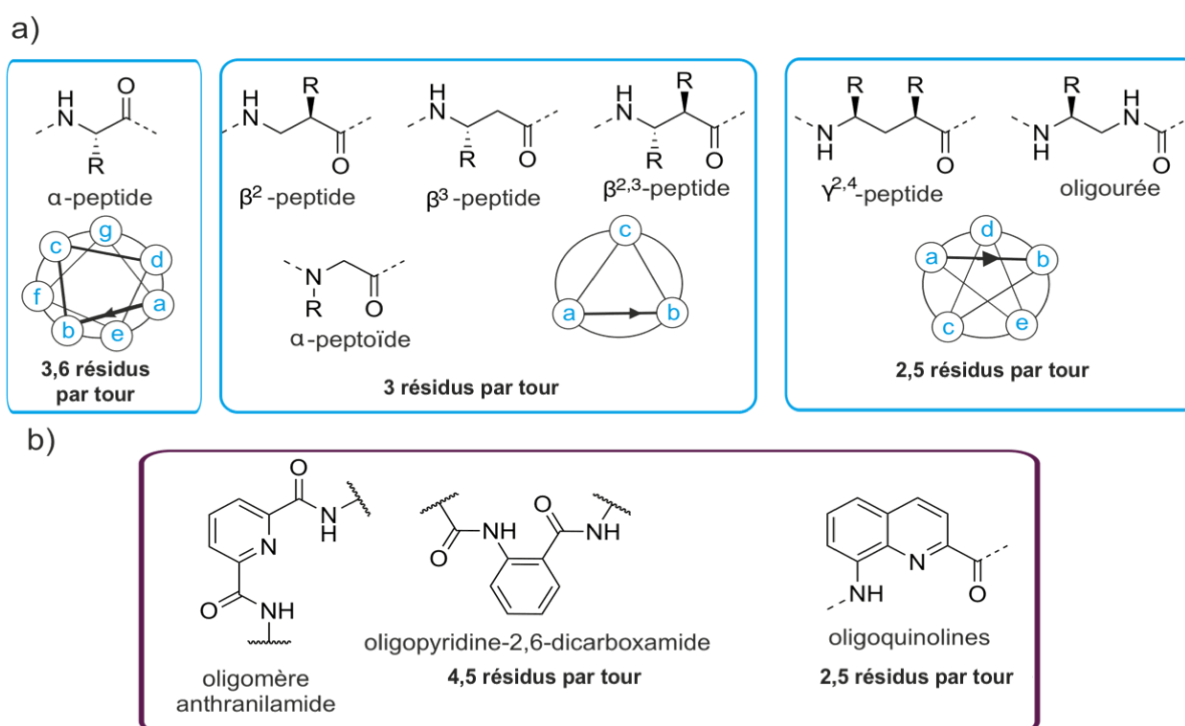


Figure I.13 : Exemples de squelettes de foldamères a) squelettes aliphatiques et la représentation schématisée de la distribution des chaînes latérales sur l'hélice et b) squelettes aromatiques.

Au cours des 15 dernières années, de nombreuses avancées scientifiques ont été réalisées dans la découverte de foldamères bioactifs issus de différents squelettes. Aujourd'hui, les scientifiques utilisent les foldamères pour mimer la composition et la structuration des peptides afin de concevoir de nouveaux agents thérapeutiques ou de

reproduire des propriétés biologiques. Les foldamères ont l'avantage de présenter une plus grande stabilité face à la dégradation enzymatique des protéases, un meilleur contrôle de leur structure secondaire et une capacité à former des assemblages définis en milieu aqueux (Figure I.14.a).¹¹⁶

Ces foldamères sont capables de cibler des membranes, des protéines ou encore des acides nucléiques. La haute prédictibilité de leur repliement, la modularité de leur séquence et la compatibilité de leur synthèse avec la synthèse sur support solide ont été les garants de leur succès. C'est grâce à des données structurales à haute résolution qu'il est aujourd'hui possible de concevoir plus précisément des foldamères bioactifs capables par exemple d'inhiber des interactions protéines-protéines (Figure I.14.b).¹¹⁷

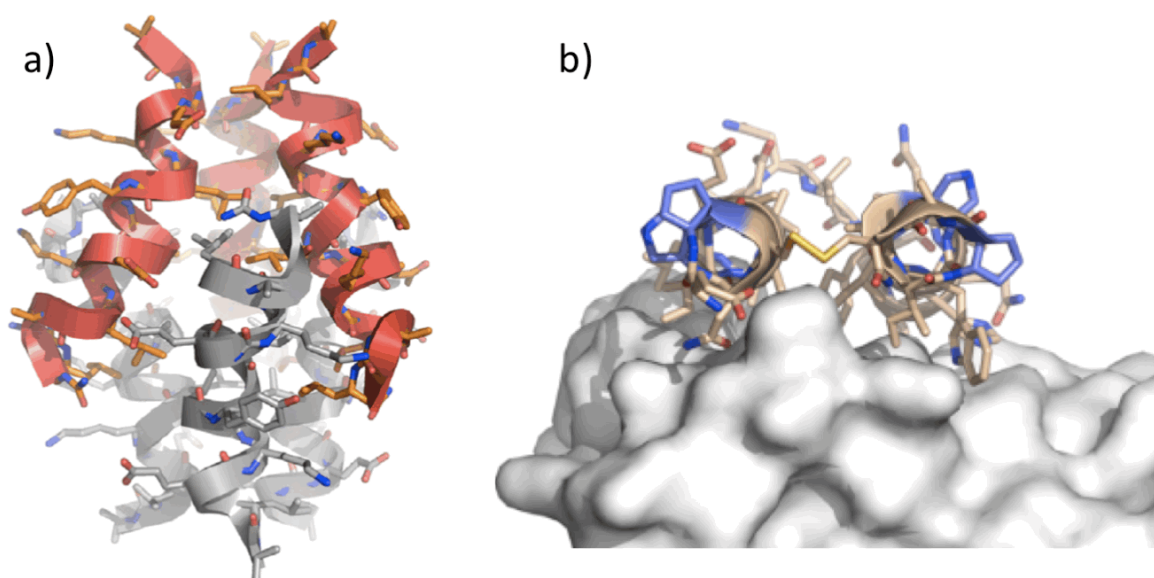


Figure I.14: a) structure cristalline d'un assemblage de 6 hélices d'oligourées et b) structure cristalline d'un foldamère α/β peptide en complexe avec la protéine VEGF.

Les foldamères construits à partir d'unités synthétiques ne possèdent pas les sites de clivages reconnus par les enzymes et sont donc potentiellement plus stables en milieu biologique. Des études de stabilité enzymatique *in vitro* ont été réalisées sur différentes familles de foldamères et soulignent une résistance accrue à un grand nombre de peptidases et protéases. C'est le cas par exemple des β - et γ - peptides,¹¹⁸ des peptoïdes,¹¹⁹ des N,N' -oligourées¹²⁰ ou encore des oligoamides aromatiques.¹²¹

Dans ce contexte, différentes architectures foldamères ont été décrites pour mimer les peptides antimicrobiens. Un grand nombre de foldamères antimicrobiens ont été conçus dans le but de former des hélices amphiphiles en combinant des unités hydrophobes et des

unités cationiques. C'est le cas notamment des antimicrobiens issus de β -peptides¹²², de peptoides,³⁰ d'oligourées¹²⁰ ou plus récemment de sulfono- γ -AApeptides¹²³ (Figure I.15).

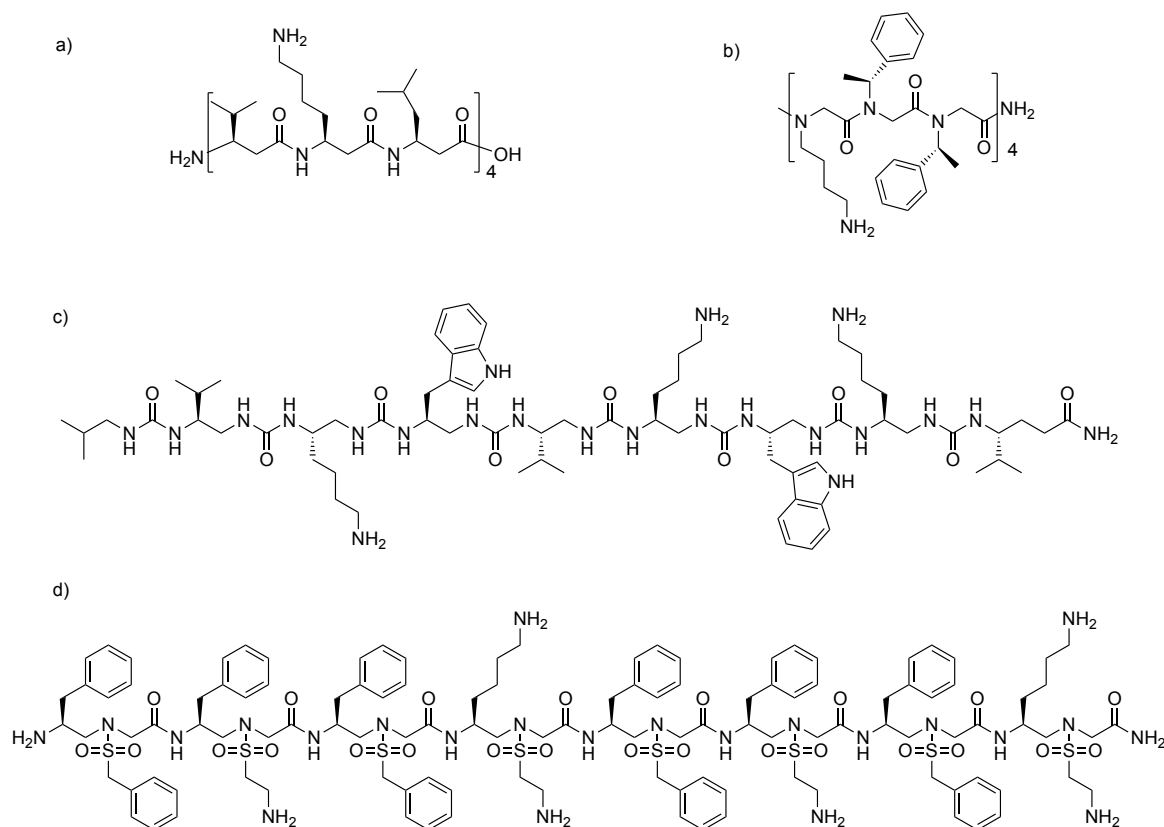


Figure I.15: Exemples de séquences foldamères antibactériennes a) β -peptide, b) peptotide, c) N,N' -oligourée et d) sulfono- γ -AApeptide.

Comme évoqué précédemment, il existe un lien direct entre peptide antimicrobiens et CPP, il est donc possible d'envisager la même analogie dans le cas des foldamères. En effet, de par leur grande stabilité structurale et leur résistance à la protéolyse, les foldamères représentent d'excellents candidats potentiels pour reproduire les structures secondaires des CPPs et leur fonction de système efficace de transport. Bien qu'il existe plusieurs exemples de foldamères antimicrobiens et que différentes architectures foldamères aient montré une capacité à traverser spontanément la membrane cellulaire, peu d'entre eux ont été étudiés comme système de transport intracellulaire. Dans la suite de cette partie, nous présenterons des exemples de foldamères pénétrant les cellules (CPFs) ainsi que leurs applications *in vitro*.

b) Exemples de foldamères pénétrant les cellules (CPFs)

Les CPFs constituent une nouvelle famille potentielle d'agents de transfection qui présentent une stabilité augmentée dans les milieux biologiques. En 2000, P.A. Wender *et al.* ont montré que des peptoides (Figure I.15) équipés de chaînes latérales de type arginines s'internalisaient dans les cellules plus efficacement que les peptides R9 et TAT, tout en ayant une biostabilité accrue.¹⁴ De la même façon, les β -peptides (Figure I.15) développés par D. Seebach¹²⁴ et les oligocarbamates de L.B. Wylie,¹²⁵ montrent eux aussi une forte capacité à s'internaliser dans les cellules tout en étant stables à la protéolyse. Ces études ont été réalisées en marquant ces foldamères avec de la fluorescéine et en mesurant la fluorescence des cellules transfectées. Plus récemment, l'équipe de I. Huc a décrit des oligomères aromatiques constitués d'un squelette de type oligoamide issu de l'acide 8-aminoquinoline-2-carboxylique. Ces oligomères aromatiques ont été équipés de chaînes latérales cationiques pour promouvoir leur solubilité en milieux aqueux. Une fois marqués à la FITC, ces foldamères ont montré une efficacité à pénétrer différentes lignées cellulaires (Jurkat, Huh-7 et Hela) similaires à celle du peptide TAT. En revanche, les tests de transport de plasmides d'ADN réalisés avec le plasmide de la luciférase n'ont montré qu'une faible activité.¹²¹ En 2013, l'équipe de D. Seebach a décrit un polypeptide hybride octa-argine constitué d'un mélange d'acides aminés (L) et (D). Ces hybrides montrent une efficacité de pénétration cellulaire comparable au peptide TAT et aux (L)-Arg₈ mais une stabilité dans le sérum nettement augmentée. Le temps de demi-vie dans le sérum du peptide (L)-Arg₈ est inférieur à 0,5 min alors que celui d'un hybride (L/D)-Arg₈ est compris entre 8 min et 5h selon la position et le nombre de résidus D insérés.¹²⁶ Une tendance similaire a été observée avec des hybrides α/β peptides.¹²⁷

En résumé, peu d'études ont été réalisées sur l'utilisation de foldamères comme mimes de peptides pénétrant les cellules. Cependant, les exemples décrits ci-dessus montrent que ces nouvelles architectures synthétiques possèdent une résistance protéolytique élevée.^{118,120} De plus, la modularité de leur séquences et leur haute prédictibilité structurale permettent d'obtenir des composés de faible toxicité et ayant une structure secondaire stable et prédéfinie. Les β -peptides¹⁴ ou les oligoquinolines¹²¹ par exemple, sont capables de s'organiser en hélices dans l'eau alors que la plupart des CPPs non modifiés n'adoptent une structure secondaire définie qu'au contact des membranes plasmiques. Les foldamères présentent donc l'avantage d'être déjà structurés.

Malheureusement, malgré un intérêt évident et grandissant, il n'existe aujourd'hui que peu d'exemples de foldamère pénétrant les cellules capables d'acheminer un cargo.

4) Les oligourées pénétrant les cellules

a) Présentation et caractérisation structurale

Les foldamères d'oligourées sont des oligomères aliphatiques constitués de monomères de type éthylène diamine reliés entre eux par une urée. Ces oligomères ont été décrits pour la première fois en 1995 par Burgess *et al.*^{128,129} et ont connus depuis une attention croissante. Ces oligomères de type *N,N'*-liées sont des aza-analogues des γ -peptides où le motif (CH₂-CO-NH) est remplacé par le motif (NH-CO-NH). De plus, l'urée possède un NH supplémentaire permettant la formation d'une liaison hydrogène supplémentaire (Figure I.16). Des études approfondies du repliement de ces foldamères ont été réalisées ces 15 dernières années que ce soit en milieu organique ou plus récemment en milieu aqueux avec des propriétés d'auto-assemblages très prometteuses.¹¹⁶ Le lien urée possède des caractéristiques communes avec le lien amide comme sa rigidité, sa planéité, sa polarité et sa capacité à former des liaisons hydrogènes. Cependant, l'urée diffère de l'amide par son moment dipolaire qui est supérieur,¹³⁰ son caractère de double liaison diminué et une barrière d'énergie de rotation plus faible (10-12 Kcal.mol⁻¹ contre 16-20 Kcal.mol⁻¹ pour l'amide).

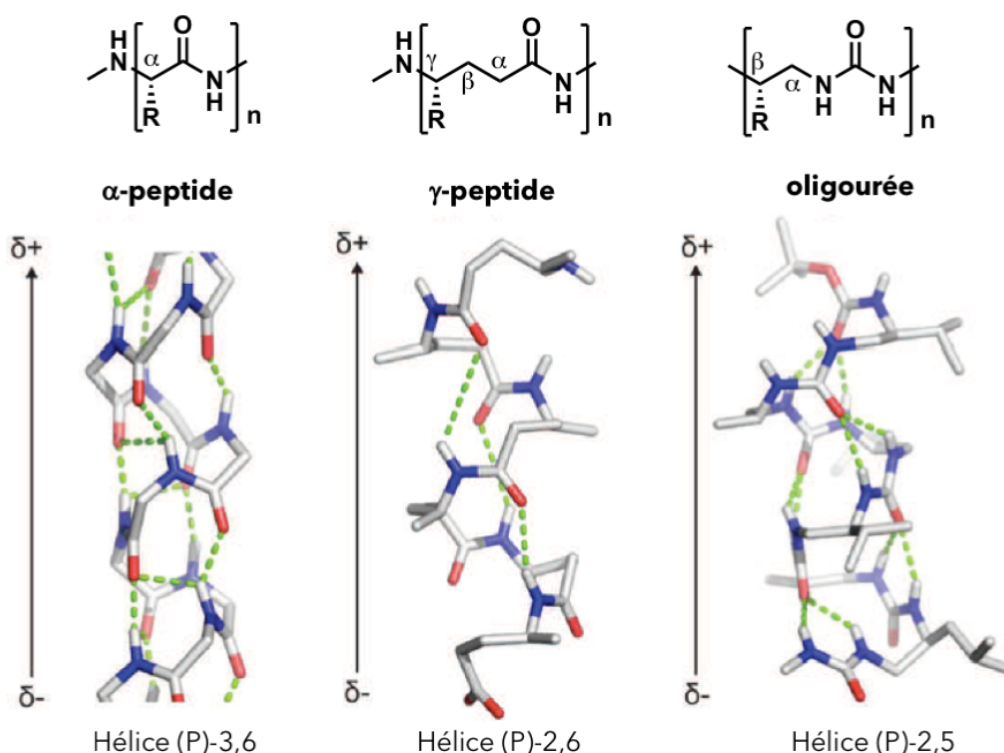


Figure 1.16: Comparaison des structures cristallines d'une hélice α -peptide¹³¹, de γ -peptide¹¹⁵ et d'oligourée.¹³²

Tout d'abord, des études en solution^{32,133–135} puis à l'état solide^{136,137} ont permis de montrer que les oligourées dérivés de (L)-acides α -aminés forment une (P)-hélice à 2,5 résidus par tour similaire à l'hélice-(P)-2,6₁₄ des γ -peptides. Les urées forment alors un réseau de liaisons hydrogène à trois centres fermant des pseudocycles de 12 à 14 atomes dus aux liaisons hydrogènes $C=O_i \dots HN'_{i-2}$ et $C=O_i \dots HN_{i-3}$. (Figure 1.17.a). Pour réaliser ces études structurales, différentes méthodes de caractérisations structurales en solution et à l'état solide ont été utilisées.

L'analyse par spectrométrie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) du proton (RMN 1H) dans différents solvants (pyridine, MeOH, DMSO, ACN) a révélé que les signaux correspondants aux NHs sont fortement dispersés lorsque l'oligourée est constituée d'au moins 5 résidus et cela quel que soit la température de l'échantillon. Ceci est caractéristique de l'implication des NHs dans des liaisons hydrogènes. De plus, les valeurs élevées des constantes de couplages vicinales (couplage NH, CH^β , $J = 9-10$ Hz) témoignent d'un arrangement anti-périplanaire des protons NH et CH^β de la chaîne principale. L'analyse RMN 1H a aussi montré de forts écarts de déplacement chimiques (allant jusqu'à 1-1,5 ppm pour les résidus centraux) entre les deux protons CH_2^α caractéristiques d'une forte anisochronicité des protons méthylènes (Figure 1.17.b). L'existence de corrélations NOE

(*Nuclear Overhauser Effect*) répétées à moyenne distance ($i/i-2$ et $i/i-3$) est caractéristique de l'existence d'un repliement en hélice (Figure I.17.c). A cela s'ajoutent d'autres caractéristiques conformationnelles¹³⁸: 1) dans les solvants peu polaires seules 4 à 5 unités urées suffisent pour insuffler le repliement en hélice, 2) la stabilité de l'hélice est accrue en bloquant l'amine en *N*-terminal (*capping* par un motif isopropylurée) ce qui permet d'apporter un 1^{er} groupement accepteur de liaisons hydrogènes et de supprimer les interactions électrostatiques répulsives entre la charge à l'extrémité *N*-terminale et le macrodipole de l'hélice. Des analyses en solution par dichroïsme circulaire (CD) dans le 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) et le MeOH révèlent une signature caractéristique de l'hélice d'oligourée avec un minimum négatif d'ellipticité à 188 nm et un maximum positif d'ellipticité à 203 nm dont l'intensité est proportionnelle au nombre de fonction urées (Figure I.17.d).¹²⁹ Par ailleurs, des études CD sur des oligourées hydrosolubles (réalisées en tampon salin à pH = 7,4) ont confirmé le maintien de la structuration en milieu aqueux avec la présence de la signature CD caractéristique de ce type d'hélice.¹³⁹

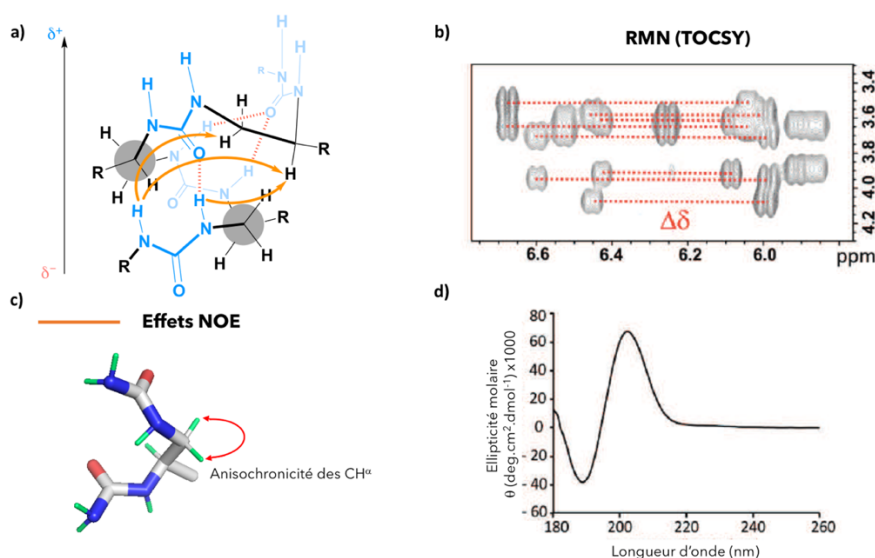


Figure I.17 : a) Informations structurales obtenues par spectroscopie RMN ¹H : connectivités NOE caractéristiques de l'hélice d'oligourée (en orange sur un schéma simplifié de l'hélice oligourée) ; b) Ecarts de déplacement chimique entre les protons CH₂^α diastérotopiques sur une RMN 2D TOCSY enregistrée dans le CD₃OH ; c) Extrait d'une structure RX d'oligourée illustrant l'anisochronicité des protons CH₂^α ; d) Spectre CD d'une hélice d'oligourée dans le TFE (séquence modèle Boc-Val^U-Ala^U-Leu^U-Val^U-Ala^U-Leu^U-NHMe à 200 μM).

Enfin, les données structurales obtenues en solution ont pu être confirmées par l'obtention de différentes structures cristallographiques aux rayons X à la fois en solvant organique et plus récemment en milieux aqueux (Figure I.18).^{116,136,137}

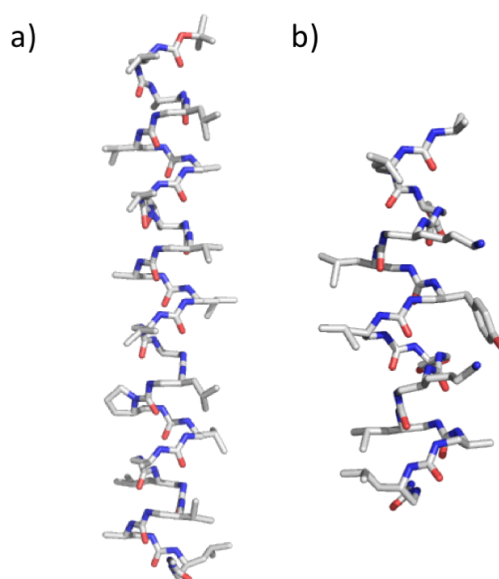


Figure I.18 : Structure cristalline d'hélices d'oligourées obtenues par diffraction aux rayons X : a) cristaux obtenus dans un solvant organique, DMF, (séquence : Boc-Val^U-Ala^U-Leu^U-Val^U-Ala^U-Leu^U-Pro^U-Val^U-Ala^U-Leu^U-Val^U-Ala^U-Leu^U-NHMe)¹³⁷ CCDC code 836813 et b) à partir de cristaux ayant poussés en milieu aqueux (séquence *iPr*-Leu^U-Glu^U-Lys^U-Leu^U-Tyr^U-Leu^U-Glu^U-Lys^U-Leu^U-Ala^U-Leu^U-NH₂).¹¹⁶

Récemment, des études ont permis de mettre en évidence la possibilité de concevoir des structures hybrides comportant des résidus de type urées insérés dans une séquence peptidique. Ces hybrides sont capables de former une seule et même hélice régulière (Figure I.19).¹⁴⁰

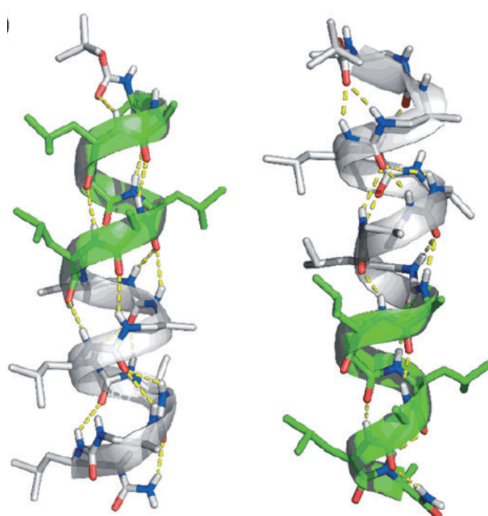


Figure I.19: Structure cristalline d'hybrides urées-peptides où la portion urée est représentée en vert. Les cristaux ont été obtenus dans le DMSO. Séquence : Boc-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Val^U-Ala^U-Leu^U-Val^U-Ala^U-Leu^U-NH₂ (gauche) et Boc-Val^U-Ala^U-Leu^U-Val^U-Ala^U-Leu^U-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-NH₂ respectivement (droite).

En raison de leur modularité de séquence, de leur stabilité structurale et de la conservation de leur conformation en milieu aqueux, les foldamères d'oligourées sont particulièrement intéressants pour de potentielles applications biologiques. De plus, leur stabilité accrue à la protéolyse¹²⁰ en fait de bons candidats pour mimer la composition et le repliement des peptides pénétrant les cellules.

b) Synthèse des oligourées

La première synthèse des oligourées décrite par Burgess¹²⁸ a depuis largement été rapportée dans la littérature. Cette première synthèse sur support solide consistait à coupler des monomères activés sous forme d'isocyanate dont l'amine *N*-terminale était d'abord protégée par un groupe phtaloyl (Figure I.20.a) pour être libérée après couplage par un traitement à l'hydrazine (60% dans du DMF). Cette stratégie nécessite des couplages de 1,5 h et l'étape de déprotection n'est complète qu'après 10h (à ce moment-là, le chauffage micro-onde n'avait pas encore été appliqué à la synthèse supportée). Parallèlement, le groupe de Schultz¹⁴¹ développa une autre stratégie de synthèse sur support solide qui consista à coupler un monomère activé par le chloroformiate de 4-nitrophenyle et dont l'amine *N*-terminale était masquée sous forme d'azoture (Figure I.20.b). Le couplage de ce block était réalisé en 4h à température ambiante, et la réduction de l'azoture en amine se faisait en présence de triéthylamine, de thiophenol et de chlorure d'étain (un composé très toxique) dans du THF en moins de 2h à température ambiante. Au moment où les travaux de Burgess et de Schultz ont été réalisés, le champ des foldamères n'avait pas été introduit par Gellman, il n'était alors question que de peptidomimes. De plus, les séquences synthétisés sur support solide n'étaient que très courtes. Plus tard, de nouvelles méthodologies de synthèse ont été développées par G. Guichard *et al.*, basées cette fois-ci sur l'utilisation de monomères activés dérivés de motifs éthylène diamine et protégés par des groupements protecteurs de type *N*-fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) (Figure I.20.c)¹⁴² ou *tert*-butoxycarbonyle (Boc) (Figure I.20.d).¹⁴³

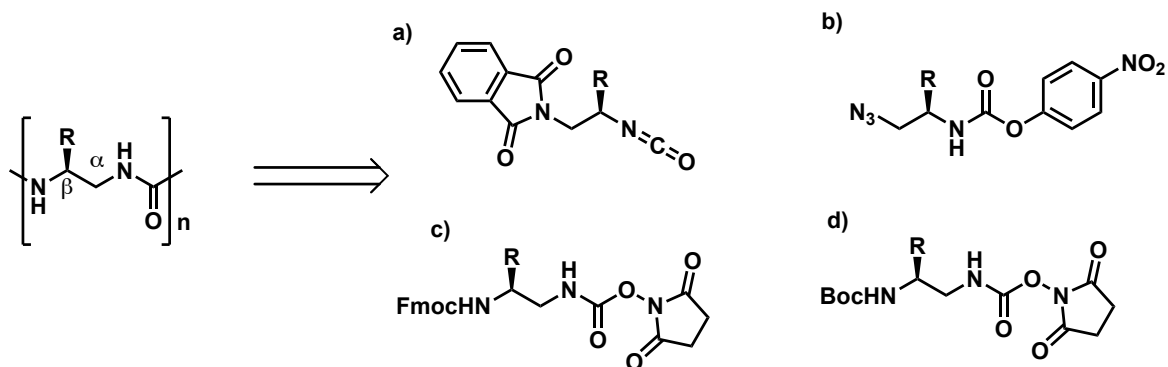


Figure I.20: Représentation schématique d'oligourées et les différentes unités monomériques utilisées pour leur synthèse.

Aujourd'hui, la méthode utilisant un monomère activé sous la forme de carbamate de succinimide et protégé par un groupement Boc (Figure I.20.d) donnent accès à toutes les chaînes latérales des acides α -aminés naturels. Une fois les monomères activés en main, la synthèse des oligourées peut se faire en solution¹³⁷ ou sur support solide.¹³²

Historiquement, l'utilisation de la synthèse sur support solide dans l'équipe a d'abord été réalisée à partir de monomères activés protégés par un groupement Fmoc¹²⁹ mais les faibles rendements obtenus, les problèmes de sur-insertion des résidus et l'incompatibilité de ces monomères avec une assistance micro-ondes ont conduit à l'abandon de cette stratégie. Une voie de synthèse dite « Boc » a alors été développée en utilisant la même activation sous forme de carbamate de succinimide mais en remplaçant le groupement Fmoc par une protection Boc. Cette stratégie de synthèse s'est montrée plus stable et compatible avec l'assistance micro-ondes. Cette voie de synthèse permet de synthétiser des oligomères avec des rendements corrects compris entre 15 et 35%, après purification par HPLC préparative, selon la taille et la composition de la séquence.

Toutefois, cette stratégie possède elle aussi certaines limites. Elle nécessite l'usage d'une résine de type 4-Méthylbenzhydrylamine (MBHA) et donc un clivage final par traitement à l'acide fluorhydrique. De plus, le lien urée formé par couplage du monomère **A** sur la résine MBHA n'est pas stable en présence d'acide trifluoroacétique et oblige l'introduction du premier résidu sous forme de γ -acide aminé (Figure I.21).¹⁴⁴

Pour ces raisons, le développement d'une nouvelle voie de synthèse sur support solide, compatible avec des résines acido-labiles (ex : Rink amide) a été mis au point par C. Douat *et al.*¹⁴⁵ Cette nouvelle stratégie repose sur le couplage sous assistance micro-ondes de monomères activés de type **B** dont l'amine est masquée sous la forme d'un azoture. L'azoture est ensuite réduit sur support solide par une réduction de Staudinger en présence

de triméthylphosphine (PMe_3) libérant ainsi l'amine nécessaire au couplage suivant (Figure I.21).¹⁴⁵

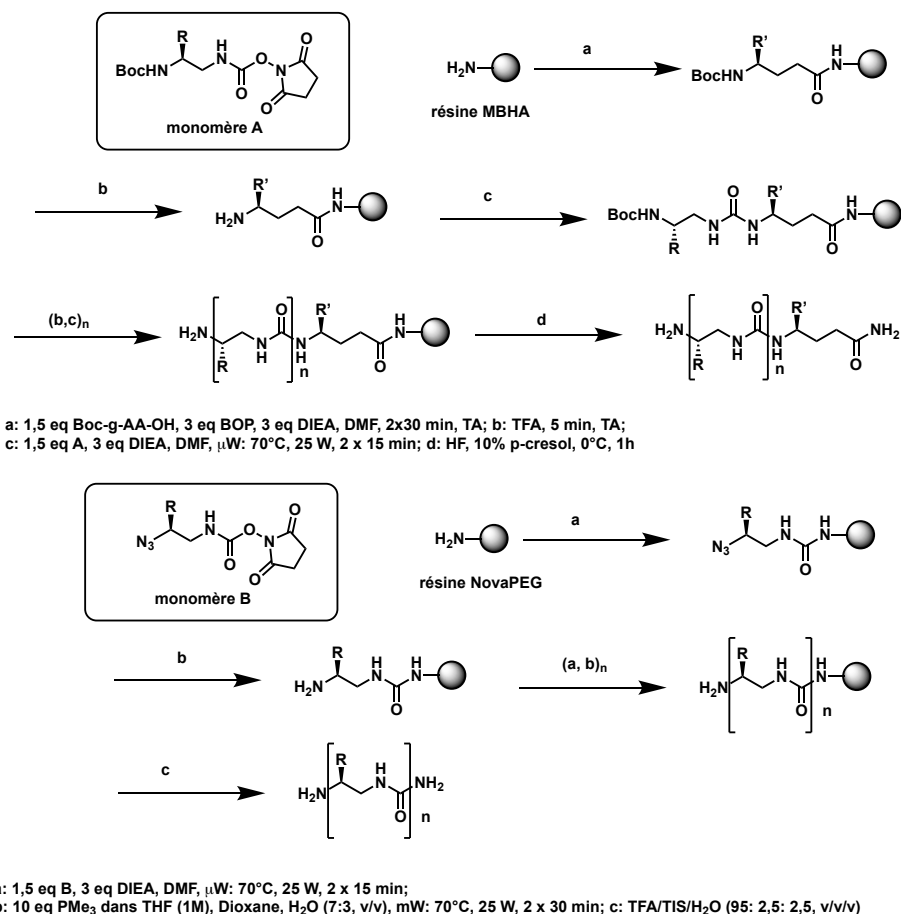


Figure I.21 : Schéma de synthèse des oligourées sur support solide sous assistance micro-ondes en stratégie Boc et en stratégie azote.

c) Développement de séquences oligourées pénétrant les cellules capables de délivrer un cargo

Précédemment, l'équipe a décrit de courtes séquences d'oligourées de 8 résidus, mimes de peptides antibactériens. Ces foldamères montrent un haut taux d'hélicité au voisinage des membranes phospholipidiques et ont une activité antimicrobienne dont le mécanisme implique une perméabilisation de la membrane des bactéries.¹²⁰ Ainsi, C. Douat *et al.* ont envisagé de convertir ces séquences d'oligourées antimicrobiens en CPFs afin de transporter des acides nucléiques. En effet, comme évoqué précédemment, il existe un lien direct entre les séquences de certains peptides antimicrobiens (riches en lysines) et des CPPs, leurs analogues où les lysines ont été remplacées par des arginines. Pour cela, C. Douat

et al. a choisi de combiner la distribution des chaînes latérales des oligourées antimicrobiens décrits précédemment avec les résidus clés du CPP LAH4.

Ainsi, dans une étude réalisée en collaboration avec le Dr. Antoine Kichler de l'Université de Strasbourg, sept oligourées ont été conçus avec différentes chaînes latérales et différentes longueurs.¹⁴⁶ Une première série (oligourées **1-4**) a été préparée en s'inspirant de la composition des séquences antimicrobiennes mais en y incorporant des résidus de type histidine et des résidus de type arginine. Une deuxième série (oligourées **5-7**) a été synthétisée de façon à se rapprocher un peu plus de la composition du peptide LAH4 et comportait donc des résidus de type leucine et alanine pour la partie hydrophobe et des résidus de type lysine et histidine pour la partie hydrophile. Tous ces oligourées ont été synthétisés sur phase solide en utilisant la stratégie Boc (Figure I.22).

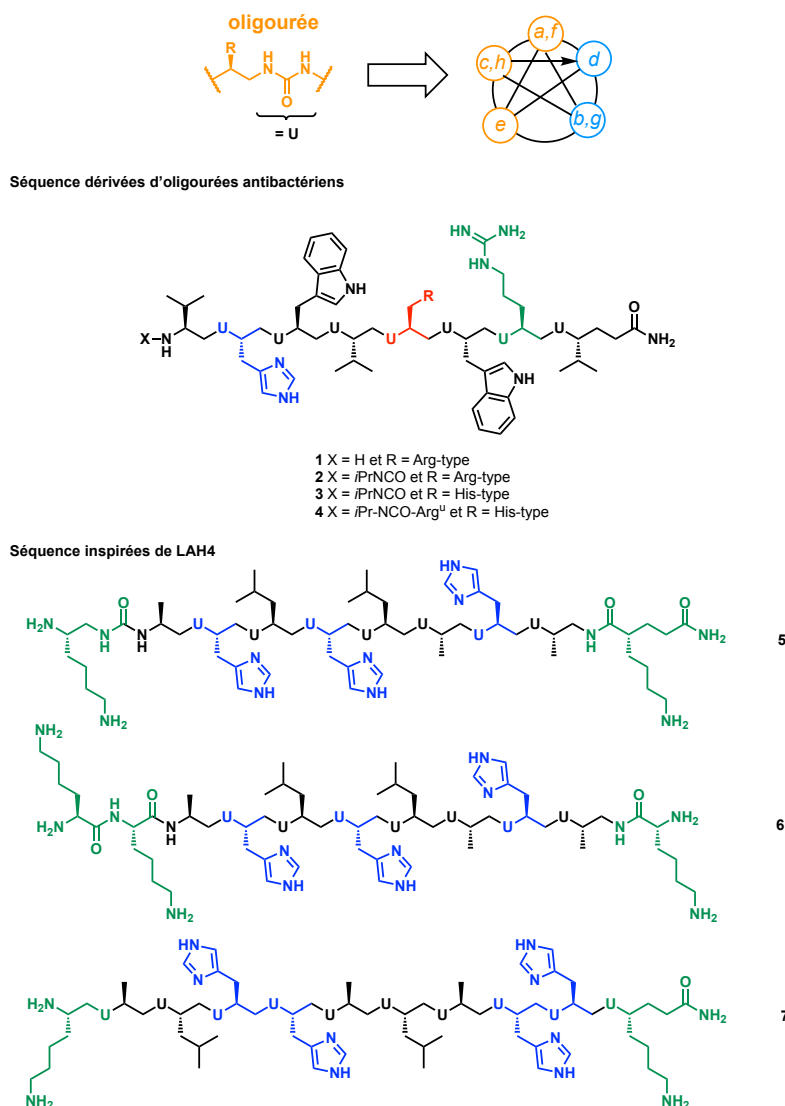


Figure I.22: Séquences d'oligourées synthétisées pour la conception de CPFs d'oligourées.

Avec ces composés en main, une étude par électrophorèse a été réalisée afin de déterminer la capacité de ces oligourées à complexer le plasmide de la luciférase. De cette façon, la quantité nécessaire pour retarder la migration de l'ADN a été mesurée. Par la suite, des tests d'expression de la luciférase ont été faits sur des cellules HEK293 en utilisant le peptide LAH4 comme contrôle. Dans cette étude, les oligourées ont été utilisés seuls ou en présence de 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) ou de ZnCl_2 des additifs. Le DOPE est un lipide connu pour faciliter l'assemblage du complexe agent de transport/acide nucléique et les ions Zn^{2+} sont connus pour aider à la fusion du complexe avec la membrane plasmique et à la libération du plasmide d'ADN une fois internalisé.¹⁴⁷ Ces ions métalliques peuvent aussi se lier aux noyaux imidazoles des résidus de type histidine et ainsi stabiliser la structuration en hélice. Ces expériences ont montré que les composés **1-7** sont tous capables de retarder la migration de l'ADN sur gel d'agarose. En revanche, ces oligourées présentent des efficacités très variables pour l'expression de la luciférase (Figure I.23). Le composé **3** est le plus efficace pour acheminer le plasmide de la luciférase (pLuc) dans les cellules HEK293. Son efficacité est accrue en présence de ZnCl_2 et est similaire à celle de LAH4 (Figure I.23). De manière non anticipée, les composés **5-7** dont les séquences ont été conçues pour ressembler à celle de LAH4 n'ont montré aucune capacité à transporter le plasmide pLuc. Ce premier résultat souligne l'importance de la présence de résidus de type tryptophane et que deux résidus de type histidine sont suffisants pour acheminer le gène dans le noyau et l'expression de la luciférase.

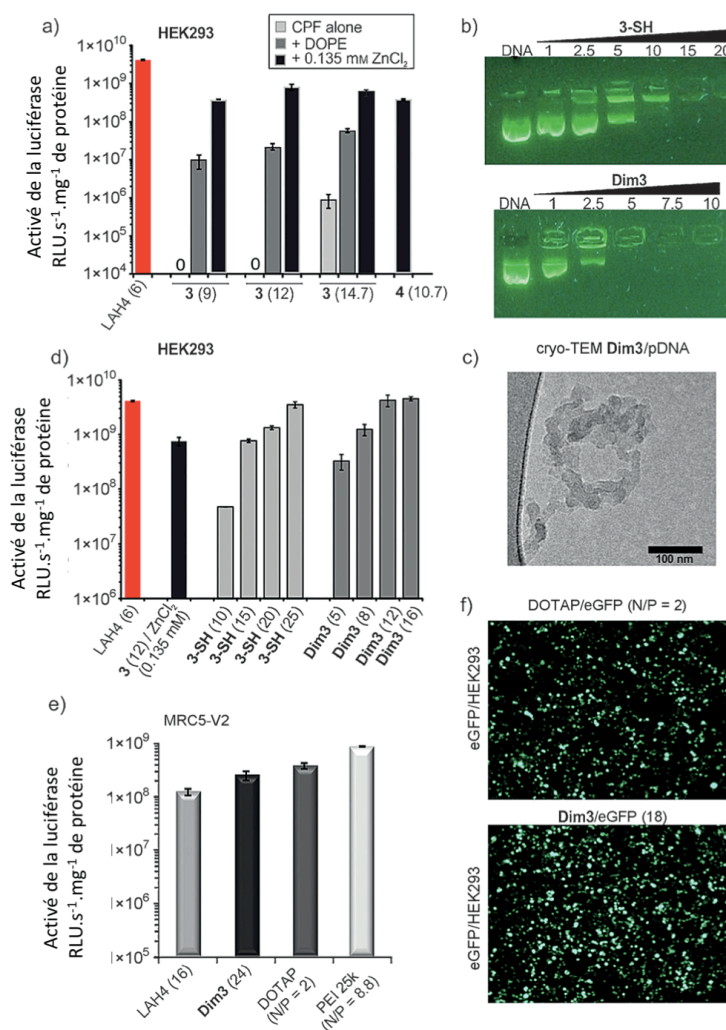


Figure 1.23 : a) Transfection de pLuc dans des cellules HEK293 en présence de **LAH4** et de différentes oligourées à plusieurs ratios massiques (CPF/ADN, entre parenthèses) sans ou avec additifs (0, 135 mM ZnCl₂ ou 3,3 μg DOPE/ μg ADN). L'activité de la luciférase a été mesurée après 28h d'incubation ; b) Gel d'électrophorèse avec pLuc (1 μg) et des quantités croissantes d'oligourées (1-20 μg) ; c) cryo-TEM du complexe **Dim3**/puc ; d) Comparaison de l'efficacité de transfection de **3**+ ZnCl₂, **3-SH**, **LAH4** et **Dim3** ; e) Efficacité de transfection obtenue sur des cellules MRC5-V2 ; f) Expression de la GFP 48h après transfection sur HEK293 avec des complexes pGFP/DOTAP ou pGFP/**Dim3**.

Afin d'améliorer l'activité de l'oligourée **3**, il a été envisagé de synthétiser un oligomère plus long qui se rapprocherait de la longueur du peptide **LAH4**. Pour cela, un thiol a été introduit du côté N-terminale du composé **3**, ce nouveau oligourée sera noté **3SH**. Celui-ci a ensuite été dimérisé *via* la formation d'un pont disulfure. Ce type de dimérisation est connu pour améliorer l'assemblage du complexe foldamère/ADN.¹⁴⁸ De plus le lien disulfure est bioréductible car la présence d'une forte concentration en glutathion dans le milieu intracellulaire permet la réduction du pont disulfure et donc la libération du cargo

dans le cytoplasme et une toxicité potentiellement diminuée (Figure I.24)¹⁴⁹. Le dimère obtenu est appelé **Dim3**.

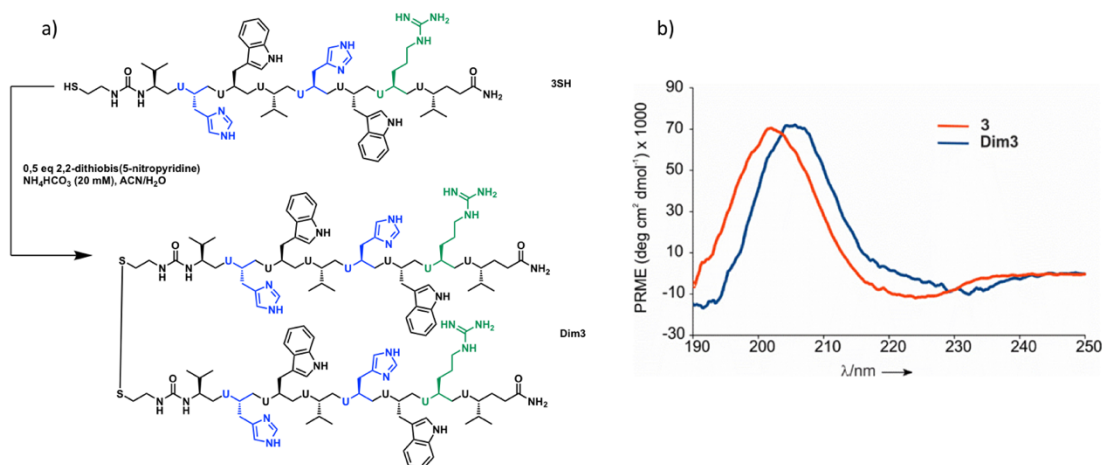


Figure I.24 : a) Représentation schématique de l'oligourée **3SH** sa dimérisation pour former **Dim3** ; b) Spectre CD de **3** et de **Dim3**.

Des études de dichroïsme circulaire ont été réalisées et prouvent que la dimérisation est compatible avec le maintien de la structuration en hélice de l'oligourée (Figure I.24). Des mesures de DLS ont aussi été réalisées et montrent que la taille des particules obtenues après complexation de l'ADN est de l'ordre de 100 nm en absence de sels et de l'ordre de 700 nm en conditions salines (les complexes sont assemblés dans une solution de NaCl). Des mesures de charges de surface ont révélé que ces particules étaient chargées positivement (+ 30 mV). Enfin, des expériences de cryoTEM (cryo-microscopie électronique à transition) ont montré que les objets obtenus étaient de forme globulaire et de taille compris entre 100 et 200 nm (Figure I.23.c).

Enfin, les tests d'expression de la luciférase témoignent que **Dim3** surpasse l'efficacité du composé **3** et a une efficacité comparable à celle du peptide LAH4 sans avoir besoin d'ajouter d'additifs (DOPE ou ZnCl_2). Il est aussi intéressant de constater que le composé **3SH** est lui aussi actif sans additifs mais à une dose supérieure, ce qui suggère une possible dimérisation de ce monomère au contact du plasmide. L'efficacité de transfection de **Dim3** a ensuite été testée sur d'autres lignées cellulaires (A549, MRC5-V2) en utilisant LAH4 ainsi que deux agents de transfection commerciaux (DOTAP et PEI-25k) comme contrôle. Dans ces lignées cellulaires, **Dim3** s'est montré aussi efficace que les contrôles et sa capacité de transfection a été confirmée par microscopie confocale en délivrant un plasmide permettant l'expression de la GFP (Green Fluorescent Protein). On peut voir sur les images

de microscopie que le niveau d'expression de la GFP est supérieur après transfection par **Dim3** qu'après transport du plasmide par le DOTAP (Figure I.23). Des tests de cytotoxicité ont aussi été réalisés en utilisant le test au MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium bromure, et les résultats ont été comparés à ceux du DOTAP et du PEI-25k. **Dim3** ne présente aucune toxicité apparente alors que le DOTAP induit 8% de mortalité cellulaire. Cette étude a été complétée par des tests de réponse au pH. En effet, il a été montré dans le cas des PEI que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'acidification des endosomes tel que la concanamycin A, diminue de façon significative l'efficacité des PEIs. L'utilisation de concanamycin A en présence de **Dim3** a conduit à une chute de l'efficacité d'un facteur 13 à 15. Ceci souligne donc l'importance de la protonation des résidus de type histidine dans le mécanisme d'internalisation de ces CPFs d'oligourées.

En conclusion, cette étude a permis de concevoir une première génération de CPF d'oligourées de faible toxicité et de charge modérée, capable de transporter des plasmides d'ADN dans différentes lignées cellulaires. Il a aussi été montré que la dimérisation de l'oligourée *via* un pont disulfure permet 1) d'amplifier la complexation de l'hélice 2,5 d'oligourée avec les acides nucléiques et 2) de faciliter la délivrance du cargo dans la cellule par un mécanisme redox. L'assemblage ainsi obtenu que l'on appellera « foldaplexe » montre une grande efficacité de transfection pour l'expression de gènes, comparable à celle obtenue avec les PEI, le DOTAP et le peptide LAH4.¹⁴⁶

5) Objectifs de la thèse

Des expériences préliminaires menées en collaboration avec le Dr. Antoine Kichler du laboratoire de Conception et Application de Molécules Biologiques à la faculté de Pharmacie de Strasbourg ont montré que l'oligourée **3** présente une efficacité de transport de plasmide d'ADN similaire à celle du peptide LAH4. L'objectif principal de cette thèse a été d'étudier l'activité de foldamères à base d'urées en tant que nouvel agent de transport de biomolécules dans les cellules. Une première étude pour le transport de plasmide d'ADN a permis d'identifier un nouveau CPF présentant une efficacité de transport améliorée dans un milieu riche en serum. Puis, plusieurs modifications chimiques ont été envisagées pour étendre les propriétés de transport des CPFs à base d'urées à d'autres acides nucléiques. En particulier, nous nous sommes intéressés à acheminer de petits ARNs interférent (siARN) dans diverses lignées cellulaires. Il a été montré que l'utilisation de ces petits ARN permettait de bloquer l'expression d'une protéine cible. Cette nouvelle stratégie pharmaceutique est aujourd'hui en plein essor et plusieurs systèmes de transport sont actuellement en phase d'évaluation thérapeutique (polymères et lyposomes cationiques). Enfin, nous nous sommes aussi intéressés au transport de protéines d'intérêt thérapeutique. Afin d'accroître la diversité chimique de nos CPFs, l'insertion de nouveaux motifs aux extrémités des séquences oligourées ont été envisagées. De plus, de nouvelles méthodologies de synthèse des CPFs oligourées ont été développées. La synthèse ainsi que l'évaluation de l'activité *in vitro* de ces CPFs ont été réalisés au cours de la thèse et seront présentés dans ce manuscrit.

En parallèle, de ce projet de transport de biomolécules, nous nous sommes intéressés à moduler l'hélicité des foldamères d'oligourées afin d'étendre leur champ d'applications. Pour cela, nous avons étudié la plasticité de l'hélice d'oligourée en préparant des macrocycles à base d'urées. La synthèse et l'étude conformationnelle en solution de ces nouveaux macrocycles seront décrites dans le troisième chapitre. Enfin, nous avons aussi étudié la dynamique de l'hélice oligourée et la possibilité d'induire un sens d'hélicité par reconnaissance d'anion.

Bibliographie

- (1) Human insulin receives FDA approval. *FDA Drug Bull.* **1982**, 12 (3), 18–19.
- (2) Leader, B.; Baca, Q. J.; Golan, D. E. Protein Therapeutics: A summary and pharmacological classification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7 (1), 21–39
- (3) Sharma, V. K.; Rungta, P.; Prasad, A. K. Nucleic acid therapeutics: basic concepts and recent developments. *RSC Adv.* **2014**, 4 (32), 16618–16631.
- (4) Gasparini, G.; Bang, E.-K.; Montenegro, J.; Matile, S. Cellular Uptake: Lessons from supramolecular organic chemistry. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (52), 10389–10402.
- (5) Copolovici, D. M.; Langel, K.; Eriste, E.; Langel, Ü. Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS Nano* **2014**, 8 (3), 1972–1994.
- (6) Green, M.; Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **1988**, 55 (6), 1179–1188.
- (7) Frankel, A. D.; Pabo, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **1988**, 55 (6), 1189–1193.
- (8) Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostini-Bazin, H.; Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88 (5), 1864–1868.
- (9) Vives, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. A truncated HIV-1 tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (25), 16010–16017.
- (10) Park, J.; Ryu, J.; Kim, K.-A.; Lee, H. J.; Bahn, J. H.; Han, K.; Choi, E. Y.; Lee, K. S.; Kwon, H. Y.; Choi, S. Y. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. *J. Gen. Virol.* **2002**, 83 (5), 1173–1181.
- (11) Derossi, D.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* **1998**, 8 (2), 84–87.
- (12) Elliott, G.; O'Hare, P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* **1997**, 88 (2), 223–233.
- (13) Pooga, M.; Hällbrink, M.; Zorko, M.; Langel, U. Cell penetration by transportan. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1998**, 12 (1), 67–77.
- (14) Wender, P. A.; Mitchell, D. J.; Pattabiraman, K.; Pelkey, E. T.; Steinman, L.; Rothbard, J. B. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97 (24), 13003–13008.
- (15) Fernández-Carneado, J.; Kogan, M. J.; Castel, S.; Giralt, E. Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the n-terminal domain of γ -zein. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43 (14), 1811–1814.
- (16) Park, C. B.; Yi, K. S.; Matsuzaki, K.; Kim, M. S.; Kim, S. C. Structure-activity analysis of buforin II, a

histone h2a-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97 (15), 8245–8250.

(17) Agrawal, P.; Bhalla, S.; Usmani, S. S.; Singh, S.; Chaudhary, K.; Raghava, G. P. S.; Gautam, A. CPPsite 2.0: a repository of experimentally validated cell-penetrating peptides. *Nucleic Acids Res.* **2016**, 44 (D1), D1098–D1103.

(18) Bechara, C.; Sagan, S. Cell-Penetrating Peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* **2013**, 587 (12), 1693–1702.

(19) Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, 84 (21), 7413–7417.

(20) Zelphati, O.; Szoka, F. C. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93 (21), 11493–11498.

(21) Le Bihan, O.; Chevre, R.; Mornet, S.; Garnier, B.; Pitard, B.; Lambert, O. Probing the in vitro mechanism of action of cationic lipid/DNA lipoplexes at a nanometric scale. *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39 (4), 1595–1609.

(22) Braun, C. S.; Jas, G. S.; Choosakoonkriang, S.; Koe, G. S.; Smith, J. G.; Middaugh, C. R. The structure of DNA within cationic lipid/DNA complexes. *Biophys. J.* **2003**, 84 (2), 1114–1123.

(23) Zaric, V.; Weltin, D.; Erbacher, P.; Remy, J.-S.; Behr, J.-P.; Stephan, D. Effective polyethylenimine-mediated gene transfer into human endothelial cells. *J. Gene Med.* **2004**, 6 (2), 176–184.

(24) Bertrand, E.; Gonçalves, C.; Billiet, L.; Gomez, J. P.; Pichon, C.; Cheradame, H.; Midoux, P.; Guégan, P. Histidinylated linear PEI: a new efficient non-toxic polymer for gene transfer. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (46), 12547.

(25) Zou, S. M.; Erbacher, P.; Remy, J. S.; Behr, J. P. Systemic linear polyethylenimine (l-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. *J. Gene Med.* **2000**, 2 (2), 128–134.

(26) Adessi, C.; Soto, C. Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9 (9), 963–978.

(27) Gellman, S. H. Foldamers: a manifesto. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31 (4), 173–180.

(28) Hill, D. J.; Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S. A field guide to foldamers. *Chem. Rev.* **2001**, 101 (12), 3893–4012.

(29) Seebach, D.; Ciceri, P. E.; Overhand, M.; Jaun, B.; Rigo, D.; Oberer, L.; Hommel, U.; Amstutz, R.; Widmer, H. Probing the helical secondary structure of short-chain β -peptides. *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79 (8), 2043–2066.

(30) Chongsiriwatana, N. P.; Patch, J. A.; Czyzewski, A. M.; Dohm, M. T.; Ivankin, A.; Gidalevitz, D.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. Peptoids that mimic the structure, function, and mechanism of helical antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105 (8), 2794–2799.

- (31) Farrera-Sinfreu, J.; Giralt, E.; Castel, S.; Albericio, F.; Royo, M. Cell-Penetrating cis- γ -amino-l-proline-derived peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (26), 9459–9468.
- (32) Violette, A.; Averlant-Petit, M. C.; Semetey, V.; Hemmerlin, C.; Casimir, R.; Graff, R.; Marraud, M.; Briand, J.-P.; Rognan, D.; Guichard, G. N,N'-linked oligoureas as foldamers: chain length requirements for helix formation in protic solvent investigated by circular dichroism, NMR spectroscopy, and molecular dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (7), 2156–2164.
- (33) Pasco, M.; Dolain, C.; Guichard, G. Foldamers in medicinal chemistry. In *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*; Elsevier, 2017; pp 89–125.
- (34) Futaki, S. Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57* (4), 547–558.
- (35) Wang, F.; Wang, Y.; Zhang, X.; Zhang, W.; Guo, S.; Jin, F. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. *J. Controlled Release* **2014**, *174*, 126–136.
- (36) Ryser, H. J.-P.; Hancock, R. Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture. *Science* **1965**, *150* (3695), 501–503.
- (37) Emi, N.; Kidoaki, S.; Yoshikawa, K.; Saito, H. Gene transfer mediated by polyarginine requires a formation of big carrier-complex of DNA aggregate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *231* (2), 421–424.
- (38) Futaki, S.; Nakase, I.; Tadokoro, A.; Takeuchi, T.; Jones, A. T. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35* (Pt 4), 784–787.
- (39) Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Lewis, R. S.; Murray, B. A.; Wender, P. A. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (31), 9506–9507.
- (40) Sakai, N.; Matile, S. Anion-mediated transfer of polyarginine across liquid and bilayer membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (47), 14348–14356.
- (41) Takayama, K.; Nakase, I.; Michiue, H.; Takeuchi, T.; Tomizawa, K.; Matsui, H.; Futaki, S. Enhanced intracellular delivery using arginine-rich peptides by the addition of penetration accelerating sequences (Pas). *J. Controlled Release* **2009**, *138* (2), 128–133.
- (42) Verdurmen, W. P. R.; Brock, R. biological responses towards cationic peptides and drug carriers. *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32* (2), 116–124.
- (43) Nakayama, F.; Yasuda, T.; Umeda, S.; Asada, M.; Imamura, T.; Meineke, V.; Akashi, M. Fibroblast growth factor-12 (fgf12) translocation into intestinal epithelial cells is dependent on a novel cell-penetrating peptide domain involvement of internalization in the in vivo role of exogenous fgf12. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (29), 25823–25834. h
- (44) Marks, J. R.; Placone, J.; Hristova, K.; Wimley, W. C. Spontaneous membrane-translocating peptides by orthogonal high-throughput screening. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (23), 8995–9004.

- (45) Reinhard, S.; Zhang, W.; Wagner, E. Optimized solid-phase-assisted synthesis of oleic acid containing siRNA nanocarriers. *ChemMedChem* **2017**, *12* (17), 1464–1470.
- (46) Som, A.; Tezgel, A. O.; Gabriel, G. J.; Tew, G. N. Self-activation in de novo designed mimics of cell-penetrating peptides. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2011**, *50* (27), 6147–6150.
- (47) Mäe, M.; El Andaloussi, S.; Lundin, P.; Oskolkov, N.; Johansson, H. J.; Guterstam, P.; Langel, U. A stearylated cpp for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J. Controlled Release* **2009**, *134* (3), 221–227.
- (48) Bechara, C.; Pallerla, M.; Zaltsman, Y.; Burlina, F.; Alves, I. D.; Lequin, O.; Sagan, S. Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2013**, *27* (2), 738–749.
- (49) Walrant, A.; Vogel, A.; Correia, I.; Lequin, O.; Olausson, B. E. S.; Desbat, B.; Sagan, S.; Alves, I. D. Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818* (7), 1755–1763.
- (50) Morris, M. C.; Vidal, P.; Chaloin, L.; Heitz, F.; Divita, G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (14), 2730–2736.
- (51) Oehlke, J.; Scheller, A.; Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Klauschenz, E.; Melzig, M.; Bienert, M. Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1998**, *1414* (1), 127–139.
- (52) Moradi, M.; Babin, V.; Roland, C.; Sagui, C. A classical molecular dynamics investigation of the free energy and structure of short polyproline conformers. *J. Chem. Phys.* **2010**, *133* (12), 125104.
- (53) Eiríksdóttir, E.; Konate, K.; Langel, Ü.; Divita, G.; Deshayes, S. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2010**, *1798* (6), 1119–1128.
- (54) Eiríksdóttir, E.; Konate, K.; Langel, Ü.; Divita, G.; Deshayes, S. secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2010**, *1798* (6), 1119–1128.
- (55) Tang, H.; Yin, L.; Kim, K. H.; Cheng, J. Helical poly(arginine) mimics with superior cell-penetrating and molecular transporting properties. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (10), 3839–3844.
- (56) Yamashita, H.; Kato, T.; Oba, M.; Misawa, T.; Hattori, T.; Ohoka, N.; Tanaka, M.; Naito, M.; Kurihara, M.; Demizu, Y. Development of a cell-penetrating peptide that exhibits responsive changes in its secondary structure in the cellular environment. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–8.
- (57) Hyun, S.; Choi, Y.; Lee, H. N.; Lee, C.; Oh, D.; Lee, D.-K.; Lee, C.; Lee, Y.; Yu, J. Construction of histidine-containing hydrocarbon stapled cell penetrating peptides for in vitro and in vivo delivery of siRNAs. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (15), 3820–3827.

- (58) Mueller, J.; Kretzschmar, I.; Volkmer, R.; Boisguerin, P. Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 Different cell lines. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (12), 2363–2374.
- (59) Maiolo, J. R.; Ferrer, M.; Ottinger, E. A. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2005**, *1712* (2), 161–172.
- (60) Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. Arginine-rich peptides an abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (8), 5836–5840.
- (61) Richard, J. P.; Melikov, K.; Vives, E.; Ramos, C.; Verbeure, B.; Gait, M. J.; Chernomordik, L. V.; Lebleu, B. Cell-penetrating peptides a reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (1), 585–590.
- (62) Guterstam, P.; Madani, F.; Hirose, H.; Takeuchi, T.; Futaki, S.; EL Andaloussi, S.; Gräslund, A.; Langel, Ü. Elucidating cell-penetrating peptide mechanisms of action for membrane interaction, cellular uptake, and translocation utilizing the hydrophobic counter-anion pyrenebutyrate. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2009**, *1788* (12), 2509–2517.
- (63) Jiao, C.-Y.; Delaroche, D.; Burlina, F.; Alves, I. D.; Chassaing, G.; Sagan, S. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (49), 33957–33965.
- (64) Nakase, I.; Takeuchi, T.; Tanaka, G.; Futaki, S. Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (4), 598–607.
- (65) Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **2003**, *422* (6927), 37.
- (66) Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, Ü.; Futaki, S.; Gräslund, A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* **2011**, *2011*.
- (67) Nakase, I.; Tadokoro, A.; Kawabata, N.; Takeuchi, T.; Katoh, H.; Hiramoto, K.; Negishi, M.; Nomizu, M.; Sugiura, Y.; Futaki, S. Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry (Mosc.)* **2007**, *46* (2), 492–501.
- (68) Wadia, J. S.; Stan, R. V.; Dowdy, S. F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.* **2004**, *10* (3), 310–315.
- (69) Kaplan, I. M.; Wadia, J. S.; Dowdy, S. F. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2005**, *102* (1), 247–253.
- (70) Jones, A. T. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J. Cell. Mol. Med.* **2007**, *11* (4), 670–684.
- (71) McMahon, H. T.; Boucrot, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12* (8), 517–533.
- (72) Pelkmans, L.; Helenius, A. Endocytosis via caveolae. *Traffic* **2002**, *3* (5), 311–320.

- (73) Ferrari, A.; Pellegrini, V.; Arcangeli, C.; Fittipaldi, A.; Giacca, M.; Beltram, F. Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2003**, *8* (2), 284–294.
- (74) Van den Berg, A.; Dowdy, S. F. Protein transduction domain delivery of therapeutic macromolecules. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22* (6), 888–893.
- (75) Doherty, G. J.; McMahon, H. T. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78* (1), 857–902.
- (76) Midoux, P.; Pichon, C.; Yaouanc, J.-J.; Jaffrès, P.-A. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers: histidine-rich nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157* (2), 166–178.
- (77) Behr, J.-P. The Proton Sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chim. Int. J. Chem.* **1997**, *51* (1–2), 34–36.
- (78) Midoux, P.; Kichler, A.; Boutin, V.; Maurizot, J.-C.; Monsigny, M. Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconjug. Chem.* **1998**, *9* (2), 260–267.
- (79) Langlet-Bertin, B.; Leborgne, C.; Scherman, D.; Bechinger, B.; Mason, A. J.; Kichler, A. Design and evaluation of histidine-rich amphipathic peptides for siRNA delivery. *Pharm. Res.* **2010**, *27* (7), 1426–1436.
- (80) Lan, Y.; Langlet-Bertin, B.; Abbate, V.; Vermeer, L. S.; Kong, X.; Sullivan, K. E.; Leborgne, C.; Scherman, D.; Hider, R. C.; Drake, A. F.; et al. Incorporation of 2,3-diaminopropionic acid into linear cationic amphipathic peptides produces pH-sensitive vectors. *ChemBioChem* **2010**, *11* (9), 1266–1272.
- (81) Johansson, H. J.; El-Andaloussi, S.; Holm, T.; Mäe, M.; Jänes, J.; Maimets, T.; Langel, Ü. Characterization of a novel cytotoxic cell-penetrating peptide derived from p14ARF protein. *Mol. Ther.* **2008**, *16* (1), 115–123.
- (82) Howl, J.; Matou-Nasri, S.; West, D. C.; Farquhar, M.; Slaninová, J.; Östenson, C.-G.; Zorko, M.; Östlund, P.; Kumar, S.; Langel, Ü.; et al. Bioportide: an emergent concept of bioactive cell-penetrating peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69* (17), 2951–2966.
- (83) Kerkis, I.; de Brandão Prieto da Silva, A. R.; Pompeia, C.; Tytgat, J.; de Sá Junior, P. L. Toxin bioportides: exploring toxin biological activity and multifunctionality. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74* (4), 647–661.
- (84) Herce, H. D.; Garcia, A. E.; Litt, J.; Kane, R. S.; Martin, P.; Enrique, N.; Rebolledo, A.; Milesi, V. Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophys. J.* **2009**, *97* (7), 1917–1925.
- (85) Nekhotiaeva, N.; Elmquist, A.; Rajarao, G. K.; Hällbrink, M.; Langel, Ü.; Good, L. Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides. *FASEB J.* **2003**, *18* (2), 394–396.
- (86) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.; Garland Science, 2002.
- (87) Mintzer, M. A.; Simanek, E. E. Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (2), 259–302.
- (88) Yin, H.; Kanasty, R. L.; Eltoukhy, A. A.; Vegas, A. J.; Dorkin, J. R.; Anderson, D. G. Non-viral vectors for

- gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15* (8), 541–555.
- (89) Nakase, I.; Niwa, M.; Takeuchi, T.; Sonomura, K.; Kawabata, N.; Koike, Y.; Takehashi, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Simpson, J. C.; et al. Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2004**, *10* (6), 1011–1022.
- (90) Haralambidis, J.; Duncan, L.; Tregear, G. W. The solid phase synthesis of oligonucleotides containing a 3'-peptide moiety. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (43), 5199–5202.
- (91) Eritja, R.; Pons, A.; Escarcellar, M.; Giralt, E.; Albericio, F. Synthesis of defined peptide-oligonucleotide hybrids containing a nuclear transport signal sequence. *Tetrahedron* **1991**, *47* (24), 4113–4120.
- (92) Pooga, M.; Soomets, U.; Hällbrink, M.; Valkna, A.; Saar, K.; Rezaei, K.; Kahl, U.; Hao, J.-X.; Xu, X.-J.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; et al. Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16* (9), 857.
- (93) Kichler, A.; Leborgne, C.; März, J.; Danos, O.; Bechinger, B. Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (4), 1564–1568.
- (94) Midoux, P.; Monsigny, M. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10* (3), 406–411.
- (95) Rittner, K. New Basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* **2002**, *5* (2), 104–114.
- (96) Simeoni, F. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system mpg: implications for delivery of sirna into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (11), 2717–2724.
- (97) Konate, K.; Dussot, M.; Aldrian, G.; Vaissière, A.; Viguier, V.; Neira, I. F.; Couillaud, F.; Vivès, E.; Boisguerin, P.; Deshayes, S. Peptide-based nanoparticles to rapidly and efficiently “Wrap’n Roll” siRNA into cells. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *30* (3), 592–603.
- (98) Lagassé, H. A. D.; Alexaki, A.; Simhadri, V. L.; Katagiri, N. H.; Jankowski, W.; Sauna, Z. E.; Kimchi-Sarfaty, C. Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research* **2017**, *6*.
- (99) Nischan, N.; Herce, H. D.; Natale, F.; Bohlke, N.; Budisa, N.; Cardoso, M. C.; Hackenberger, C. P. R. Covalent attachment of cyclic TAT peptides to GFP results in protein delivery into live cells with immediate bioavailability. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (6), 1950–1953.
- (100) Schwarze, S. R.; Ho, A.; Vocero-Akbani, A.; Dowdy, S. F. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **1999**, *285* (5433), 1569–1572.
- (101) Morris, M. C.; Depollier, J.; Mery, J.; Heitz, F.; Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19* (12), 1173.
- (102) Herce, H. D.; Schumacher, D.; Schneider, A. F. L.; Ludwig, A. K.; Mann, F. A.; Fillies, M.; Kasper, M.-A.; Reinke, S.; Krause, E.; Leonhardt, H.; et al. Cell-permeable nanobodies for targeted immunolabelling and

- antigen manipulation in living cells. *Nat. Chem.* **2017**, *9* (8), 762–771.
- (103) Kesharwani, P.; Jain, K.; Jain, N. K. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39* (2), 268–307.
- (104) Svenson, S.; Tomalia, D. A. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 102–115.
- (105) Ohsaki, M.; Okuda, T.; Wada, A.; Hirayama, T.; Niidome, T.; Aoyagi, H. In vitro gene transfection using dendritic poly(L-lysine). *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13* (3), 510–517.
- (106) Baigude, H.; McCarroll, J.; Yang, C.; Swain, P. M.; Rana, T. M. Design and creation of new nanomaterials for therapeutic RNAi. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2* (4), 237–241.
- (107) Inoue, Y.; Kurihara, R.; Tsuchida, A.; Hasegawa, M.; Nagashima, T.; Mori, T.; Niidome, T.; Katayama, Y.; Okitsu, O. Efficient delivery of siRNA using dendritic poly(L-lysine) for loss-of-function analysis. *J. Controlled Release* **2008**, *126* (1), 59–66.
- (108) Watanabe, K.; Harada-Shiba, M.; Suzuki, A.; Gokuden, R.; Kurihara, R.; Sugao, Y.; Mori, T.; Katayama, Y.; Niidome, T. In vivo siRNA delivery with dendritic poly(L-lysine) for the treatment of hypercholesterolemia. *Mol. Biosyst.* **2009**, *5* (11), 1306–1310.
- (109) Liu, X.; Zhou, J.; Yu, T.; Chen, C.; Cheng, Q.; Sengupta, K.; Huang, Y.; Li, H.; Liu, C.; Wang, Y.; et al. Adaptive amphiphilic dendrimer-based nanoassemblies as robust and versatile siRNA delivery systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (44), 11822–11827.
- (110) Dong, Y.; Yu, T.; Ding, L.; Laurini, E.; Huang, Y.; Zhang, M.; Weng, Y.; Lin, S.; Chen, P.; Marson, D.; et al. A Dual Targeting dendrimer-mediated siRNA delivery system for effective gene silencing in cancer therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (47), 16264–16274.
- (111) Mogaki, R.; Okuro, K.; Aida, T. Molecular glues for manipulating enzymes: trypsin inhibition by benzamidine-conjugated molecular glues. *Chem Sci* **2015**, *6* (5), 2802–2805.
- (112) Hashim, P. K.; Okuro, K.; Sasaki, S.; Hoashi, Y.; Aida, T. Reductively cleavable nanocaplets for sirna delivery by template-assisted oxidative polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (50), 15608–15611.
- (113) Nadiathe, V.; Liu, R.; Killinger, B. A.; Movassaghian, S.; Kim, N. H.; Moszczynska, A. B.; Masters, K. S.; Gellman, S. H.; Merkel, O. M. Screening Nylon-3 polymers, a new class of cationic amphiphiles, for sirna delivery. *Mol. Pharm.* **2015**, *12* (2), 362–374.
- (114) Guichard, G.; Huc, I. Synthetic foldamers. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (21), 5933–5941.
- (115) Hintermann, T.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D. γ -Peptides forming more stable secondary structures than α -peptides: synthesis and helical NMR-solution structure of the γ -hexapeptide analog of H-(Val-Ala-Leu)₂-OH. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81* (5–8), 983–1002.
- (116) Collie, G. W.; Pulka-Ziach, K.; Lombardo, C. M.; Fremaux, J.; Rosu, F.; Decossas, M.; Mauran, L.; Lambert, O.; Gabelica, V.; Mackereth, C. D.; et al. Shaping quaternary assemblies of water-soluble non-peptide

helical foldamers by sequence manipulation. *Nat. Chem.* **2015**, 7 (11), 871–878.

(117) Checco, J. W.; Kreitler, D. F.; Thomas, N. C.; Belair, D. G.; Rettko, N. J.; Murphy, W. L.; Forest, K. T.; Gellman, S. H. Targeting diverse protein–protein interaction interfaces with α/β -peptides derived from the α -domain scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, 112 (15), 4552–4557.

(118) Frackenhohl, J.; Arvidsson, P. I.; Schreiber, J. V.; Seebach, D. The outstanding biological stability of beta- and gamma-peptides toward proteolytic enzymes: an in vitro investigation with fifteen peptidases. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2001**, 2 (6), 445–455.

(119) Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K. Peptoids: a modular approach to drug discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89 (20), 9367–9371.

(120) Teyssières, E.; Corre, J.-P.; Antunes, S.; Rougeot, C.; Dugave, C.; Jouvion, G.; Claudon, P.; Mikaty, G.; Douat, C.; Goossens, P. L.; et al. Proteolytically stable foldamer mimics of host-defense peptides with protective activities in a murine model of bacterial infection. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (18), 8221–8232.

(121) Gillies, E. R.; Deiss, F.; Staedel, C.; Schmitter, J.-M.; Huc, I. Development and biological assessment of fully water-soluble helical aromatic amide foldamers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46 (22), 4081–4084.

(122) Hamuro, Y.; Schneider, J. P.; DeGrado, W. F. De novo design of antibacterial β -peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121 (51), 12200–12201.

(123) Li, Y.; Wu, H.; Teng, P.; Bai, G.; Lin, X.; Zuo, X.; Cao, C.; Cai, J. Helical antimicrobial sulfono- γ -AApeptides. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (11), 4802–4811.

(124) Rueping, M.; Mahajan, Y.; Sauer, M.; Seebach, D. cellular uptake studies with β -peptides. *ChemBioChem* **2002**, 3 (2–3), 257–259.

(125) Wender, P. A.; Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Kreider, E. L.; Wylie, B. L. Oligocarbamate molecular transporters: design, synthesis, and biological evaluation of a new class of transporters for drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (45), 13382–13383.

(126) Purkayastha, N.; Eyer, K.; Robinson, T.; Dittrich, P. S.; Beck, A. K.; Seebach, D.; Kolesinska, B.; Cadalbert, R. Enantiomeric and Diastereoisomeric (Mixed) L/ D-Octaarginine Derivatives – A simple way of modulating the properties of cell-penetrating peptides. *Chem. Biodivers.* **2013**, 10 (7), 1165–1184.

(127) Demizu, Y.; Oba, M.; Okitsu, K.; Yamashita, H.; Misawa, T.; Tanaka, M.; Kurihara, M.; Gellman, S. H. A preorganized β -amino acid bearing a guanidinium side chain and its use in cell-penetrating peptides. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13 (20), 5617–5620.

(128) Burgess, K.; Shin, H.; Linthicum, D. S. Solid-Phase Syntheses of unnatural biopolymers containing repeating urea units. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34 (8), 907–909.

(129) Burgess, K.; Ibarzo, J.; Linthicum, D. S.; Russell, D. H.; Shin, H.; Shitangkoon, A.; Totani, R.; Zhang, A. J. Solid phase syntheses of oligoureases. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119 (7), 1556–1564.

- (130) Kumler, W. D.; Fohlen, G. M. The dipole moment and structure of urea and thiourea. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64* (8), 1944–1948.
- (131) Gesell, J.; Zasloff, M.; Opella, S. J. Two-dimensional ¹H nmr experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. *J. Biomol. NMR* **1997**, *9* (2), 127–135.
- (132) Nelli, Y.-R.; Douat-Casassus, C.; Claudon, P.; Kauffmann, B.; Didierjean, C.; Guichard, G. An activated building block for the introduction of the histidine side chain in aliphatic oligoureas foldamers. *Tetrahedron* **2012**, *68* (23), 4492–4500.
- (133) Semetey, V.; Rognan, D.; Hemmerlin, C.; Graff, R.; Briand, J.-P.; Marraud, M.; Guichard, G. Stable helical secondary structure in short-chain N,N'-linked oligoureas bearing proteinogenic side chains. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (11), 1893–1895.
- (134) Violette, A.; Lancelot, N.; Poschalko, A.; Piotto, M.; Briand, J.-P.; Raya, J.; Elbayed, K.; Bianco, A.; Guichard, G. Exploring helical folding of oligoureas during chain elongation by high-resolution magic-angle-spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *Chem. – Eur. J.* **2008**, *14* (13), 3874–3882.
- (135) Guichard, G.; Violette, A.; Chassaing, G.; Miclet, E. Solution structure determination of oligoureas using methylene spin state selective nmr at ¹³C natural abundance. *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46* (10), 918–924.
- (136) Fischer, L.; Claudon, P.; Pendem, N.; Miclet, E.; Didierjean, C.; Ennifar, E.; Guichard, G. The canonical helix of urea oligomers at atomic resolution: insights into folding-induced axial organization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (6), 1067–1070.
- (137) Fremaux, J.; Fischer, L.; Arbogast, T.; Kauffmann, B.; Guichard, G. Condensation approach to aliphatic oligoureas foldamers: helices with n-(pyrrolidin-2-ylmethyl)ureido junctions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (48), 11382–11385.
- (138) Fischer, L.; Guichard, G. Folding and self-assembly of aromatic and aliphatic urea oligomers: towards connecting structure and function. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (14), 3101–3117.
- (139) Violette, A.; Fournel, S.; Lamour, K.; Chaloin, O.; Frisch, B.; Briand, J.-P.; Monteil, H.; Guichard, G. Mimicking helical antibacterial peptides with nonpeptidic folding oligomers. *Chem. Biol.* **2006**, *13* (5), 531–538.
- (140) Fremaux, J.; Mauran, L.; Pulka-Ziach, K.; Kauffmann, B.; Odaert, B.; Guichard, G. α -Peptide-oligoureas chimeras: stabilization of short α -helices by non-peptide helical foldamers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (34), 9816–9820.
- (141) Kim, J.-M.; Bi, Y.; Paikoff, S. J.; Schultz, P. G. The solid phase synthesis of oligoureas. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (30), 5305–5308.
- (142) Guichard, G.; Semetey, V.; Rodriguez, M.; Briand, J.-P. Solid phase synthesis of oligoureas using o-succinimidyl-(9h-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)ethylcarbamate derivatives as activated monomers. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (10), 1553–1557.

- (143) Guichard, G.; Semetey, V.; Didierjean, C.; Aubry, A.; Briand, J.-P.; Rodriguez, M. Effective preparation of o-succinimidyl-2- (tert-butoxycarbonylamino)ethylcarbamate derivatives from β -amino acids. Application to the synthesis of urea-containing pseudopeptides and oligoureas. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (23), 8702–8705.
- (144) Claudon, P.; Violette, A.; Lamour, K.; Decossas, M.; Fournel, S.; Heurtault, B.; Godet, J.; Mély, Y.; Jamart-Grégoire, B.; Averlant-Petit, M.-C.; et al. Consequences of isostructural main-chain modifications for the design of antimicrobial foldamers: helical mimics of host-defense peptides based on a heterogeneous amide/urea backbone. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2010**, *49* (2), 333–336.
- (145) Douat-Casassus, C.; Pulka, K.; Claudon, P.; Guichard, G. Microwave-enhanced solid-phase synthesis of *N*, *N'*-linked aliphatic oligoureas and related hybrids. *Org. Lett.* **2012**, *14* (12), 3130–3133.
- (146) Douat, C.; Aisenbrey, C.; Antunes, S.; Decossas, M.; Lambert, O.; Bechinger, B.; Kichler, A.; Guichard, G. A cell-penetrating foldamer with a bio reducible linkage for intracellular delivery of DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (38), 11133–11137.
- (147) Du, Z.; Munye, M. M.; Tagalakis, A. D.; Manunta, M. D. I.; Hart, S. L. The role of the helper lipid on the dna transfection efficiency of lipopolyplex formulations. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 7107.
- (148) Åmand, H. L.; Nordén, B.; Fant, K. Functionalization with c-terminal cysteine enhances transfection efficiency of cell-penetrating peptides through dimer formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *418* (3), 469–474.
- (149) Liu, J.; Liu, H.; Jia, Z.; Bulmus, V.; Davis, T. P. An approach to biodegradable star polymeric architectures using disulfide coupling. *Chem. Commun.* **2008**, No. 48, 6582.

CHAPITRE 2

Nouveaux foldamères d'oligourées pour le transport
intracellulaire d'acides nucléiques et de protéines

Évoquée précédemment dans le chapitre 1, la conception de structures amphipatiques d'oligourées a conduit à de bonnes activités de transport de plasmide d'ADN dans différentes lignées cellulaires (HEK293, A549, MRC5-V2). Parmi les oligourées testées, le composé **3** possède l'activité la plus intéressante. Par la suite, il a été établi que l'introduction d'une fonction thiol terminale (composé **3SH**) permettait une rapide homodimérisation du foldamère qui 1) améliore la formation du complexe foldamère/pADN (appelé foldaplexe) et 2) permet un relargage efficace du cargo une fois dans la cellule où le pont disulfure sera réduit par le glutathion présent dans le milieu intracellulaire. Dans ce chapitre, le composé **3SH** sera renommé **OL1** pour plus de clarté. La structuration en hélice-2,5 de l'oligourée **OL1** et de son dimère (**Dim1**) a été confirmée par dichroïsme circulaire dans un tampon aqueux. De plus, le CPF **Dim1** possède une efficacité de transfection similaire à celle du peptide contrôle LAH4 et à d'autres agents de transfection comme le PEI ou le DOTAP.¹ Ces résultats ont donc constitué le point de départ de ce travail de thèse sur la conception de nouveaux foldamères d'oligourées dérivants de la séquence d'**OL1** répondant à trois objectifs différents.

Tout d'abord, de nouvelles séquences oligourées monomériques ou dimériques ont été conçues dans le but de maximiser l'assemblage du complexe foldamère/pADN. Ensuite, ce projet de recherche s'est focalisé sur le transport de petits ARN interférents (siARN). Il a été montré que ces petits ARN permettaient de bloquer l'expression d'une protéine cible.² Cette nouvelle stratégie thérapeutique est aujourd'hui en plein essor et plusieurs systèmes de transport sont actuellement en phase d'évaluation thérapeutique (lyposomes cationiques, vecteurs polymériques).³ Enfin, nous nous sommes également intéressés à l'utilisation de ce type d'architecture pour le transport intracellulaire de protéines d'intérêt thérapeutique. En effet, ces vingt dernières années, les protéines thérapeutiques ont connu un succès important en tant qu'outil de recherche et sont parmi les classes de médicaments les plus dynamiques. Par conséquent, développer des agents de transport capables d'acheminer des protéines fonctionnelles actives dans les cellules constituerait un outil puissant tant pour la recherche fondamentale qu'appliquée.

Ainsi, en collaboration avec l'équipe du Dr. Antoine Kichler du laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives à la faculté de pharmacie de l'Université de Strasbourg, de nouveaux foldamères d'oligourées ont été développés afin de répondre à ces trois objectifs. Ces composés ont ensuite été testés *in vitro* afin d'étudier leur potentiel de transport de biomolécules.

1) Conception d'un nouveau système hybride foldamère-peptide : adressage cellulaire et stabilité accrue en milieu biologique

Afin de diversifier la composition de nos dimères d'oligourées et de potentiellement améliorer leur capacité à transporter des plasmides d'ADN dans les cellules cibles, nous avons décidé de combiner la séquence de l'oligourée **OL1** avec un pseudo-peptide multivalent riche en résidus arginine, appelé **NCL** (Figure II.1). Pour cela un analogue d'**OL1** a été utilisé où la position de la fonction thiol terminale a été déplacée du côté N-terminal vers le côté C-terminal pour des raisons purement synthétiques. Dans ce chapitre, cet analogue sera nommé **OL1_{inv}** et son homodimère **Dim1_{inv}**. **OL1_{inv}** a donc été couplé à **NCL** via un pont disulfure pour former l'hétérodimère **Dim2** (Figure II.1). Le pseudo-peptide **NCL** a été décrit dans la littérature comme étant capable de se lier aux nucléoprotéines de la surface cellulaire et notamment à la nucléoline.^{4,5}

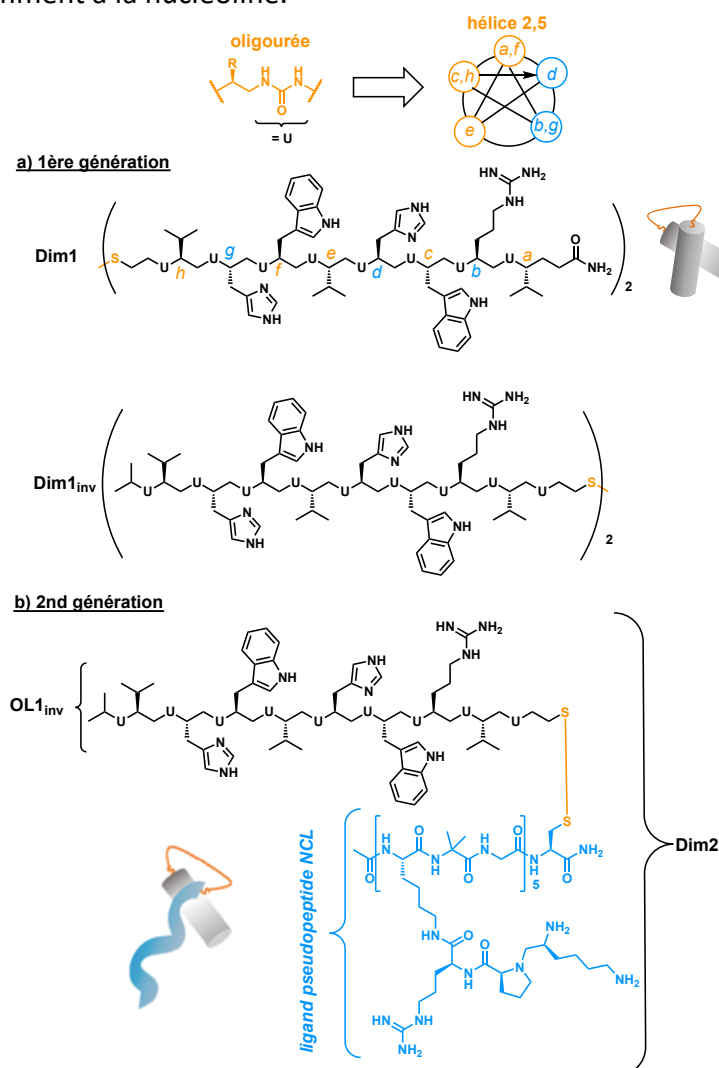


Figure II.1 : Représentation de la répartition spatiale des résidus sur la projection d'une hélice 2,5 d'oligourée et formule chimique de a) 1^{re} génération de CPF à base d'urées : homodimère **Dim1** et son analogue **Dim1_{inv}** et b) 2nd génération de CPF : hétérodimère foldamère-NCL à base d'urées **Dim2**.

La nucléoline est une protéine de 76 kDa qui joue un rôle clé dans différents processus cellulaires tel que la transcription, le transport d'ARNr, la réplication et la recombinaison d'ADN.⁶ La nucléoline est aussi un récepteur à la surface cellulaire où elle est associée à l'actine du cytosquelette et joue le rôle de transporteur entre le cytoplasme et le noyau. De plus, elle est surexprimée à la surface des cellules endothéliales activées et dans différents types de cellules cancéreuses.⁷ Plusieurs études récentes ont rapporté l'intérêt d'utiliser des ligands de la nucléoline (*i.e* l'aptamère AS1411,⁶ le peptide F3 ciblant les cellules tumorales⁷ ou des pseudo-peptides multimériques^{5,8}) comme anticancéreux mais aussi comme agent de transport intracellulaire.

Ainsi, l'hétérodimère hybride **Dim2** (Figure II.1) a été assemblé en solution à partir de deux fragments thiols et sa capacité de transport a été évaluée *in vitro*. Dans un premier temps, la synthèse supportée du fragment thiol oligourée et des peptides contrôles ainsi que l'assemblage en solution des dimères seront décrits. Puis les résultats d'activité *in vitro* de l'hétérodimère **Dim2** seront présentés en comparaison avec des CPP connus, et les homodimères d'**OL1_{inv}** et de **NCL** appelés respectivement **Dim1_{inv}** et **Dim3*** (*attention ce composé est différent du **Dim3** évoqué dans le chapitre 1 qui avait été nommé ainsi dans le papier cité, ici les composés ont été nommés par ordre d'apparition).

Cette étude a d'abord été initiée par le Dr. Céline Douat puis m'a été confiée car elle répondait aux objectifs de ma thèse.

a) Développement d'une résine de type cystamine pour la synthèse de CPF

Le premier volet de ce projet a consisté à synthétiser sur support solide l'oligourée **OL1_{inv}**. Pour cela, différentes stratégies étaient disponibles au laboratoire (stratégie de type Boc et azoture *c.f* chapitre 1).

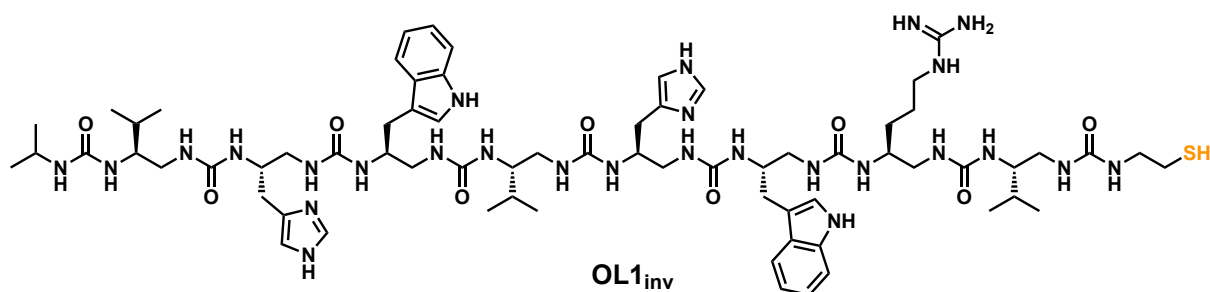


Figure II.2: Structure chimique d'**OL1_{inv}**.

La séquence de l'oligourée **OL1_{inv}** (Figure II.2) diffère de celle du composé **OL1** utilisé dans la première génération de CPF (Figure II.1), par la position de l'urée cysteamine terminale. En effet, celle-ci a été déplacée du côté N- vers le côté C-terminal pour faciliter la synthèse de l'oligourée par stratégie Boc en évitant d'avoir recours à un clivage final à l'HF. De plus, la stratégie Boc a été préférée à la stratégie azoture car jusqu'à présent le monomère activé de type histidine (His^u) n'est accessible qu'avec une protection Boc.⁹ La synthèse sur support solide par stratégie Boc est une méthode robuste qui permet de synthétiser des oligourées avec de bons rendements et une pureté élevée.¹⁰⁻¹² Toutefois, cette stratégie possède certaines limites. D'une part, elle nécessite l'emploi d'une résine de type 4-Methylbenzhydrylamine (MBHA) et donc un clivage final à l'acide fluorhydrique (HF). Elle nécessite aussi le couplage du premier résidu sous forme de γ -acide aminé car un lien urée directement introduit sur la résine n'est pas stable au TFA. Pour ces différentes raisons, une nouvelle approche de synthèse sur support solide, compatible avec la stratégie Boc a été développée au cours de ma thèse.

Cette nouvelle stratégie repose sur l'emploi d'une résine MBHA équipée d'un linker de type cystamine qui pourra être clivé en conditions réductrices pour libérer l'oligourée avec une fonction thiol C-terminal. Cette nouvelle stratégie permet non seulement d'éviter d'avoir recours à un clivage final à l'HF mais, elle évite aussi l'utilisation d'un γ -acide aminé en première position. Le linker cystamine fonctionnalisé sous forme d'urée étant stable aux conditions TFA. Une résine équipée d'un linker de type cystamine a déjà été décrite dans la littérature.¹³ Ici, il a été supposé que la nouvelle résine (**R1**) serait compatible avec une irradiation micro-ondes et serait stable à l'utilisation de TFA nécessaire pour la déprotection du groupement Boc.

Pour préparer la résine **R1**, le linker **L1** a initialement été synthétisé en solution (Figure II.3). La cystamine commerciale a tout d'abord été monoprotégée par un groupement Boc pour former l'intermédiaire **L1a** qui a ensuite été mis à réagir en présence d'anhydride succinique et de DMAP pour former le linker **L1** avec un rendement de 79%.

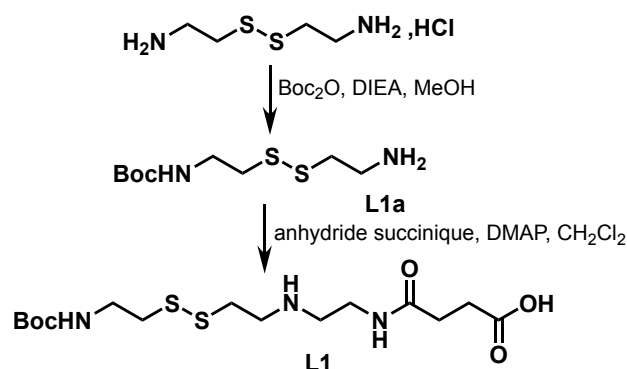


Figure II.3 : Schéma de synthèse du linker **L1**.

La résine **R1** a ensuite été préparée en réalisant un couplage peptidique sous irradiation micro-ondes du linker **L1** sur la résine commerciale MBHA (Figure II.4.a). L'introduction du linker **L1** sur la résine MBHA a été contrôlée en réalisant un test colorimétrique (*i.e* test Kaiser). On peut noter que cette nouvelle méthodologie permet de réaliser une fonctionnalisation totale de la résine.

Une fois la résine **R1** en main, des étapes de couplages/déprotections itératives des différents monomères (**M**) portant des chaînes latérales de type valine (**M^V**), tryptophane (**M^W**), ornithine (**M^O**) et histidine (**M^H**) ont été effectuées en conditions standard et sous irradiation micro-ondes (Figure II.4.a). Puisque cette nouvelle méthodologie de synthèse ne nécessite pas l'utilisation d'HF, les groupements protecteurs des chaînes latérales utilisés habituellement en stratégie Boc ne peuvent pas tous être employés. Par exemple, les résidus de type arginine sont habituellement protégés par un groupement tosyl en stratégie Boc, qui est déprotégé lors du clivage à l'HF. Ici, une alternative a donc dû être envisagée pour l'introduction du résidu Arg^u. Un résidu de type ornithine protégé par un groupement Alloc sur l'amine de la chaîne latérale (**M^O**) a donc été introduit en position *b* de l'oligourée comme précurseur du résidu Arg^u. Une fois l'élongation de chaîne terminée, l'intermédiaire supporté **OL1_{invb}** a été traité par du Pd(Ph₃)₄ en présence de phénylsilane sous atmosphère inerte pour enlever le groupement Alloc de l'Orn^u et permettre la guanidinylation en utilisant le 1-amido-pyrazole hydrochloride (**1**) pour former l'intermédiaire **OL1_{invc}** (Figure II.4.a). Après déprotection du tosyl des noyaux imidazoles des His^u par de l'hydroxybenzotriazole (HOBt), l'oligourée **OL1_{inv}** a été détachée de la résine par réduction du pont disulfure en présence de dithiothréitol (DTT) en milieu basique et a été obtenue avec un rendement de 13% après purification sur RP-HPLC préparative (Figure II.4.a). Le chromatogramme HPLC du produit brut (Figure II.4.b) révèle une pureté de 45%.

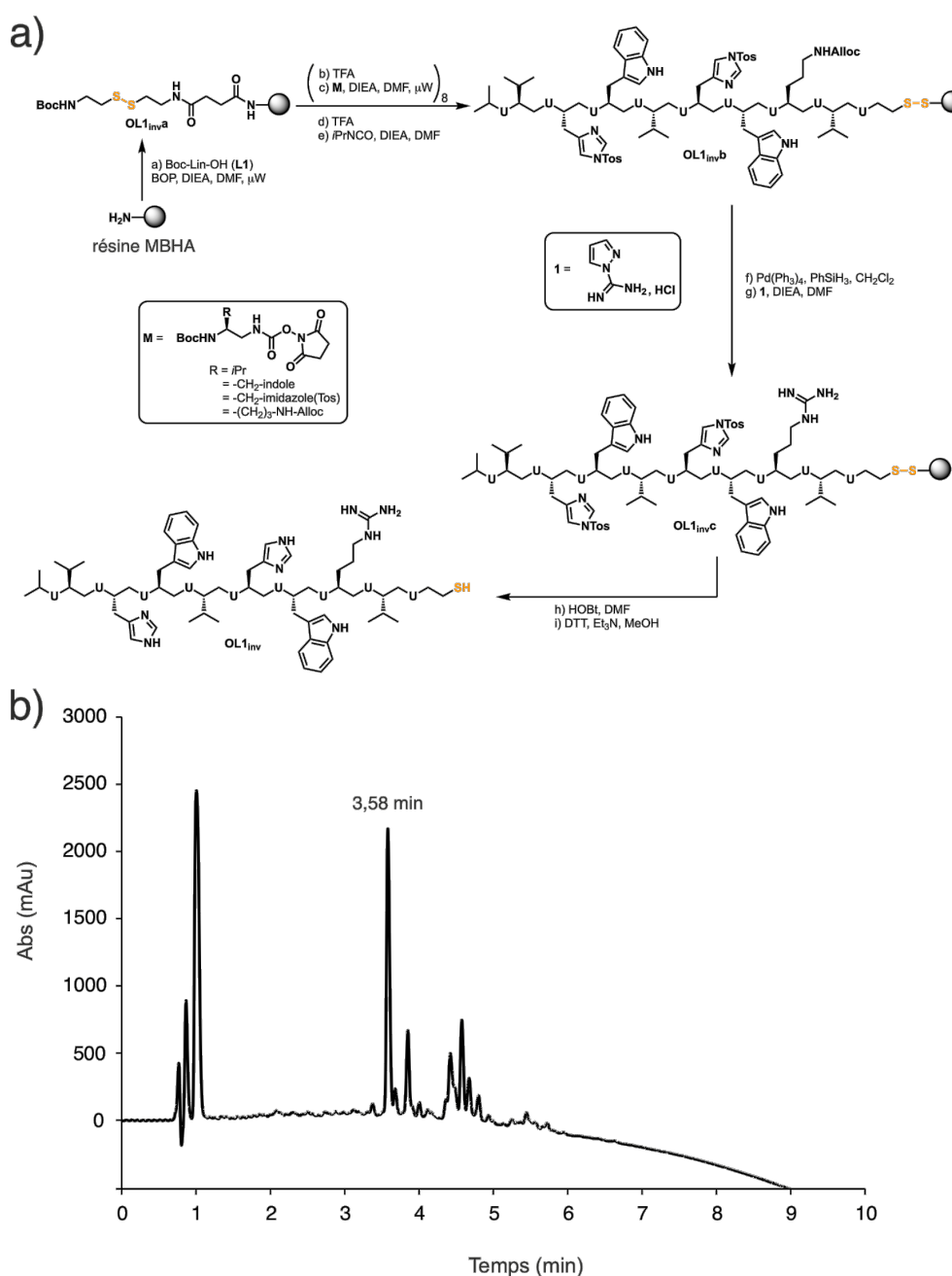


Figure II.4 : a) Schéma de synthèse de l'oligourée **OL1_{inv}** sur support solide sous assistance des micro-ondes en stratégie Boc avec la nouvelle résine **R1** ; b) Chromatogramme HPLC du produit brut **OL1_{inv}**. Conditions HPLC : (30-70% CH₃CN (+0,1% TFA) dans H₂O (+0,1% TFA) en 10 min, λ = 200nm).

b) Synthèse automatisée sur support solide de la version « cystéine » du peptide LAH4

Les peptides **LAH4** (séquence : KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA) et **LAH4-L1** (séquence : KKALLAHLALHLLALLALHLAHLALKKA) sont des peptides cationiques amphipatiques de synthèse qui ont montré une grande capacité *in vitro* à délivrer des plasmides d'ADN dans différentes lignées cellulaires.^{14,15} Ces peptides ont été choisis comme contrôle positif dans

cette étude car ils sont parmi les CPPs les plus efficaces décrits dans la littérature.^{15,16} Notre collaborateur, le Dr Antoine Kichler, avait déjà dans son laboratoire les peptides de contrôles **LAH4** et **LAH4-L1**. Cependant, l'hétérodimère composé du peptide **LAH4** et de NCL (**Dim4**) a aussi été préparé afin de comparer son activité avec celle de l'hétérodimère **Dim2**. Pour cela, il a fallu introduire une fonction thiol terminale sur le peptide **LAH4**. La séquence de **LAH4** a été allongée en position N-terminale par un résidu cystéine permettant la conjugaison à NCL. La synthèse de ce peptide **Cys-LAH4** (Figure II.5) a donc été réalisée au cours de ma thèse.

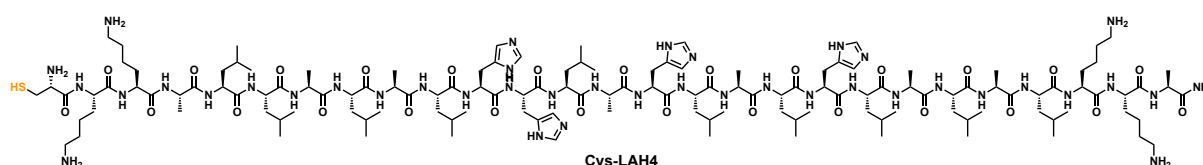


Figure II.5 : Structure chimique du peptide **Cys-LAH4**.

La synthèse du peptide **Cys-LAH4** a été réalisée en utilisant la stratégie Fmoc classiquement utilisée en synthèse supportée sur la résine commerciale Rink amide MBHA. Cette synthèse a été faite sur un synthétiseur micro-ondes automatique, le *Liberty-Blue* commercialisé par CEM qui permet une haute reproductibilité des cycles de couplages/déprotection et pilote l'ajout des différents réactifs ainsi que les étapes de lavage tout au long de la synthèse.

Lors d'un premier essai, la synthèse a été réalisée en suivant les recommandations par défaut de CEM. Les couplages itératifs des acides aminés protégés *N*-Fmoc ont été réalisés deux fois de façon systématique en présence de diisopropylcarbodiimide (DIC) et d'éthyl-2-cyano-2-(hydroximino)acétate (Oxyma) comme agents de couplage sous irradiation micro-ondes à 75°C et 30 W pendant 5 min. Une fois l'élongation de chaîne terminée, le peptide a été détaché de la résine en utilisant un « cocktail de clivage » composé de TFA/TIS/H₂O/EDT (92,5 :2,5 :2,5 :2,5; v/v/v/v). Le peptide a ensuite été précipité en utilisant de l'éther froid et le brut réactionnel a été analysé par RP-HPLC analytique. L'analyse HPLC a révélé un très grand nombre d'impuretés et la présence du peptide attendu n'a pu être identifiée (Figure II.6.a).

Nous avons donc décidé de répéter la synthèse supportée en utilisant d'autres conditions de couplages. Au lieu d'utiliser un agent de couplage *in situ* de type carbodiimide, nous avons utilisé le *N,N,N',N'*-tetraméthyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uronium hexafluorophosphate (HBTU) un réactif de couplage de type uronium associé à du 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), classiquement utilisé pour réduire les risques d'épimérisation

au cours des cycles de couplage. De la diisopropyléthylamine (DIEA) a été utilisée comme base au cours des réactions de couplage. Les étapes de couplages ont été réalisées sous irradiation micro-ondes à 75°C, 30 W pendant 5 min, à l'exception des résidus histidines qui ont été couplés à 50°C, 30W pendant 10 min. Chaque couplage a été répété une seconde fois de façon systématique. Après clivage du peptide dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment et précipitation à l'éther, le chromatogramme RP-HPLC du brut réactionnel a révélé la présence d'un pic majoritaire avec une pureté supérieure à 80% (Figure II.6.b) dont l'analyse par LC-MS a permis de confirmer qu'il correspondait au peptide **Cys-LAH4**.

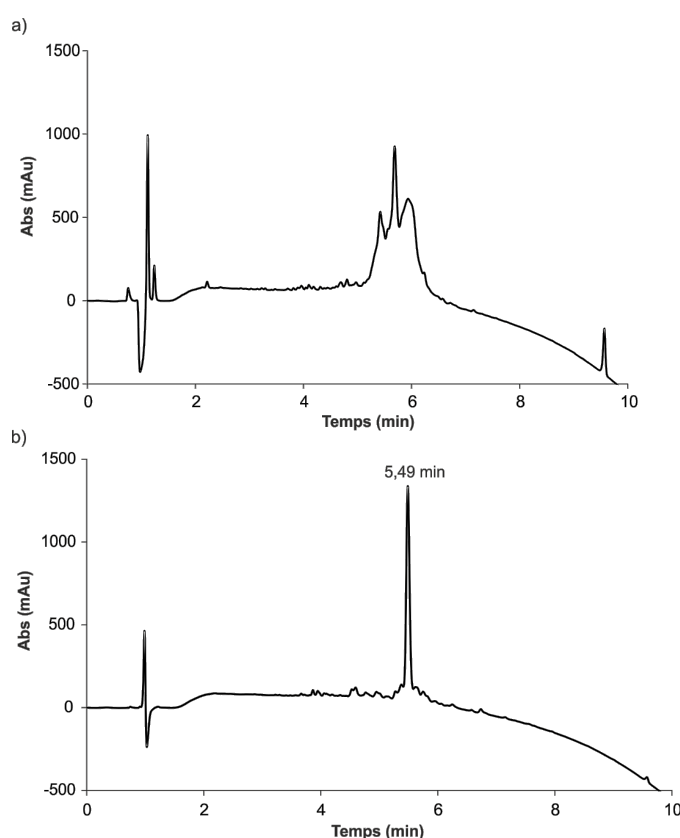


Figure II.6 : Chromatogramme HPLC du produit brut de **cys-LAH4** après synthèse sur support solide automatisée en utilisant a) DIC/oxyma ou b) HBTU/DIEA. Conditions d'HPLC : (10-100% CH₃CN (+0,1% TFA) dans H₂O (+0,1% TFA) en 10 min, λ = 200nm).

La synthèse de **Cys-LAH4** a ainsi été optimisée et le peptide a pu être isolé par RP-HPLC préparative avec un rendement global de 35%.

c) Homo- et Hétéro-dimérisation des séquences CPF et CPP en solution

i) Synthèse des dimères d'oligourées

La dimérisation des oligourées *via* la formation d'un pont disulfure est une méthode rapide et efficace pour allonger une séquence sans avoir recours à des couplages supplémentaires. De plus, il a été montré que cette dimérisation améliore l'efficacité de transfection des CPFs à base d'urées.¹ Une première méthode de synthèse de ces homodimères a été employée précédemment en activant le soufre terminal par l'intermédiaire d'un nucléophile relais de type Bis(5-nitro-2-pyridyl) disulfide (NPys)₂ en milieu tamponné.¹ Dans le cadre de ce projet, cette méthode a été utilisée pour former le dimère **Dim1_{inv}** (Figure II.7). Celui-ci a été obtenu avec un rendement de 54% après purification sur RP-HPLC préparative.

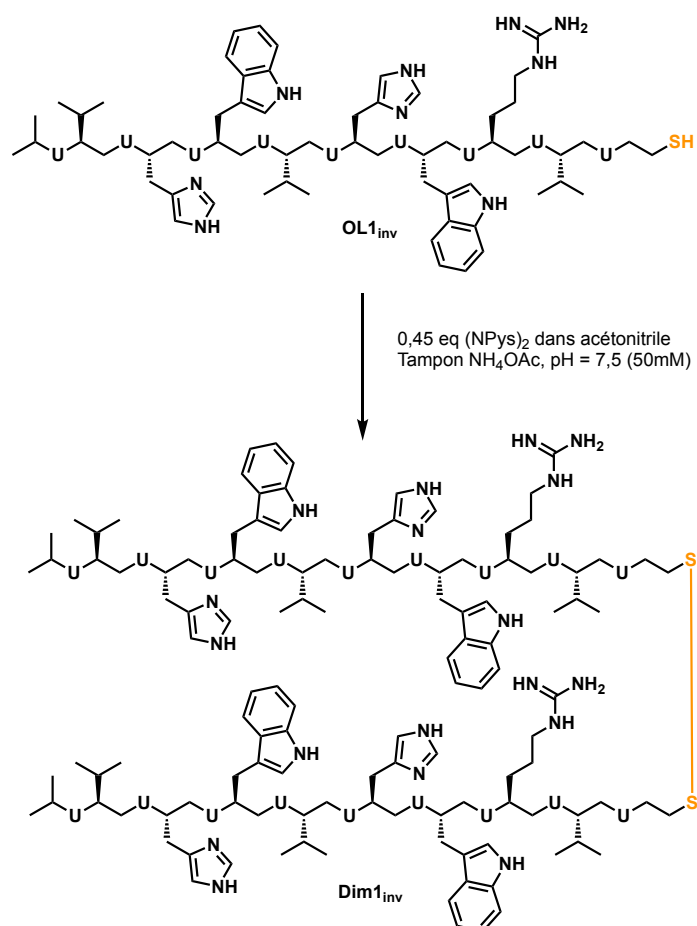


Figure II.7: Schéma de synthèse du composé **Dim1_{inv}** à partir de **OL1_{inv}**.

L'homodimère **Dim3** a quant à lui été synthétisé par oxydation au DMSO. En effet, l'oxydation de thiols en pont disulfure peut se faire par une oxydation à l'air (comme c'est le cas dans la synthèse de **Dim1_{inv}**) ou bien par une oxydation au DMSO. Pour cela, le composé

NCL (acheté à la société PolyPeptide) est dissous dans un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5) contenant 15% de DMSO et la réaction est laissée sous agitation durant 48h et suivi par HPLC. Cette voie de synthèse a permis d'obtenir le dimère **Dim3** avec un rendement de 72% après purification sur RP-HPLC préparative.

En ce qui concerne la synthèse des hétérodimères, celle-ci doit se faire en deux étapes. Tout d'abord, le thiol d'un des deux monomères est activé en présence d'un excès de (NPys)₂ dans un milieu tamponné (tampon NH₄OAc 50 mM, pH 7,5), l'activation est alors suivie par HPLC. Une fois celle-ci terminée, l'excès de (NPys)₂ est extrait à l'aide de dichlorométhane et une solution du second monomère (non activé) est ajoutée. La dimérisation est elle aussi suivie par HPLC et permet d'obtenir efficacement l'hétérodimère souhaité. Après une mise au point nécessaire sur petite quantité afin de déterminer quel monomère activé conduisait au meilleur rendement, les deux hétérodimères d'intérêts ont pu être préparés. En effet, nous avons pu observer que les rendements varient en fonction de la nature du monomère activé. Cette optimisation sur petite quantité a donc été nécessaire pour optimiser le rendement. Cette voie de synthèse a permis d'obtenir l'hétérodimère **Dim2** avec un rendement de 12% et l'hétérodimère **Dim4** avec un rendement de 20% après purification sur RP-HPLC préparative. Cette méthode de pré-activation permet de favoriser la formation de l'hétérodimère au détriment des homodimères (Figure II.8).¹⁷

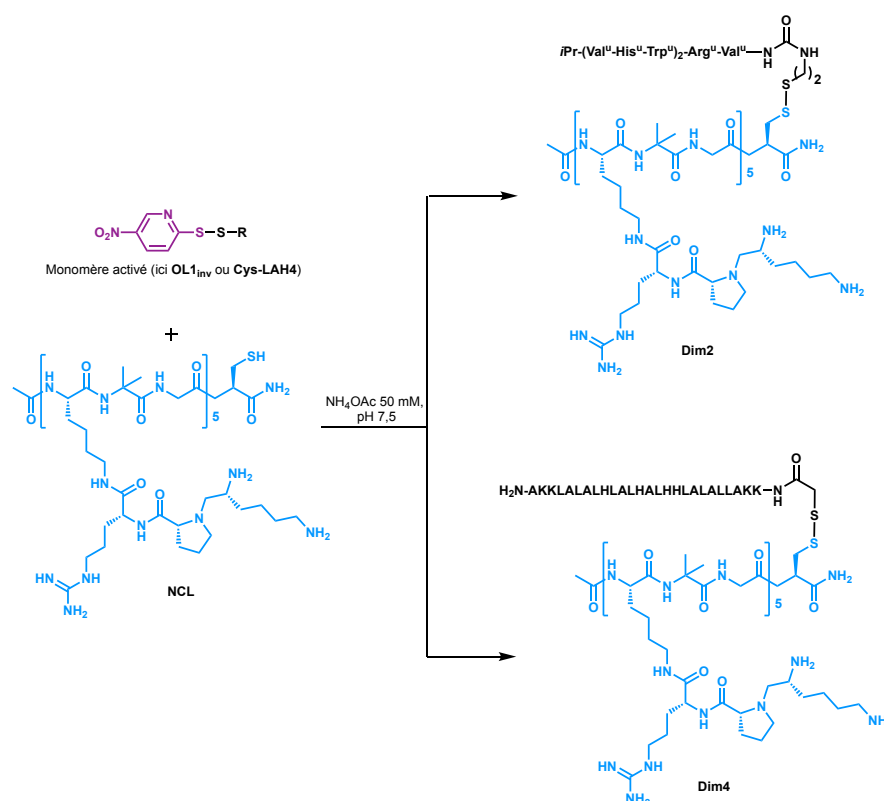


Figure II.8: Schéma de synthèse des hétérodimères **Dim2** et **Dim4**.

ii) Etude conformationnelle en solution du dimère **Dim2** par dichroïsme circulaire

L'étude du repliement de l'oligourée **OL1** et de son dimère **Dim1** avait été faite par dichroïsme circulaire (CD) lors de l'étude de la première génération de CPF comme expliqué dans le chapitre 1. Les hélices-2,5 des oligourées ont une signature CD caractéristique avec un maximum positif d'ellipticité molaire aux environ de 205 nm.¹⁸ Ici, des expériences de CD ont été réalisées pour confirmer la structuration en hélice-2,5 de la portion oligourée du dimère **Dim2**. Les spectres CD ont été mesurés soit dans les conditions de transfection (150 mM NaCl) soit dans un tampon phosphate (40 mM, pH 7,4) (Figure II.9). Les analyses CD indiquent que l'hétérodimère **Dim2** possède un signal positif intense à 205 nm et cela quel que soit le milieu alors que le monomère **NCL** ne montre aucun signal à cette longueur d'onde. De plus, **NCL** ne présente pas de signal caractéristique d'une structuration connue (hélice- α ou feuillet- β). Ce résultat est contraire à celui attendu puisque le peptide multivalent **NCL** possède des résidus Aib dans son squelette qui ont été introduits pour favoriser sa structuration en hélice- α . Ces résultats CD permettent donc d'affirmer que la portion urée de **Dim2** adopte une conformation en hélice-2,5. En comparant les spectres CD de **Dim2** et **OL1_{inv}**, on peut remarquer que le signal caractéristique de l'urée à 205 nm est plus intense pour **Dim2** que pour **OL1_{inv}**. Ceci suggère que l'hélice-2,5 est stabilisée par la dimérisation avec le ligand NCL.

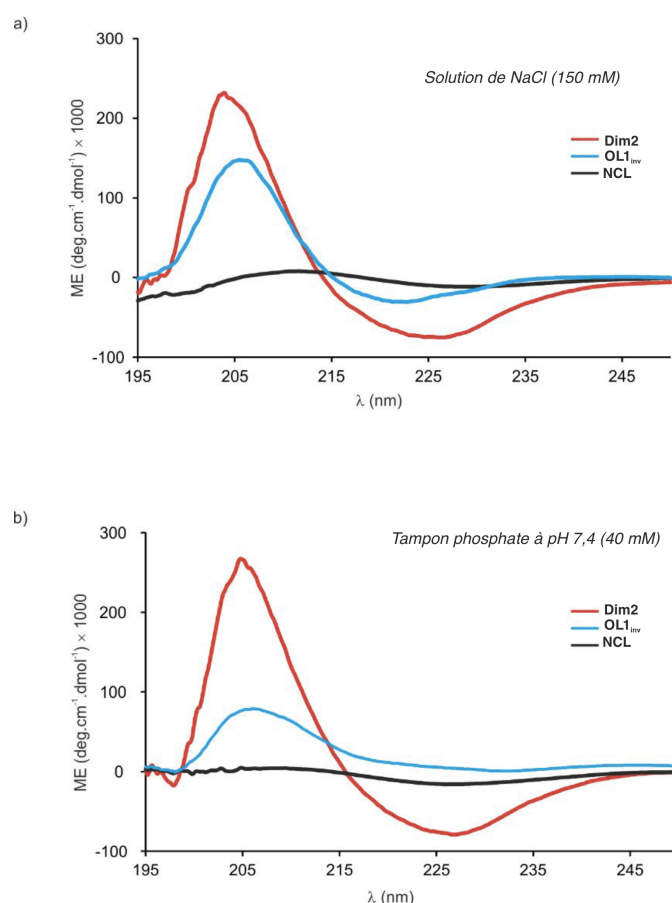


Figure II.9: Comparaison des spectres CD des composés **Dim2**, **OL1_{inv}** et **NCL** mesurés (a) dans une solution de NaCl et (b) dans un tampon phosphate à pH 7,4 (40 mM).

d) Détermination des propriétés de transfection des nouvelles architectures foldamères et peptidiques

i) Formation du complexe **Dim2**/ADN et étude de la capacité de transport de **Dim2**

Dans un premier temps, des expériences de gel retard ont été réalisées afin de déterminer la capacité du composé **Dim2** à former un complexe avec un plasmide d'ADN (ici le plasmide permettant l'expression de la luciférase : p-Luc) (Figure II.10). Pour une quantité fixée d'ADN, des quantités croissantes en hétérodimère **Dim2** ont été utilisées et le composé **Dim1** a été choisi comme contrôle positif. Le gel révèle que **Dim2** est capable de fortement interagir avec l'ADN puisque l'on observe une perte totale de la migration de p-Luc à un ratio massique **Dim2**/p-Luc égal à 1 (Figure II.10). De plus, le marquage de l'ADN n'est plus visible ce qui prouve la force de l'interaction entre le foldamère et p-Luc. La valeur obtenue pour le contrôle positif **Dim1** est en accord avec les données précédemment décrites dans la littérature.¹

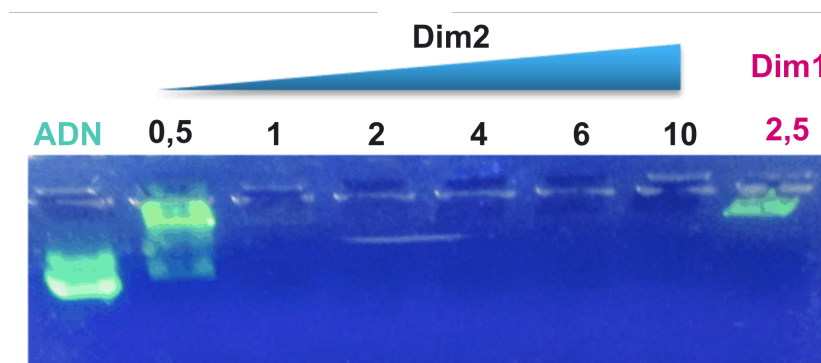


Figure II.10 : Gel retard réalisé avec un quantité fixe de plasmide d'ADN (*p-luc*) et une quantité croissante de l'hétérodimère **Dim2**. Le ration massique **Dim2**/pADN est indiqué au-dessus de chaque dépôt. **Dim1_{inv}** a été utilisé comme contrôle positif.

Des tests de transfection ont ensuite permis de déterminer la capacité du nouveau CPF **Dim2** à transporter l'ADN dans les cellules ciblées. Les composés **Dim1**, **Dim1_{inv}** et **Dim3** ont aussi été étudiés (Figure II.11.a). La capacité de transport des différents vecteurs a été déterminée en utilisant le plasmide exprimant la luciférase (*pLuc*) comme gène rapporteur dans la lignée cellulaire HEK293 (cellules embryonnaires rénales humaines). La luciférase est une enzyme à l'origine du phénomène de bioluminescence. Après ajout de son substrat (la luciférine), la luciférase catalyse la réaction de bioluminescence en oxydant la luciférine en présence d'oxygène. Cette oxydation fait passer la luciférine d'un état stable à un état électronique excité et instable. En retournant à son état stable, la luciférine émet un photon qui produit une lumière jaune-verte. Cette lumière est facilement quantifiable par luminescence et le gène exprimant la luciférase peut donc servir de gène modèle pour évaluer la capacité d'un vecteur à délivrer de l'ADN. Ici, le CPF **Dim1** et le *N,N,N*-triméthylammonium méthylsulfate (DOTAP), un vecteur lipidique cationique, ont été choisis comme contrôles positifs.

Tout d'abord, les complexes vecteurs/ADN ont été préparés en mélangeant une quantité définie d'ADN (1,5 µg) à une quantité étudiée de vecteur dans une solution de NaCl (150 mM). Les complexes d'ADN ont ainsi été préparés à différents ratios molaire N/P (*i.e* le ratio entre la quantité molaire d'amines cationiques présentes dans le vecteur et la quantité molaire de phosphates anioniques portés par l'ADN). Ce ratio correspond donc à un ratio de charges et est calculé de la façon suivante :

$$\frac{N}{P} = \frac{n(\text{vecteur})(\text{mol}) * \text{nombre de charges positives du vecteur}}{m(\text{ADN})(\mu\text{g}) * 3,0 \text{ E}^{-9}}$$

Où $n(\text{vecteur})$ correspondant au nombre de moles du vecteur, $m(\text{ADN})$ correspondant à la masse d'ADN utilisée en µg (car 1 µg d'ADN contient 3 nmol de phosphates).

Ces complexes se forment par interaction électrostatique entre les résidus chargés positivement du vecteur et les phosphates chargés négativement de l'ADN. Il est aussi possible que les liens urées soient impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques car il a été montré que l'urée est capable de reconnaître des phosphates^{19,20} mais le rôle spécifique des urées dans les complexes ADN/CPF n'a pour l'instant pas été démontré. Après 20 min, les complexes ont été dilués avec du milieu de culture et le milieu enrichi en foldaplexe a été déposé sur les cellules. Après incubation des cellules pendant 2,5 heures à 37°C, le milieu a été remplacé par un milieu cellulaire frais contenant du sérum. L'activité de la luciférase a été mesurée 24 à 48 heures plus tard après avoir lysé les cellules. Chaque expérience a été effectuée plusieurs fois, et des triplicats ont été faits de façon systématique. Si pLuc a bien été internalisé dans le noyau, alors la cellule sera capable de produire de la luciférase et celle-ci pourra être quantifiée. Sauf mention exceptionnelle, toutes les expériences de transfection décrites dans cette thèse ont été réalisées en suivant le même protocole.

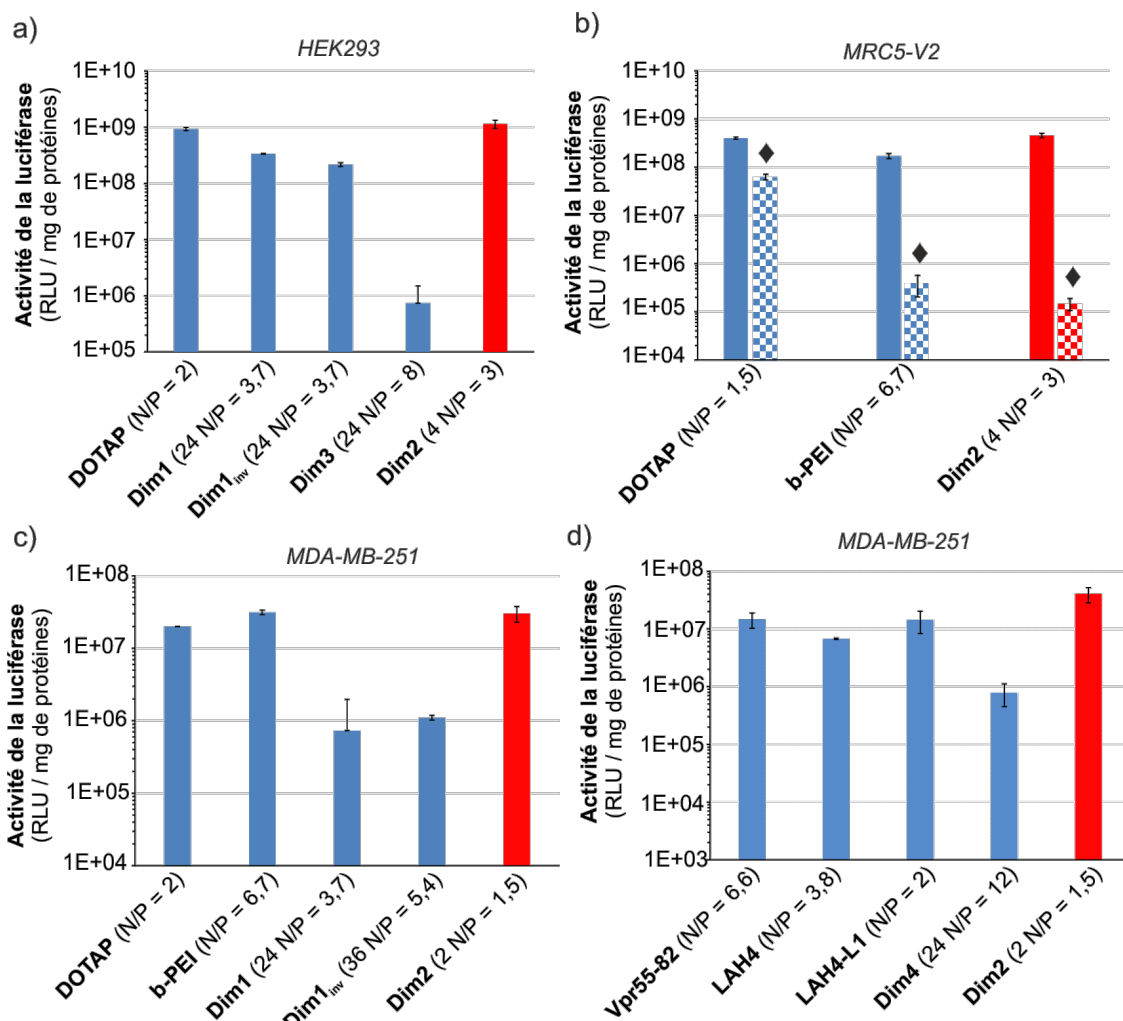


Figure II.11 : Evaluation de l'efficacité de transport du plasmide de la luciférase (pLuc) par différents vecteurs peptidiques ou CPF à une quantité fixe en ADN (1,5 µg) et des quantités croissantes en vecteurs, pour différents ratios N/P. L'activité de la luciférase a été mesurée 24-48h après la transfection. L'efficacité de transport est exprimée en unité de lumière par seconde et par mg de protéines, les résultats présentés correspondent aux moyennes des triplicats. Ici, seules sont reportées les conditions ayant données le meilleur résultat. L'ensemble des conditions testées sont décrites dans la partie expérimentale (Figure V.24 et Figure PE.25). Les masses (µg) des composés utilisés dans ce test et les ratios de charges vecteur/ADN (N/P) sont indiqués entre parenthèses. (a) Transfection de cellules HEK293 avec pLuc en présence de DOTAP et de 4 dimères **Dim1**, **Dim1_{inv}**, **Dim3** et **Dim2** ; (b) transfection de cellules MRC5-V2 en présence de DOTAP, PEI ou **Dim2** en présence (♦) ou absence de concanamycin A (15 nM) ; (c) transfection de cellules MDA-MB-231 en présence de DOTAP, PEI ou **Dim2** et (d) comparaison de l'efficacité de transfection de **Dim2** par rapport à des CPP de référence (**Vpr55-82**, **LAH4** et **LAH4-L1**).

Ces premiers résultats montrent que **Dim2** transporte efficacement pLuc dans la lignée HEK293 avec un niveau d'expression de la luciférase similaire à celui obtenu avec le lipide DOTAP et supérieur à celui de **Dim1**. On peut noter aussi que malgré un poids moléculaire plus élevé ($MW = 4842 \text{ g.mol}^{-1}$ pour **Dim2** contre 2899 pour **Dim1**), le ratio de charges N/P de **Dim2** reste inférieur à celui de **Dim1** avec une valeur optimale de N/P égale à 3 pour **Dim2**, et à 3,7 pour **Dim1**. Ce résultat est particulièrement intéressant car un faible ratio de charges limite le risque de cytotoxicité et le risque d'engendrer une potentielle

réponse immunitaire. Cela réduit aussi la possibilité que du foldamère non complexé soit présent dans le milieu cellulaire. De plus, si l'on compare l'activité de **Dim1** et **Dim1_{inv}**, on peut conclure que déplacer la fonction thiol du N- terminal vers le C- terminal n'impacte pas l'efficacité de transfection du CPF. Le composé **Dim3** correspondant à l'homodimère du ligand NCL ne démontre quant à lui qu'une faible activité de transfection (1000 fois inférieure à celle de **Dim2**). Ce résultat souligne donc l'importance de la portion urée et son rôle clé pour le transport de pLuc par **Dim2** (Figure II.11.a).

Afin de confirmer ces premiers résultats, des tests de transfection ont été réalisés dans deux autres lignées cellulaires humaines : des fibroblastes MRC5 immortalisés par le virus à ADN SV40 (MRC5-V2) et une lignée cellulaire de cancer du sein (MDA-MB-231). Ici, en plus du DOTAP, le polymère cationique 25 kDa b-PEI qui est aujourd'hui l'un des meilleurs vecteurs cationiques décrits dans la littérature,²¹⁻²⁶ a été utilisé comme contrôle positif (Figure II.11.b et II.11.c). Ces expériences confirment l'efficacité de transfection du CPF **Dim2** et soulignent qu'il est aussi efficace que les deux agents de transport commerciaux (DOTAP et b-PEI) avec de faibles ratios N/P compris entre 1,5 et 3 selon la lignée cellulaire étudiée.

Des expériences ont ensuite été répétées sur la lignée cellulaire MDA-MB-231 afin de comparer l'activité du CPF **Dim2** avec des CPPs (LAH4,²⁷ LAH4-L1²⁸ et Vpr55-82^{29,30}). **Dim2** surpasse l'efficacité des trois CPPs avec un ratio N/P de 1,5, qui est inférieur à celui des trois CPPs étudiés (ratio N/P allant de 2 à 6,6 pour les CPPs) (Figure II.11.c). Enfin, si l'on regarde l'activité de l'hétérodimère **Dim4**, correspondant à l'hétérodimère composé du peptide **LAH4** et du ligand **NCL**, on constate que celui-ci est moins actif que le peptide **LAH4** seul (Figure II.11.d). Ce dernier résultat souligne encore une fois l'importance de la portion urée dans l'efficacité de transfection de l'hétérodimère **Dim2**.

ii) Étude du mécanisme d'internalisation du nouveau CPF **Dim2**

Comme évoqué dans le chapitre 1, le principal mode d'internalisation des CPPs est la voie d'endocytose. L'efficacité du transport d'acides nucléiques dans les cellules dépend donc de la capacité du vecteur à sortir de l'endosome afin de libérer son cargo dans le cytoplasme. Dans le chapitre 1, on a évoqué l'importance de l'acidification des endosomes pour permettre la libération du foldaplexe (c.f effet éponge à protons chapitre 1).

Afin d'étudier le mode d'internalisation du CPF **Dim2**, l'expression de la luciférase a été mesurée après inhibition de l'acidification des endosomes par la concanamycin A (un antibiotique connu comme étant capable d'inhiber les V-ATPase, responsables de l'afflux de protons dans l'endosome).³¹ En présence de concanamycin A, l'efficacité du b-PEI et celle du

dimère **Dim2** sont toutes les deux diminuées d'un facteur 1000 alors que l'activité du DOTAP n'est pas affectée (Figure II.11.b). Ces résultats soulignent donc l'importance de l'acidification des endosomes et donc de la protonation des résidus His^u dans l'internalisation du CPF **Dim2**. Ce résultat est en accord avec l'étude réalisée sur la première génération de CPF, le dimère **Dim1**.

iii) Caractérisation physico-chimique des foldaplexes

Des analyses par DLS (Diffusion dynamique de la lumière) ont été faites afin de déterminer la taille des complexes de seconde génération CPF/ADN et leur charge de surface. Lorsque les complexes ont été préparés en absence de sels, la majorité des particules ont montré une taille d'environ 100 nm similaire à celle décrite pour le dimère **Dim1**.¹ Cependant, pour favoriser les assemblages, la préparation des assemblages s'effectue en milieu salin à une concentration de 150 mM en NaCl. Les expériences de DLS dévoilent qu'en milieu salin, les foldaplexes forment de plus grosses particules ayant une taille 10 fois plus grande que dans l'eau pure (environ 1000 nm). La présence de sel induit donc une agrégation des particules. La charge de surface des complexes a quant à elle été déterminée en mesurant le potentiel zeta des complexes. Cette mesure a été faite au ratio optimale de N/P (N/P = 2,7). A ce ratio, les foldaplexes montrent un zeta potentiel positif de + 27mV. Cette charge globale positive permet donc l'internalisation du complexe **Dim2**/ADN.

iv) Détermination de l'efficacité de transport en milieu enrichi en sérum

Pour examiner d'avantage la capacité de transport de gènes du nouveau CPF **Dim2**, des études de transfection ont été réalisées dans un milieu enrichi en sérum, afin d'étudier la stabilité du complexe dans un milieu qui se rapproche des fluides biologiques en vue de potentielles futures études *in vivo*. En effet, des études préliminaires sur des séquences d'oligourées proches de celles d'**OL1** ont montré une stabilité des composés à la protéolyse.¹⁰ Ces résultats ont donc conduit à envisager que les CPFs à base d'urées pourraient être stables en milieu enrichi en sérum. Des tests de transfection ont donc été faits dans un milieu cellulaire contenant jusqu'à 50% de sérum fœtal bovin. Cette nouvelle étude a elle aussi été effectuée sur les trois lignées cellulaires mentionnées plus haut. Les agents de transfection DOTAP, b-PEI, LAH4 et **Dim1** ont eux aussi été inclus dans cette étude (Figure II.12.a et II.12.b). Lorsque 25% de sérum a été introduit dans le milieu cellulaire pour la transfection de cellules MRC5-V2, aucune perte d'activité n'a été observée pour le CPF **Dim2** et celui-ci a révélé une activité comparable aux agents de transfection commerciaux

DOTAP et b-PEI. En revanche, une chute d'activité d'un facteur 1000 a été observée pour le CPP **LAH4** (Figure II.12.a). La même tendance a pu être observée sur la lignée cellulaire MDA-MB-231 (Figure II.12.b). Alors que le composé **Dim2** ne présente aucune modification de son activité de transfection en présence ou en absence de sérum, ce n'est pas le cas du CPF **Dim1** qui montre une activité environ 700 fois plus basse en présence de 50% de sérum (Figure II.12.b). Il est aussi intéressant de noter que contrairement au DOTAP et au b-PEI pour lesquels le ratio vecteur/ADN doit être augmenté pour compenser l'effet du sérum, dans le cas du dimère **Dim2** le même niveau d'expression de la luciférase est conservé en présence ou en absence de sérum (Figure PE.26).

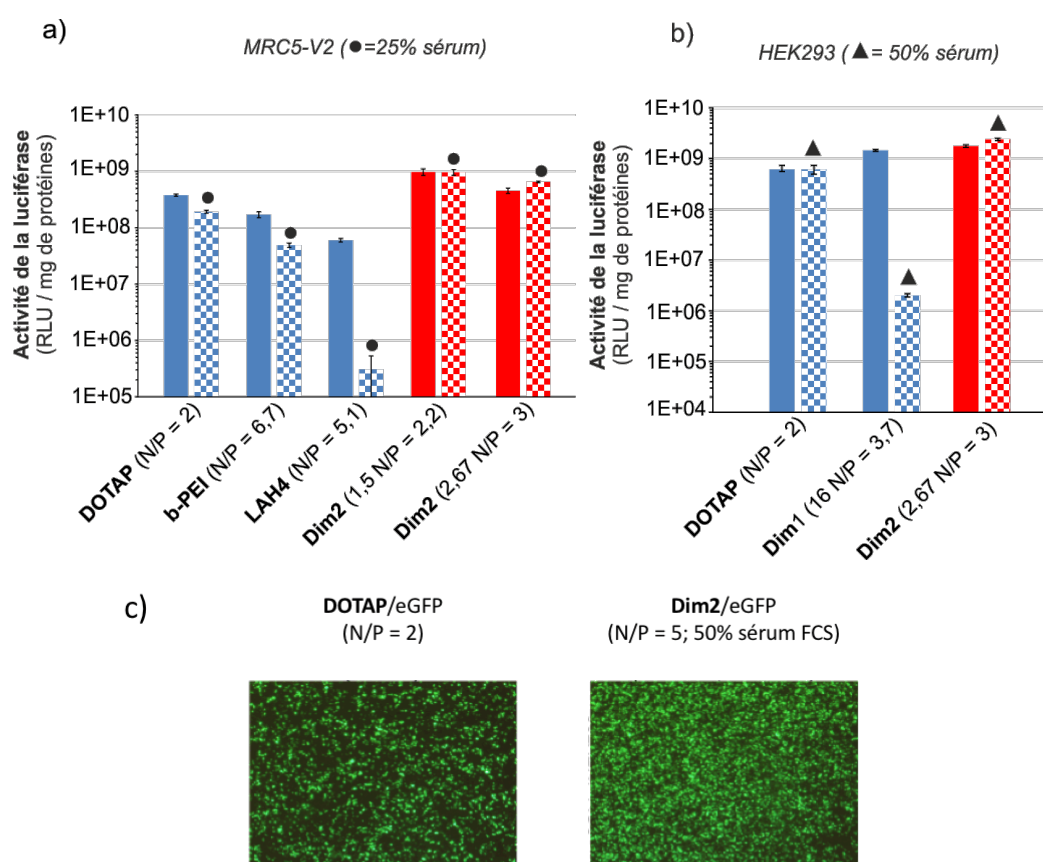


Figure II.12 : Comparaison de l'efficacité de transfection en milieu enrichi en sérum de **Dim2**. Les masses (μ g) des composés utilisés dans ce test et les ratios de charges vecteur/ADN (N/P) sont indiqués entre parenthèses. (a) Transfection de cellules MRC5-V2 avec (●) ou sans 25 % de sérum ; (b) transfection de cellules MBDA-MB-231 en absence ou présence de 50% de sérum (▲). L'ensemble des conditions testées sont décrites dans la partie expérimentale (Figure PE.26). c) expression de la GFP (protéine fluorescente verte) 48h après transfection du gène correspondant sur des cellules HEK293 sans sérum avec le DOTAP comme agent de transport (photo de gauche) ou avec 50% de sérum et **Dim2** comme agent de transport (photo de droite).

Enfin, pour compléter cette étude et la rendre plus visuelle, un autre plasmide a été inclus dans l'étude. Des cellules HEK293 ont été analysées par microscopie fluorescente

après transfection du gène exprimant la GFP (« *Green Fluorescent Protein* ») par le CPF **Dim2** dans un milieu cellulaire contenant 50% de sérum. Ces images ont été comparées à celles obtenues après transfection de ce gène par le DOTAP en absence de sérum (Figure II.12.c). En comparant les deux images, on peut noter que le nombre de cellules exprimant la GFP 24h après transfection est supérieur en présence de **Dim2** que de DOTAP.

v) Tests de cytotoxicité

La toxicité des complexes **Dim2**/p-Luc a été évaluée sur des cellules MDA-MB-231 à partir de trois tests *in vitro* dont les protocoles sont décrits ci-dessous. Tout d'abord, la viabilité cellulaire a été mesurée en utilisant un test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) ce qui permet de mesurer la viabilité cellulaire. Le MTT est un sel jaune dont la coloration passe au violet lorsque le MTT est réduit en 5-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-1,3-diphénylformazan par des réductases seulement présentes dans les cellules vivantes. Le dosage UV du formazan formé permet donc de mesurer la viabilité cellulaire. Appliqué dans le contexte de notre étude, le test MTT a permis de confirmer que **Dim2** n'a pas d'impact négatif sur la viabilité et la croissance cellulaire (Figure II.13.a). Parallèlement, l'intégrité membranaire a été évaluée en mesurant la quantité de lactate déhydrogénase (LDH) présente dans le milieu extracellulaire. Cette enzyme se localise dans le milieu intracellulaire, son dosage dans le milieu extracellulaire est un marqueur de l'altération de la membrane plasmique.³² Les résultats révèlent que le b-PEI et le DOTAP perturbent l'intégrité de la membrane car on mesure environ 1,5 à 2 fois plus de LDH extracellulaire en présence de ces agents de transfection qu'avec le contrôle (cellules seules). En revanche, en présence de **Dim2** les cellules ne présentent pas d'altération de leur membrane car le dosage n'a pas révélé de quantité importante de LDH (Figure II.13.b). Enfin, le dernier test a consisté à déterminer la quantité totale de protéines après transfection des cellules par les différents vecteurs.²⁷ Ici encore, le b-PEI et le DOTAP présentent une diminution de la quantité totale de protéines par rapport au contrôle alors que **Dim2** n'affiche aucune toxicité (Figure II.13.c). Ces trois tests permettent de conclure que le CPF **Dim2** ne montre aucune toxicité apparente pour les cellules.

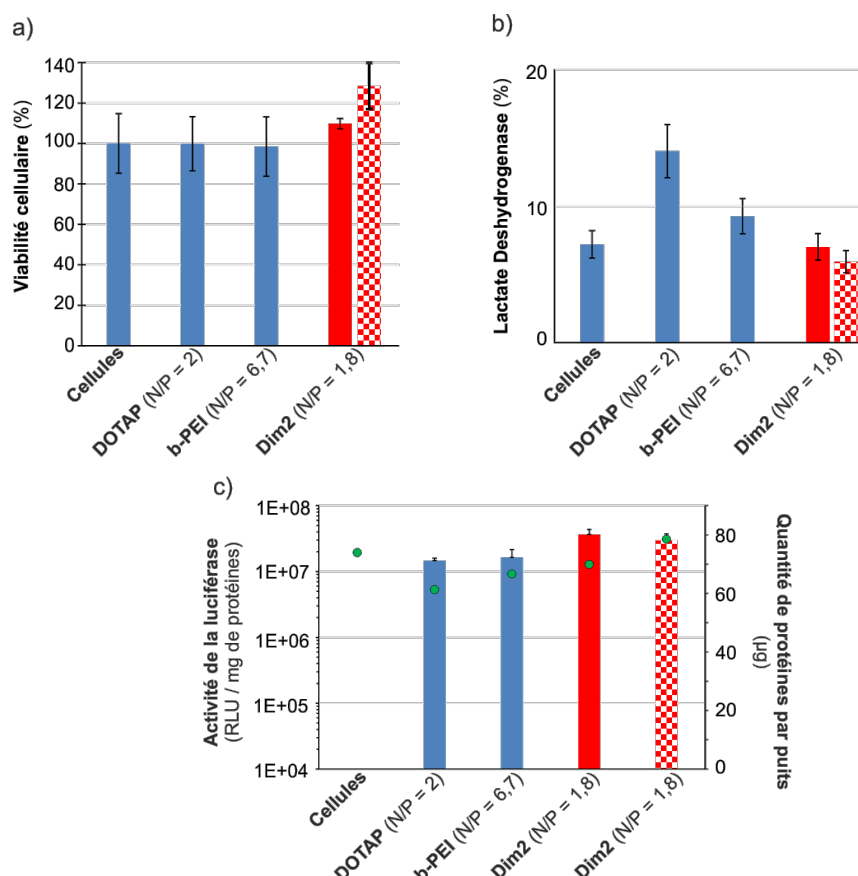


Figure II.13 : Comparaison des différentes méthodes de mesure de la toxicité cellulaire. Différents agents de transfection ont été complexés à une quantité constante de pADN (2,25 μ g par triplicat) et les complexes ont été incubés pendant 2h40 avec des cellules MDA-MB-231 en absence ou en présence de 50% de sérum (barre à damier). Les masses (μ g) des composés utilisés dans ce test et les ratios de charges vecteur/ADN (N/P) sont indiqués entre parenthèses. (a) Test MTT, (b) Mesure du taux de lactate deshydrogenase et (c) dosage de la quantité totale de protéines où la quantité de protéines est exprimée en μ g par puits (axe y à droite).

2) Conception de nouvelles séquences CPF à base d'urée pour le transport de siARN

a) L'ARN interférence comme outil thérapeutique

Comme évoqué dans le chapitre 1, la thérapie génique, qui consiste à prévenir ou soigner une maladie en introduisant du matériel génétique dans les cellules a connu un fort gain d'intérêt ces vingt dernières années. L'emploi d'ADN ou d'ARN comme agent thérapeutique permet d'introduire un gène sain capable de suppléer à un gène altéré. Une nouvelle approche s'est aussi développée et consiste à utiliser le mécanisme naturel d'inhibition post-transcriptionnelle : l'ARN interférence (ARNi), plutôt que des stratégies antigènes ou antisens.³³ L'ARNi est un mécanisme naturel impliquant de petits ARNs doubles brins (siARN, *small-interfering* ARN) dont l'un des brins est complémentaire d'un ARN messenger (ARNm) cible. La thérapie siARN consiste à utiliser des siARNs synthétiques

constitués de 19 à 23 paires de base conçus pour cibler de façon spécifique un ARNm et donc inhiber l'expression d'un gène cible. Une fois introduit dans la cellule, les deux brins seront séparés par une enzyme présente dans le cytosol (enzyme Dicer) puis le brin dit passager sera éliminé et le brin fonctionnel sera reconnu et chargé par le complexe RISC (« *RNA Induced Silencing Complex* »). Le complexe ainsi chargé va pouvoir cribler les ARNm jusqu'à reconnaître l'ARNm cible. Celui-ci sera ensuite dégradé, empêchant ainsi l'expression de la protéine et donc l'expression du gène cible³⁴ (Figure II.14).

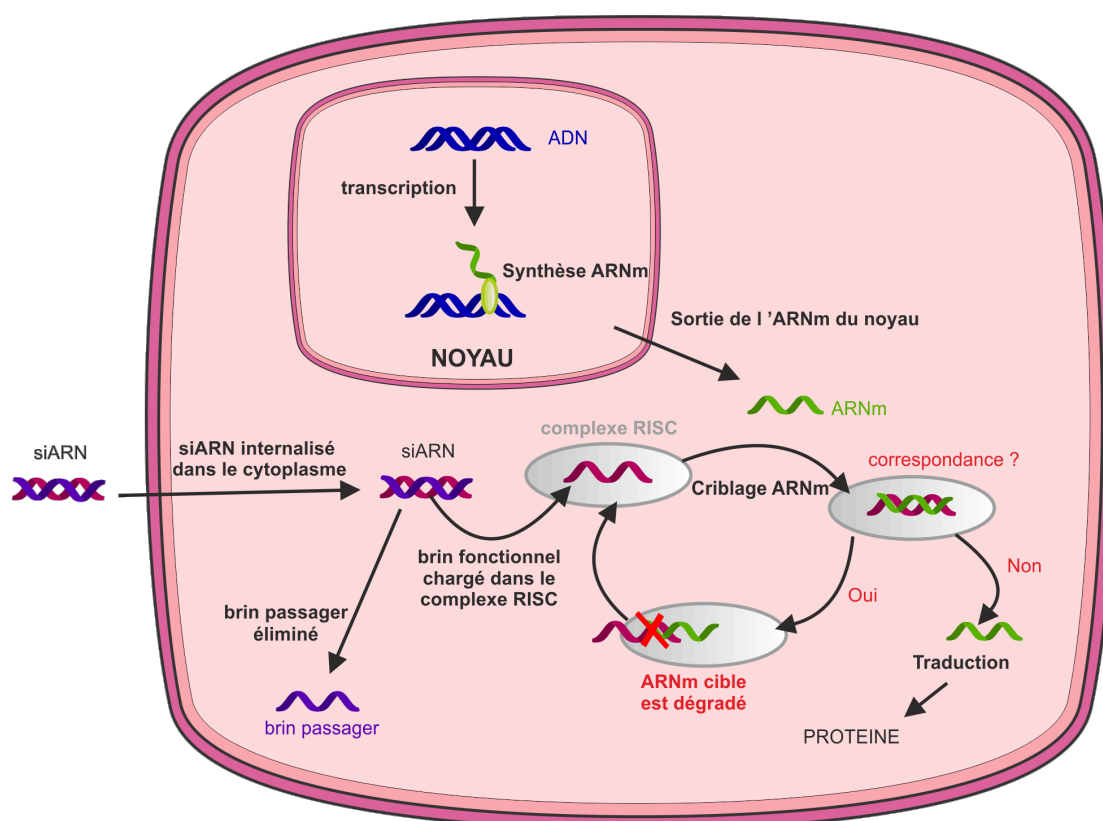


Figure II.14 : Schéma de principe de l'ARN interférence.

L'utilisation de cette nouvelle technologie s'est montrée très attractive pour traiter de nombreuses maladies génétiques.^{2,34,35} Cependant, comme l'ADN ou l'ARN, les siARNs ne sont pas capables de pénétrer les cellules spontanément, il est donc nécessaire d'avoir recours à des agents de transfection pour les transporter.

Différents vecteurs cationiques ont ainsi été décrits dans la littérature pour acheminer les siARNs. On peut citer notamment, les polymères cationiques comme les PEIs,³⁶ les dendrimères décrits par L.Peng *et al.*³⁷ ou certains CPPs.³⁸⁻⁴⁰

Grâce aux résultats encourageants obtenus dans l'équipe concernant le transport d'ADN dans les cellules par des CPFs à base d'urées, nous avons envisagé qu'il serait peut-

être aussi possible d'acheminer des siARNs dans les cellules grâce aux CPFs à base d'urées. De façon surprenante, ni **Dim1** ni ses dérivés **OL1**, **OL1_{inv}** ou **Dim1_{inv}** n'ont démontré d'activité de transport de siARNs malgré leur efficacité comme transporteur de gènes. L'hétérodimère **Dim2** ne permet pas non plus d'acheminer des siARNs dans les cellules. Par conséquent, de nouveaux designs ont dû être envisagés pour préparer des CPFs capables de transporter des siARNs. Différentes stratégies ont donc été testées et seront décrites dans cette partie.

b) Séquences foldamères à base d'urée ciblant les siARN

A première vue, les siARNs doubles brins et les ADNs doubles brins possèdent des points communs : ils sont constitués de deux brins d'acides nucléiques et possèdent tous des squelettes phosphodiester anioniques avec le même ratio de charges négatives par acide nucléique. Néanmoins, dans un contexte de transfection, leurs différences peuvent expliquer pourquoi certains agents de transport parviennent à acheminer de l'ADN et sont inefficaces pour le transport de siARN.

Les plasmides d'ADN (pADN) utilisés en thérapie génique sont généralement long de plusieurs milliers de paires de bases alors qu'un siARN n'est constitué que de 19 à 23 paires de base. La taille des plasmides leur permet généralement de pouvoir se compacter en de petites particules de taille nanométrique lorsqu'ils sont complexés par un vecteur cationique. Cette condensation de l'ADN assure la stabilité du complexe et la protection de l'ADN face à la dégradation enzymatique. *A contrario* la longueur de persistance d'un siARN (*i.e* la longueur minimale à laquelle l'ARN se comporte comme une tige rigide) est de 70 nm (équivalent à environ 260 paires de base). Ainsi un ARN de taille inférieure, tel qu'un siARN qui ne contient pas plus de 23 paires de base, se comporte comme une tige rigide et ne peut donc pas se compacter comme un plasmide d'ADN lorsqu'il est complexé par un vecteur. Cette caractéristique fait du siARN une molécule bien plus rigide qu'un pADN. Il a été suggéré que cette différence de rigidité se traduit par une plus grande difficulté à former des complexes vecteur/siARN stables mais aussi par la formation de particules de taille plus grosses et donc plus difficiles à internaliser dans les cellules. En effet, il est généralement admis qu'au-delà de 150 nm, les particules ne peuvent s'internaliser par des mécanismes d'endocytose.^{41,42} Ces raisons expliquent certainement pourquoi un bon agent de transport d'ADN n'est pas nécessairement capable d'acheminer des siARNs dans les cellules.

Afin de diversifier la composition de nos CPFs à base d'urées et ainsi identifier des séquences capables d'acheminer des siARNs, deux séquences d'oligourées ont été

synthétisées. La composition de la séquence de l'oligourée **OL1_{inv}** a été conservée mais la fonction isopropyl *N*-terminale a été modifiée.

En 2012, G. Creusat *et al.* ont décrit que l'introduction de motifs pyridylthiourée sur les amines primaires de vecteurs de type PEI améliore de façon significative la stabilité du complexe vecteur/siARN. L'hydrophobicité particulière apportée par le motif pyridylthiourée confère alors au PEI une haute capacité de transport de siARN *in vitro* avec une faible toxicité.⁴³ De plus, il est aussi possible d'envisager que ce motif pyridylthiourée soit capable de se lier aux phosphates des acides nucléiques. En s'inspirant de ces travaux, le composé **OL5** a été conçu dans lequel un motif pyridylthiourée a été introduit en position *N*-terminale de l'oligourée (Figure II.15). Cette modification pourrait avoir un effet positif sur la formation et la stabilité de l'assemblage entre le CPF et le siARN mais pourrait aussi faciliter la sortie de l'endosome.

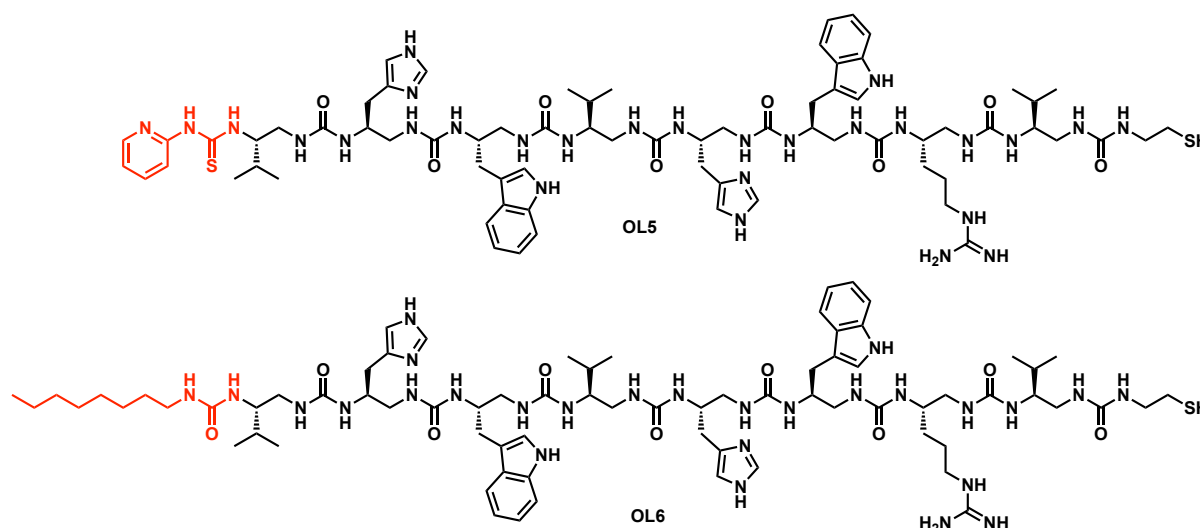


Figure II.15 : Structure chimique des oligourées **OL5** et **OL6**.

Une autre approche consiste à augmenter l'hydrophobicité du CPF. En effet, il a été décrit dans la littérature qu'augmenter l'hydrophobicité d'un CPP peut, en plus de diminuer sa toxicité, augmenter l'accumulation du vecteur à la surface de la membrane cellulaire et par voie de conséquence améliorer sa pénétration, mais cela peut aussi favoriser la sortie de l'endosome.⁴⁴ Par exemple, S. Reinhart *et al.* ont couplé une chaîne acide oléique en *N*-terminale d'un CPP et ont montré que cette longue chaîne hydrophobe permettait la formation de complexes stables CPP/siARN capables de s'internaliser dans différentes lignées cellulaires (N2A et DU145).³⁸ Il a donc été envisagé d'effectuer le même type de modification sur le CPF **OL1_{inv}**. Une chaîne octyle a ainsi été couplée en *N*-terminale *via* un lien urée pour former l'oligourée **OL6** (Figure II.15).

La préparation de l'oligourée **OL5** a été réalisée par synthèse sur support solide en suivant la méthodologie décrite précédemment (Figure II.4) puis le 2-pyridyl-isothiocyanate a été couplé en position N-terminale sous irradiation micro-ondes. Un rendement de 14% a été obtenu après purification par RP-HPLC préparative. L'oligourée **OL6** a été préparée en suivant la même stratégie. Cette fois-ci le composé 1-octyl-isocyanate a été couplé en N-terminal sous irradiation micro-ondes. Le composé **OL6** a pu être isolé avec un rendement de 6% après purification par RP-HPLC préparative. Ce faible rendement s'explique par un couplage incomplet de l'octyl urée terminale (~50% de rendement de couplage). Les chromatogrammes RP-HPLC des bruts de synthèse des composés **OL5** et **OL6** sont présentés Figure II.16.

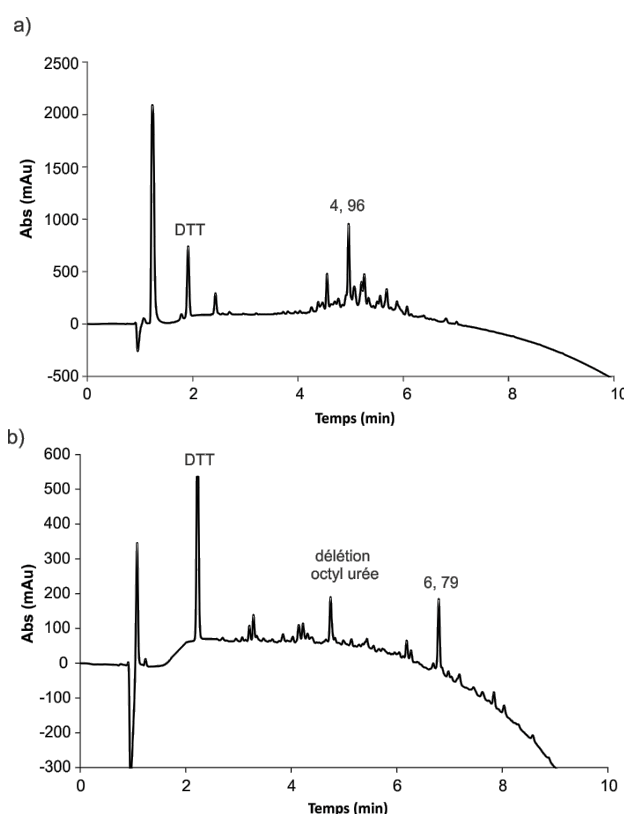


Figure II.16: Chromatogramme HPLC des bruts de synthèse des composés (a) **OL5** et (b) **OL6** : (10-100% CH₃CN (+0,1% TFA) dans H₂O (+0,1% TFA) en 10 min, λ = 200nm).

c) Transport *in vitro* d'un siARN ciblant l'expression de la luciférase

i) Etude de la capacité de transport de siARN des oligourées **OL5** et **OL6**

Une première série de tests biologiques a été réalisée afin de connaître la capacité des oligourées **OL5** et **OL6** à acheminer un siARN. Ces expériences ont été faites sur une lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome du poumon exprimant le gène de la luciférase

(A549-luc). Le gène de la luciférase une fois isolé est introduit dans un plasmide qui est employé pour transformer la lignée cellulaire de façon stable et lui conférer le gène de la luciférase. Les expériences de transfection ont été réalisées en suivant le même protocole que celui décrit précédemment pour la transfection de pADN mais cette fois-ci, les tests ont été faits en duplicats. Deux siARNs différents ont été utilisés : un siARN capable de s'apparier parfaitement à l'ARNm codant pour l'expression de la luciférase (siLuc) et un siARN contrôle (siCTRL) non spécifique et donc n'inhibant pas l'expression de la luciférase. Le siCTRL est donc un contrôle négatif qui ne cible aucun ARNm. Il permet de s'assurer de la spécificité de l'extinction de la luciférase par siLuc mais est aussi un moyen de mesurer la toxicité du vecteur. En effet, lors des expériences de transfections, la viabilité cellulaire est déterminée par dosage des protéines cellulaires. L'activité de la luciférase est alors normalisée par la quantité en mg de protéines cellulaires. Une chute de l'activité de la luciférase avec le siCTRL est donc un marqueur de la toxicité du vecteur. Pour chaque complexe, le ratio N/P, sera cette fois-ci calculé de la manière suivante :

$$\frac{N}{P} = \frac{n(\text{vecteur}) (\text{mol}) * \text{nombre de charges positives du vecteur}}{n(\text{siARN})(\text{mol}) * 42}$$

42 étant le nombre de phosphates présents dans le siARN utilisé (siLuc).

En contrôle positif, des agents de transfection de type CPP ont été utilisés, il s'agit du VPr-pro et du VPr55-82.^{45,46} L'activité de la luciférase est exprimée en pourcentage en considérant que l'activité des cellules non transfectées est égale à 100%. L'inhibition de l'expression de la luciférase correspond donc à la différence entre l'activité obtenue après internalisation du siLuc et l'activité des cellules non transfectées.

Ces premiers résultats soulignent qu' **OL5** montre des propriétés de transport de siLuc dans la lignée A549-luc avec une inhibition du gène de 65% pour un ratio N/P égal à 12,3. A cette concentration en **OL5**, l'expression de la luciférase avec le siCTRL reste supérieure à 80% ce qui signifie que l'inhibition du gène est spécifique et le vecteur est peu toxique. L'oligourée **OL6** présente lui aussi des propriétés de transport de siLuc avec une inhibition de 95% avec un ratio N/P inférieur à celui d'**OL5** (N/P = 6,1). Cependant, l'activité de la luciférase avec le siCTRL est de 63%, ce qui témoigne d'une toxicité intrinsèque du vecteur (Figure II.17).

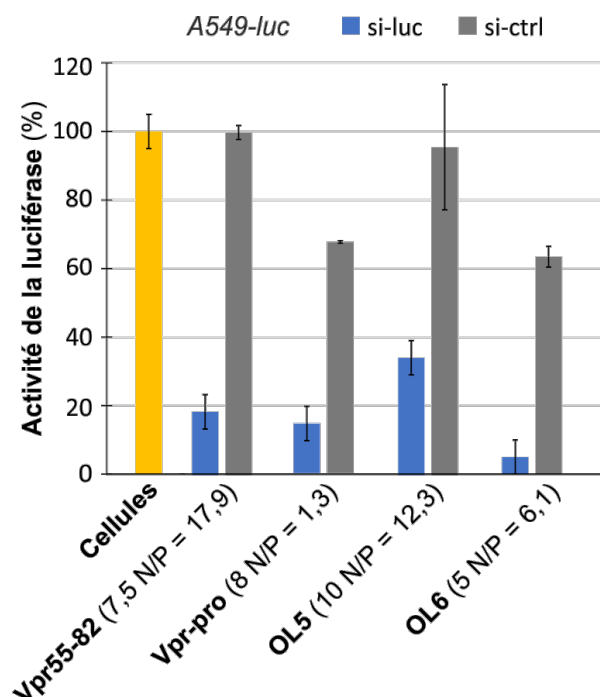


Figure II.17 : Transfection de siLuc/siCTRL par différents vecteurs peptides (Vpr-Pro et Vpr55-82) ou CPF (**OL5** et **OL6**) à une quantité fixe en siARN (50 nM) et des quantités croissantes en vecteurs, pour différents ratios N/P. L'expression de la luciférase est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité des cellules non transfectées, les résultats présentés correspondent aux moyennes des duplicats. Ici, seules sont reportées les conditions ayant données le meilleur résultat. Les masses (μg) des composés utilisés dans ce test et les ratios de charges vecteur/siARN (N/P) sont indiqués entre parenthèses. L'ensemble des conditions testées sont décrites dans la partie expérimentale (Figure PE.27).

Des résultats plus prometteurs ont pu être obtenus en ajoutant à la formulation du complexe du 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), un lipide fusogénique qui est connu comme étant un additif permettant d'augmenter l'efficacité de transfection des complexes vecteur/acide nucléique.⁴⁷ Ce lipide avait déjà été utilisé lors de la première étude de CPFs à base d'urées décrite en 2015.¹ Cet effet a été attribué à la capacité du DOPE à déstabiliser la membrane endosomale par fusion. Cette capacité de la DOPE tient à sa géométrie : sa tête polaire ayant une aire inférieure à celle de ses chaînes alkyles, elle a une géométrie conique qui modifie le rayon de courbure des membranes où elle est insérée. Les membranes endosomales adoptent alors une phase non lamellaire qui leur permettent de fusionner ce qui aboutit à la formation d'un pore et donc à la déstabilisation de la membrane endosomale permettant la libération du complexe vecteur/acide nucléique.^{48–51}

Une deuxième série d'expérience a donc été effectuée afin d'étudier l'effet de l'ajout de DOPE dans la formulation. Au cours de cette expérience, un nouveau criblage de concentration a aussi été fait sur les composés **OL5** et **OL6** afin d'optimiser la dose employée (Figure II.18 et PE.28). Le DOPE seul a été utilisé ici comme contrôle et témoigne de

l'inactivité du lipide seul (activité de la luciférase à 90% avec le DOPE seul). Ainsi, la quantité d'**OL6** permettant d'atteindre une extinction de la luciférase a pu être réduite à 2,5 µg ce qui correspond à un ratio de N/P égal à 3. A cette concentration, l'activité de la luciférase après transfection du siCTRL est désormais supérieure à 80% alors qu'elle était de 63% à plus haute dose (5 µg). Il est donc possible de réduire la toxicité d'**OL6** tout en conservant une activité de transport de siARN satisfaisante.

Il est cependant intéressant de constater que l'ajout de DOPE (2,5 µg) améliore significativement l'activité de l'oligourée **OL5** avec une inhibition de l'activité de la luciférase de 92% de façon spécifique et sans toxicité comme en témoigne la valeur de l'activité après transfection du siCTRL (91% d'expression de la luciférase). En revanche, on n'observe pas d'impact de l'ajout de DOPE sur l'activité d'**OL6**, la formulation **OL6** + DOPE est même plus toxique que la formulation sans DOPE comme en témoigne la chute d'activité après transfection du siCTRL (activité de la luciférase inférieure à 30%).

Dans l'étude de la première génération de CPF oligourée réalisée en 2015, il avait été montré que la dimérisation d'**OL1** *via* la formation d'un pont disulfure améliorait l'efficacité de transfection du vecteur. L'oligourée **OL5** a donc été dimérisée en suivant la méthodologie utilisée pour synthétiser **Dim1** décrite précédemment (Figure II.7) et a permis de préparer le composé **Dim5**. L'homodimère **Dim5** a donc été testé en absence ou en présence de DOPE. Contrairement aux résultats obtenus en transport de gènes, cette fois-ci, la dimérisation de l'oligourée n'impacte pas l'efficacité de transfection (pour rappel, en transport de gène, la dimérisation avait permis d'obtenir de bons niveaux de transfection sans ajout de DOPE à la formule).¹ **Dim5** possède une efficacité de transport similaire à celle d'**OL5** avec une inhibition de la luciférase de 72% en absence de DOPE et de 90% en présence de DOPE. On peut tout de même noter qu'avec **Dim5** le ratio N/P du complexe est divisé par deux pour obtenir le même niveau d'inhibition qu'avec **OL5**. En revanche, lorsque l'on remplace le DOPE par un lipide non fusogénique le DOPC, on observe une perte de l'activité de transfection (Figure II.18).

L'ensemble de ces résultats permettent de conclure que les deux nouveaux CPFs **OL5** et **OL6** transportent efficacement le siLuc. **OL5** et son dimère **Dim5** possèdent une activité comparable avec des ratios N/P de 12,3 et 6,1 respectivement. La meilleure formulation retenue pour **OL5** et **Dim5** sera en présence de DOPE alors qu'**OL6** est moins toxique en absence de DOPE et son ratio N/P optimal est de 6,1. Toutefois, on constate que le CPF **OL6** bien qu'efficace en absence de DOPE reste plus toxique qu'**OL5** et son dimère.

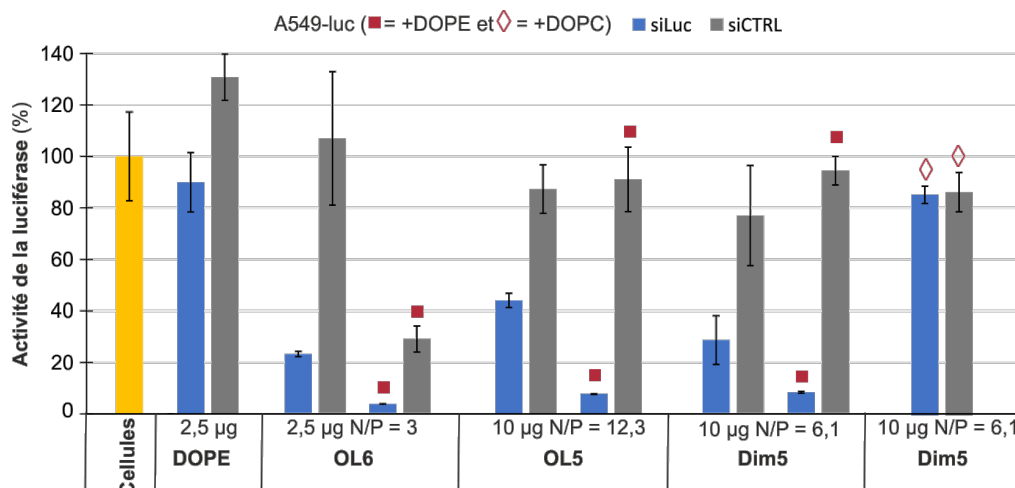


Figure II.18: Transfection de siLuc/siCTRL par différents CPF (**OL5**, **OL6** et **Dim5**) à une quantité fixe en siARN (50 nM) en absence ou en présence (carré rouge) de DOPE (2,5 µg) ou de DOPC (losange rouge, 2,5 µg). L'expression de la luciférase est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité des cellules non transfectées, les résultats présentés correspondent aux moyennes des duplicats. Ici, seul sont reportées les conditions ayant données le meilleur résultat. Les masses (µg) des composés utilisés dans ce test et les ratios de charges vecteur/siARN (N/P) sont indiqués sous les barres. L'ensemble des conditions testées sont décrites dans la partie expérimentale (Figure PE.28).

ii) Transport de siARN en milieu enrichi en sérum

Certains vecteurs voient leur activité chuter dans les milieux biologiques, c'est le cas notamment de beaucoup de CPPs qui sont dégradés par les protéases du sérum. C'est pourquoi les premiers tests de transfection sont habituellement réalisés en absence de sérum. Cependant, si l'on veut pouvoir un jour étendre l'utilisation de nouveaux agents de transport à une étude *in vivo*, ceux-ci doivent être stables dans les fluides biologiques. C'est pour cela que nous avons voulu étudier la capacité des nouveaux CPFs **OL5** et **OL6** à acheminer des siARNs en présence de sérum (Figure II.19.a). De nouveaux tests de transfection ont donc été faits en présence de 10% de sérum. De façon intéressante, l'activité des CPFs **OL5** et **OL6** est conservée en présence de 10% de sérum avec une inhibition du gène de la luciférase de 80% pour la formulation **OL5+DOPE** et une inhibition de 85% pour **OL6**. Pour rappel, nous avons souligné précédemment que l'oligourée **OL6** présente une toxicité intrinsèque, il est remarquable ici de constater que cette toxicité n'apparaît plus en présence de sérum, cette fois-ci l'activité de la luciférase après transfection du siCTRL est de 87% alors qu'elle était de 65% en absence de sérum. De plus, on observe un même comportement d'**OL6** lorsque l'on augmente la dose de sérum à 25% (expression de la luciférase inférieure à 20% et faible toxicité) (Figure II.19.a). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les agents de transfection cationiques peuvent interagir avec les protéines sériques. En absence de sérum, il est donc probable qu'il existe dans le milieu

cellulaire une quantité du vecteur **OL6** non complexée avec le siARN et donc susceptible d'induire une toxicité. En présence de sérum, cette portion « libre » de vecteur interagit avec les protéines sériques ce qui limite sa toxicité. Ces nouvelles expériences de transfection permettent de conclure que l'activité des CPFs **OL5** et **OL6** est stable en milieu enrichi en sérum.

iii) *Évaluation de l'impact de la quantité de siARN*

Nous avons ensuite voulu étudier s'il était possible d'observer une même diminution de l'expression de la luciférase en réduisant la quantité de siARN utilisée à un ratio N/P constant. L'efficacité de transport du composé **OL6** a donc été mesurée à 50 nM et à 20 nM en siARN en présence de 10% de sérum.

On constate qu'à 50 ou à 20 nM en siARN, l'activité du CPF **OL6** est conservée à un ratio N/P constant (Figure II.19.b). Ce résultat est intéressant car en conservant le même ratio N/P, si l'on diminue la concentration en siARN alors on diminue la quantité de vecteur utilisée et donc la toxicité du vecteur est réduite. Ce dernier paramètre permet donc d'optimiser la formulation à base d'**OL6** de façon à obtenir une activité de transport satisfaisante tout en limitant la toxicité du vecteur CPF. A 20 nM en siARN, seul 1,4 µg du CPF **OL6** est suffisant pour atteindre une inhibition de 78% de l'expression de la luciférase (Figure II.19.b).

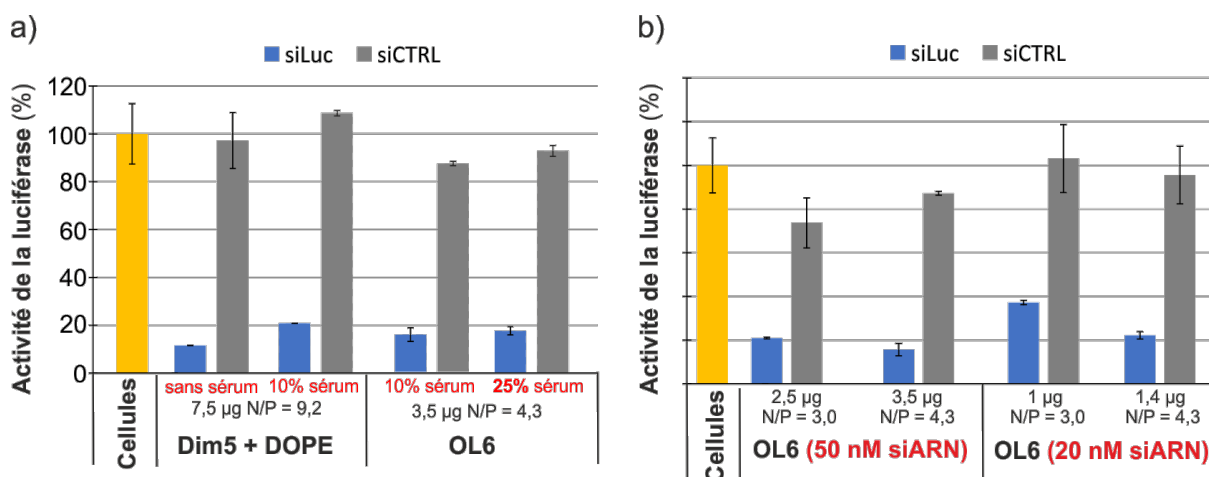


Figure II.19 : (a) Transfection de siLuc/siCTRL en présence des CPF **OL5** et **OL6** pour une concentration donnée de siARN (50 nM) en absence ou présence de 10 ou 25% de sérum bovin. (b) Transfection de siLuc/siCTRL par **OL6** à différentes concentrations en siARN. L'expression de la luciférase est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité des cellules non transfectées, les résultats présentés correspondent aux moyennes des duplicats. Ici, seules sont reportées les conditions ayant données la meilleure extinction d'expression de la luciférase. Les masses (µg) des composés utilisés dans ce test et les ratios de charges vecteur/siARN (N/P) sont indiqués sous les barres. L'ensemble des conditions testées sont décrites dans la partie expérimentale (Figure PE.29).

iv) Transport intracellulaire d'un siARN d'intérêt thérapeutique

Les résultats décrits ci-dessus ont montré que les CPFs **OL5** et **OL6** sont capables de transporter efficacement le siARN ciblant l'expression de la luciférase. Ce siARN est un siARN modèle utilisé généralement en premier lors de tests de transfection de nouveaux vecteurs car l'activité de la luciférase est une donnée facilement mesurable. Afin d'étendre l'étude de nos nouveaux CPF à des cibles biologiques plus pertinentes, nous avons réalisé des expériences de transport d'un siARN d'intérêt thérapeutique, c'est à dire un siARN ciblant un gène impliqué dans une pathologie.

Pour cela, nous avons choisi d'utiliser un siARN ciblant l'expression du gène de la Polo-Like Kinase 1 (Plk1). Il a été décrit que cette protéine est surexprimée dans les cellules cancéreuses.⁵² Des études ont démontré que ce gène était impliqué dans la prolifération cellulaire et que son inhibition induisait l'apoptose.⁵³ Dans le cadre de cette étude, nous avons décidé de transporter un siARN anti-Plk1 (siPlk1) dont la séquence (*c.f* partie expérimentale) a déjà prouvé son efficacité *in vitro* et *in vivo*.^{54,55}

L'efficacité biologique *in vitro* a été évaluée par des tests de cytotoxicité reliant indirectement la mort cellulaire à l'inhibition de l'expression de la protéine Plk-1. La mort cellulaire a été évaluée par un test MTS (*i.e* un test similaire au test MTT impliquant un autre sel de tétrazolium, le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tétrazolium) sur la lignée cellulaire A549-luc utilisée précédemment dans le but de comparer l'activité de transport de nos CPF sur une même lignée cellulaire mais avec deux siARN différents (siLuc et siPlk1). Un siARN contrôle a également été testé (siCTRL). Le protocole de préparation des complexes a été le même que celui utilisé pour le transport de siLuc et la concentration en siARN utilisée a été de 50 nM. Contrairement aux expériences réalisées avec le siLuc, cette fois-ci les tests ont été faits en triplicats et non en duplicats car éteindre un gène endogène comme le PLK1 est nettement plus difficile qu'éteindre un gène rapporteur comme la luciférase. L'activité de transport est déterminée par la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage où la valeur de 100% correspond aux cellules non traitées. Si le siPlk1 a bien été acheminé dans les cellules alors l'inhibition de la protéine induit une mort cellulaire et l'on peut mesurer une diminution du taux de cellules vivantes (Figure II.20).

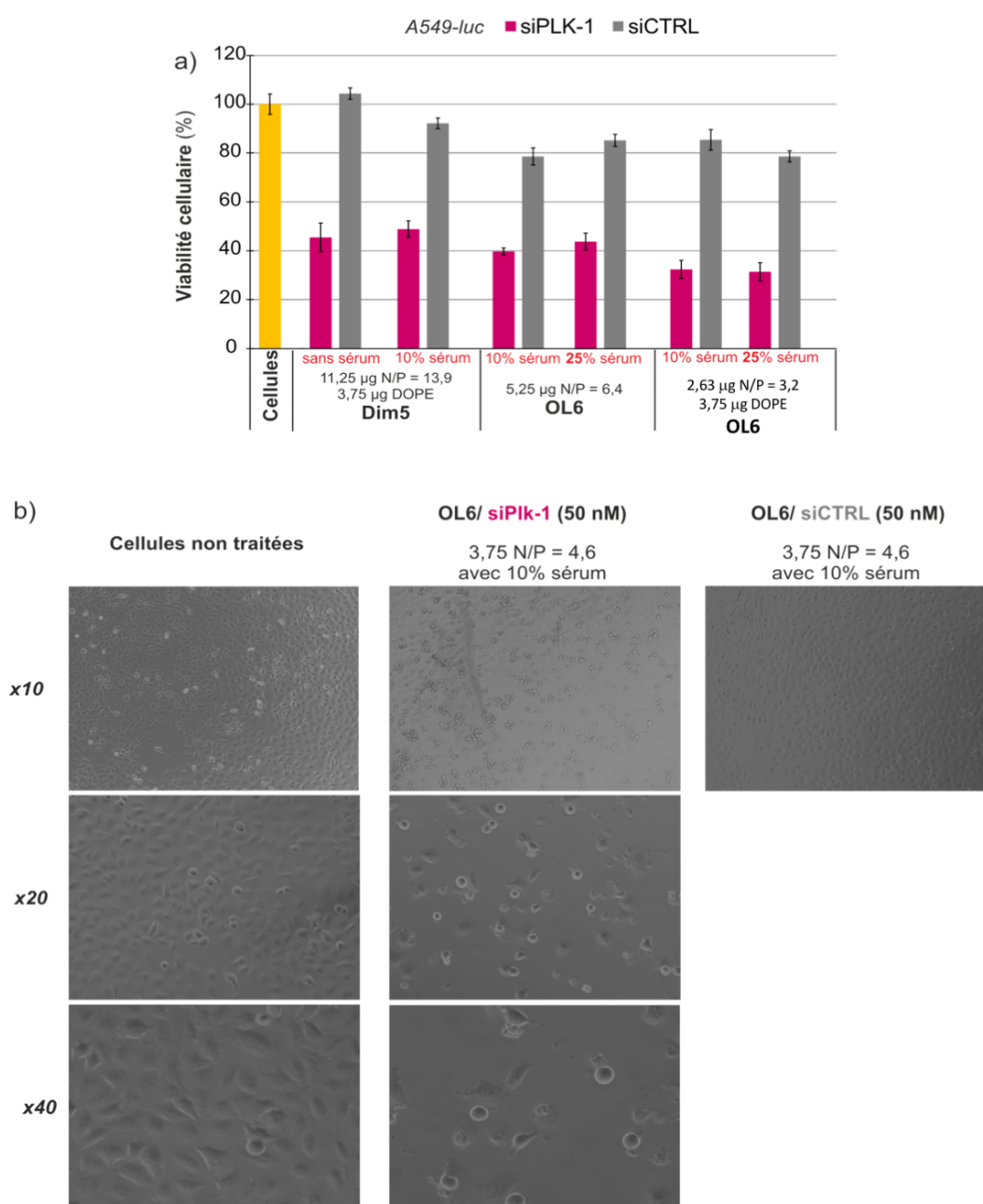


Figure II.20: (a) Transfection de siPlk1/siCTRL par différents vecteurs CPF (**OL5/DOPE** et **OL6**) à une quantité fixe en siARN (50 nM). La viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non transfectées. Les résultats présentés correspondent aux moyennes des triplicats. Ne sont représentées ici que les conditions ayant données les meilleurs résultats. Les masses (µg) des composés utilisés dans ce test et les ratios de charges vecteur/siARN (N/P) sont indiqués entre parenthèses. L'ensemble des conditions testées sont décrites dans la partie expérimentale (Figure PE.30). (b) Images obtenues par microscopie des cellules A549-luc incubées avec les complexes formés avec le siPlk1 et le siCTRL et le vecteur **OL6**. Les cellules A549-luc ont été incubées à 37°C pendant 48h. Observation réalisée sous plusieurs grossissements.

Les résultats soulignent d'une part, que le CPF **Dim5** (11,25 µg) formulé avec du DOPE permet d'atteindre une inhibition de 55% en présence ou non de 10% de sérum avec un ratio N/P de 13,9. Le composé **OL6** permet d'inhiber la protéine à hauteur de 60% en présence de 10% de sérum mais inhibe l'activité de Plk1 de 68% lorsqu'il est formulé avec du

DOPE, toujours en présence de 10% de sérum avec un ratio N/P de 6,4. D'autre part, on remarque qu'en utilisant l'oligourée **OL6** une baisse de la viabilité cellulaire est visible pour le siCTRL témoignant de la toxicité intrinsèque du vecteur **OL6** (Figure II.20.a).

Ces résultats sont très encourageants car des taux d'inhibition similaires ont été récemment décrits dans la littérature en utilisant des vecteurs cationiques micellaires de polydiacetylenique (inhibition de 50% à une concentration en siARN de 100nM).⁵⁵ Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'en augmentant la concentration en siARN, on pouvait atteindre un meilleur taux d'inhibition. A une concentration de 200 nM, une inhibition de près de 60% a pu être observée.⁵⁵ Dans notre étude, les CPFs utilisés permettent une inhibition de 50% à une plus faible concentration en siARN (50 nM).

Parallèlement, les effets de l'inhibition de la protéine Plk1 sur la morphologie des cellules A549-luc ont été étudiés. Les images obtenues par microscopie confirment les résultats obtenus en transfection *in vitro*. En effet, en présence de siPlk1, le nombre de cellules diminue de façon significative et la morphologie des cellules est modifiée (cellules arrondies), indiquant une mort cellulaire importante, résultat de l'inhibition de l'expression de Plk1 (Figure II.20.b). A l'inverse, en présence du siCTRL la densité cellulaire reste importante ce qui corrobore les résultats de viabilité cellulaire obtenus en transfection.

En conclusion, ces résultats ont permis de démontrer l'efficacité de nos vecteurs CPF à transporter un siARN inhibant un gène endogène induisant l'inhibition de l'expression de la protéine Plk1 et la mort cellulaire.

3) Utilisation de CPF à base d'urées pour le transport intracellulaire de protéines

a) Les protéines comme outil thérapeutique

De par l'importance de leurs fonctions, des maladies peuvent apparaître si une protéine contient une mutation ou est présente à une concentration anormale (sur ou sous-exprimée).⁵⁶ D'un point de vue médical, les protéines sont de formidables outils thérapeutiques et sont aujourd'hui parmi les classes de médicaments les plus dynamiques. Près de 30% des médicaments approuvés par la FDA entre 2015 et 2018 sont des protéines.⁵⁷ Comparées aux petites molécules, elles présentent de nombreux avantages : une haute spécificité, une faible possibilité d'effets secondaires et une haute tolérance par l'organisme. De plus, dans le cas de maladies dues à l'absence ou la mutation d'un gène,

elles peuvent être un traitement alternatif à la thérapie génique.⁵⁶ La Table II-1 présente des exemples des différentes utilisations thérapeutiques des protéines.

Table II-1 : Exemples de protéines thérapeutiques et leur utilisation⁵⁶

Type de fonction	Exemples de protéines	Application thérapeutique
Activité enzymatique ou de régulation	Insuline	Régulation du taux de glucose chez les personnes diabétiques
	Immunoglobulines	Traitement de l'immunodéficience
	Hormone de stimulation folliculaire (FSH)	Augmentation de l'ovulation pour l'aide à la reproduction
Activité d'inhibition d'une cible moléculaire	Immunoglobulines	Traitement du cancer du sein
	Fuzeon® petite protéine inhibant l'entrée du VIH dans les cellules	Traitement pour les patients malades du SIDA à un stade avancé
Protéines vaccins	Lipoprotéine	Vaccination contre la maladie de Lyme
	HbsAg (antigène du virus de l'hépatite B)	Vaccination contre l'hépatite B
Protéines diagnostiques	GHRH (Hormone libératrice d'hormones de croissance)	Diagnostic de déficience de sécrétion d'hormones de croissance
	mAb spécifique de glycoprotéines tumorales (Anticorps radiomarqué)	Détection du cancer colorectal

Cependant, la plupart des protéines pharmaceutiques actuelles visent des cibles se trouvant à la surface cellulaire ou extracellulaire. Les protéines ne traversent pas spontanément la membrane plasmique en raison de leur taille et/ou de leurs propriétés physico-chimiques. Le développement d'outils capables d'acheminer des protéines

fonctionnelles actives dans les cellules permettrait d'étendre le champ d'applications de ces biomolécules.

Différentes technologies de transport ont été décrites dans la littérature pour acheminer des protéines dans les cellules. Par exemple, Yoshizaki *et al.*, ont décrit un lipide cationique capable de former des liposomes et d'encapsuler la protéine OVA (ovalbumin) utilisées dans le traitement du cancer par immunothérapie. Ces liposomes ont été préparés en incorporant le lipide cationique 3,5-didodecyloxybenzamidine à des liposomes de phosphatidylcholine de jaune d'œuf. Yoshizaki *et al.* ont montré que ce liposome transporte la protéine OVA dans le cytosol mais aussi dans les endosomes et lysosomes.⁵⁸ Des co-polymers amphiphiles peuvent aussi s'assembler en micelles à structure cœur-coquille et encapsuler des protéines dans leur cœur. Lin *et al.* ont ainsi décrit un polymère amphiphile cationique équipé de PEG (Polyéthyléneglycol) de type PEI (Alkyl-PEI2k-PEG2k) capables d'acheminer la protéine TRAIL dans des cellules A-549.⁵⁹ TRAIL est une protéine ciblant un récepteur membranaire, capable d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Or son efficacité est limitée par un faible temps de demi vie et une résistance dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses. Dans cette étude, Lin *et al.* ont montré que leur vecteur permettait d'augmenter la stabilité de la protéine et son efficacité thérapeutique. Chang *et al.* ont eux, utilisé des technologies de type dendrimères (le PAMAM) pour transporter différentes protéines (BSA, p53, saporine, β -galactosidase, R-phycoerythrine) dans le cytoplasme de cellules HELA.⁶⁰

Récemment, le groupe de Y. Cheng a développé un polymère riche en guanidines capables de transporter des protéines natives de tailles et de charges variées dans le cytosol de cellules vivantes tout en maintenant leur activité biologique.⁶¹ Dans le domaine des CPPs, le groupe de C. P. R. Hackenberger a décrit l'utilisation de CPPs cycliques liés de façon covalente à la protéine cargo par un lien clivable (pont disulfure). Ils ont pu délivrer la protéine mCherry, une protéine fluorescente, dans des cellules HELA et montrer sa présence dans différents compartiments cellulaires (membrane, noyau, cytosquelette de l'actine).⁶²

Bien que d'importants progrès aient été réalisés en transport de protéines, différentes contraintes demeurent. Contrairement aux acides nucléiques qui possèdent les mêmes unités répétitives, les protéines diffèrent entre elles par leur poids moléculaire, leur charge globale (positive ou négative), leur hydrophobicité et leur structure secondaire. Ainsi, un agent de transport est souvent efficace pour une famille de protéines donnée et sera totalement inactif sur d'autres cibles biologiques. C'est la raison pour laquelle, un agent de

transport universel est requis et permettrait d'étendre l'utilisation des protéines thérapeutiques.^{63,64}

b) Transport *in vitro* de plusieurs protéines par un dimère d'oligourée

Dans le chapitre 1, il a été rapporté que certains CPPs sont capables d'acheminer des protéines dans les cellules. C'est le cas notamment du peptide Pep-1⁶⁵ qui a été utilisé pour transporter la GFP et la β -galactosidase. D'autres peptides riches en résidus arginines (Penetratin, pTAT, pVEC et Transportan) ont aussi été étudiés pour leur propriété de transport de protéines.⁶⁶

Nous avons donc envisager qu'il serait possible d'utiliser les CPFs à base d'urées pour le transport intracellulaire de protéines *via* la formation de complexe CPF/protéine non covalents. L'homodimère **Dim1_{inv}** a donc été testé *in vitro* pour transporter des protéines de différents poids moléculaires et point isoélectrique (pI). Le pI correspond au pH auquel la charge globale d'une protéine est neutre. Cela signifie donc que plus le pI est élevé plus la protéine est riche en résidus cationiques.

i) Transport d'une enzyme : la luciférase

Comme premier choix de protéine, il nous a paru pertinent de sélectionner la luciférase comme premier modèle. Cette protéine a un poids moléculaire de 62 kDa et un pI égal à 6,3. Une première série d'expérience a été effectuée dans le but d'étudier la capacité de **Dim1_{inv}** à acheminer cette protéine. Ces expériences ont été réalisées sur une lignée cellulaire humaine de cancer du côlon (HCT116). Le peptide LAH4 a été utilisé comme contrôle positif et la luciférase seule (sans vecteur) a été utilisée comme contrôle négatif dans la mise en place de cette série d'expérience. Les complexes vecteur/protéine ont été préparés en solution, en mélangeant une quantité fixée de luciférase (2 μ g) à des quantités croissantes en vecteur dans un tampon phosphate (PBS). Après une faible agitation pour ne pas détériorer la protéine, les complexes ont été laissés à température ambiante pendant 30 min puis du milieu cellulaire additionné d'antibiotiques et dépourvu de sérum a été ajouté aux solutions de complexes. Chaque expérience a été faite en duplicats. Le milieu enrichi en complexe a ensuite été déposé sur les cellules et celles-ci ont été remises en incubation à 37°C pendant 2 à 4h. Le dosage de l'activité de la luciférase a ensuite été réalisé de la même façon que décrit précédemment lors des tests de transfection de pLuc.

Cette première série d'expérience a mis en avant la capacité de **Dim1_{inv}** à transporter l'enzyme luciférase dans les cellules HCT116 avec une activité de la luciférase supérieure à celle obtenue après transport de l'enzyme par le peptide **LAH4** (Figure II.21).

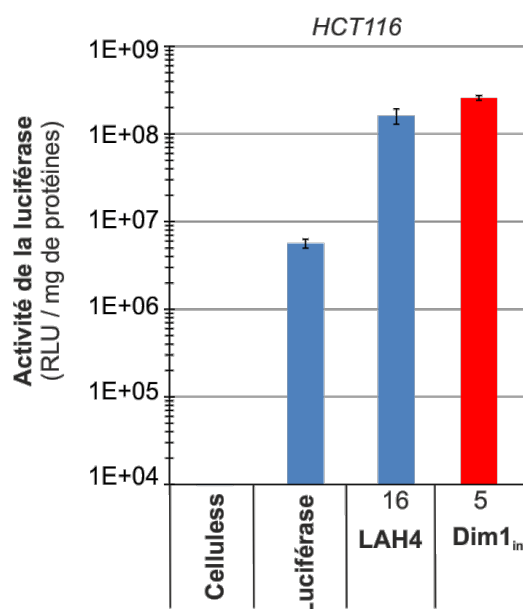


Figure II.21 : Transport de luciférase par le peptide LAH4 ou le CPF **Dim1_{inv}** à une quantité fixe en luciférase (2 µg) et des quantités croissantes en vecteurs. L'expression de la luciférase est exprimée unité de lumière par seconde et par mg de protéines, les résultats présentés correspondent aux moyennes des duplicats. Ici, seule sont reportées les conditions ayant données le meilleur résultat. Les masses (µg) des composés utilisés dans ce test sont indiquées sous les barres. L'ensemble des conditions testées sont décrites dans la partie expérimentale (Figure V.31).

ii) Transport de l'albumine de sérum bovin

Encouragés par ces premiers résultats, de nouvelles expériences ont été réalisées afin de transporter une autre protéine : l'albumine de sérum bovin (BSA). Cette protéine possède un poids moléculaire de 66 kDa et un pI égal à 4,5. L'efficacité de transport à cette fois-ci a été mesurée différemment. En effet, la BSA n'a pas d'activité quantifiable comme c'est le cas pour la luciférase. Une version de la BSA marquée par un fluorophore, la fluorescéine, a donc été utilisée ici (BSA-FITC). L'efficacité de transport a ainsi pu être mesurée grâce à deux techniques différentes : la cytométrie en flux et la microscopie de fluorescence. Il faut noter qu'une mesure simple de la fluorescence n'est pas suffisante car elle ne permettrait pas de distinguer la fraction de protéine qui a réellement été internalisée de celle qui s'est retrouvée piégée dans la membrane cellulaire. Comme nous allons le discuter dans le prochain paragraphe, un extincteur de fluorescence a été utilisé et a permis après une seconde analyse des échantillons de déterminer la fraction de protéine se trouvant dans le milieu intracellulaire. Pour la cytométrie en flux, les cellules sont analysées

vivantes. Après incubation 3-4 heures à 37°C dans du milieu contenant les complexes préformés, les cellules ont été lavées avec du tampon PBS puis elles ont été décrochées avec un mélange volumique (1:1) de Trypsine et de PBS (car les cellules utilisées sont adhérentes). Les cellules ont ensuite été transférées dans des microtubes (en rassemblant les duplicats), placées dans la glace et analysées au cytomètre.

Le bleu de trypan agit comme extincteur de la fluorescéine. Après ajout du bleu de trypan à une concentration de 0,2%, les cellules ont été incubées 15 min dans la glace puis une deuxième mesure au cytomètre a été effectuée. En réalisant ces deux analyses (avec et sans bleu de trypan) il est alors possible de déterminer la fraction de BSA-FITC ayant été internalisée. Au cours de cette expérience, le peptide Vpr55-91 a été utilisé comme contrôle positif.

Les résultats prouvent que **Dim1_{inv}** transporte efficacement la BSA-FITC. En effet, le graphe obtenu à 37°C montre que les cellules sont fluorescentes sans bleu de trypan après transport par le peptide Vpr55-91 mais aussi après transport par le CPF **Dim1_{inv}**. Après traitement au bleu de trypan, on remarque une diminution du signal, le signal résultant ne correspond alors qu'à celui des cellules ayant effectivement internalisée la BSA-FITC. Il est intéressant de constater, que le signal résultant est plus intense avec **Dim1_{inv}** qu'avec le peptide Vpr55-91 (Figure II.22.b). **Dim1_{inv}** semble donc posséder une meilleure activité de transport que le peptide Vpr55-91.

Une autre série de mesure a été faite à 4°C. En réalisant la transfection à 4°C, il est possible de bloquer le processus d'endocytose.⁶⁷ L'expérience précédente a donc été répétée en incubant les cellules à 4°C au lieu de les incubé à 37°C. Les résultats obtenus présentent un signal de fluorescence en absence de bleu de trypan après transfection par Vpr55-91 et par **Dim1_{inv}**. En revanche, après traitement au bleu de trypan, le signal obtenu est le même que celui du contrôle (cellules non transfectées). Cela indique donc que le signal obtenu sans bleu de trypan ne correspond qu'à une absorption de la protéine à la surface des cellules. Les résultats de cette expérience suggère donc que la BSA-FITC est internalisée *via* un mécanisme d'endocytose (Figure II.22.a).

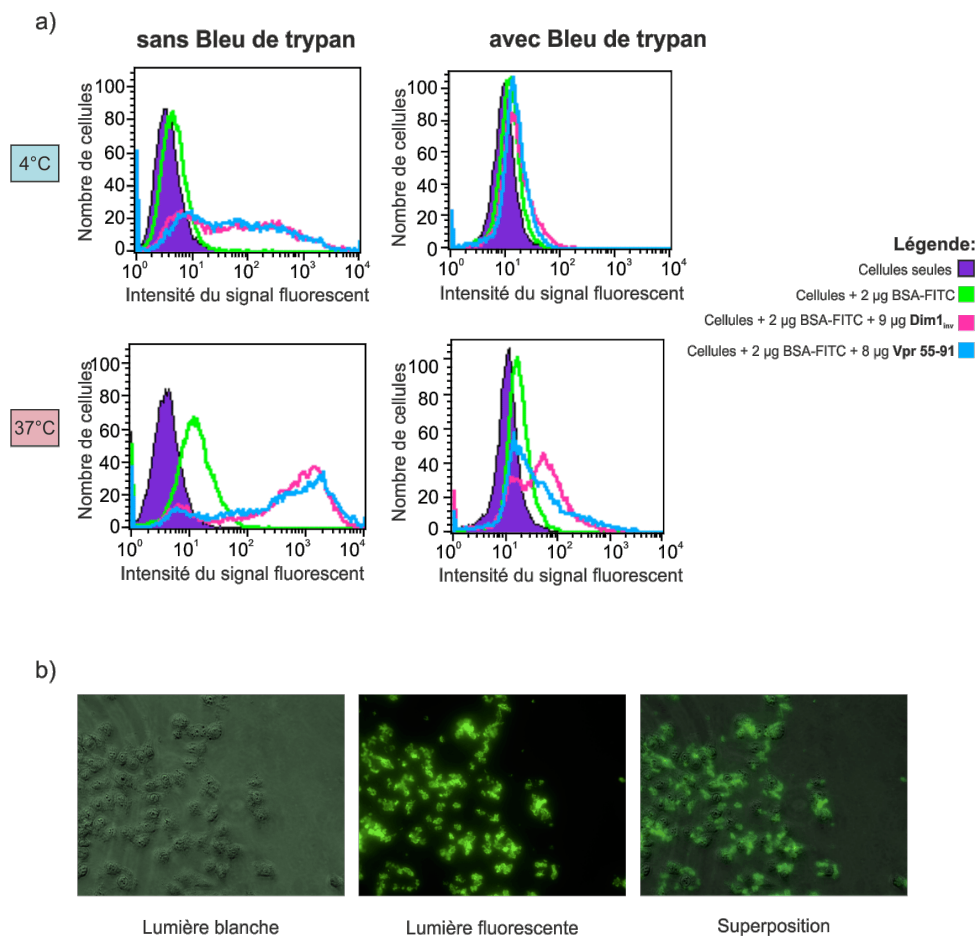


Figure II.22 : (a) Histogramme de cytométrie en flux obtenus après transfection de la BSA-FITC par Vpr55-91 ou le CPF **Dim1_{inv}**. Les expériences ont été réalisées à 4°C ou à 37°C en absence ou en présence de bleu de trypan. (b) Images obtenues par microscopie des cellules HCT116 incubées avec les complexes **Dim1_{inv}**/protéine (x40).

En parallèle, en utilisant les mêmes conditions expérimentales que pour la cytométrie en flux, les cellules ont été observées par microscopie après incubation à 37°C dans du milieu contenant les complexes vecteur/protéine. Les cellules ont été observées en lumière blanche, en lumière fluorescente puis les images ont été superposées afin de préciser la localisation des complexes (Figure II.22.b). Les images montrent bien que les cellules sont fluorescentes, en revanche, comme il ne s'agit pas de microscopie confocale, on ne peut pas distinguer les complexes collés à la surface des cellules de ceux qui sont à l'intérieur des cellules. Ces résultats ne permettent donc que d'illustrer ceux obtenus en cytométrie en flux et devront donc être confirmés par microscopie confocale.

iii) Transport d'une protéine d'intérêt thérapeutique

Les premiers résultats obtenus nous ont permis de démontrer que le CPF **Dim1_{inv}** transporte efficacement deux protéines de poids moléculaire et de pl différents grâce à la formation de complexes non covalents CPF/protéine. Nous avons ensuite choisi d'essayer de

transporter une protéine d'intérêt thérapeutique : la saporine, une protéine de 30 kDa extraite de *Saponaria officinalis*, dont le pI est de 9,5. Cette protéine est un inhibiteur de l'activité ribosomique et est donc un outil intéressant pour le traitement de cancer.⁶⁸ L'activité de transport a été déterminée en mesurant la viabilité cellulaire exprimée en pourcentage où la valeur de 100% correspond aux cellules non traitées. La viabilité a été déterminée à l'aide d'un test MTS. Cette fois-ci les expériences ont été effectuées en triplicats. La saporine seule ainsi que le CPF **Dim1_{inv}** seul ont été utilisés comme contrôles négatifs.

Un premier test de transport de la saporine a été réalisé sur la lignée cellulaire HCT116. Ces premiers résultats soulignent que **Dim1_{inv}** transporte efficacement la saporine et permet d'atteindre une mortalité cellulaire de 73% alors que moins de 20% de cellules sont tuées en présence du vecteur **Dim1_{inv}** ou de la saporine seule (Figure II.23.a).

D'autres expériences ont ensuite été réalisées sur deux autres lignées cellulaires. Une lignée de fibroblastes humains (MRC5-V2) et une lignée cellulaire humaine cancéreuse de glioblastomes (U87). Cette fois encore, l'homodimère **Dim1_{inv}** a montré une bonne efficacité de transport de la protéine saporine. Sur la lignée MRC5-V2, une mortalité cellulaire de 64% a pu être observée et une mortalité de 52% a été mesurée sur la lignée U87 (Figure II.23.b et II.23.c).

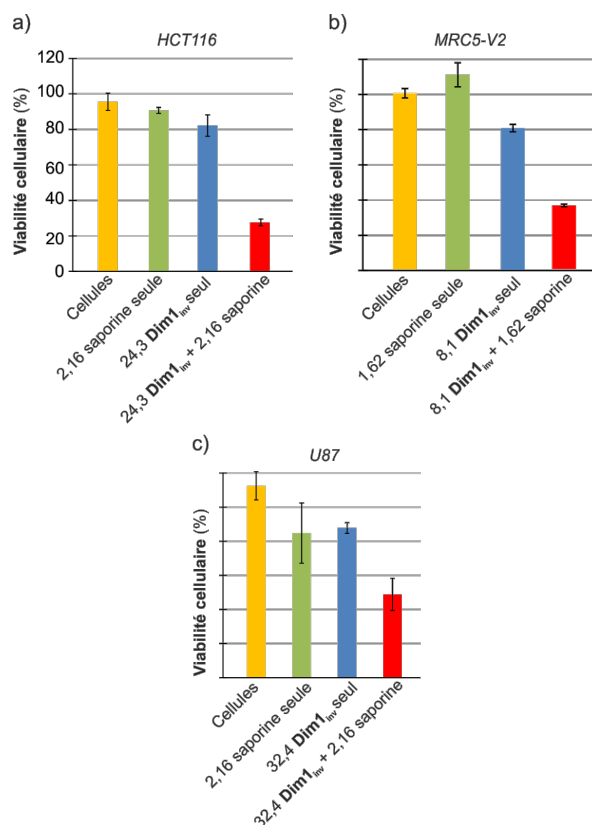


Figure II.23 : Transfection de la protéine saporine par **Dim1_{inv}**. La viabilité cellulaire a été mesurée par un test MTS, les résultats présentés correspondent aux moyennes des triplicats. Ici, seules sont reportées les conditions ayant données le meilleur résultat. L'ensemble des conditions testées sont décrites dans la partie expérimentale (Figure V.32). Les masses (μg) des composés utilisés dans ce test sont indiqués sous les barres. (a) Transfection de cellules HEK293 avec la saporine en présence de **Dim1_{inv}**; (b) transfection de cellules MRC5-V2 en présence de **Dim1_{inv}**; (c) transfection de cellules U87 en présence de **Dim1_{inv}**.

iv) Synthèse du CPF **Dim1_{inv}** marqué par une sonde fluorescente

Dans le but d'étudier le mode de transport de nos CPF à base d'urées et d'avoir des informations sur leur localisation intracellulaire, nous avons envisagé de préparer une version fluorescente de **Dim1_{inv}**. Pour cela le composé que l'on appellera **Dim1_{inv}-FITC** a été synthétisé *via* la formation d'un hétérodimère entre **OL1_{inv}** et **OL7**, un analogue fluorescent d'**OL1_{inv}** (Figure II.24). **OL7** a été préparé en suivant la même procédure que pour la synthèse d'**OL1_{inv}** à l'exception que le couplage de l'isopropylisocyanate terminal a été remplacé par un couplage de la fluoresceinisothiocyanate (FITC) précédé par celui d'un résidu de type glycine urée afin d'espacer le fluorophore de la chaîne oligourée. Le produit obtenu présente deux pics car la fluorescéine est en solution sous la forme de deux isomères (Figure II.24.a). **OL7** a pu être obtenu avec un rendement de 4,5% après purification sur RP-HPLC préparative. Le chromatogramme HPLC du produit pur est représenté Figure II.24.c.

L'hétérodimère **Dim1_{inv}-FITC** a ensuite pu être préparé en suivant la méthodologie de synthèse utilisée pour la préparation de **Dim2** (Figure II.24.b) et a été obtenu avec un

rendement de 37% après purification sur RP-HPLC préparative (Figure II.24.d). Ce composé n'a pas encore été testé *in vitro* et le sera dans les prochains mois.

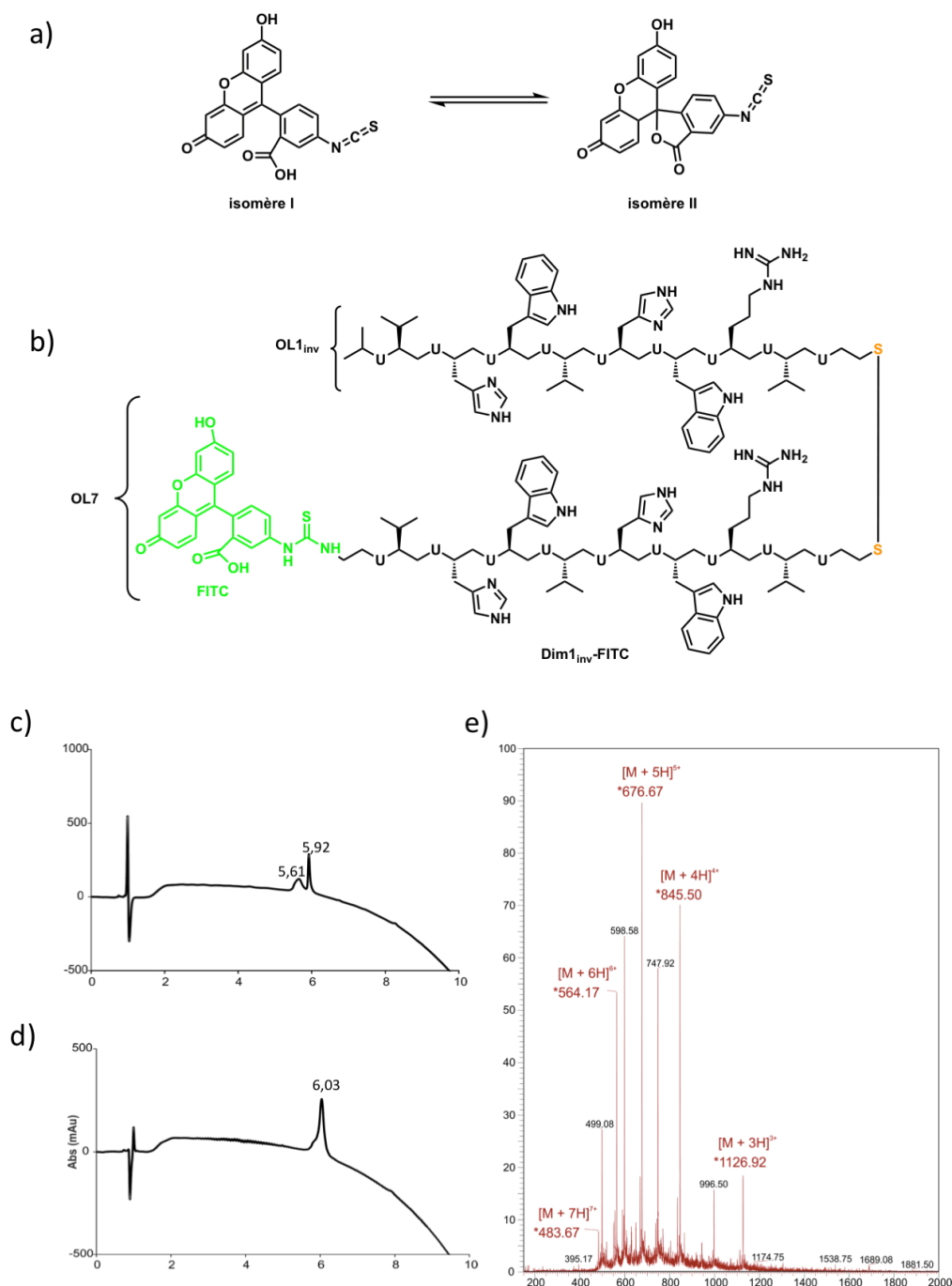


Figure II.24: (a) Structure chimique des isomères de la FITC, (b) structure chimique des oligourées **OL7** et **Dim1_{inv}-FITC**, (c) RP-HPLC chromatogramme d'**OL7** après purification sur RP-HPLC préparative, (d) RP-HPLC chromatogramme de **Dim1_{inv}-FITC** après purification sur RP-HPLC préparative. Conditions HPLC : (10-100% CH₃CN (+0,1% TFA) dans H₂O (+0,1% TFA) en 10 min, λ = 200nm), (e) Spectre de masse du dimère **Dim1_{inv}-FITC**.

4) Conclusion et perspectives

En conclusion, le développement d'une nouvelle résine équipée d'un linker de type cystamine pour la synthèse d'oligourées en stratégie Boc a permis de préparer de nouveau CPFs à base d'urées sans avoir recours à un clivage final à l'HF. Cette nouvelle méthodologie offre un accès facile à des oligourées équipées d'une fonction thiol terminale et permet leur fonctionnalisation en exploitant la réactivité des thiols. Ceci a permis de préparer l'hétérodimère **Dim2** issu du couplage entre la séquence d'**OL1_{inv}** et de **NCL** un ligand de la nucléoline. **Dim2** a témoigné d'une activité de transfection comparable à celle d'agents de transfection commerciaux et concurrentielle de celle des CPPs parmi les plus efficaces. De plus, ce nouveau CPF a présenté une haute stabilité en milieu riche en sérum avec aucune perturbation de son efficacité de transport de gènes contrairement aux CPP contrôles. Les tests réalisés ont aussi montré que **Dim2** ne possède aucune cytotoxicité apparente. L'hybride urée-peptide décrit ici pourrait représenter une alternative pour pallier les limitations des CPPs. Des études futures viseront à étudier si le mécanisme d'internalisation de ce nouveau CPF implique l'internalisation d'une nucléoline de surface et si ce CPF possède une sélectivité cellulaire. Dans ce chapitre, nous avons aussi décrit les tous premiers exemples de CPFs capables d'acheminer des siARNs dans les cellules. Les nouveaux CPFs **OL5** et **OL6** ont tous les deux témoigné d'une activité de transport de siARN dans la lignée cellulaire A549-luc. Deux siARNs différents ont pu être internalisés : le siARN inhibant l'activité de la luciférase (siLuc) et un siARN thérapeutique ciblant l'expression de la Polo like kinase 1 (siPlk1) permettant ainsi d'induire la mort de cellules cancéreuses. De futures tests viseront à mesurer l'efficacité de transfection sur d'autres lignées cellulaires afin de confirmer les résultats obtenus.

Enfin, nous avons aussi révélé dans ce chapitre que l'homodimère **Dim1_{inv}** transporte efficacement des protéines. Des tests de transport ont ainsi été réalisés et ont montré que ce CPF peut transporter trois protéines différentes ayant des poids moléculaires différents (30 à 66 kDa) et des points isoélectriques variés (4,5 à 9,5). Dans le cas du transport de la saporine, une protéine d'intérêt thérapeutique, les tests ont pu être faits sur trois lignées cellulaires différentes (HCT116, U87 et MRC5-V2). De futures expériences viseront à transporter une protéine fluorescente avec l'analogue fluorescent de **Dim1_{inv}** (**Dim1_{inv}-FITC**) afin de pouvoir co-localiser la protéine et le foldamère et ainsi obtenir des informations sur la destination intracellulaire de nos CPFs. Enfin, nous essaierons d'acheminer d'autres protéines telle que la GFP et/ou des anticorps qui ont un intérêt thérapeutique.

Bibliographie

- (1) Douat, C.; Aisenbrey, C.; Antunes, S.; Decossas, M.; Lambert, O.; Bechinger, B.; Kichler, A.; Guichard, G. A Cell-penetrating foldamer with a bio-reducible linkage for intracellular delivery of DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (38), 11133–11137.
- (2) Burnett, J. C.; Rossi, J. J.; Tiemann, K. Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials. *Biotechnol. J.* **2011**, *6* (9), 1130–1146.
- (3) Tatiparti, K.; Sau, S.; Kashaw, S. K.; Iyer, A. K. siRNA delivery strategies: a comprehensive review of recent developments. *Nanomaterials* **2017**, *7* (4), 77.
- (4) Destouches, D.; Khoury, D. E.; Hamma-Kourbali, Y.; Krust, B.; Albanese, P.; Katsoris, P.; Guichard, G.; Briand, J. P.; Courty, J.; Hovanessian, A. G. Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin. *PLOS ONE* **2008**, *3* (6), e2518.
- (5) Destouches, D.; Page, N.; Hamma-Kourbali, Y.; Machi, V.; Chaloin, O.; Frechault, S.; Birmpas, C.; Katsoris, P.; Beyrath, J.; Albanese, P.; et al. A simple approach to cancer therapy afforded by multivalent pseudopeptides that target cell-surface nucleoproteins. *Cancer Res.* **2011**, *71* (9), 3296–3305.
- (6) Wu, J.; Song, C.; Jiang, C.; Shen, X.; Qiao, Q.; Hu, Y. Nucleolin targeting AS1411 modified protein nanoparticle for antitumor drugs delivery. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (10), 3555–3563.
- (7) Christian, S.; Pilch, J.; Akerman, M. E.; Porkka, K.; Laakkonen, P.; Ruoslahti, E. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J. Cell Biol.* **2003**, *163* (4), 871–878.
- (8) Nisole, S.; Krust, B.; Callebaut, C.; Guichard, G.; Muller, S.; Briand, J. P.; Hovanessian, A. G. The anti-HIV pseudopeptide HB-19 forms a complex with the cell-surface-expressed nucleolin independent of heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (39), 27875–27884.
- (9) Nelli, Y.-R.; Douat-Casassus, C.; Claudon, P.; Kauffmann, B.; Didierjean, C.; Guichard, G. An activated building block for the introduction of the histidine side chain in aliphatic oligoureia foldamers. *Tetrahedron* **2012**, *68* (23), 4492–4500.
- (10) Teyssières, E.; Corre, J.-P.; Antunes, S.; Rougeot, C.; Dugave, C.; Jouvion, G.; Claudon, P.; Mikaty, G.; Douat, C.; Goossens, P. L.; et al. Proteolytically stable foldamer mimics of host-defense peptides with protective activities in a murine model of bacterial infection. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (18), 8221–8232.
- (11) Douat-Casassus, C.; Pulka, K.; Claudon, P.; Guichard, G. Microwave-enhanced solid-phase synthesis of N,N'-linked aliphatic oligoureias and related hybrids. *Org. Lett.* **2012**, *14* (12), 3130–3133.
- (12) Antunes, S.; Douat, C.; Guichard, G. Solid-phase synthesis of hybrid urea oligomers containing conservative thiourea mutations. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016* (12), 2131–2138.
- (13) Quideau, S.; Douat-Casassus, C.; Delannoy López, D. M.; Di Primo, C.; Chassaing, S.; Jacquet, R.; Saltel, F.; Genot, E. Binding of filamentous actin and winding into fibrillar aggregates by the polyphenolic c-glucosidic

- ellagitannin vescalagin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50 (22), 5099–5104.
- (14) Kichler, A.; Leborgne, C.; März, J.; Danos, O.; Bechinger, B. Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100 (4), 1564–1568.
- (15) Langlet-Bertin, B.; Leborgne, C.; Scherman, D.; Bechinger, B.; Mason, A. J.; Kichler, A. Design and evaluation of histidine-rich amphipathic peptides for siRNA delivery. *Pharm. Res.* **2010**, 27 (7), 1426–1436.
- (16) Georgescu, J.; Munhoz, V. H. O.; Bechinger, B. NMR structures of the histidine-rich peptide LAH4 in micellar environments: membrane insertion, pH-dependent mode of antimicrobial action, and DNA transfection. *Biophys. J.* **2010**, 99 (8), 2507–2515.
- (17) Douat-Casassus, C.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. Selective catalysis with peptide dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (25), 7817–7826.
- (18) Violette, A.; Averlant-Petit, M. C.; Semetey, V.; Hemmerlin, C.; Casimir, R.; Graff, R.; Marraud, M.; Briand, J.-P.; Rognan, D.; Guichard, G. N,N'-linked oligoureas as foldamers: chain length requirements for helix formation in protic solvent investigated by circular dichroism, NMR spectroscopy, and molecular dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (7), 2156–2164.
- (19) Nishizawa, S.; Bühlmann, P.; Iwao, M.; Umezawa, Y. Anion recognition by urea and thiourea groups: remarkably simple neutral receptors for dihydrogenphosphate. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (36), 6483–6486.
- (20) Diemer, V.; Fischer, L.; Kauffmann, B.; Guichard, G. Anion recognition by aliphatic helical oligoureas. *Chem. Eur. J.* **2016**, 22 (44), 15684–15692.
- (21) Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92 (16), 7297–7301.
- (22) Zaric, V.; Weltin, D.; Erbacher, P.; Remy, J.-S.; Behr, J.-P.; Stephan, D. Effective polyethylenimine-mediated gene transfer into human endothelial cells. *J. Gene Med.* **2004**, 6 (2), 176–184.
- (23) Akinc, A.; Thomas, M.; Klivanov, A. M.; Langer, R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J. Gene Med.* **2005**, 7 (5), 657–663.
- (24) Bertrand, E.; Gonçalves, C.; Billiet, L.; Gomez, J. P.; Pichon, C.; Cheradame, H.; Midoux, P.; Guégan, P. Histidinylated Linear PEI: a new efficient non-toxic polymer for gene transfer. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (46), 12547.
- (25) Kichler, A.; Leborgne, C.; Coeytaux, E.; Danos, O. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J. Gene Med.* **2001**, 3 (2), 135–144.
- (26) Kim, J.; Park, J.; Kim, H.; Singha, K.; Kim, W. J. Transfection and intracellular trafficking properties of carbon dot-gold nanoparticle molecular assembly conjugated with PEI-pDNA. *Biomaterials* **2013**, 34 (29), 7168–7180.
- (27) Kichler, A.; Leborgne, C.; März, J.; Danos, O.; Bechinger, B. Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100 (4), 1564–

1568.

- (28) Mason, A. J. The antibiotic and DNA-transfecting peptide LAH4 selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes. *FASEB J.* **2005**, 1-23.
- (29) Kichler, A.; Pages, J. C.; Leborgne, C.; Druillennec, S.; Lenoir, C.; Coulaud, D.; Delain, E.; Le Cam, E.; Roques, B. P.; Danos, O. Efficient DNA transfection mediated by the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 viral protein R. *J. Virol.* **2000**, 74 (12), 5424–5431.
- (30) Coeytaux, E.; Coulaud, D.; Le Cam, E.; Danos, O.; Kichler, A. The Cationic Amphipathic Alpha-Helix of HIV-1 Viral protein R (Vpr) binds to nucleic acids, permeabilizes membranes, and efficiently transfects cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (20), 18110–18116.
- (31) Dröse, S.; Altendorf, K. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of v-ATPases and p-ATPases. *J. Exp. Biol.* **1997**, 200 (Pt 1), 1–8.
- (32) Kumar, P.; Nagarajan, A.; Uchil, P. D. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, 2018 (6).
- (33) Opalinska, J. B.; Gewirtz, A. M. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1 (7), 503–514.
- (34) Ozcan, G.; Ozpolat, B.; Coleman, R. L.; Sood, A. K.; Lopez-Berestein, G. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, 87, 108–119.
- (35) Gallas, A.; Alexander, C.; Davies, M. C.; Puri, S.; Allen, S. Chemistry and formulations for siRNA therapeutics. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (20), 7983.
- (36) Höbel, S.; Aigner, A. Polyethylenimine (PEI)/siRNA-mediated gene knockdown in vitro and in vivo. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2010**, 623, 283–297.
- (37) Dong, Y.; Yu, T.; Ding, L.; Laurini, E.; Huang, Y.; Zhang, M.; Weng, Y.; Lin, S.; Chen, P.; Marson, D.; et al. A dual targeting dendrimer-mediated siRNA delivery system for effective gene silencing in cancer therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140 (47), 16264–16274.
- (38) Reinhard, S.; Zhang, W.; Wagner, E. Optimized solid-phase-assisted synthesis of oleic acid containing siRNA nanocarriers. *ChemMedChem* **2017**, 12 (17), 1464–1470.
- (39) Hyun, S.; Choi, Y.; Lee, H. N.; Lee, C.; Oh, D.; Lee, D.-K.; Lee, C.; Lee, Y.; Yu, J. Construction of histidine-containing hydrocarbon stapled cell penetrating peptides for in vitro and in vivo delivery of siRNAs. *Chem. Sci.* **2018**, 9 (15), 3820–3827.
- (40) Konate, K.; Dussot, M.; Aldrian, G.; Vaissière, A.; Viguier, V.; Neira, I. F.; Couillaud, F.; Vivès, E.; Boissguerin, P.; Deshayes, S. Peptide-based nanoparticles to rapidly and efficiently “Wrap’n Roll” siRNA into cells. *Bioconjug. Chem.* **2018**, 30 (3), 592–603.
- (41) Lee, S. H.; Chung, B. H.; Park, T. G.; Nam, Y. S.; Mok, H. Small-interfering RNA (siRNA)-based functional micro- and nanostructures for efficient and selective gene silencing. *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45 (7),

1014–1025.

- (42) Gary, D. J.; Puri, N.; Won, Y.-Y. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *J. Controlled Release* **2007**, *121* (1), 64–73.
- (43) Creusat, G.; Thomann, J.-S.; Maglott, A.; Pons, B.; Dontenwill, M.; Guérin, E.; Frisch, B.; Zuber, G. Pyridylthiourea-grafted polyethylenimine offers an effective assistance to siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *J. Controlled Release* **2012**, *157* (3), 418–426.
- (44) Beloor, J.; Zeller, S.; Choi, C. S.; Lee, S.-K.; Kumar, P. Cationic cell-penetrating peptides as vehicles for siRNA delivery. *Ther. Deliv.* **2015**, *6* (4), 491–507.
- (45) Coeytaux, E.; Coulaud, D.; Le Cam, E.; Danos, O.; Kichler, A. The Cationic amphipathic alpha-helix of HIV-1 viral protein R (VPr) binds to nucleic acids, permeabilizes membranes, and efficiently transfects cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (20), 18110–18116.
- (46) Kichler, A.; Pages, J. C.; Leborgne, C.; Druillennec, S.; Lenoir, C.; Coulaud, D.; Delain, E.; Le Cam, E.; Roques, B. P.; Danos, O. Efficient DNA transfection mediated by the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 viral protein R. *J. Virol.* **2000**, *74* (12), 5424–5431.
- (47) Du, Z.; Munye, M. M.; Tagalakakis, A. D.; Manunta, M. D. I.; Hart, S. L. The role of the helper lipid on the DNA transfection efficiency of lipopolyplex formulations. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 7107.
- (48) Cullis, P. R.; Hope, M. J. Effects of fusogenic agent on membrane structure of erythrocyte ghosts and the mechanism of membrane fusion. *Nature* **1978**, *271* (5646), 672–674.
- (49) Gao, X.; Huang, L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *179* (1), 280–285.
- (50) Felgner, J. H.; Kumar, R.; Sridhar, C. N.; Wheeler, C. J.; Tsai, Y. J.; Border, R.; Ramsey, P.; Martin, M.; Felgner, P. L. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (4), 2550–2561.
- (51) Siegel, D. P. The modified stalk mechanism of lamellar/inverted phase transitions and its implications for membrane fusion. *Biophys. J.* **1999**, *76* (1 Pt 1), 291–313.
- (52) Strebhardt, K.; Ullrich, A. Targeting Polo-like Kinase 1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (4), 321–330.
- (53) Judge, A. D.; Robbins, M.; Tavakoli, I.; Levi, J.; Hu, L.; Fronda, A.; Ambegia, E.; McClintock, K.; MacLachlan, I. Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119* (3), 661–673.
- (54) Kaushik, M.; Bhullar, J. S.; Bindroo, S.; Singh, H.; Mittal, V. K. Minimally invasive management of complicated diverticular disease: current status and review of literature. *Dig. Dis. Sci.* **2016**, *61* (3), 663–672.
- (55) Ripoll, M.; Pierdant, M.; Neuberg, P.; Bagnard, D.; Wagner, A.; Kichler, A.; Remy, J.-S. Co-delivery of anti-PLK-1 siRNA and camptothecin by nanometric polydiacetylenic micelles results in a synergistic cell killing.

RSC Adv. **2018**, 8 (37), 20758–20763.

(56) Leader, B.; Baca, Q. J.; Golan, D. E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7 (1), 21–39.

(57) Anselmo, A. C.; Gokarn, Y.; Mitragotri, S. Non-invasive delivery strategies for biologics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**.

(58) Yoshizaki, Y.; Yuba, E.; Sakaguchi, N.; Koiwai, K.; Harada, A.; Kono, K. Potentiation of pH-sensitive polymer-modified liposomes with cationic lipid inclusion as antigen delivery carriers for cancer immunotherapy. *Biomaterials* **2014**, 35 (28), 8186–8196.

(59) Lin, G.; Zhang, Y.; Zhu, C.; Chu, C.; Shi, Y.; Pang, X.; Ren, E.; Wu, Y.; Mi, P.; Xia, H.; et al. Photo-excitable hybrid nanocomposites for image-guided photo/thermal synergistic cancer therapy. *Biomaterials* **2018**, 176, 60–70.

(60) Chang, H.; Lv, J.; Gao, X.; Wang, X.; Wang, H.; Chen, H.; He, X.; Li, L.; Cheng, Y. Rational design of a polymer with robust efficacy for intracellular protein and peptide delivery. *Nano Lett.* **2017**, 17 (3), 1678–1684.

(61) Yu, C.; Tan, E.; Xu, Y.; Lv, J.; Cheng, Y. A guanidinium-rich polymer for efficient cytosolic delivery of native proteins. *Bioconjug. Chem.* **2019**, 30 (2), 413–417.

(62) Schneider, A. F. L.; Wallabregue, A. L. D.; Franz, L.; Hackenberger, C. P. R. Targeted subcellular protein delivery using cleavable cyclic cell-penetrating peptides. *Bioconjug. Chem.* **2019**, 30 (2), 400–404.

(63) Liu, X.; Wu, F.; Ji, Y.; Yin, L. Recent advances in anti-cancer protein/peptide delivery. *Bioconjug. Chem.* **2019**, 30 (2), 305–324.

(64) Lagassé, H. A. D.; Alexaki, A.; Simhadri, V. L.; Katagiri, N. H.; Jankowski, W.; Sauna, Z. E.; Kimchi-Sarfaty, C. Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research* **2017**, 6.

(65) Morris, M. C.; Depollier, J.; Mery, J.; Heitz, F.; Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19 (12), 1173.

(66) Säälk, P.; Elmquist, A.; Hansen, M.; Padari, K.; Saar, K.; Viht, K.; Langel, U.; Pooga, M. Protein cargo delivery properties of cell-penetrating peptides. a comparative study. *Bioconjug. Chem.* **2004**, 15 (6), 1246–1253.

(67) Sudhakaran, P. R.; Prinz, R.; Von Figura, K. Effect of temperature on endocytosis and degradation of sulphated proteoglycans by cultured skin fibroblasts. *J. Biosci.* **1982**, 4 (4), 413–418.

(68) Polito, L.; Bortolotti, M.; Mercatelli, D.; Battelli, M. G.; Bolognesi, A. Saporin-S6: A useful tool in cancer therapy. *Toxins* **2013**, 5 (10), 1698–1722.

Chapitre 3

Modulation de l'hélicité pour étendre les champs
d'applications des foldamères d'oligourées

L'essor de la chimie des foldamères a ouvert de nouvelles perspectives dans la conception d'architectures synthétiques capables de mimer les fonctions biologiques. Diverses molécules biomimétiques ont été conçues à partir de précurseurs non biologiques (β -peptides, γ -peptides, oligourées, oligoquinolines...). Ces oligomères sont, selon S. Gellman, « des architectures moléculaires synthétiques ayant une forte propension à adopter une conformation spécifique ».¹ Ce sont donc des oligomères possédant une structure secondaire bien définie. Les foldamères peuvent ainsi mimer différents motifs structuraux biologiques : hélices- α , feuillets- β à l'état solide mais aussi en solution.^{2,3} Ces mimes synthétiques peuvent ainsi inhiber des interactions biologiques⁴ ou être utilisés comme catalyseur de réactions chimiques.⁵ Les foldamères ont aussi été utilisés pour mimer des peptides antibactériens,⁶ ou reconnaître des acides nucléiques.⁷ On peut noter que la plupart des exemples décrits dans la littérature soulignent l'importance de la relation structure-activité dans le design de foldamères biomimétiques.

Généralement, un foldamère « idéal » adopte une conformation stable et définie.^{1,3} Or dans un contexte de biomimétisme, on doit prendre en compte qu'en réalité, la plupart des protéines ne sont pas rigides.⁸ Beaucoup de protéines fonctionnelles comportent des segments non structurés ou bien ne se structurent qu'après reconnaissance d'un ligand. On dit alors qu'elles sont intrinsèquement désordonnées. Par exemple, certaines enzymes peuvent agir sur des substrats de forme et de géométrie différente et donc il est inévitable que ces enzymes présentent un certain degré de flexibilité dans leur structure afin d'être capables de reconnaître des substrats de forme différentes.⁹ Certaines fonctions biologiques nécessitent donc une flexibilité conformationnelle.

La rigidité conformationnelle des foldamères peut donc être perçue comme un facteur limitant dans la conception de molécules synthétiques capables de mimer des fonctions biologiques.^{9,10}

C'est la raison pour laquelle, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'essayer de moduler la conformation des foldamères d'oligourées afin de potentiellement accéder à de nouvelles fonctions biomimétiques. Pour cela au cours de cette thèse, nous avons choisi d'étudier deux stratégies complémentaires.

La première a consisté à exploiter la réactivité des thiols pour former des oligourées macrocycliques. En comparaison, les peptides cycliques ont connu un fort regain d'intérêt car il a été démontré que la rigidité de leur squelette améliore la pénétration cellulaire et permet, dans certains cas, de former des assemblages en milieux aqueux.^{11,12} Nous avons donc envisagé que la cyclisation d'oligourées pourrait aider à stabiliser la conformation en

hélice de courtes séquences (*i.e* comportant un nombre maximum de 5 urées, ce qui n'équivaut qu'à deux tours d'hélice) mais donnerait aussi accès à de nouvelles architectures tridimensionnelles présentant un potentiel dans un contexte biologique. Pour réaliser ces cyclisations, nous avons choisi d'exploiter la réaction de S-alkylation permettant l'introduction de connecteurs externes. Il nous a ainsi été possible de cribler différents connecteurs de taille et composition chimique différentes. Selon le type de connecteur organique utilisé on pourrait ainsi jouer sur différentes propriétés en augmentant par exemple la pénétration cellulaire des molécules résultantes ou en modifiant la conformation de l'oligourée linéaire pour donner lieu à de nouvelles formes tridimensionnelles.

La deuxième stratégie qui sera décrite dans ce chapitre repose sur la conception d'architectures foldamères capables de moduler leur conformation par reconnaissance d'un ligand. Dans cette partie nous étudierons la dynamique de l'hélice oligourée et la possibilité d'inverser le sens d'hélicité par reconnaissance d'anion.

1) Conception d'oligourées hydrosolubles cycliques et étude de leur repliement

Au fil des ans, les peptides cycliques de synthèse ont connu un intérêt grandissant, principalement parce qu'ils sont des candidats médicaments intéressants pour l'industrie pharmaceutique et de potentiels outils biologiques.¹³ Ci-dessous, nous dressons un état de l'art non exhaustif, des stratégies les plus connues de cyclisation de peptides avec un intérêt particulier pour les méthodes récentes impliquant la réactivité des thiols.

Parmi les stratégies de cyclisation les plus classiques, on peut citer, la formation de lien amide, de pont disulfure, la cyclisation azoture-alcyne, la réaction thiol-ene ou la métathèse cyclisante (RCM).¹⁴ Des réaction de lactamisation « tête-queue », c'est-à-dire liant les deux extrémités du peptide (N- et C-terminale) par un lien amide ont aussi été utilisées pour préparer de courts peptides cycliques qui ont montré une haute stabilité à la protéolyse, une faible cytotoxicité et une biodisponibilité orale.¹⁵ Au début des années 2000, la stratégie dite « peptide agrafe » (Figure III.1) a permis de concevoir des peptides cycliques capables de cibler la surface de protéines afin de développer des inhibiteurs d'interactions protéine-protéines.¹⁶ Cette approche reposait sur une réaction de métathèse cyclisante entre deux résidus α,α -disubstitués contenant une chaîne latérale de type alcène, insérés en position i , $i+4$ ou i , $i+7$. Ce choix de position étant fait de manière à stabiliser fortement la formation de l'hélice- α tout en facilitant la pénétration cellulaire du peptide natif. Depuis la

première découverte par Verdine *et al.*, de très nombreux exemples de peptides agrafes ont été décrits dans la littérature.¹⁷

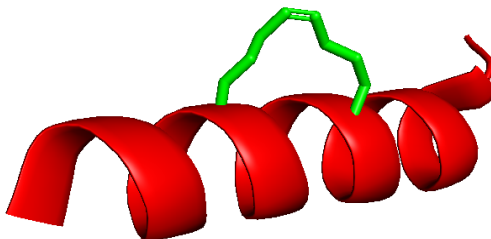


Figure III.1 : Structure cristalline d'un peptide agrafe où l'hélice- α est représentée en rouge et l'agrafe hydrocarbonée en vert (code PDB : 4MZK).¹⁷

Plus récemment, des méthodes de S-arylation sur la chaîne latérale de résidus cystéines ont été décrites conjointement par les groupes de B. Pentelute et de S. Buchwald.¹⁸ Dans le même ordre d'idées, le groupe de R. Derda a décrit la modification de résidus cystéines *via* une réaction de substitution nucléophile aromatique (S_NAr) avec des perfluoroarènes en milieu aqueux.¹⁹ Le groupe de P. Dawson a lui utilisé le dichloroacétone comme connecteur sur des résidus cystéines pour préparer des peptides agrafes dans le but de stabiliser l'hélice- α du peptide natif.²⁰ Grâce à la nucléophilie particulière des thiols, le groupe de A. Wilson a réussi à bloquer la conformation en hélice- α de peptides par une double substitution de deux résidus cystéines en position i , $i+4$ en présence de dibromomaléimide.²¹ Depuis les travaux de Verdine *et al.* sur la métathèse cyclisante, une grande variété de méthode de cyclisation de peptides a été décrite. Chacune d'entre elles utilise une réaction chimique différente permettant de former des peptides agrafes présentant des propriétés biologiques variées. Le groupe de D.R. Spring a récemment rassemblé l'ensemble de ces méthodes dans une revue et présente les différentes méthodes de cyclisation en deux groupes. Le premier correspondant aux méthodes de cyclisation intramoléculaire (*i.e* la réaction d'une chaîne latérale sur une autre) et le second correspondant aux cyclisations impliquant l'introduction d'un linker externe (Figure III.2).²²

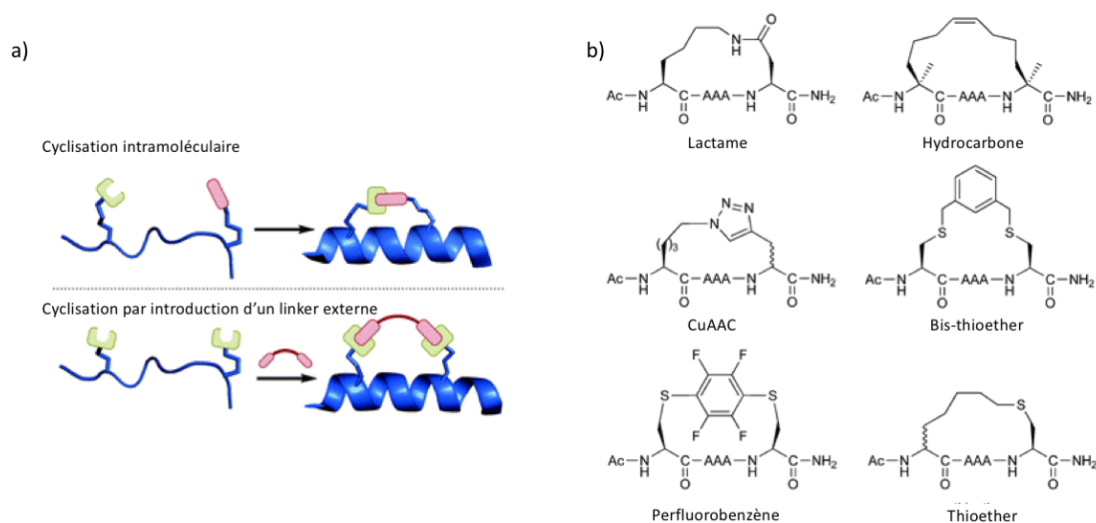


Figure III.2 : (a) Cyclisation intramoléculaire v.s cyclisation par introduction d'un linker externe. La cyclisation intramoléculaire implique la réaction d'une chaîne latérale sur une autre et la cyclisation par introduction d'un linker externe nécessite l'utilisation d'un réactif bifonctionnelle capable de réagir simultanément sur deux chaînes latérales. (b) Comparaison des différentes stratégies de cyclisation sur un pentapeptide modèle.²²

Une autre approche de cyclisation a récemment été décrite par le groupe de W. Degrado qui a développé une méthode de macrocyclisation englobant la totalité de la séquence peptidique (*i.e* reliant les deux extrémités N- et C-terminales). Un connecteur semi-rigide aromatique a été attaché aux deux extrémités du peptide *via* la formation de thioethers reliant le connecteur à des résidus cystéines. Le peptide cyclique ainsi formé montre non seulement une forte stabilité de l'hélice- α mais permet aussi de former des assemblages définis en milieux aqueux (Figure III.3).¹¹

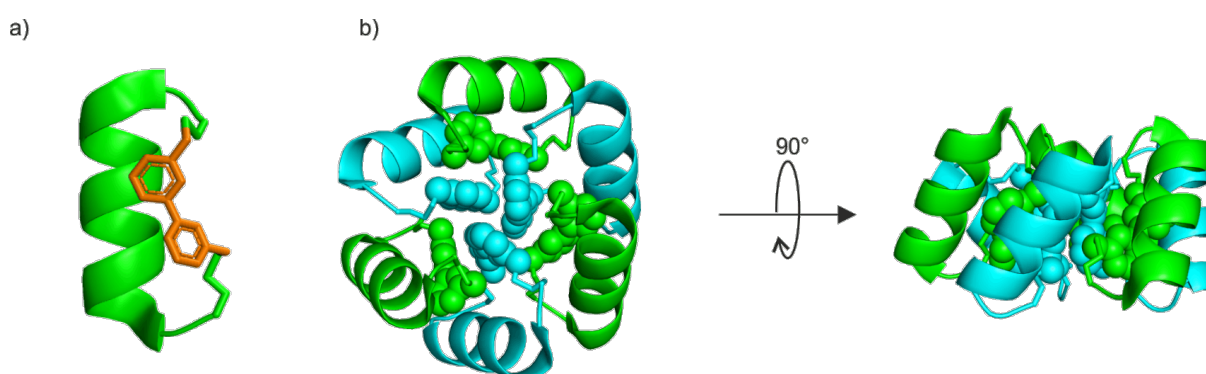


Figure III.3 : Macrocycle peptidique développé par W. Degrado. (a) Structure cristalline du peptide macrocyclique où le connecteur aromatique est représenté en orange et (b) structure cristalline de l'assemblage obtenue en milieu aqueux (code PDB : 6B17).¹¹

En parallèle, le groupe de C. Heinis a mis au point une méthode rapide de cyclisation permettant d'accéder à une librairie composée de milliers de peptides bicycliques. Pour cela,

ils ont combinés la méthode de « phage display » à des cyclisations par formation de thioethers à partir de connecteurs composés de deux atomes de brome. En présence de deux connecteurs différents, ils ont pu avoir accès à une librairie de peptides très riches en taille, en composition chimique et en géométrie. Cette méthodologie a été appliquée à l'identification d'inhibiteurs de la protéine plasma kallikrein, une cible thérapeutique d'intérêt pour traiter l'angio-œdème héréditaire. Cette stratégie a permis d'identifier des inhibiteurs ayant des constantes d'affinité de liaison de l'ordre du subnanomolaire.²³

Dans le domaine des foldamères, le groupe d'I. Huc en collaboration avec H. Suga a récemment démontré que des hybrides foldamère-peptide peuvent être synthétisés par le ribosome en utilisant la reprogrammation génétique. En particulier grâce aux connaissances de l'équipe de H. Suga dans la cyclisation de peptides *via* la réaction de S-alkylation de résidus cystéine, ils ont conçu des macrocycles peptide-foldamère aromatique dont l'étude conformationnelle en solution a révélé une induction totale du sens d'hélicité du segment foldamère induite par le fragment peptidique.²⁴

En ce qui concerne, l'utilisation de connecteurs photoisomérisables, on peut citer les travaux de J. Chmielewski *et al.* qui ont étudié l'impact de l'insertion de connecteurs azobenzène sur la structuration de coudes- β peptidiques²⁵ ou le travail intensif du groupe de G. A. Wooley sur la modulation de la conformation en hélice- α de peptides cycliques par irradiation photochimique grâce à l'insertion de connecteurs de type azobenzène. G.A. Wooley *et al.* ont démontré que la photoisomérisation de l'azobenzène de la configuration *trans* à *cis* induisait une forte augmentation du taux d'hélicité du peptide.²⁶⁻²⁸

Tous ces exemples soulignent l'intérêt grandissant pour la synthèse de peptides cycliques. Ce constat nous a donc permis d'envisager qu'il serait intéressant d'étudier l'impact de la cyclisation sur le repliement des hélices-2,5 d'oligourées. La cyclisation pourrait permettre de stabiliser de courtes séquences oligourées mais aussi nous donner accès à de nouvelles conformations originales. En particulier nous nous sommes intéressés à l'utilisation de la réaction de S-alkylation pour cycliser des oligourées car cette réaction est chimiquement stable, facile à réaliser, sélective et peu coûteuse.²⁹ De plus, il existe un grand nombre de connecteurs commerciaux capables de réagir avec des thiols ce qui nous permet de cribler une grande variété de composés présentant des tailles et des compositions chimiques différentes.

a) Développement d'une nouvelle résine pour la synthèse d'oligourées bis-thiol

Afin d'étudier les conséquences structurales de la cyclisation sur l'hélice-2,5 d'oligourées, la synthèse de différentes oligourées comportant une terminaison de type cystamine aux deux extrémités N- et C-terminales a été réalisée sur support solide. Trois séquences oligourée ont donc été préparées. Elles diffèrent par leur taille mais sont toutes constituées par les mêmes résidus (Figure III.4). Le design de ces séquences s'est inspiré de la composition de l'oligourée **H1** (séquence : $i\text{Pr}^{\text{U}}\text{-Leu}^{\text{U}}\text{-Glu}^{\text{U}}\text{-Lys}^{\text{U}}\text{-Leu}^{\text{U}}\text{-Tyr}^{\text{U}}\text{-Leu}^{\text{U}}\text{-Glu}^{\text{U}}\text{-Lys}^{\text{U}}\text{-Leu}^{\text{U}}\text{-Ala}^{\text{U}}\text{-Leu}^{\text{U}}\text{-NH}_2$) dont la structure cristalline a été obtenue en milieu aqueux.² Ce choix de design a été fait afin de pouvoir comparer le repliement des nouvelles oligourées cycliques avec celui d'une oligourée connue (**H1**). L'introduction de terminaisons de type cystamine nous a permis d'exploiter la réactivité des thiols et ainsi de préparer des macrocycles « tête-queue » fermés soit par un pont disulfure soit *via* l'introduction d'un connecteur externe introduit par S-alkylation ou S-arylation.

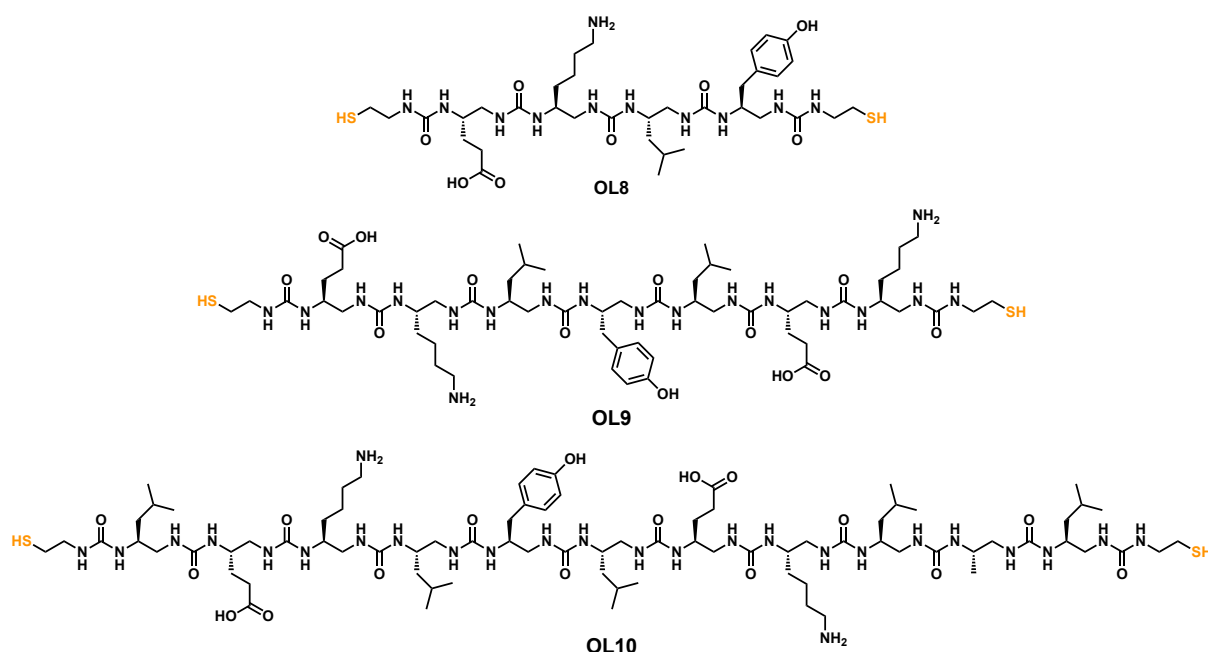


Figure III.4 : Structure chimique des oligourées **OL8**, **OL9** et **OL10**.

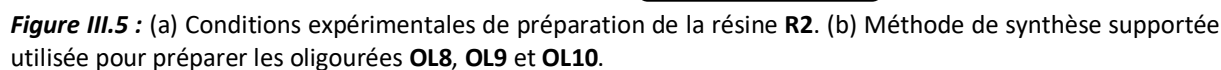
Comme évoqué dans le chapitre 1, deux approches de synthèse sur support solide des oligourées sont disponibles au laboratoire: la stratégie Boc et la stratégie azoture. Dans cette étude, c'est la stratégie azoture qui a été choisie pour préparer les oligourées **OL8**, **OL9** et **OL10**. La stratégie azoture en synthèse supportée (c.f. chapitre 1) a été développée en 2012 au laboratoire.³⁰ Cette approche qui utilise une résine acido-labile et le TFA pour le

clivage final de la résine permet d'éviter certains problèmes liés à l'utilisation de la stratégie Boc et notamment l'emploi de l'acide fluorhydrique pour le clivage final.

Ici, une nouvelle résine (**R2**) a été mise au point afin de pouvoir exploiter la stratégie de synthèse sur support solide azoture tout en introduisant une terminaison de type cystamine en position C-terminale de l'oligourée (Figure III.5.a). Cette résine a été préparée au laboratoire à partir d'une résine commerciale, la 2-chlorotritylchloride (résine CTC) sur laquelle a été couplé un linker de type cystamine (**L2**) préalablement protégé par un groupement Fmoc. Une fois le linker installé, le nouveau taux de greffage de la résine (exprimé en mmol/g) a été déterminé par dosage UV de l'adduit Fmoc-pipéridine à 289 nm et 300 nm. Cette méthodologie s'inspire de travaux publiés par le groupe de F. Albericio, qui a développé une résine dérivée de la CTC en y greffant un linker alkyl thiol, l'acide 16-mercaptohexadécanoïque. Grâce à cette résine, ils sont parvenus à synthétiser sur support solide un alkyl thiol biotinylé dont la synthèse n'avait alors été décrite qu'en solution.³¹

La résine CTC n'est pas compatible avec l'irradiation micro-ondes. En effet, il a été démontré que bien que la résine CTC permette d'obtenir des peptides par synthèse supportée avec une haute pureté et un faible taux d'épimérisation, celle-ci n'est pas compatible à l'irradiation micro-ondes. Après synthèse supportée sous assistance micro-ondes, les rendements des produits obtenus sont très faibles car le lien trityl ester est hydrolysé au cours du chauffage ce qui se traduit par un relargage en solution de la chaîne en cours d'élongation.³² Cette résine est donc habituellement utilisée avec des conditions de couplages à température ambiante. Dans la résine **R2**, le lien trityl ester a été remplacé par un lien trityl thioether qui lui n'est pas hydrolysé au cours de la synthèse, la résine **R2** devrait donc être stable à l'irradiation micro-ondes. Une fois obtenue, la résine **R2** a été utilisée avec la stratégie de synthèse azoture classiquement utilisée au laboratoire (Figure III.5.b).

Après déprotection du Fmoc, des étapes de couplages/réductions itératives des différents monomères (**M**) portant des chaînes latérales de type acide glutamique (**M^E**), lysine (**M^K**), leucine (**M^L**), alanine (**M^A**) et tyrosine (**M^Y**) ont été effectuées en conditions standard et sous irradiation micro-ondes (Figure III.5.b). Une fois l'élongation de chaîne terminée, le linker **L3** a été couplé sur l'amine N-terminale afin d'introduire la deuxième terminaison de type cystamine. L'oligourée a ensuite pu être détachée de la résine **R2** en utilisant un cocktail de clivage composé de TFA/TIS/H₂O/EDT (92,5 : 2,5 : 2,5 : 2,5; v/v/v/v) (Figure III.5.b).



Néanmoins, on peut noter que les résultats obtenus confirment la stabilité de la résine **R2** à l'irradiation micro-ondes.

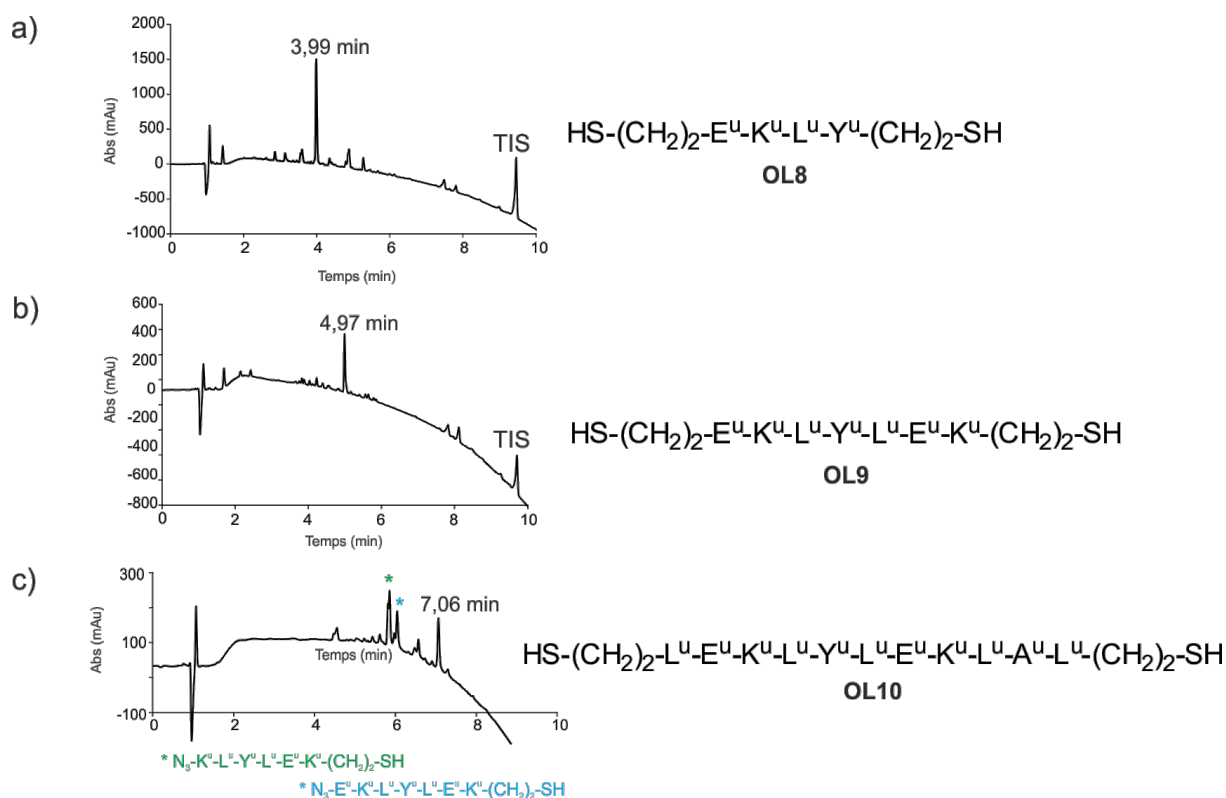


Figure III.6 : Chromatogrammes RP-HPLC des produits bruts (a) **OL8**, (b) **OL9** et (c) **OL10** synthétisés par stratégie azoture avec la résine **R2** (UV à 200 nm, 10-100% CH_3CN (+ 0,1% TFA) dans H_2O (+0,1% TFA) en 10 min).

b) Macrocyclisation d'oligourées

Dans une série de réactions réalisées en parallèles, nous avons fait réagir l'oligourée **OL8** avec différents connecteurs et avons isolé les macrocycles correspondants : **MC3-MC6** (Figure III.8). En parallèle, nous avons synthétisé les macrocycles **MC1** et **MC2** qui sont issus de l'oxydation des thiols des oligourées **OL8** et **OL9** respectivement (Figure III.8). La formation du pont disulfure intramoléculaire est un moyen « chimique » de vérifier la réactivité des thiols mais aussi la flexibilité de la conformation hélicoïdale en milieu aqueux permettant le cou dage de cette dernière pour permettre le macrocycle « contraint » de se former.

La cyclisation par oxydation des thiols en pont disulfure a donc été réalisée en premier en utilisant l'oxydation au DMSO. Ce choix d'oxydation permet de former rapidement le pont disulfure avec un excellent rendement et une haute pureté.³³ Afin de limiter la multimérisation de l'oligourée et de favoriser la cyclisation intramoléculaire, la réaction d'oxydation a été réalisée en conditions diluées (0,5 mg/mL d'oligomère) dans un tampon bicarbonate d'ammonium (50 mM, pH 8) contenant 25% de DMSO à température

ambiante. La réaction a été laissée sous agitation pendant 48h puis les macrocycles **MC1** et **MC2** correspondant à l'oxydation des oligourées **OL8** et **OL9** ont pu être isolés après purification par RP-HPLC préparative avec un rendement de 34% et 31% respectivement. En revanche, lorsque l'oligourée **OL10** a été traitée dans les mêmes conditions, aucune trace du macrocycle attendu n'a pu être détectée par LC-MS, même après 7 jours de réaction. Cette différence de réactivité indique que la rigidité du squelette hélicoïdal d'**OL10** empêche la réaction de cyclisation d'avoir lieu. A l'inverse, les squelettes hélicoïdaux des oligourées **OL8** et **OL9** semble plus « fragiles » et donc peuvent permettre une cyclisation facile.

Nous avons ensuite réaliser les cyclisations impliquant un connecteur externe en exploitant la réaction de S-alkylation. Cette stratégie nécessite l'utilisation d'un réactif bifonctionnel qui permet de former un macrocycle en réagissant sur les deux thiols de l'oligourée. En comparaison avec une cyclisation intramoléculaire comme celle réalisée précédemment (**MC1** et **MC2**) plus de sous-produits peuvent se former au cours de cette réaction en raison de son chemin réactionnel (Figure III.7). La première étape correspond au couplage intermoléculaire entre le connecteur et l'un des thiols de l'oligourée pour former un intermédiaire linéaire (**MCa**), puis un second couplage intramoléculaire se produit entre le thiol libre et la seconde terminaison du connecteur pour former le macrocycle (**MC**). Cette réaction est donc en compétition avec le couplage de deux connecteurs sur une oligourée qui fournit un produit linéaire (**L**). Cette réaction parallèle n'existe pas dans le cas d'une cyclisation intramoléculaire et s'ajoute donc aux autres sous-produits potentiels qui correspondent à des produits de multimérisation. Malgré cela, la formation du produit macrocyclique peut être favorisée par une pré-organisation conformationnelle de l'intermédiaire réactionnel (**MCa**) positionnant la terminaison qui n'a pas réagi du connecteur, proche du second thiol de l'oligourée (Figure III.7).

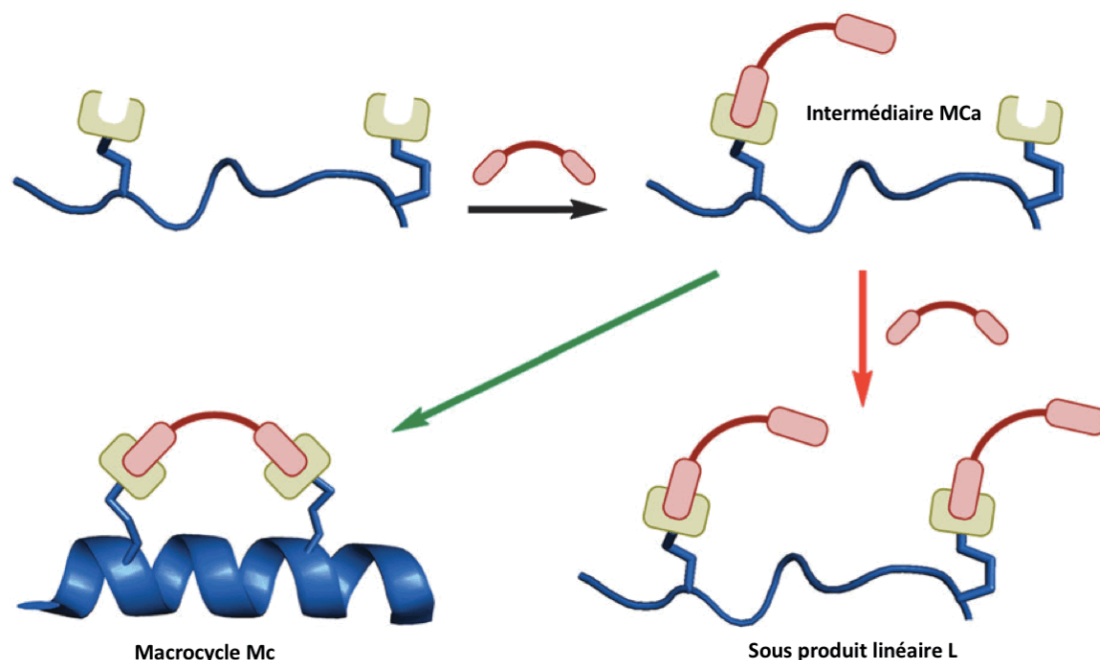


Figure III.7 : Chemin réactionnel de la réaction de cyclisation impliquant un connecteur externe proposé par le groupe de R. D. Spring.²²

Les réactifs bifonctionnel utilisés comme connecteurs externes dans cette étude sont des composés possédant deux terminaisons de type $\text{CH}_2\text{-Br}$. Nous avons fait le choix de cribler différents connecteurs de différentes tailles et composition chimique (**C3**, **C4** et **C6**, Figure III.8). En fonction de la taille du connecteur, on s'attend à observer une modulation de l'hélicité de l'oligourée. Par exemple, un connecteur dont la longueur sous forme étendue correspondrait à la distance entre les deux extrémités N- et C- terminales d'une oligourée constituée de 5 motifs urées devrait permettre de stabiliser la conformation hélicoïdale d'une courte séquence (5 urées ne correspondant qu'à deux tours d'hélice) en hélice-2,5. A l'inverse, un connecteur plus court devrait déstabiliser l'hélice-2,5 de l'oligourée et pourrait induire une courbure dans le squelette de l'hélice. Ainsi, en fonction du connecteur utilisé, il devrait être possible soit de stabiliser la conformation en hélice-2,5 de courtes séquences oligourées, soit d'accéder à de nouvelles conformations coudées.

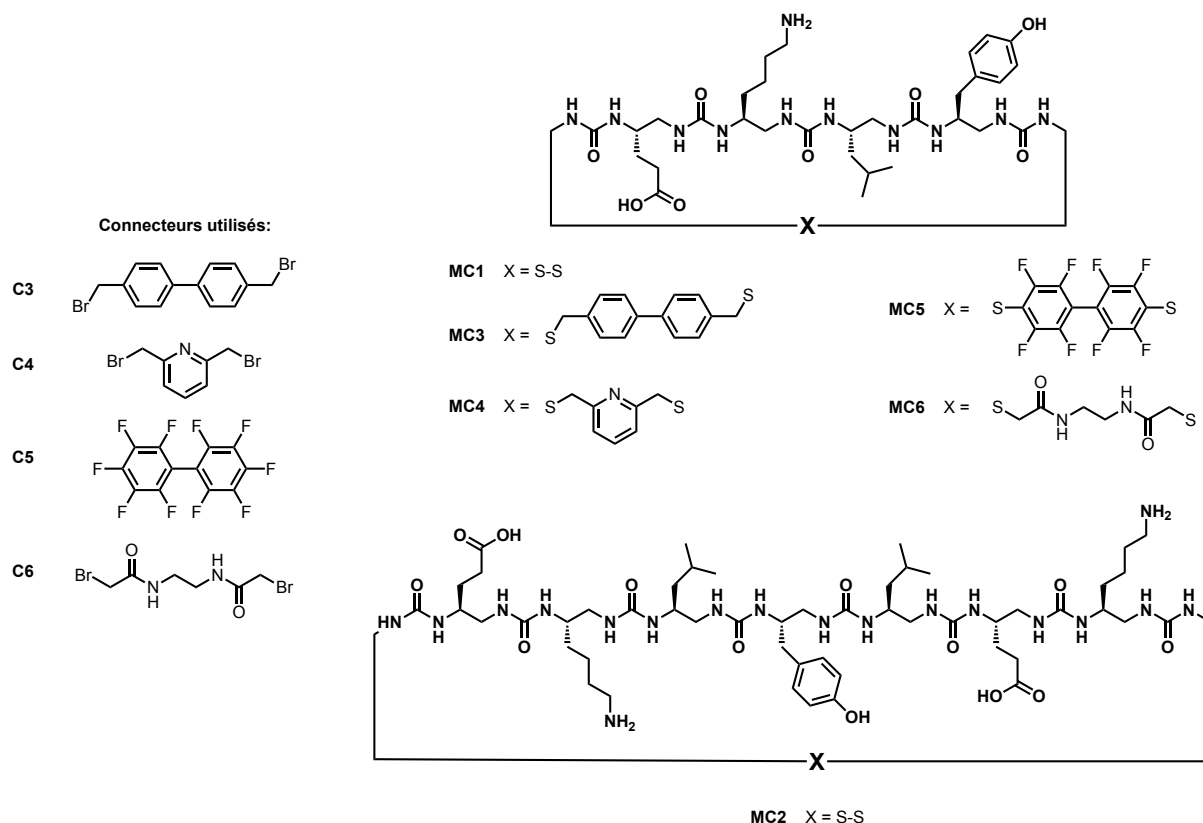


Figure III.8 : Structure chimique des macrocycles (**MC1-MC6**) synthétisés au cours de cette étude.

En plus des connecteurs équipés de terminaisons $\text{CH}_2\text{-Br}$ présentés précédemment, nous avons inclus dans l'étude un connecteur de type perfluoroaromatique (**C5**, Figure III.8). Ce connecteur a été utilisé par le groupe de B. Pentelute pour cycliser un CPP. B. Pentelute *et al.*, ont en effet montré que la réaction de substitution nucléophile aromatique ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) était sélective des deux fluors en position *para* du connecteur perfluoroaryle. L'introduction de ce connecteur leur a permis de stabiliser la structure en hélice- α du peptide et d'améliorer son efficacité de transport d'oligonucléotides antisens d'un facteur 14 tout en lui conférant une stabilité accrue à la protéolyse.¹² Ainsi, dans un contexte d'utilisation de nos oligourées pour des applications pharmaceutiques, il nous a paru intéressant d'inclure ce connecteur dans notre étude.

Les cyclisations par S-alkylation ont été réalisées en conditions basiques (tampon bicarbonate d'ammonium, 50 mM, pH 8) à température ambiante et en présence de 1,5 équivalent de connecteur. Ces réactions ont été faites en conditions diluées (0,5 mg/mL d'oligourée) afin de minimiser la multimérisation. L'ensemble des conditions expérimentales utilisées pour les différentes cyclisations sont résumées Figure III.9. Les bruts réactionnels ont été analysés par LC-MS afin d'identifier la nature des produits formés. Lorsque les macrocycles ont pu être formés en quantité suffisantes, ceux-ci ont ensuite été isolés par

RP-HPLC préparative. En ce qui concerne la cyclisation par S-alkylation d'**OL8**, tous les bruts réactionnels ont montré la présence d'un seul pic majoritaire correspondant au macrocyle attendu.

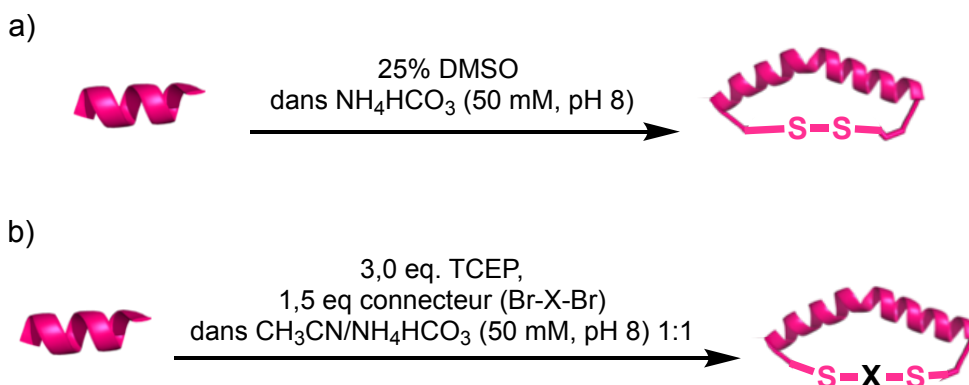


Figure III.9 : Conditions expérimentales de cyclisation des oligourées : (a) oxydation des thiols en présence de DMSO pour la cyclisation intramoléculaire par formation d'un pont disulfure et (b) cyclisation *via* l'introduction d'un connecteur externe couplé par formation de liens thioethers.

Ainsi, les macrocycles **MC3-MC6** ont pu être obtenus avec des rendements de 23%, 23%, 13% et 19% respectivement après purification sur RP-HPLC préparative. Le mode de repliement des macrocycles isolés (**MC1-MC6**), dérivant du tétramère **OL8**, a ensuite été étudié en solution par dichroïsme circulaire.

c) Étude conformationnelle en solution

Au cours de cette étude, nous avons évalué l'impact de la cyclisation sur l'hélice-2,5 d'oligourée en réalisant des expériences CD en milieu aqueux (Figure III.10). Cette étude a été compliquée par le fait que les spectres sont généralement exprimés en ellipticité molaire, ce qui nécessite de connaître la concentration exacte de la solution. Celle-ci est habituellement déterminée en mesurant l'absorbance à 280 nm des résidus de type Tyr^U. Or, certains des connecteurs aromatiques utilisés dans cette étude absorbent aussi à cette longueur d'onde ce qui complique la mesure de la concentration. Il a donc été décidé de calibrer chacun des spectres CD grâce à l'absorbance UV à 205 nm qui correspond à la longueur d'onde à laquelle absorbe la liaison urée. Ainsi, nous avons mesuré la concentration du composé de référence linéaire **OL8** grâce à l'absorbance à 280 nm du résidu Tyr^U. Pour les dérivés macrocycliques d'**OL8**, nous avons appliqué un facteur de correction de la concentration correspondant au rapport des absorbances à 205 nm. Ainsi nous avons considéré que la concentration du composé macrocyclique était égale à :

$$\text{Concentration (MC)} = \text{Concentration (OL8)} * \frac{\text{Absorbance MC (205 nm)}}{\text{Absorbance OL8 (205 nm)}}$$

Cette calibration a été appliquée à chacun des macrocycles à l'exception de **MC1** car le linker biphényl absorbe à 205 nm. Pour ce macrocycle, nous avons donc estimé la concentration en pesant le macrocycle isolé sec après lyophilisation. Étant donné que les solvants de purification contiennent du TFA, les produits isolés sont sous forme de sels de TFA. Afin de réduire, l'incertitude de la pesée due à la présence de ce sel de poids moléculaire élevé (113 g.mol⁻¹), un échange de sel a été réalisé au préalable en réalisant 3 traitements successifs avec une solution d'HCl (0,1M) avant une nouvelle lyophilisation.

Dans cette étude, les données CD ont été interprétées en se basant sur la forme et l'intensité à 205 nm des spectres CD des oligourées macrocycliques. Les oligourées linéaires (**OL8** et **OL9**) ont aussi été analysées et ont été utilisées comme référence pour discuter les données CD des macrocycles et ainsi estimer l'impact de la cyclisation sur la stabilité de l'hélice-2,5.

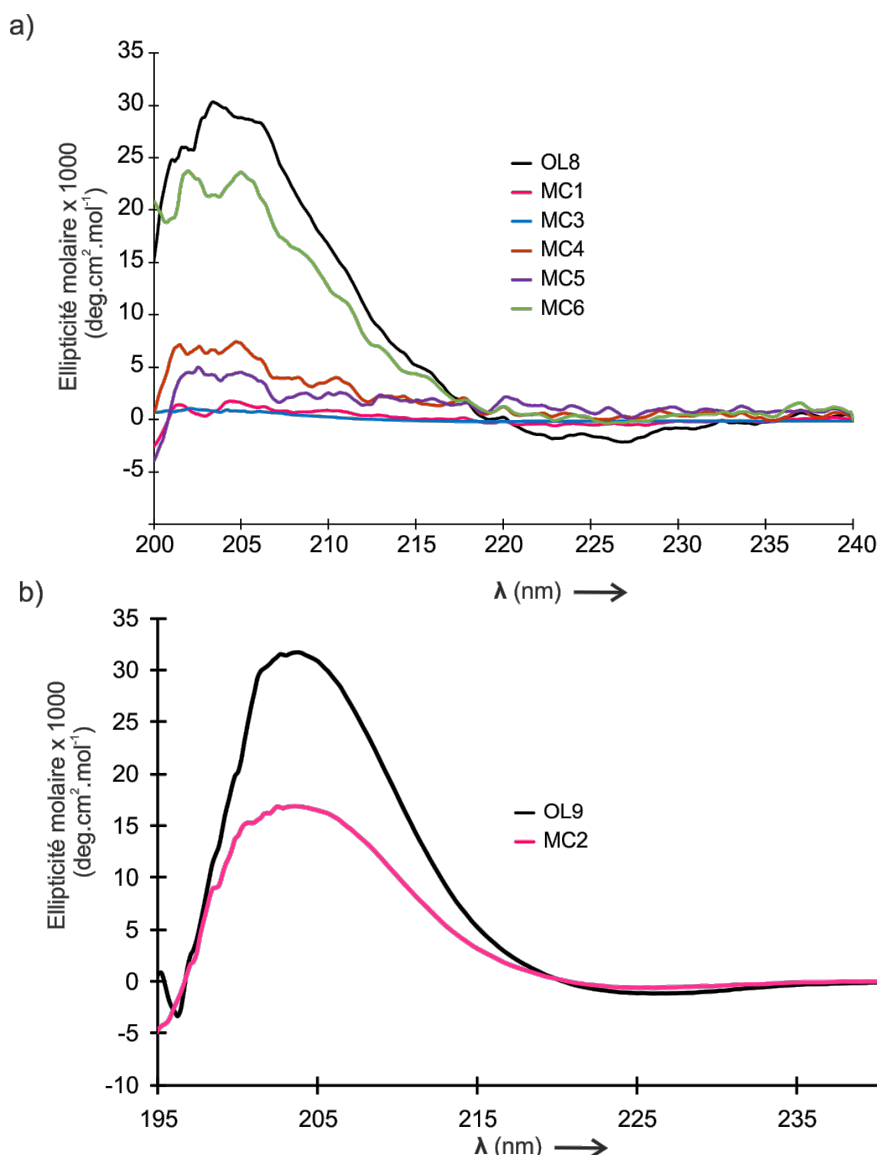


Figure III.10 : Spectres CD des oligourées **OL8** et **OL9** en comparaison avec leur macrocycles isolés. (a) Spectres CD d'**OL8**, **MC1** et **MC3-MC6** et (b) spectres CD d'**OL9** et **MC2**. Les spectres ont été enregistrés dans un tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,5) et mesurés à 0,1 mM.

Les spectres présentés Figure III.10 ont été réalisés dans un tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,5) à 0,1 mM. Comme attendu, les oligourées tétramère (**OL8**) et heptamère (**OL9**) présentent la signature CD caractéristique d'une hélice-2,5 droite avec un maximum d'ellipticité positif à 203 nm dont l'intensité augmente avec le nombre de résidus dans la chaîne oligourée (le signal d'**OL9** étant plus intense que celui d'**OL8**). L'intensité du maximum à 203 nm des composés **MC1**, **MC3**, **MC4** et **MC5** est très faible par rapport à celle d'**OL8**. La cyclisation oxydante du tétramère oligourée ainsi que les cyclisation par insertion des connecteurs bis(bromométhyl)biphényle, bis(bromométhyl)pyridine et décafluorobiphényle semble donc déstabiliser l'hélice-2,5 d'**OL8**. En revanche, le macrocycle

MC6 présente un signal à 203 nm plus intense que les autres macrocycles et proche de l'intensité du composé linéaire **OL8**, le connecteur aliphatique **C6** semble donc compatible avec l'hélice-2,5 du tétramère **OL8**.

En ce qui concerne, la cyclisation d'**OL9**, on constate que le macrocycle **MC2** correspondant au produit de cyclisation oxydante d'**OL9**, présente un maximum positif à 203 nm qui est moins intense que celui de l'oligourée linéaire. Cette cyclisation semble donc déstabiliser l'hélice-2,5 de l'heptamère.

Pour compléter cette étude structurale par CD, des études futures en RMN seront réalisées. En parallèle, des essais de cristallisation ont été initiés afin d'obtenir des données structurales à l'état solide et déterminer le mode de repliement de ces oligomères cycliques.

2) Dynamique de l'hélice oligourée et induction d'hélicité par reconnaissance d'anion

Une hélice est un objet chiral construit à partir de sous unités chirales ou achirales. Les hélices formées à partir de sous unités chirales sont caractérisée par une forte induction du sens d'hélicité. Par exemple, les hélices α -peptidiques construites à partir de (*L*)-acides aminés forment une hélice droite (*P*). A l'inverse, dans le cas d'hélices construites à partir de sous unités achirales, les deux « pas de vis » de l'hélice sont formés en mélange équimolaire dit racémique comprenant 50% d'hélice gauche (*M*) et 50% d'hélice droite (*P*).³⁴

Les oligourées construites à partir de monomères dérivés de (*L*)-acides aminés adoptent une conformation en hélice-2,5 (*P*).³⁵ En 2016, le groupe de J. Clayden en collaboration avec notre groupe a montré qu'il était possible de construire des oligourées à partir de sous unités achirale de type *meso* 1,2-cyclohexane diamine.³⁶ Pour maintenir la symétrie *meso*, les monomères ont été liés par des liens urées car c'est un motif symétrique facilitant l'accès à des oligomères *meso* (Figure III.11). Grâce à des études RMNs, il a été montré qu'en solution 50% de l'hélice est gauche (*M*) et 50% est droite (*P*). Ces deux hélices sont en échange lent au temps de la RMN avec une barrière d'inversion de 70 kJ.mol⁻¹ ce qui se traduit par la présence de deux jeux de signaux d'égale intensité en RMN.

a) Oligourée chirale

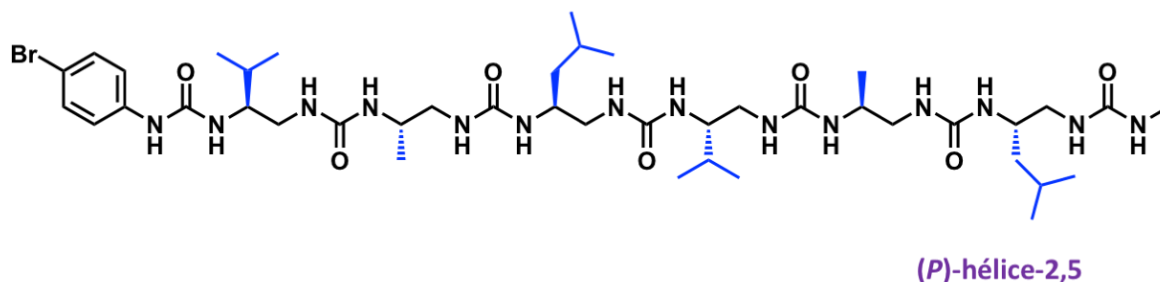
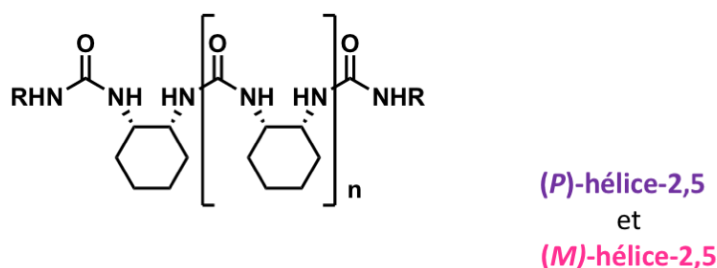
b) Oligourée *meso*

Figure III.11 : (a) Structure chimique d'une oligourée chirale synthétisée dans l'équipe et (b) structure chimique des oligourées *meso* dérivant du monomère *meso* cyclohexane-1,2-diamine décrits par J. Clayden *et al.*

Dans le cas des oligourées *meso*, l'inversion du sens d'hélicité s'accompagne d'une inversion de la direction du réseau de liaisons hydrogènes et donc du sens du macrodipôle de l'hélice. Les deux terminaisons N- (côté positif du macrodipôle) et C- terminales (côté négatif du macrodipôle) de l'oligourée *meso* étant énantiotopes, J. Clayden *et al.* ont montré qu'en modifiant l'une des deux terminaisons, il est possible d'induire une légère préférence pour un sens d'hélice. Le ratio des deux populations d'hélices (*P*) et (*M*) devient alors différent de 1. Il est aussi possible d'induire une préférence pour un sens d'hélice en formant un complexe 1:1 entre l'oligourée *meso* et un anion chiral, le Boc-D-proline.³⁶ Cette reconnaissance d'anion a été parallèlement mise en évidence dans une étude menée par notre groupe et publiée en 2016 par V. Diemer *et al.* Il a alors été prouvé que la reconnaissance d'anion par une hélice d'oligourée s'effectue spécifiquement sur un site dédié de l'hélice : l'urée terminale située du côté positif du macrodipôle de l'hélice-2,5 (côté « N-terminal ») (Figure III.12).³⁷

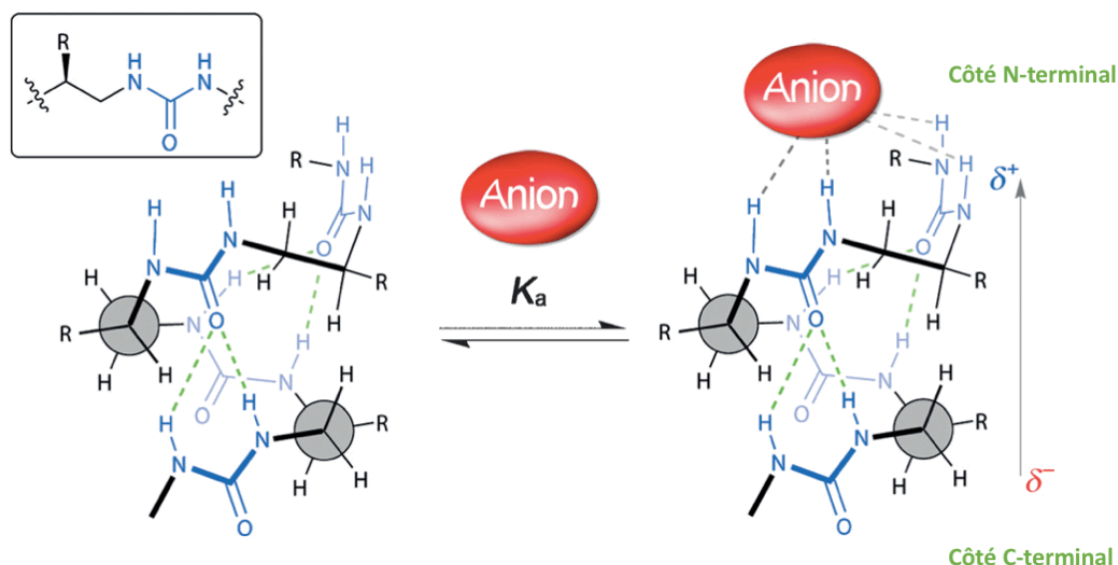


Figure III.12 : Schéma de principe de la reconnaissance d'anion par le pôle positif du macrodipôle de l'hélice-2,5 d'oligourée.

Plus récemment, J. Clayden *et al.* ont publié une nouvelle étude sur les oligourées *meso*. Ils ont montré qu'en choisissant des terminaisons ayant des propriétés de donneurs de liaisons hydrogènes différentes, il était possible de moduler le sens d'enroulement de l'hélice.³⁸ Ces oligourées désymétrisées seront appelés dans notre étude *pseudo-meso*. Ainsi, la terminaison qui est le meilleur donneur de liaisons H se retrouve du côté négatif du macrodipôle de l'hélice, à l'inverse le meilleur accepteur de liaisons H se retrouve du côté positif. Par exemple, si une urée est placée à l'une des extrémités de l'oligourée *pseudo-meso* et qu'un carbamate est située à l'autre extrémité, alors l'extrémité urée se situera du côté négatif du macrodipôle car c'est un meilleur donneur de liaisons H. Les populations relatives des deux conformères, dans lesquels chaque terminaison fonctionne soit en tant que C- terminale (groupement donneur de liaisons H) soit en tant que N- terminale (groupement accepteur de liaisons H), varient alors en fonction des propriétés de donneurs de liaisons H des groupements terminaux.

Dans cette même étude, J. Clayden *et al.* ont observé qu'en présence d'un excès d'anion (achiral cette fois-ci : phosphate, acétate ou chlorure), le sens d'hélicité de ces oligourées *pseudo-meso* s'inversait, passant d'une hélice (*P*) à une hélice (*M*). L'origine de cette inversion de l'hélice (*P*) à (*M*) peut se comprendre en considérant les sites de liaisons possibles de l'anion sur l'oligourée *pseudo-meso*. En effet, l'hélice (*M*) expose deux NHs du côté positif de son macrodipôle (terminaison urée) alors que l'hélice (*P*) n'expose qu'un seul NH du côté positif du macrodipôle de l'hélice (terminaison carbamate). Ainsi puisque la reconnaissance d'anion se fait spécifiquement du côté positif du macrodipôle et que c'est

l'hélice (*M*) qui possède le macrodipôle positif avec le meilleur site de coordination pour l'anion alors pour satisfaire la coordination de l'anion, les populations d'hélices (*P*) et (*M*) s'inversent. Cette inversion du sens d'hélicité a été caractérisée par dichroïsme circulaire.³⁸

Parallèlement à cette étude, nous avons initié de notre côté une étude sur des séquences *meso* et pseudo-*meso* qui seraient cette fois-ci construites à partir de sous unités chirales mais cette étude a longtemps été rendue difficile de part des problèmes synthétiques.

Pour conserver le caractère *meso*, ces nouvelles oligourées ont été conçues avec un plan de symétrie interne (Figure III.13).

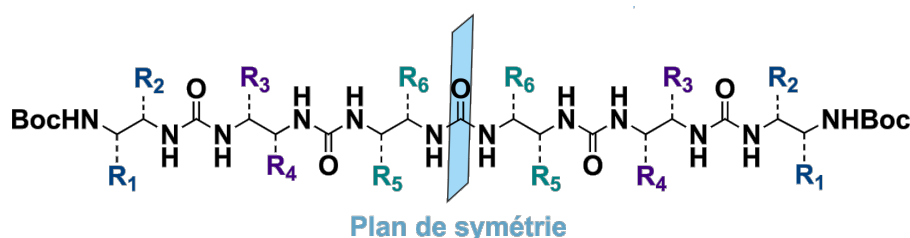


Figure III.13 : Représentation schématique des oligourées *meso* décrites dans cette thèse.

Ce nouveau design est intéressant car il est plus proche des systèmes biologiques et pourrait aussi à long terme permettre de concevoir des oligourées hydrosolubles équipées de chaînes latérales dérivées d'acides aminés naturels (Lys^u ou Glu^u par exemple).

a) Synthèse en solution des nouvelles oligourées *meso*

Les tous premiers essais de synthèse de ces oligourées avaient été réalisés sur support solide mais la terminaison NH(CO)NH₂ induisait des problèmes d'agrégaions et des difficultés de caractérisation des séquences. De plus, des limitations sur les possibilités de modification post-synthèse nous ont poussé à « revenir » sur une approche de synthèse en solution.

Ainsi, pour cette étude, trois oligourées *meso* (**OL11**, **OL12** et **OL13**) et quatre oligourées pseudo-*meso* (**OL14**, **OL15**, **OL16** et **OL17**) ont été synthétisées (Figure III.14). Afin de faciliter l'étude en comparant ces nouvelles oligourées avec des composés précédemment décrits, il a été décidé d'équiper ces oligourées *meso* de chaîne latérale de type Val^u, Ala^u et Leu^u (Figure III.14). Les oligourées ont été préparées en solution à partir de monomère énantiomériquement pur préalablement synthétisé (*c.f* partie expérimentale) dont les chaînes latérales sont situées soit en position α soit en position β du résidu urée (Figure III.14). Les séquences *meso* des oligourées **OL11**, **OL12** et **OL13** diffèrent les unes des

autres par les combinaisons possibles des configurations des chaînes latérales : **OL11** correspondant à (S)(S)(S)(R)(R)(R), **OL12** à (S)(S)(R)(S)(R)(R) et **OL13** à (S)(R)(S)(R)(S)(R).

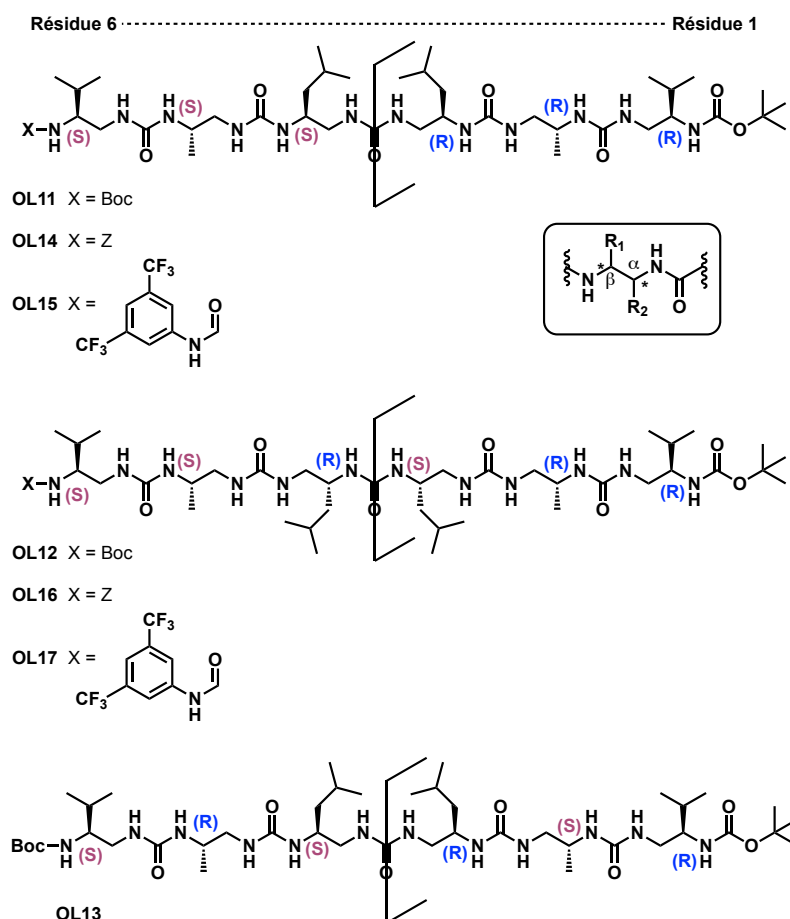


Figure III.14 : Structure chimique des oligourées *meso* **OL11-OL13** et pseudo-*meso* **OL14-OL17** synthétisé pour cette étude.

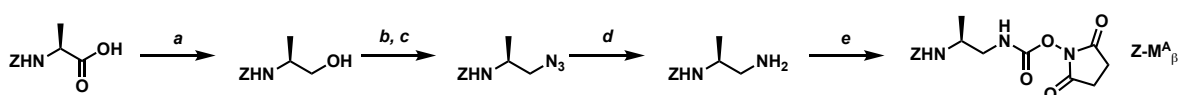
Pour préparer les différentes oligourées, des monomères activés sous la forme de carbamate de succinimide dont l'amine est masquée sous forme d'azoture ont été utilisés et la synthèse a été réalisée de manière conventionnelle de l'extrémité « C- terminale » vers l'extrémité « N-terminale ». La position et la configuration de la chaîne latérale ont donc été préalablement définies lors de la synthèse des monomères. Par exemple, dans l'oligourée **OL11**, le premier résidu a été préparé à partir de Boc-(D)-Val-OH commerciale en réduisant l'acide carboxylique en alcool avant de le convertir en azoture. Le Boc-NH de ce résidu a ensuite été considéré comme l'extrémité C-terminale. La chaîne latérale de ce premier résidu a donc été positionnée sur le CH_α du résidu urée avec une configuration (R). Une fois introduit, la configuration de la chaîne latérale du résidu est conservée tout au long de l'élongation de chaîne. L'azoture a ensuite été réduit par hydrogénation au palladium sur

charbon pour permettre le couplage du second résidu à l'aide du monomère de type (R)-Ala^u en présence de DIEA dans du DMF.

Malheureusement, nos premières tentatives pour synthétiser **OL11** en utilisant seulement des monomères de type azoture ont échoué. La réduction de l'azoture des dimère et trimère a bien fonctionné en conditions standard (H₂ 1 bar, 10% Pd-C). En revanche et de manière inattendu et quelque soient les conditions de réduction utilisées, la réduction de l'azoture du tétramère n'a conduit qu'à de très faible rendements. Ce manque de réactivité était inattendu et demeure inexpliqué étant donné qu'aucun problème comparable n'a été observé au laboratoire lorsque la stratégie azoture est utilisée en synthèse supportée.

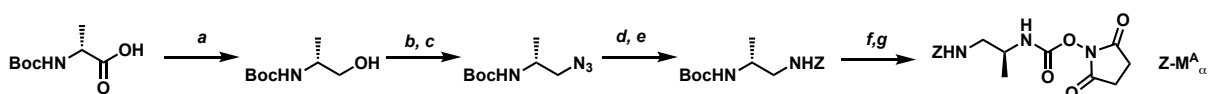
Pour pallier ce problème de réactivité chimique, nous avons repensé le choix de nos monomères en remplaçant l'azoture par un groupement protecteur de type benzyloxycarbonyle (appelé Z) à partir du tétramère. De nouveaux monomères activés de type **Z-M^X_{α/β}** (où X correspond au code à une lettre de l'acide aminé dont est issu le monomère et α/β correspond à la position de la chaîne latérale dans le résidu urée) ont donc été préparés et leur voie de synthèse est résumée dans la Figure III.15. Les rendements de synthèse des nouveaux monomères ainsi que le détail des procédures sont détaillés dans la partie expérimentale.

a)



a: *t*BuOC(O)Cl, NMM, THF, -10°C; b: Et₃N, MsCl, DCM; c: NaN₃, DMF, 80°C; d: PPh₃, THF/H₂O, 70°C; e: DSC, DCM

b)



a: *t*BuOC(O)Cl, NMM, THF, -10°C; b: Et₃N, MsCl, DCM; c: NaN₃, DMF, 80°C; d: PPh₃, THF/H₂O, 70°C; e: Et₃N, BnOC(O)Cl, DCM; f: TFA; g: DSC, DCM

Figure III.15 : Synthèse des monomères activés de type **Z-M^X_{α/β}** à travers l'exemple des monomères de type alanine urée.

Une fois ces nouveaux monomères en main, les oligourées **OL11**, **OL12**, **OL13**, **OL14** et **OL16** ont été assemblées en suivant la méthodologie de synthèse présentée en détail dans la Figure III.16 et décrite pour la préparation d'**OL11**, **OL14** et **OL15**. La synthèse débute par l'hydrogénation de l'azoture du premier monomère suivi du couplage du résidu suivant réalisé en présence de DIEA. Ces deux étapes sont répétées jusqu'à l'obtention du trimère. L'azoture du trimère est ensuite réduit par hydrogénation puis le quatrième résidu est

couplé sous la forme d'un monomère de type $\mathbf{Z-M}^{\alpha/\beta}$ (Figure III.16). Ces étapes sont répétées en choisissant judicieusement les monomères activés de façon à contrôler la configuration et la position des chaînes latérales. Une purification sur colonne chromatographique a été réalisée après le couplage de chaque résidu de façon systématique. Au cours d'une première tentative de synthèse en suivant cette méthodologie, nous avons observé qu'une synthèse sans purification intermédiaire ne permettait pas d'isoler l'hexamère désiré avec succès. Chaque intermédiaire a donc été purifié et isolé. Les autres oligomères ont été synthétisés de manière similaire avec des rendements globaux pour les composés **OL11**, **OL12**, **OL13**, **OL14**, **OL15**, **OL16** et **OL17** de 21%, 15%, 2%, 18%, 40%, 4% et 30% respectivement. Les rendements plus faibles de certaines synthèses soulignent des difficultés de couplage probablement dues à l'agrégation de certains intermédiaires en particulier pour la série de composés de type (S)(S)(R)(S)(R)(R) : **OL12**, **OL16** et **OL17**.

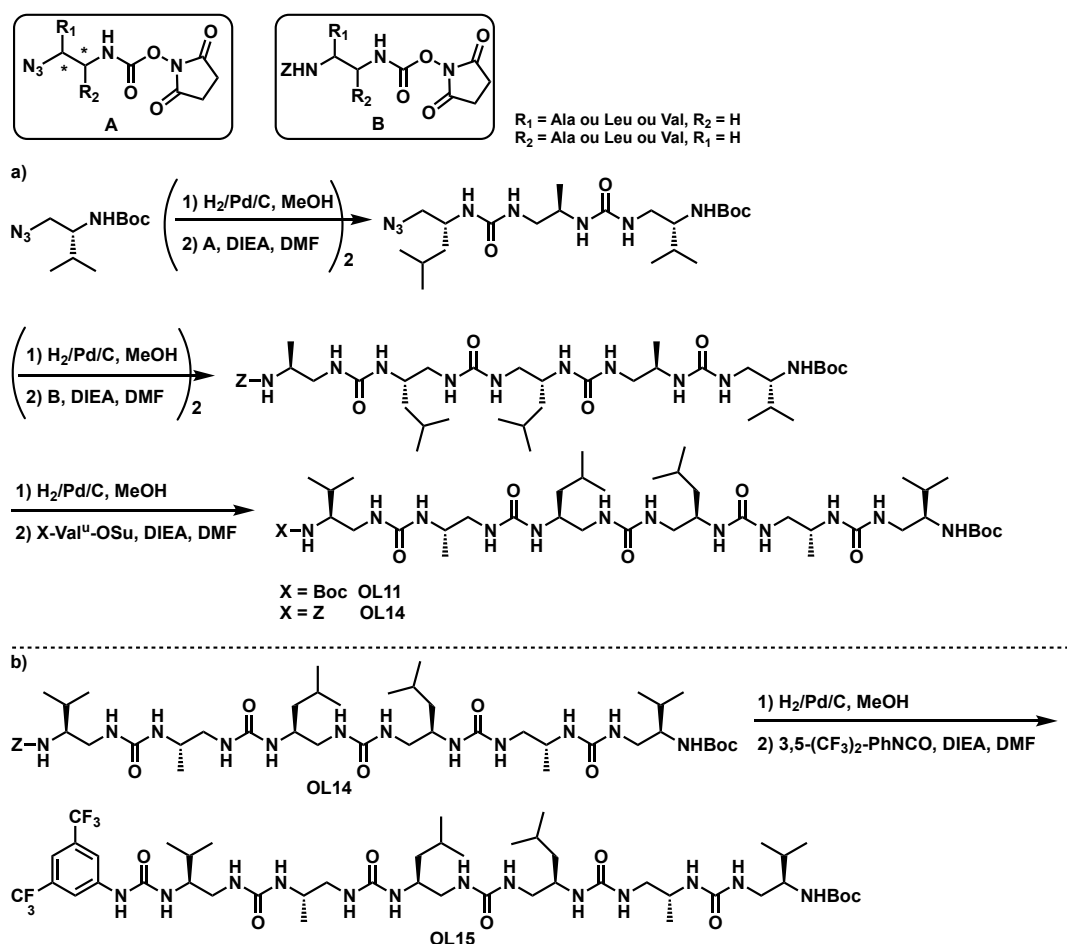


Figure III.16: (a) Méthodologie de synthèse en solution utilisée pour préparer **OL11** et **OL14**. (b) Modification post-réactionnelle d'**OL14** pour synthétiser **OL15**.

Une fois cette série d'oligourées en main, leur mode de repliement en solution en utilisant différentes techniques spectroscopiques (CD, RMN) et à l'état solide (diffractions des rayons X) a été étudié.

b) Etude conformationnelle en solution et à l'état solide

i) Par RMN

Si une hélice-2,5 est formée en solution, le spectre RMN du proton (^1H) d'une oligourée doit présenter une forte dispersion des jeux de signaux correspondant aux NHs des urées. De plus, comme évoqué dans le chapitre 1, les deux protons méthylène $\text{CH}_{2\alpha}$ ou β (selon le positionnement de la chaîne latérale sur le motif éthylène diamine) de la chaîne principale doivent être bien distincts et leur écart de déplacement chimique ($\Delta\delta$) proche ou supérieur à 1, car placé dans un environnement hélicoïdal, ces protons possèdent en effet un fort degré d'anisochronicité. Les oligourées **OL11-17** ont donc été analysées par RMN dans de l'acétonitrile- d_3 et des expériences RMN à deux dimensions : COSY, TOCSY et ROESY ont été réalisées de façon à réaliser l'attribution complète de tous les systèmes de spin lorsque cela a été possible. De cette façon, nous avons mesuré l'écart de déplacements chimiques entre les protons CH_2 de la chaîne principale pour chaque résidu pour les oligourées dont l'attribution complète a pu être réalisée (Table III-1).

Dans un premier temps, nous avons analysé en RMN du proton (^1H) les spectres des oligourées *meso* **OL11**, **OL12** et **OL13**. Puisque ces trois séquences ont été conçues avec un plan de symétrie, on s'attend à n'observer que la moitié des signaux en RMN ^1H . Le spectre RMN du composé **OL11** présente une région NHs répartie entre 5,2 ppm et 6,2 ppm (Figure III.17.a) avec des $\Delta\delta$ supérieur à 1 ppm pour les CH_2 des résidus Leu^u et Ala^u (Table III-1). En revanche, le spectre ^1H de l'oligourée **OL12** a été plus complexe à analyser et son attribution n'a pu être réalisée complètement (Figure III.17.b). Cette difficulté d'attribution des signaux reflète une structuration moindre et la potentielle agrégation due à la proximité des deux chaînes latérales Leu^u (possible gêne stérique). Le composé **OL13** présente quant à lui une région NHs répartie entre 4.4 et 5.8 ppm avec des $\Delta\delta$ supérieur à 1 ppm pour les CH_2 des résidus Leu^u et Ala^u (Table III-1). Il semble donc que les oligourées **OL11** et **OL13** aient un comportement similaire en RMN.

Dans le but d'étudier la possibilité d'induction d'hélicité, nous avons ensuite analysé par RMN les pseudo *meso* **OL14-OL17** à température ambiante. Les séquences **OL14** et **OL16** sont toutes les deux équipées de deux terminaisons carbamates, l'une Z et l'autre Boc alors qu'**OL15** et **OL17** possèdent une terminaison Boc et une terminaison 3,5-

bis(trifluorométhyl)phenylurée qui a été introduite dans le but de maximiser l'induction d'hélicité (Figure III.14). La comparaison des spectres ^1H des composés **OL11**, **OL14** et **OL15** montre un changement drastique dans la zone des NHs urées lorsque la symétrie du composé est rompue (Figure III.17.a). Une tendance similaire a été observée avec les composés **OL12**, **OL16** et **OL17** mais de façon plus modérée due à une probable agrégation évoquée précédemment sur cette série de composés (Figure III.17.b).

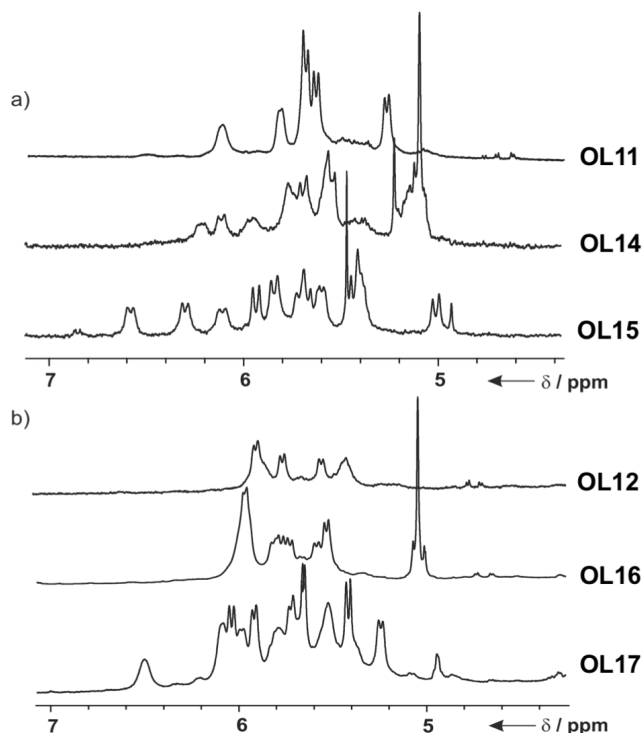


Figure III.17 : Zoom sur la région des NHs urées des spectres ^1H RMN (CD_3CN , 400 MHz) de (a) **OL11**, **OL14** et **OL15** et (b) **OL12**, **OL16** et **OL17**.

De plus, si le composé **OL14** montre un éclatement modéré des signaux de la région des NHs, la dispersion des signaux NHs du composé **OL15** est quant à elle significative avec des valeurs de déplacements chimiques comprises entre 5,0 ppm et 6,6 ppm. **OL15** présente aussi des écarts de déplacements chimiques élevés des protons CH_2 ($\Delta\delta > 1$ pour 5 résidus sur 6) (Table III-1). En revanche, le composé **OL17** présente de faibles écarts de déplacement chimiques des protons CH_2 pour 5 résidus sur 6, ce qui corrobore l'hypothèse d'agrégation formulée précédemment. Dans la Table III-1, une oligourée de référence a été incluse (**OL18** : Boc-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe)³⁹ afin de pouvoir comparer les valeurs de $\Delta\delta$ des oligourées *meso* et *pseudo-meso* avec ceux d'une oligourée dont la conformation est une hélice-2,5 (*P*).

Table III-1 : Valeurs calculées des $\Delta\delta$ des oligourées *meso* **OL11-13** et pseudo-*meso* **OL14-17** où les résidus ont été numérotés de la droite vers la gauche (**Figure III.14**).

Oligourées	Val ^u ₁	Ala ^u ₂	Leu ^u ₃	Leu ^u ₄	Ala ^u ₅	Val ^u ₆
OL11	0,51	1,03	1,20	-	-	-
OL12^a	n.d	n.d	n.d	-	-	-
OL13	0,72	1,32	1,36	-	-	-
OL14^c	1,2-	1,05	1,5-	0,8	1,03	0,46-
OL15	1,04	1,27	1,32	1,35	1,43	0,82
OL16^a	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
OL17^c	1,14	0,81	0,59	1,35	0,85	0,35
OL18^b	1,08	1,27	1,34	1,25	1,22	0,96

^aL'attribution complète des signaux n'a pas pu être réalisée et donc le calcul des $\Delta\delta$ n'a pas été possible.

^bCette oligourée a été incluse dans la Table à titre comparatif.³⁹

^cL'attribution de la position des résidus n'a pu être réalisée.

ii) Par dichroïsme circulaire (CD)

Étant donné que l'attribution complète des signaux des oligourées **OL12**, **OL16** et **OL17** n'a pu être réalisée en raison d'un chevauchement important de signaux NHs, nous avons par la suite focalisé notre attention sur des études conformationnelles par dichroïsme circulaire.

Pour étudier plus en détail, l'induction d'hélicité due à la désymétrisation d'**OL11**, les spectres CD des composés **OL14** et **OL15** ont été enregistrés dans du 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) à 0,2 mM. Le spectre CD d'**OL14** montre en effet une légère induction d'hélicité avec la présence des deux bandes caractéristiques de l'hélice-2,5 à 195 et 203 nm respectivement, à l'exception que ces deux bandes ont des maximums opposés comparés aux spectres CD connus des hélices-2,5 d'oligourées (Figure III.18). Ce changement de signe indique une préférence pour une hélice-2,5 (*M*) puisque le maximum à 203 nm est négatif. Cette induction d'hélicité est encore plus prononcée pour le composé **OL15** qui présente un maximum négatif à 203 nm. En comparaison, nous avons analysé dans les mêmes conditions le composé **OL19** qui est une oligourée de référence équipée des mêmes chromophores et des mêmes chaînes latérales (séquence : (CF₃)₂-PhNHCO-Val^u-Ala^u-Leu^u-Val^u-Ala^u-Leu^u-NHMe).⁵ On peut constater que l'intensité du signal CD de **OL15** est comparable à celle de **OL19** lorsqu'il est analysé dans le TFE à 0,2 mM (Figure III.18: intensité de -326025 et +397078 respectivement). En revanche, le spectre CD du composé **OL17** ne présente qu'une faible intensité, ce qui semble indiquer une faible structuration en hélice.

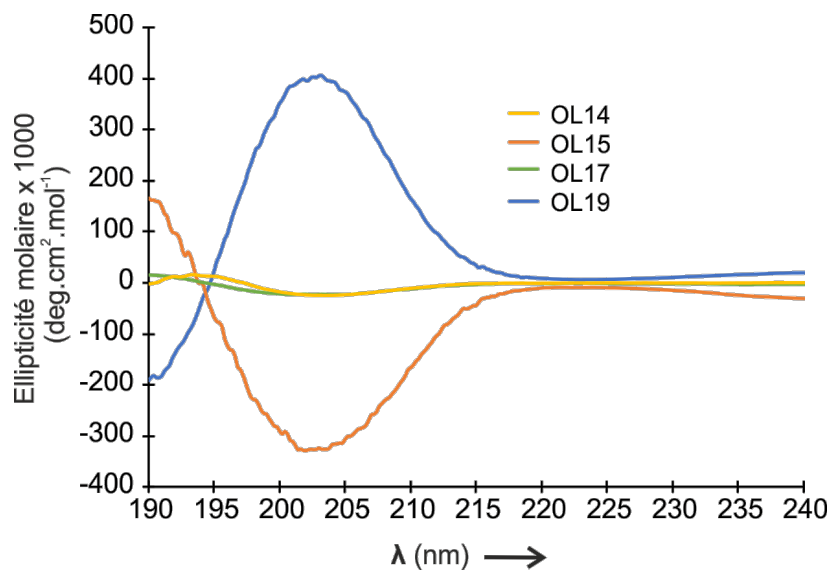


Figure III.18 : Comparaison des spectres CD des oligourées pseudo-meso **OL14**, **OL15**, **OL17** et de l'oligourée canonique **OL19**. Les spectres CD ont été mesurés à 0,2 mM dans le TFE.

Ces résultats CD montrent que la terminaison de type 3,5-bis(trifluorométhyl)phénylurée contrôle la direction du réseau de liaisons H de l'hélice-2,5 de **OL15** qui adopte une configuration gauche et confirment la faible structuration en hélice du composé **OL17**.

iii) Étude structurale par diffraction des rayons X

Après avoir étudié la structuration de nos oligomères en solution, la cristallisation de certains d'entre eux a permis d'obtenir des informations sur leur mode de repliement à l'état solide. Les oligomères **OL11**, **OL14** et **OL15** ont été cristallisés dans l'acétonitrile (Figure III.19). Malheureusement et malgré de nombreuses tentatives, les oligourées **OL12**, **OL16** et **OL17**, n'ont pu être cristallisés, ce qui pourrait être le signe d'une trop grande déformation ou absence de stabilité de l'hélice-2.5 et corroborerait les résultats obtenus par analyse RMN.

La structure d'**OL11** a été résolue dans le groupe spatial monoclinique I2/a avec une unité asymétrique (ASU) racémique comprenant 4 molécules de chaque énantiomère. La structure révèle un repliement partiel de l'hélice-2,5 (Figure III.19.a). De plus, la superposition d'un conformère (*P*) d'**OL11** avec la structure cristalline d'**OL18** confirme la différence structurale entre **OL11** et la structure de l'hélice-2,5 canonique (Figure III.19.b). On peut en effet observer qu'au-delà du quatrième résidu, la chaîne principale est projetée de 54,8° en direction opposée du positionnement du cinquième résidu de l'hélice-2,5 régulière ce qui se traduit par une perte des deux dernières liaisons H. Cette observation à

l'état solide est en accord avec la faible valeur de $\Delta\delta$ pour la Val^u₆ mesurée en RMN du proton pour le composé **OL11**.

Pour le pseudo-*meso* **OL14**, la structure aux rayons X a été résolue dans le groupe spatial P2 et comporte deux molécules dans l'unité asymétrique (ASU). La structure cristalline confirme les résultats obtenus en spectroscopie CD et montrent qu'**OL14** adopte une conformation hélicoïdale gauche (*M*) partielle induite par le caractère accepteur de liaisons H du carbamate Boc situé du côté « C-terminal » de l'hélice. Cependant, la structure révèle aussi une déstabilisation de l'hélice à partir du cinquième résidu avec une perte de la dernière liaison H entre le NH du benzylcarbamate terminal et le carbonyle de l'Ala^u₅ (Figure III.19.c) De plus, la structure d'**OL14** souligne une distorsion de la chaîne principale au niveau du résidu Ala^u₅ (soulignée en orange dans la Figure III.19.c).

En réalité, l'unité asymétrique d'**OL14** contient deux molécules d'eau qui forment un réseau des liaisons H intermoléculaires impliquant les fonctions NH de la quatrième urée et le carbonyle du résidu Leu^u₃ des deux molécules **OL14** présentent dans l'unité asymétrique et orientées de façon antiparallèle (Figure III.19.d). Cet arrangement dans le cristal est différent de ce qui a été précédemment observé pour les hélice-2,5 d'oligourées³⁹ et ces molécules d'eau induisent une modification dans la géométrie de la quatrième fonction urée qui devrait être incluse au réseau de liaison H intramoléculaire avec le NH-benzyl carbamate terminal.

Finalement le pseudo-*meso* **OL15** a cristallisé dans un groupe d'espace P4₃ avec quatre molécules dans l'unité asymétrique. La structure cristalline d'**OL15** confirme l'induction d'une hélice-2,5 gauche (*M*) où les deux extrémités terminales participent au réseau de liaisons H. Cette structure RX est donc en accord avec les résultats obtenus en CD et par RMN du proton. Il est intéressant de noter que l'unité asymétrique contient aussi une molécule d'eau, qui cette fois-ci relie par liaisons H le carbonyle de la 2^{ème} urée avec les NHs urées de la quatrième urée (Figure III.19.e).

Pour analyser plus en détail, le repliement d'**OL15**, nous avons généré son image par effet miroir (utilisation de *discovery studio visualizer 2016*), afin de pouvoir la superposer avec la structure d'**OL18** (Figure III.19.f). Les deux structures sont parfaitement identiques sur les trois premiers résidus puis la chaîne principale d'**OL15** dévie de celle d'**OL18**. Puisque la quatrième urée est engagée dans des liaisons H avec une molécule d'eau alors l'orientation de ses NHs est différente de celle du composé **OL18** ce qui force le reste de la molécule à se réarranger pour maintenir la conformation en hélice.

En conclusion, ces résultats ainsi que les analyses en solution confirment que l'introduction du groupe 3,5-bis(trifluorométhyl)phényle qui possède un effet électroattracteur fort, dû à la présence des groupements trifluorométhyle, amplifie l'acidité des NHs de la dernière fonction urée ce qui permet une bonne propagation du réseau de liaisons H le long de la chaîne de l'oligourée **OL15** et induit une sélectivité du pas de vis de l'hélice.

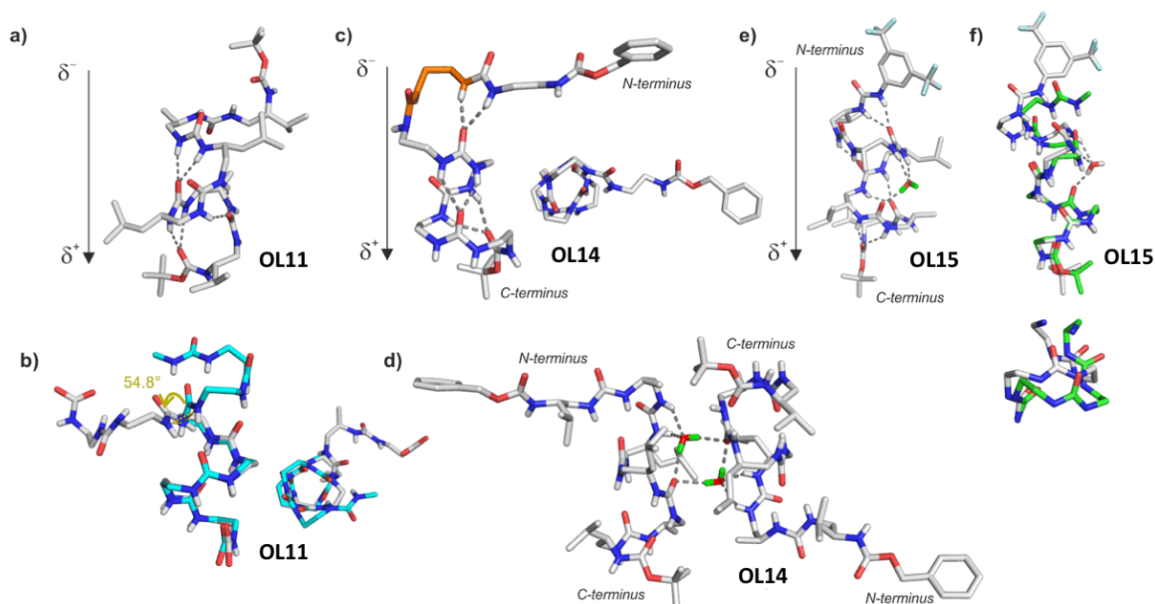


Figure III.19 : Comparaison des structures cristallines des oligourées **OL11**, **OL14** et **OL15** : a) structure cristalline du conformère (*P*) d'**OL11** présent dans l'unité asymétrique racémique ; b) superposition des structures d'**OL11** (gris clair) et d'**OL18** (cyan) montrant la distorsion de l'hélice d'**OL11** au-delà du quatrième résidu (les chaînes latérales ont été omises pour plus de clarté) ; c) Structure du conformère *M* d'**OL14** présent dans l'ACU où le réarrangement structural du squelette du 5^{ème} résidu (Ala^u₅) est représenté en orange (les chaînes latérales ont été enlevées pour plus de clarté) ; d) représentation des deux molécules d'**OL14** en position antiparallèle qui s'interconnectent avec les deux molécules d'eau ; e) Structure d'**OL15** soulignant l'interaction d'une molécule d'eau dans la structure (vert) et f) image miroir d'**OL15** en superposition avec **OL18**.

c) Reconnaissance d'anion et inversion du sens d'hélice

Dans la continuité de ces études structurales, nous avons souhaité évaluer la possibilité d'inverser le sens de l'hélice des composés **OL15** et **OL17** par reconnaissance d'anions. En effet, nous avons récemment mis en évidence que la reconnaissance d'anions par l'hélice-2,5 d'oligourée était site-spécifique et impliquait les NHs des deux urées positionnées du côté δ^+ du macrodipole de l'hélice et ne participant pas au réseau de liaison H intramoléculaire.³⁸ Nous avons donc supposé que cette reconnaissance spécifique pourrait

induire une réorganisation du réseau de liaisons H qui s'accompagnerait d'une inversion du sens de l'hélice-2.5 du composé pseudo-*méso* (Figure III.20).

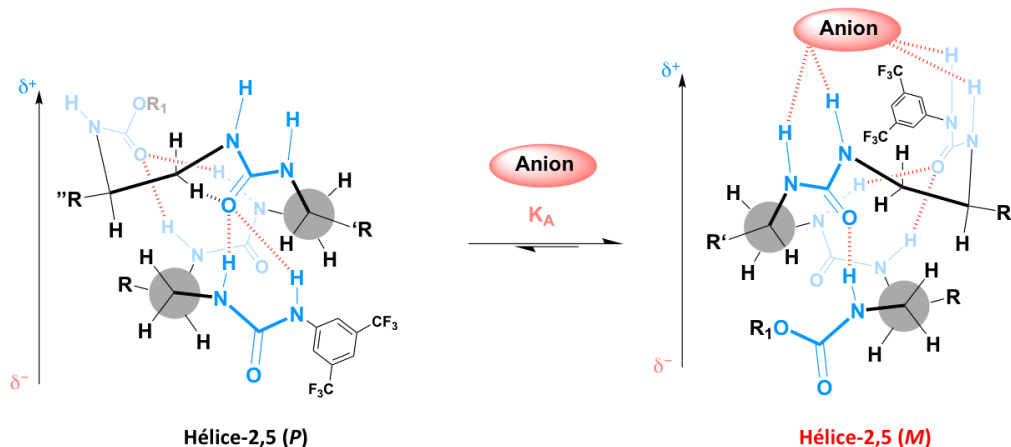


Figure III.20 : Schéma de principe de l'inversion du sens d'hélicité par reconnaissance d'anions sur le composé OL15.

Nous avons tout d'abord étudié la capacité du pseudo-*meso* **OL15** à reconnaître des anions achiraux. Cette étude a été réalisée par spectroscopie CD. Les spectres CD du composé **OL15** ont été enregistrés en présence de quantités croissantes (jusqu'à 15 équivalents) d'acétate de tétra-*N*-butylammonium (TBAOAc) dans l'acétonitrile à 25°C. Comme anticipé, cette série d'expériences a révélé que l'ajout d'anion acétate induisait une inversion de la courbe CD d'**OL15** (Figure III.21). Jusqu'à 1 équivalent, on observe une diminution du maximum négatif d'intensité à 203 nm qui devient positif à partir d'1,25 équivalents de TBAOAc et atteint un maximum positif avec 15 équivalents. Ce titrage d'anion a ensuite été corrélé à un modèle mathématique (*c.f* partie expérimentale) afin de déterminer la constante d'association du complexe oligourée/anion. Une valeur de K_D de l'ordre de 10^{-6} M a pu être déterminée et est en accord avec les valeurs précédemment décrites dans la littérature par l'équipe de J. Clayden.³⁸ Tout comme dans l'étude de J. Clayden décrite en introduction de cette partie, l'urée terminale présente du côté négatif du macrodipôle de l'hélice (*M*) est le meilleur site de coordination de l'anion. Or, comme la reconnaissance d'anion se fait de façon spécifique du côté positif de l'hélice, la coordination de l'anion induit une modification du ratio entre les deux hélice (*P*) et (*M*) rendant majoritaire l'hélice (*P*) de façon à positionner l'urée terminale du côté positif du macrodipôle se qui se traduit en CD par une inversion du signal à 203 nm.

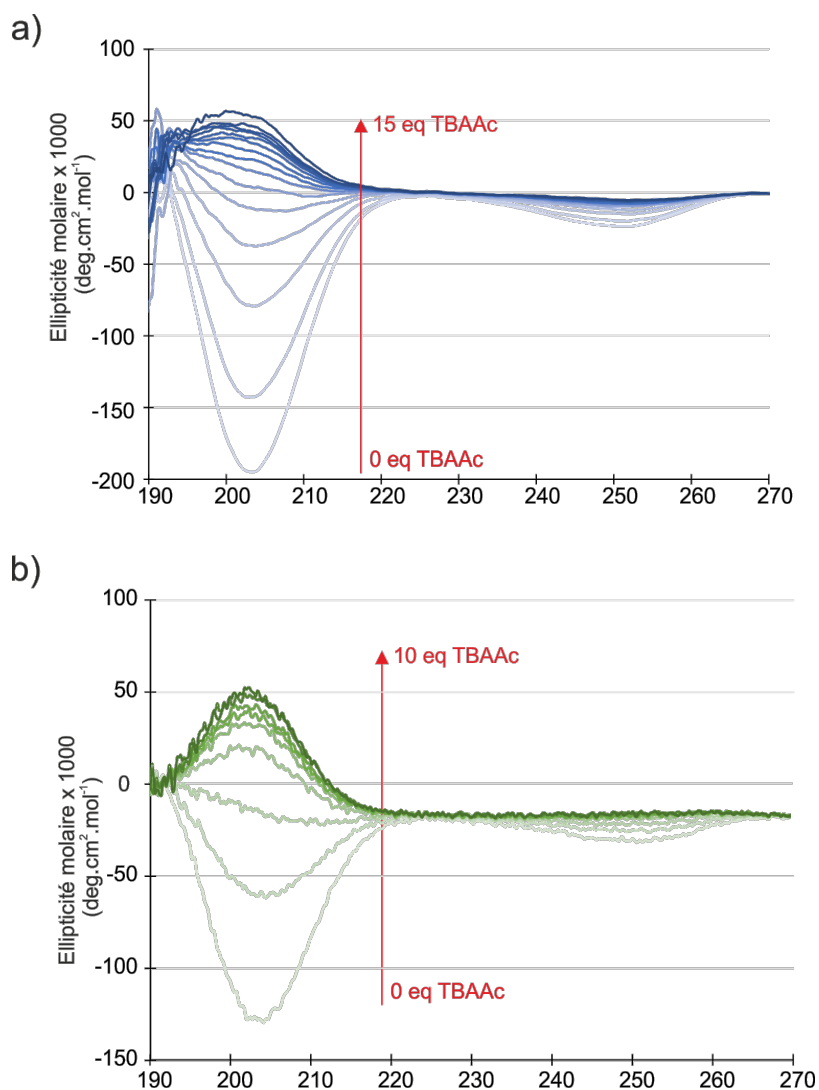


Figure III.21 : Inversion du maximum d'ellipticité à 203 nm sous ajout progressif de tétrabutylammonium acétate. Les courbes CD ont été enregistrées à 0,1 mM dans de l'acétonitrile à 25°C (a) Oligourée **OL15** et (b) oligourée **OL17**.

3) Conclusion et perspectives

En conclusion, les résultats obtenus sont ceux d'une première étude de cyclisation d'oligourées. Le développement d'une nouvelle résine acido-labile a permis de synthétiser plusieurs oligourées de différentes longueurs équipées de terminaison cystamine aux deux extrémités N- et C-terminales avec des rendements compris entre 10% et 35% selon la taille de l'oligourée. Différents macrocycles hydrosolubles composés de connecteurs de différentes tailles et compositions chimiques ont été préparés. Les premières données structurales révèlent que l'impact de la cyclisation sur la structuration de l'hélice-2,5 est dépendant de la nature du connecteur. Dans l'ensemble, la plupart des connecteurs testés jusqu'à présent exerce un effet déstabilisateur d'hélice oligourée à l'exception du connecteur aliphatique **C6** qui semble compatible avec la structuration en hélice-2,5 de l'oligourée **OL8**.

De plus, au cours de cette étude, de nouvelles oligourées *meso* construits à partir de sous unités chirales ont été développées et synthétisés en solution. Les études conformationnelles en solution et à l'état solide ont révélés que la modulation des groupements terminaux en N- et C- terminales permettait d'induire une directionnalité du réseau de liaisons H et donc un sens d'hélicité. De plus, il a été démontré que les pseudo-*meso* **OL15** et **OL17** étaient capables de reconnaître un ligand anionique et que cette reconnaissance d'anions induisait une inversion du sens d'hélicité. Des études futures viseront à adapter cette nouvelle stratégie de design à des oligourées hydro-solubles afin de peut-être pouvoir induire une inversion d'hélicité par reconnaissance d'un ligand biologique.

Bibliographie

- (1) Gellman, S. H. Foldamers: a manifesto. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31* (4), 173–180.
- (2) Collie, G. W.; Pulka-Ziach, K.; Lombardo, C. M.; Fremaux, J.; Rosu, F.; Decossas, M.; Mauran, L.; Lambert, O.; Gabelica, V.; Mackereth, C. D.; et al. Shaping quaternary assemblies of water-soluble non-peptide helical foldamers by sequence manipulation. *Nat. Chem.* **2015**, *7* (11), 871–878.
- (3) Guichard, G.; Huc, I. Synthetic foldamers. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (21), 5933–5941.
- (4) Bartus, É.; Hegedüs, Z.; Wéber, E.; Csipak, B.; Szakonyi, G.; Martinek, T. A. De novo modular development of a foldameric protein–protein interaction inhibitor for separate hot spots: a dynamic covalent assembly approach. *ChemistryOpen* **2017**, *6* (2), 236–241.
- (5) Bécart, D.; Diemer, V.; Salaün, A.; Oiarbide, M.; Nelli, Y. R.; Kauffmann, B.; Fischer, L.; Palomo, C.; Guichard, G. Helical oligourea foldamers as powerful hydrogen bonding catalysts for enantioselective C–C bond-forming reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (36), 12524–12532.
- (6) Teyssières, E.; Corre, J.-P.; Antunes, S.; Rougeot, C.; Dugave, C.; Jouvion, G.; Claudon, P.; Mikaty, G.; Douat, C.; Goossens, P. L.; et al. Proteolytically stable foldamer mimics of host-defense peptides with protective activities in a murine model of bacterial infection. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (18), 8221–8232.
- (7) Douat, C.; Aisenbrey, C.; Antunes, S.; Decossas, M.; Lambert, O.; Bechinger, B.; Kichler, A.; Guichard, G. A cell-penetrating foldamer with a bio reducible linkage for intracellular delivery of DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (38), 11133–11137.
- (8) Smith, C. A.; Ban, D.; Pratihari, S.; Giller, K.; Schwiegk, C.; de Groot, B. L.; Becker, S.; Griesinger, C.; Lee, D. Population shuffling of protein conformations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (1), 207–210.
- (9) Habchi, J.; Tompa, P.; Longhi, S.; Uversky, V. N. Introducing protein intrinsic disorder. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (13), 6561–6588.
- (10) Fuxreiter, M.; Tóth-Petróczy, Á.; Kraut, D. A.; Matouschek, A. T.; Lim, R. Y. H.; Xue, B.; Kurgan, L.; Uversky, V. N. Disordered proteinaceous machines. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (13), 6806–6843.
- (11) Wu, H.; Acharyya, A.; Wu, Y.; Liu, L.; Jo, H.; Gai, F.; DeGrado, W. F. Design of a short thermally stable α -helix embedded in a macrocycle. *ChemBioChem* **2018**, *19* (9), 902–906.
- (12) Wolfe, J. M.; Fadzen, C. M.; Holden, R. L.; Yao, M.; Hanson, G. J.; Pentelute, B. L. Perfluoroaryl bicyclic cell-penetrating peptides for delivery of antisense oligonucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (17), 4756–4759.
- (13) White, A. M.; Craik, D. J. Discovery and optimization of peptide macrocycles. *Expert Opin. Drug Discov.* **2016**, *11* (12), 1151–1163.
- (14) White, C. J.; Yudin, A. K. Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nat. Chem.* **2011**, *3* (7), 509–524.

- (15) Guarracino, D. A.; Riordan, J. A.; Barreto, G. M.; Oldfield, A. L.; Kouba, C. M.; Agrinoni, D. Macrocyclic control in helix mimetics. *Chem. Rev.* **2019**.
- (16) Iegre, J.; Ahmed, N. S.; Gaynord, J. S.; Wu, Y.; Herlihy, K. M.; Tan, Y. S.; Lopes-Pires, M. E.; Jha, R.; Lau, Y. H.; Sore, H. F. Stapled peptides as a new technology to investigate protein–protein interactions in human platelets. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (20), 4638–4643.
- (17) Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L. An all-hydrocarbon cross-linking system for enhancing the helicity and metabolic stability of peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (24), 5891–5892.
- (18) Vinogradova, E. V.; Zhang, C.; Spokoyny, A. M.; Pentelute, B. L.; Buchwald, S. L. Organometallic palladium reagents for cysteine bioconjugation. *Nature* **2015**, *526* (7575), 687–691.
- (19) Kalhor-Monfared, S.; Jafari, M. R.; Patterson, J. T.; Kitov, P. I.; Dwyer, J. J.; Nuss, J. M.; Derda, R. Rapid biocompatible macrocyclization of peptides with decafluoro-diphenylsulfone. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (6), 3785–3790.
- (20) Assem, N.; Ferreira, D. J.; Wolan, D. W.; Dawson, P. E. Acetone-linked peptides: a convergent approach for peptide macrocyclization and labeling. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2015**, *54* (30), 8665–8668.
- (21) Grison, C. M.; Burslem, G. M.; Miles, J. A.; Pilsl, L. K. A.; Yeo, D. J.; Imani, Z.; Warriner, S. L.; Webb, M. E.; Wilson, A. J. Double quick, double click reversible peptide “stapling.” *Chem. Sci.* **2017**, *8* (7), 5166–5171.
- (22) Lau, Y. H.; Andrade, P. de; Wu, Y.; Spring, D. R. Peptide stapling techniques based on different macrocyclisation chemistries. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (1), 91–102.
- (23) Kale, S. S.; Villequey, C.; Kong, X.-D.; Zorzi, A.; Deyle, K.; Heinis, C. Cyclization of peptides with two chemical bridges affords large scaffold diversities. *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 715–723.
- (24) Rogers, J. M.; Kwon, S.; Dawson, S. J.; Mandal, P. K.; Suga, H.; Huc, I. Ribosomal synthesis and folding of peptide-helical aromatic foldamer hybrids. *Nat. Chem.* **2018**, *10* (4), 405–412.
- (25) Ulysse, L.; Cubillos, J.; Chmielewski, J. Photoregulation of cyclic peptide conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (32), 8466–8467.
- (26) Beharry, A. A.; Woolley, G. A. Azobenzene photoswitches for biomolecules. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (8), 4422–4437.
- (27) Samanta, S.; Woolley, G. A. Bis-azobenzene crosslinkers for photocontrol of peptide structure. *ChemBioChem* **2011**, *12* (11), 1712–1723.
- (28) Kumita, J. R.; Smart, O. S.; Woolley, G. A. Photo-control of helix content in a short peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (8), 3803–3808.
- (29) Calce, E.; De Luca, S. The cysteine S-alkylation reaction as a synthetic method to covalently modify peptide sequences. *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23* (2), 224–233.
- (30) Douat-Casassus, C.; Pulka, K.; Claudon, P.; Guichard, G. microwave-enhanced solid-phase synthesis of

N,N'-linked aliphatic oligoureas and related hybrids. *Org. Lett.* **2012**, *14* (12), 3130–3133.

(31) Prats-Alfonso, E.; García-Martín, F.; Bayo, N.; Cruz, L. J.; Pla-Roca, M.; Samitier, J.; Errachid, A.; Albericio, F. Facile solid-phase synthesis of biotinylated alkyl thiols. *Tetrahedron* **2006**, *62* (29), 6876–6881.

(32) Echalié, C.; Al-Halifa, S.; Kreiter, A.; Enjalbal, C.; Sanchez, P.; Ronga, L.; Puget, K.; Verdié, P.; Amblard, M.; Martinez, J.; et al. Heating and microwave assisted SPPS of C-terminal acid peptides on trityl resin: the truth behind the yield. *Amino Acids* **2013**, *45* (6), 1395–1403.

(33) Yiannios, C. N.; Karabinos, J. V. Oxidation of thiols by dimethyl sulfoxide. *J. Org. Chem.* **1963**, *28* (11), 3246–3248.

(34) Bailly, B. A. F. L.; Clayden, J. Dynamic foldamer chemistry. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (27), 4852–4863.

(35) Violette, A.; Averlant-Petit, M. C.; Semetey, V.; Hemmerlin, C.; Casimir, R.; Graff, R.; Marraud, M.; Briand, J.-P.; Rognan, D.; Guichard, G. N,N'-linked oligoureas as foldamers: chain length requirements for helix formation in protic solvent investigated by circular dichroism, NMR spectroscopy, and molecular dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (7), 2156–2164.

(36) Wechsel, R.; Raftery, J.; Cavagnat, D.; Guichard, G.; Clayden, J. The meso helix: symmetry and symmetry-breaking in dynamic oligourea foldamers with reversible hydrogen-bond polarity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (33), 9657–9661.

(37) Diemer, V.; Fischer, L.; Kauffmann, B.; Guichard, G. Anion recognition by aliphatic helical oligoureas. *Chem. – Eur. J.* **2016**, *22* (44), 15684–15692.

(38) Wechsel, R.; Žabka, M.; Ward, J. W.; Clayden, J. Competing hydrogen-bond polarities in a dynamic oligourea foldamer: a molecular spring torsion balance. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (10), 3528–3531.

(39) Nelli, Y. R.; Antunes, S.; Salaün, A.; Thinon, E.; Massip, S.; Kauffmann, B.; Douat, C.; Guichard, G. Isosteric substitutions of urea to thiourea and selenourea in aliphatic oligourea foldamers: site-specific perturbation of the helix geometry. *Chem. – Eur. J.* **2015**, *21* (7), 2870–2880.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les peptides pénétrant les cellules (CPPs), peptides amphipathiques de charge nette généralement positive, sont d'importants agents de transport de biomolécules. En effet, il a été démontré que ces peptides sont capables d'acheminer différents types de molécules dans le milieu intracellulaire : sondes pour l'imagerie, petites molécules et peptides thérapeutiques, acides nucléiques et protéines. Ces peptides ont la capacité intrinsèque de pénétrer les cellules avec une faible toxicité *via* différents mécanismes cellulaires. Comparés à d'autres agents de transport comme les lipides cationiques ou les polymères, ils montrent une haute biocompatibilité, une plus faible toxicité, sont de taille et de composition définie et leur activité peut être facilement optimisée par de simples modifications de séquence. Néanmoins, ils possèdent aussi plusieurs inconvénients qui limitent aujourd'hui encore leur développement pharmaceutique, comme une faible stabilité protéolytique et un temps de demi-vie de seulement quelques minutes dans le sang.

Pour pallier ces limitations, la synthèse *de novo* de mimes synthétiques de CPPs s'est récemment développée. Cette recherche a notamment pu bénéficier de la conception de nouvelles architectures moléculaires, inspirées des biopolymères, que l'on appelle foldamères. Les foldamères combinent différentes propriétés leur permettant d'être de très bons candidats pour mimer les CPPs. Ils présentent une taille moyenne (contrairement aux polymères), une très forte prédictibilité de repliement, une modularité et une diversité de séquence et squelette, et une résistance à la protéolyse. Ainsi, la conception de foldamères pénétrant les cellules (CPFs) a été envisagée par plusieurs groupes de recherche. Des études ont été réalisées notamment avec des β -peptides, des oligoquinolines, des peptides hybrides constitués d'un mélange de (*L*) et (*D*) acides aminés mais aussi des hybrides α/β peptides. Malgré leur grande pluralité structurale, les exemples résumés dans le chapitre 1, mettent en évidence un nombre restreint de CPFs capables d'acheminer « véritablement » un cargo dans les cellules.

Au laboratoire, nous nous intéressons à une famille de foldamères peptidomimétiques à base d'urées capables d'adopter des structures en hélice-2,5 stabilisées par un réseau de liaisons hydrogènes intramoléculaires à trois centres. De précédents travaux ont montré que des oligourées à huit résidus dérivant de foldamères antimicrobiens possédaient une activité de transport de gènes *in vitro*. Ces oligourées sont capables de former des complexes non covalents avec des plasmides d'ADN. En particulier, l'oligourée **3** possède l'activité la plus intéressante. Il a été établi que l'introduction d'une fonction thiol du côté N-terminale de l'oligourée (composé **3SH** renommé **OL1** dans cette thèse) permettait une rapide homodimérisation du foldamère qui 1) améliore la formation du complexe foldamère/pADN et 2) permet un relargage efficace du cargo une fois dans la

cellule où le pont disulfure sera réduit. Ce dimère (**Dim1**) possède une efficacité de transport similaire à celle d'agents de transfection commerciaux comme le DOTAP et le PEI et comparable à celle du CPP LAH4, l'un des CPPs les plus efficaces décrits dans la littérature (Figure 1).

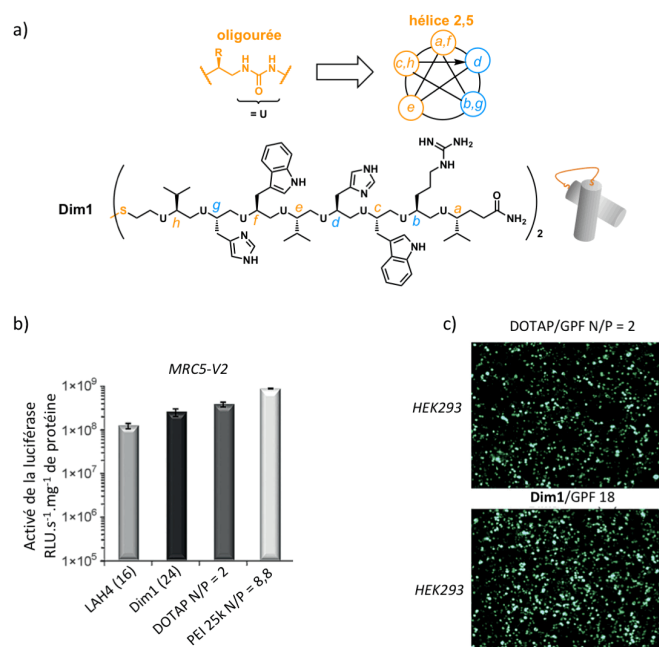


Figure 1 : (a) Séquence du dimère **Dim1** conçu pour adopter une structure hélicoïdale amphiphile et représentation schématique de la projection des chaînes latérales sur l'hélice-2,5 ; (b) efficacité de transport du plasmide exprimant la luciférase sur des cellules MRC5-V2 ; (c) expression de la protéine GFP 48h après transfection des cellules HEK293 avec des complexes pGFP/DOTAP ou pGFP/**Dim1**.

Ces résultats ont constitué la base de ce travail de thèse pour le développement d'une nouvelle génération de composés dans le but d'optimiser l'assemblage du complexe CPF/ADN, appelés « foldaplexe » mais aussi de pouvoir transporter d'autres biomolécules. Le premier volet de cette thèse, résumé dans le chapitre 2, a été consacré à la conception de nouvelles séquences CPFs, dérivées de la composition de l'oligourée **OL1**.

Tout d'abord, une nouvelle méthodologie de synthèse sur support solide avec une résine de type MBHA fonctionnalisée par un linker de type cystamine a permis la synthèse toujours en chimie Boc de nouveaux CPFs à base d'urées sans avoir recours à un clivage final à l'acide fluorhydrique. Cette nouvelle méthodologie offre un accès facile à des oligourées équipées d'une fonction thiol en C- terminale et permet leur fonctionnalisation post-synthèse. Ceci a permis de préparer tout d'abord l'hétérodimère **Dim2** issu du couplage *via* la formation d'un pont disulfure entre la séquence **OL1_{inv}** et **NCL** un ligand de la nucléoline (Figure 2). Ce nouveau CPF hybride a montré une activité de transport de gène comparable à celle d'agents de transfection commerciaux et concurrentielle de celle des CPPs parmi les plus

efficaces. De plus, ce nouveau CPF présente une haute stabilité en milieu enrichi en sérum avec aucune perturbation de son efficacité de transport contrairement aux CPPs contrôles (Figure 2). Les tests réalisés ont aussi montré que **Dim2** ne possède aucune cytotoxicité apparente. Ce nouvelle hybride CPF urée-peptide pourrait constituer une alternative pour pallier les limitations des CPPs. Des études futures viseront à déterminer si le mécanisme d'internalisation de ce CPF implique l'internalisation de la nucléoline de surface et si ce CPF présente une sélectivité pour les cellules cancéreuses.

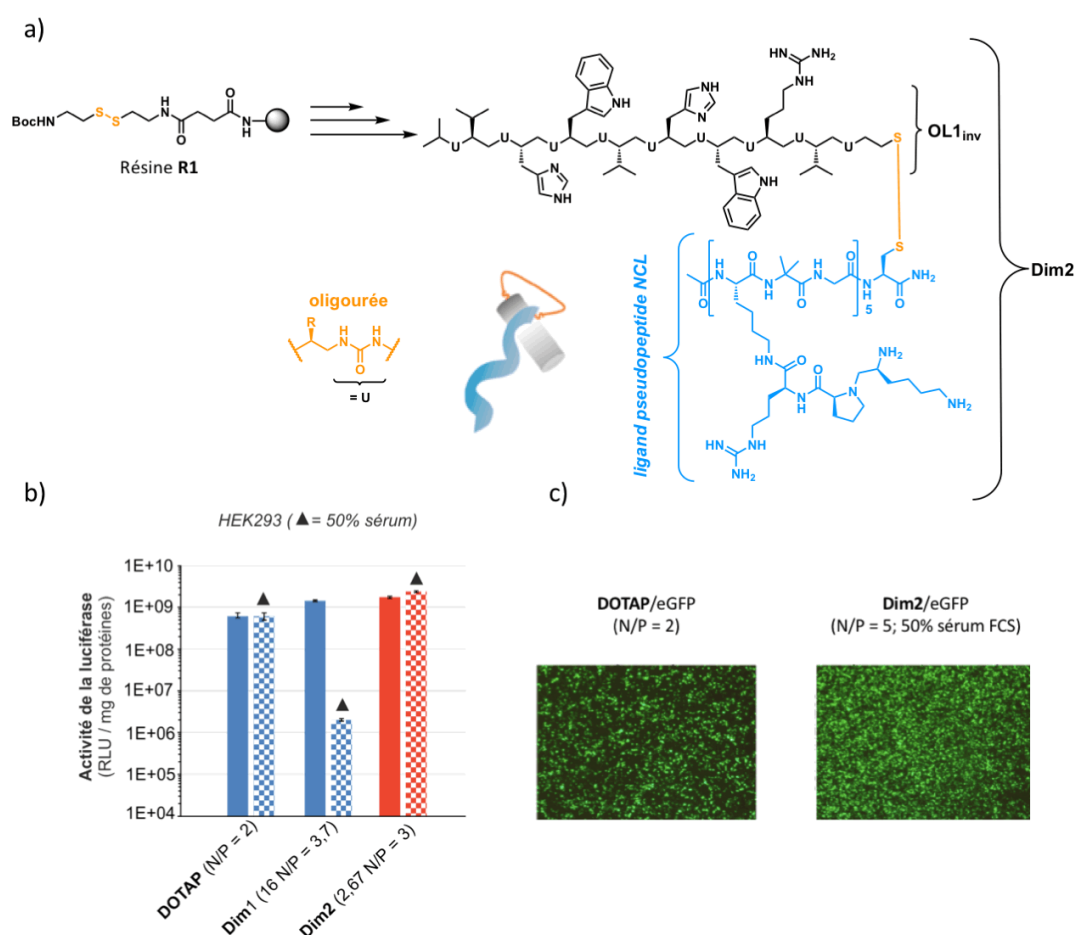


Figure 2 : (a) Nouvelle résine R1 utilisée pour la synthèse supportée des oligourées équipées d'une fonction thiol C- terminale et structure chimique de l'hétérodimère **Dim2** ; (b) Efficacité de transport du plasmide exprimant la luciférase sur des cellules HEK293 ; (c) expression de la protéine GFP 48h après transfection des cellules HEK293 avec des complexes DOTAP/pGFP ou **Dim2**/pGFP en présence de 50% de sérum.

Par la suite, des modifications dans la séquence de **OL1_{inv}** ont permis de préparer les oligourées **OL5** et **OL6** qui sont les tous premiers exemples de CPFs capables d'acheminer des siARNs dans les cellules. En effet, l'utilisation de ces petits ARNs est une stratégie thérapeutique en plein essor car ils permettent de bloquer l'expression d'une protéine cible. Développer des agents de transport de siARNs efficaces est donc essentiel pour leur développement pharmaceutique. Les nouveaux CPFs **OL5**, **Dim5** (homodimère d'**OL5**) et **OL6**

(Figure 3) ont tous les deux montré une activité de transport de siARN dans la lignée cellulaire A549-luc. Deux siARNs ont été acheminés efficacement dans le milieu intracellulaire : le siARN inhibant l'activité de la luciférase (siLuc) et un siARN thérapeutique ciblant l'expression de la Polo-Like kinase 1 (siPlk1) permettant ainsi d'induire la mort de cellules cancéreuses. Il a été démontré que l'efficacité de transport de ces nouveaux CPFs restait stable en milieu enrichi en sérum. De futures études viseront à confirmer ces résultats sur une plus large variété de lignées cellulaires.

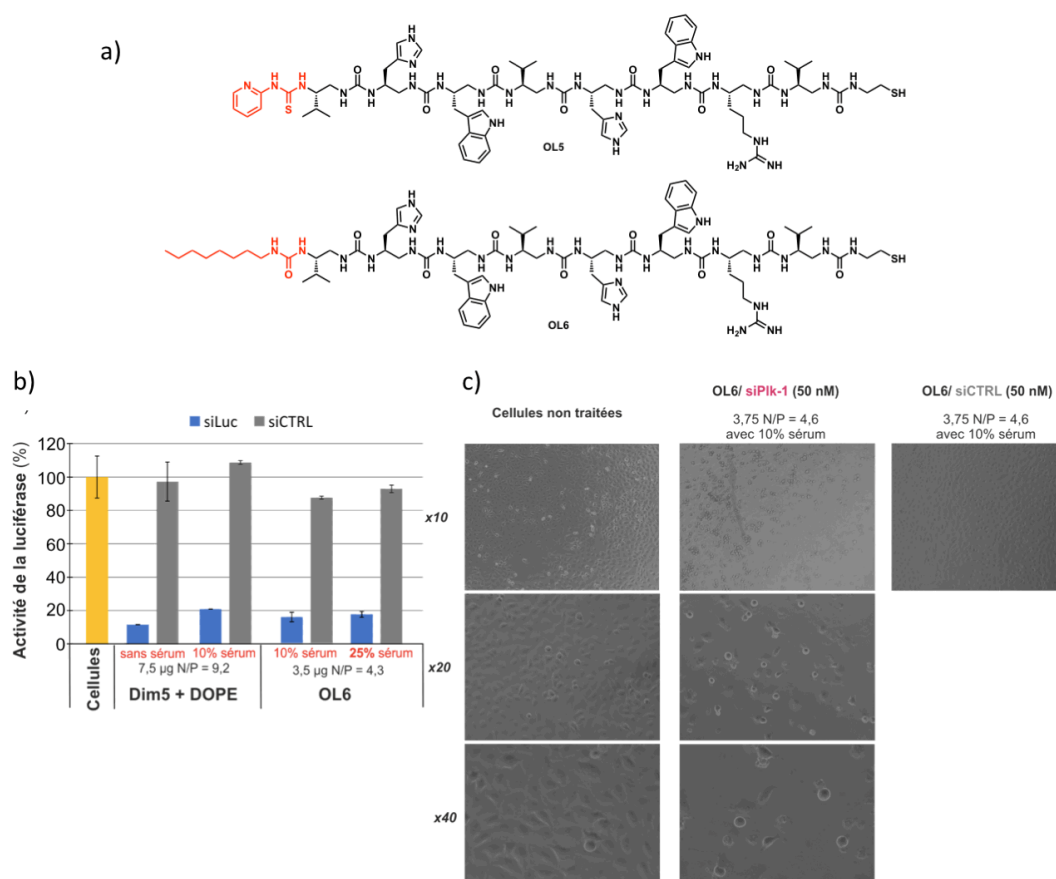


Figure 3 : (a) Structure chimique des CPFs **OL5** et **OL6** ; (b) Efficacité de transport de siLuc dans la lignée cellulaire A549-luc ; (c) images obtenues par microscopie de cellules A549-luc incubées avec les complexes **OL6/siPlk1** et **OL6/siCTRL**. La comparaison avec le contrôle permet d'observer l'impact du transport de siPlk1 sur la morphologie cellulaire.

Enfin, dans le chapitre 2, nous avons aussi montré que le dimère **Dim1_{inv}** transporte efficacement des protéines. Des tests de transport ont permis de mettre en évidence que ce CPF est capable de transporter efficacement trois protéines de taille (30 à 66 kDa) et de charge différente ($4,5 < pI < 9,5$) : la luciférase, la BSA (marquée à la fluorescéine) et la saporine une protéine thérapeutique. La saporine, a pu être acheminée efficacement dans trois lignées cellulaires (HCT116, U87 et HEK293) (Figure 4). De futures expériences viseront à transporter une protéine fluorescente avec un analogue fluorescent de **Dim1_{inv}** afin de

pouvoir co-localiser la protéine et le CPF et ainsi obtenir des informations sur la destination intracellulaire de nos composés. Enfin, nous essaierons aussi d'étendre ces résultats à d'autres protéines telles que la GFP et/ou des anticorps qui ont un intérêt thérapeutique.

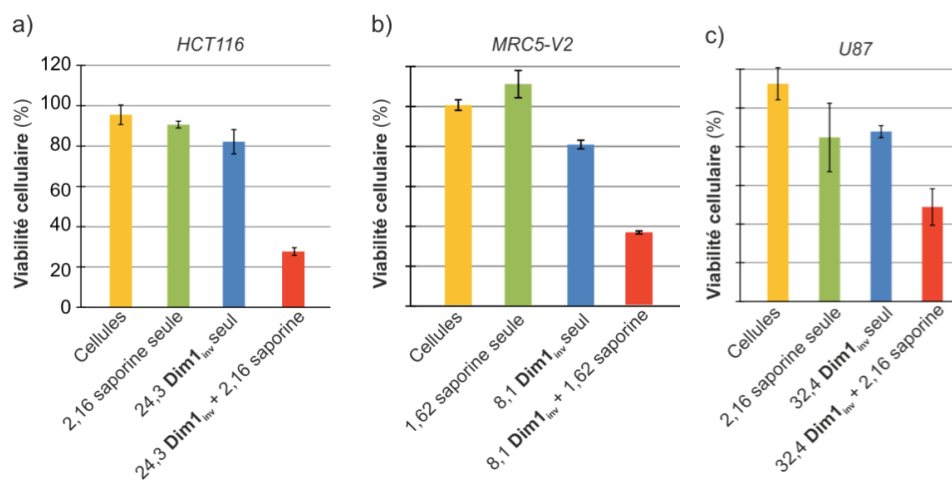


Figure 4 : Efficacité de transport de la saporine par le dimère Dim1_{inv} dans différentes lignées cellulaires.

La dernière partie de cette thèse, résumée dans le chapitre 3, s'est intéressée à moduler l'hélicité des foldamères oligourées afin d'étendre leur champ d'applications. Pour cela, nous avons étudié la plasticité de l'hélice-2,5 oligourée en préparant des macrocycles à base d'urées (Figure 5). Les résultats présentés sont ceux d'une toute première étude de cyclisation d'oligourées. Le développement d'une nouvelle résine acido-labile a permis de synthétiser sur support solide plusieurs oligourées de tailles variées (de 4 à 12 motifs urées) équipés de terminaisons cystéamine aux deux extrémités N- et C- terminales. Différents macrocycles hydrosolubles composés de connecteurs de taille et de composition chimique différente ont ensuite été construits en solution. Les premières données structurales obtenues par dichroïsme circulaire révèlent que l'impact de la cyclisation sur l'hélice-2,5 oligourée est dépendant de la nature du connecteur. Dans l'ensemble, la plupart des connecteurs testés exerce un effet déstabilisateur d'hélice à l'exception du connecteur aliphatique **C6** qui semble compatible avec l'hélice-2,5 de l'oligourée **OL8**.

De plus, au cours de cette étude, de nouvelles oligourées *meso* construites à partir de sous unités chirales ont été préparées en solution (Figure 5). Les études conformationnelles en solution et à l'état solide ont révélées que la modulation des groupements terminaux des oligourées pseudo-*meso* permettait d'induire un sens directionnel du réseau de liaisons hydrogènes et donc une préférence pour un sens d'hélicité. Alors que cette préférence est relativement insensible à la nature du solvant

utilisé (TFE ou acétonitrile), l'addition d'un excès d'anion (acétate de tétrabutylammonium) capable de se lier sélectivement du côté positif du macrodipôle de l'hélice, peut induire une inversion du sens de l'hélice de façon à exposer l'extrémité équipée du meilleur donneur de liaisons hydrogène du côté positif du macrodipôle (Figure 5). Cette inversion a été confirmée par des expériences de dichroïsme circulaire.

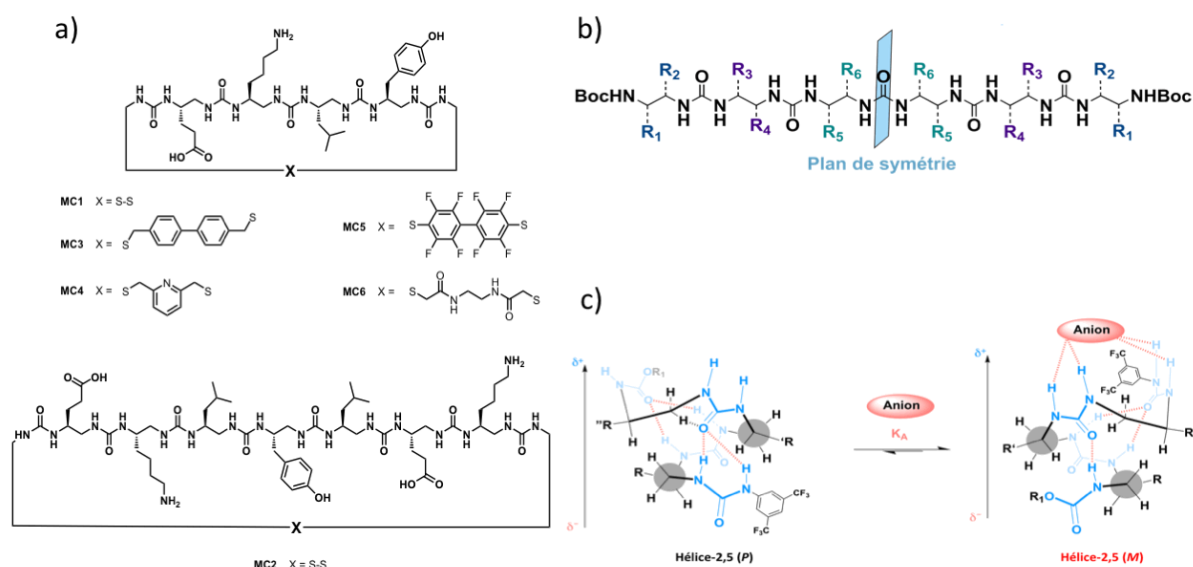


Figure 5 : (a) Structure chimique des macrocycles hydrosolubles synthétisés ; (b) représentation schématique des oligourées *meso* ; (c) schéma de principe de l'inversion du sens de l'hélice par reconnaissance d'anions.

Cette thèse a permis d'initier un certain nombre de nouveaux projets, comme l'étude d'oligourées macrocycliques et *meso*.

De plus, l'ensemble des données recueillies au cours de cette thèse forment une base solide pour la conception de nouveaux foldamères capable d'interagir avec des molécules biologiques, en particulier on pourrait envisager de concevoir des canaux membranaires puisque l'on a démontré que nos séquences sont capables d'interagir avec les membranes.

Enfin, l'utilisation des oligourées *meso* pourrait être étendue à la conception de composés hydrosolubles capables de moduler leur sens d'hélicité après reconnaissance d'un partenaire biologique. Ceci permettrait peut-être de concevoir des récepteurs biomimétiques artificiels.

Partie Expérimentale

CONTENTS

1) General methods	149
2) Experimental data of chapter 2	151
<i>a) Chemistry</i>	<i>151</i>
i) Synthesis of N- Boc protected O-succinimidyl carbamates monomers	151
ii) Synthesis of linkers	153
iii) Solid phase oligoureas and peptides synthesis under microwave irradiation:	154
General procedure A for solid phase oligourea synthesis under microwave irradiation using Boc strategy:	154
General procedure B for the solid phase synthesis of Cys-LAH4:	159
iv) General procedure C for the disulfide bridge homodimerization via NPys activation:	160
v) General procedure D for the disulfide bridge homodimerization via DMSO oxydation:	162
vi) General procedure E for the disulfide bridge heterodimerization :	164
<i>b) Biophysics and biology</i>	<i>168</i>
i) Transfection reagents and cell culture	168
ii) Preparation of the DNA complexes	169
iii) Preparation of the siRNA complexes	169
iv) Preparation of the protein complexes	169
v) DNA retardation assay	170
vi) Transfection experiments	170
pDNA transfection experiments	170
Transfection of HEK293 cells with GFP as reporter gene	170
Gene delivery in the presence of a proton pump inhibitor	171
Delivery of the siRNA targeting the luciferase	171
Silencing of Polo-like kinase 1	171
siRNA sequences used	172
Protein transduction experiments	172
Luciferase transduction experiments	172
BSA-FITC transduction experiments	172
Saporine transduction experiments	172
vii) Cell viability assays	173
MTT:	173
MTS :	173

Lactate deshydrogenase assay	173
viii) Total protein content	173
ix) Particle size and zeta potential measurements	174
c) <i>Transfection assays</i>	175
i) DNA transfection	175
ii) siRNA delivery	178
iii) Protein delivery	180
3) Experimental data of chapter 3	182
a) <i>Experimental data of macrocyclisation project</i>	182
i) Synthesis of azide O-succinimidyl carbamates monomers	182
ii) Synthesis of linkers	185
iii) Synthesis of bis-thiol oligoureas	186
General procedure F for solid phase oligourea synthesis under microwave irradiation using azide strategy:	187
iv) Synthesis of the macrocycles	190
b) <i>Experimental data of meso oligoureas project</i>	197
i) Synthesis of O-succinimidyl carbamates monomers	197
ii) Synthesis of meso and pseudo-meso oligoureas in solution:	202
iii) Titration experiments	224
Bibliography	226

1) General methods

Commercially available reagents were used throughout without purification. The solvents were purchased from Sigma Aldrich. THF and DCM were preliminary dried by passing through solvent drying system (SPS 800 Manual from MBraun). TFA was purchased from Sigma Aldrich. DMF and DCM for solid phase synthesis were purchased from Carlo Erba. RP-HPLC quality acetonitrile (CH_3CN) and MilliQ water were used for RP-HPLC analyses and purification. *N*-protected amino acids were purchased from Iris Biotech. Rink amide MBHA resin was purchased from Merck and 4-methylbenzhydrylamine (MBHA) from Polypeptide laboratories.

Thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F254 (Merck) with detection by UV light and charring with 1% w/w ninhydrin in ethanol (EtOH) followed by heating. Flash Column chromatography were carried out on silica gel (40-63 μm , Merck). Purification by automated combiflash were performed with the Teledyne Isco Combiflash Rf®.

Solid phase oligourea syntheses with microwave irradiation were carried out on a Discover System, or on the DiscoverBio System, from CEM (CEM μWaves S.A.S., Orsay, France).

Analytical RP-HPLC analyses were performed on a Dionex ultimate U3000 using a Macherey-Nagel Nucleur column (4.6 x 100 mm, 3 μm) at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was composed of 0.1% (v/v) TFA- H_2O (Solvent A) and 0.1% (v/v) TFA- CH_3CN (Solvent B). Semi-preparative purifications of oligoureas were performed on a Dionex ultimate U3000 using a Macherey-Nagel Nucleodor VP250/10 100-16 C18ec column (10 x 250 mm, 16 μm) at a flow rate of 4 mL/min. Preparative purifications of oligoureas were performed on a Gilson GX-281 using a Macherey-Nagel Nucleodor VP250/21 100-5 C18ec column (21 x 250 mm, 5 μm) at a flow rate of 20 mL/min.

^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on two different NMR spectrometers: (1) an Avance II NMR spectrometer (Bruker Biospin) with a vertical 7.05T narrow-bore/ultrashield magnet operating at 300 MHz for ^1H NMR observation and 75 MHz for ^{13}C NMR observation by means of a 5-mm direct BBO 1H/19F_XBB_H probe with Z gradient capabilities; (2) a DPX-400 NMR spectrometer (Bruker Biospin) with a vertical 9.4T narrow-bore/ultrashield magnet operating at 400 MHz for ^1H NMR observation by means of a 5-mm direct QNP $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}/^{19}\text{F}$ probe with gradient capabilities. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm, δ) relative to the ^1H or ^{13}C residual signal of the deuterated solvent used. ^1H NMR splitting patterns with observed first-order coupling are designated as singlet

(s), broad singlet (bs), doublet (d), triplet (t) or quartet (q). Not defined ^1H NMR splitting patterns are designated as multiplet (m). Coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz).

ESI-HRMS analyses were carried out on a ThermoElectron LCQ Advantage spectrometer equipped with an ion trap mass analyzer and coupled with a ThermoElectron Surveyor HPLC system or on an LC/MS system consisting of an Agilent 1290 Infinity liquid chromatograph coupled to an Agilent 6230 Time-of-Flight LC/MS equipped with an electrospray ion source from the Mass Spectrometry facility at the European Institute of Chemistry and Biology (UMS 3033-IECB), Pessac, France.

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

$$[\theta] = \frac{\psi \times 10^{-3}}{\text{nres} \times l \times C}$$

Where nres is the number of residues in the oligomer, l is the pathlength in cm, and C is the oligourea concentration in dmol.cm^{-3} .

For X-Ray diffraction studies, data collections were performed at the IECB X-ray facility (UMS 3033) on two different high flux microfocus Rigaku rotation anodes at the copper $k\alpha$ wavelength. Data were collected on a micromax MM07 (800W) equipped with osmic Varimax mirrors and a Dectris Pilatus 200 K hybrid detector. The crystals were mounted on cryo-loops after quick soaking on Paratone-N oil from Hampton research and flash-frozen. Both diffractometers have partial chi geometry goniometer allowing omega-scan data collections. The data were processed with the CrystalClear suite version 1.36 and 2.1b25 (CrystalClear (Rigaku/MS), 2006). All crystal structures were solved using direct methods implemented in SHELXD¹ and were refined using SHELXL 2013 version. Full-matrix least-squares refinement were performed on F^2 for all unique reflections, minimizing $w(\text{Fo}^2 - \text{Fc}^2)^2$, with anisotropic displacement parameters for non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were positioned in idealized positions and refined with a riding model, with Uiso constrained to 1.2 Ueq value of the parent atom (1.5 Ueq when CH_3). The positions and isotropic displacement parameters of the remaining hydrogen atoms were refined freely. SIMU and DELU commands were used to restrain some side chains as rigid groups and restrain their displacement parameters.

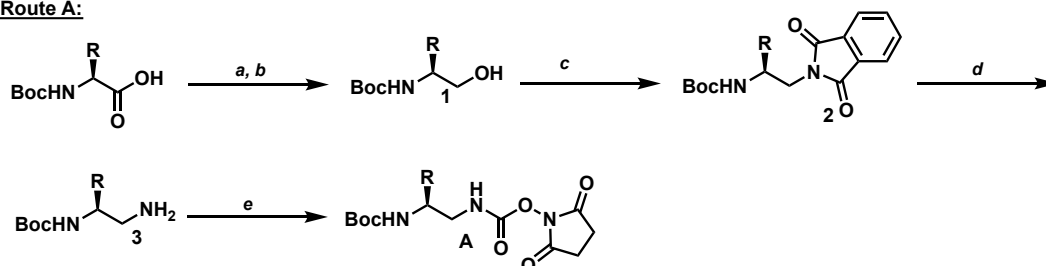
Melting points were measured in open capillary tubes on a Büchi Melting point B-545. Optical rotations were determined on a Jasco P-2000 polarimeter and are given as $[\alpha]_D$ (concentration in mg/mL solvent).

2) Experimental data of chapter 2

a) Chemistry

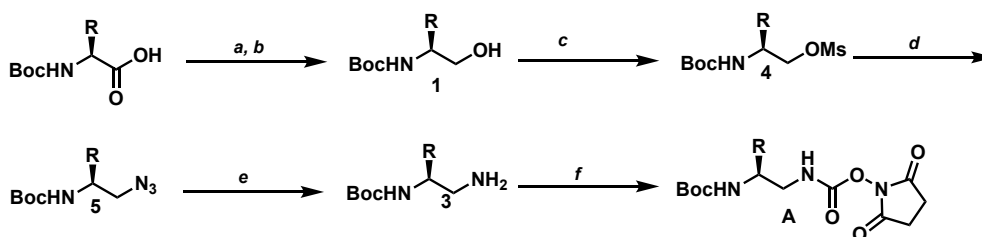
i) Synthesis of N-Boc protected O-succinimidyl carbamates monomers

Route A:



a: *t*BuOC(O)Cl, NMM, THF, -10°C; **b:** NaBH₄, H₂O; **c:** Phthalimide, PPh₃, DIAD, THF; **d:** H₂N.NH₂.H₂O, CH₃OH, 70°C; **e:** DSC, DCM

Route B:

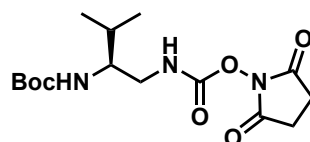


a: *t*BuOC(O)Cl, NMM, THF, -10°C; **b:** NaBH₄, H₂O; **c:** Et₃N, MsCl, DCM; **d:** NaN₃, DMF; **e:** PPh₃, THF:H₂O (8:2); **f:** DSC, DCM

Figure PE.1 : Procedure for the synthesis of N-Boc protected O-succinimidyl carbamates monomers.

Two different routes have been described for the preparation of N-Boc protected O-succinimidyl carbamates monomers depending on the nature of the side chain residue. Route B will be preferred for Orn(Alloc) side chain residue.²⁻⁴

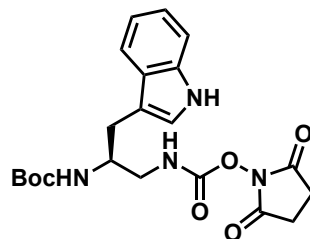
Tert-butyl-[(2S)-1-(((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)amino]-3-methylbutan-2-yl]carbamate (M^V):



Boc-Val-OH (15 g, 6.9 mmol) was transformed according to *Route A*. The product was precipitated in Et₂O to afford 9 g of Boc-Val^U-OSu as a white solid in 38% yield. The synthesis of this building block has been previously reported.⁵ ¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.02 (bs, 1H), 4.53 (bs, 1H), 3.57-3.38 (m, 2H), 3.23 (m, 1H), 2.80 (s, 4H), 1.86 (m,

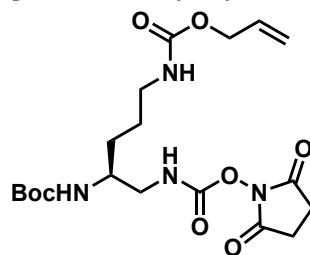
1H), 1.44 (s, 9H), 0.82 (t, 6H); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 169.7, 55.4, 45.5, 30.3, 28.3, 19.3, 18.1. MS (MALDI-TOF) m/z 383 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 367 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

***Tert*-butyl-N-[(2S)-1-((((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)amino)-3-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl]carbamate (M^{W}):**



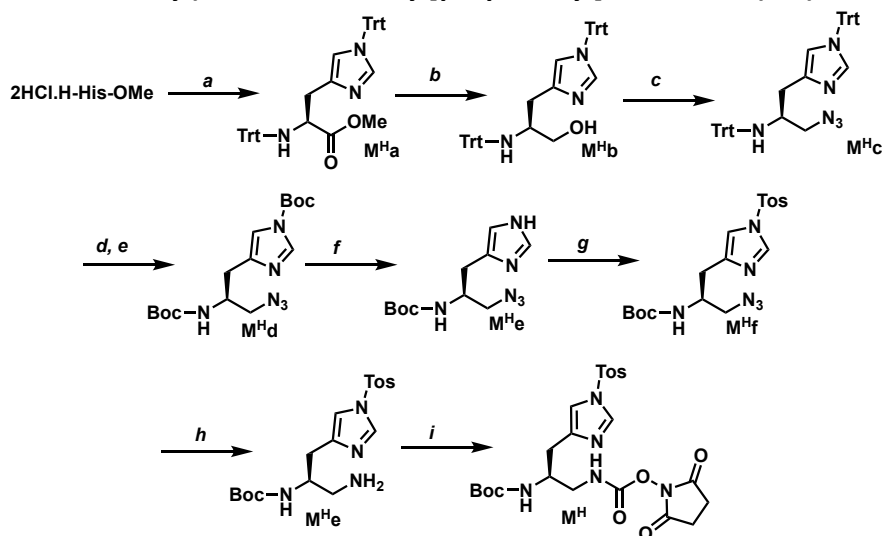
Boc-Trp-OH (10 g, 33 mmol) was transformed according to *Route A*. The product was precipitated in Et_2O / pentane (3:7) to afford 3 g of Boc-Trp^u-OSu as a brown solid in 18% yield. ^1H NMR (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 8.09 (bs, 1H), 7.58 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 7.35 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 7.11 (m, 2H), 7.07 (m, 1H), 6.01 (bs, 1H), 4.68 (bs, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.45 (m, 2H), 3.29 (bs, 1H), 2.98 (d, 2H), 2.80 (s, 4H), 1.42 (s, 9H); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 170.41, 152.52, 136.82, 132.74, 132.61, 129.19, 129.03, 128.00, 123.61, 122.76, 120.24, 119.23, 111.83, 111.22, 70.53, 66.42, 53.38, 51.28, 46.61, 28.85, 26.00, 15.82. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 431.1852, found 431.19255.

***Tert*-butyl-N-[(2S)-1-((((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)amino)-5-(((prop-2-en-1-yl)oxy)carbonyl)amino}pentan-2-yl]carbamate (M^0):**



Boc-Orn(Alloc)-OH (5 g, 16 mmol) was transformed according to *Route B*. The product was precipitated in Et_2O to afford 1.9 g of Boc-Orn^u(Alloc)-OSu as a white solid in 27% yield. ^1H NMR (300MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 6.00 (bs, 2H), 5.18 (m, 2H), 4.86 (bs, 1H), 4.54 (m, 2H), 3.71 (m, 1H), 3.18 (m, 4H), 2.81 (s, 4H), 1.60 (m, 4H), 1.45 (s, 9H); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$: 169.90, 156.60, 152.15, 133.06, 117.72, 65.65, 50.45, 46.66, 40.63, 29.48, 28.43, 26.59, 25.58. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. For $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{O}_8\text{N}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 443.20636 found 443.21339.

***Tert*-butyl-N-[(2*S*)-1-[[[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]carbonyl]amino]-3-[1(4-methylbenzenesulfonyl)-1*H*-imidazol-4-yl]propan-2-yl]carbamate (**M^H**):**



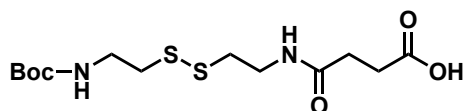
a: Trt-Cl, Et₃N, CH₃CN; **b:** LiAlH₄ powder, THF; **c:** DPPA, DBU, NaN₃, DMF, 65°C; **d:** 6M HCl, THF; **e:** (Boc)₂O, Et₃N, DMAP, CH₃CN/H₂O, 70°C; **f:** K₂CO₃, MeOH/H₂O; **g:** Ts-Cl, DMAP, Et₃N, DCM; **h:** Pd/BaSO₄, EtOAc; **i:** DSC, DCM

This experimental procedure is based on a procedure published by Nelli et al.²

M^H was prepared following the procedure described by Nelli et al.² The activated building block was recovered as a white solid (2.2 g, 70%). ¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.96 (d, 1H, J = 1.3 Hz), 7.85 (m, 2H), 7.40 (m, 2H), 7.14 (s, 1H), 6.51 (bs, 1H), 5.43 (bs, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.39-3.17 (m, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.80 (d, 2H, J = 5.8 Hz), 2.47 (s, 3H), 1.45 (s, 9H); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 170.0, 156.0, 152.0, 146.4, 140.3, 136.5, 134.7, 130.5, 127.4, 115.2, 79.8, 77.3, 49.9, 45.4, 29.9, 28.3, 25.5, 21.7. HRMS (ESI): *m/z* calculated for C₂₃H₃₀N₅O₃S [M+H]⁺, 536.1815, found 536.1805.

ii) Synthesis of linkers

3-([2-[(2-[[[(*tert*-butoxy)carbonyl]amino}ethyl)disulfanyl]ethyl]carbamoyl]propanoic acid (L1**):**



The synthesis of linker **L1** was realized by adapting the reported procedure by Sun et al.⁶ Cystamine dihydrochloride (5.0 g, 22.2 mmol) and DIEA (8.40 mL, 48.8 mmol) were dissolved in 250 mL of MeOH followed by the addition of di-*tert*-butyl dicarbonate [(Boc)₂O] (1.45 g, 6.66 mmol) and stirred 4 h at room temperature. After removal of MeOH by rotary evaporation, the crude material was dissolved in EtOAc and washed successively two times with water and brine and dried with anhydrous magnesium sulfate. After concentration of

the organic phase and drying under high vacuum pure mono N-Boc-protected-cystamine intermediate was obtained as a white compound (1.5 g, ρ = 89%) and was directly engaged to the next step.

Succinic anhydride (0.6 g, 5.95 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (0.22 g, 1.79 mmol) were dissolved in 50 mL of DCM followed by the addition of intermediate N-Boc protected cystamine and stirring was maintained overnight at room temperature. The reaction medium was next washed twice with 1M KHSO₄ aqueous solution, once with brine, dried with anhydrous MgSO₄ before evaporation under reduced pressure.

Linker **L1** was recovered as a white solid after high vacuum drying in 79% yield. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 11.90 (bs, 1H), 7.79 (t, 1H), 6.72 (t, 1H), 2.95 (q, 2H), 2.26 (m, 2H), 2.16 (m, 2H), 2.08 (m, 2H), 1.13 (s, 9H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ 173.79, 171.11, 155.51, 77.78, 37.99, 37.55, 37.26, 29.96, 29.08, 28.21. ESI-MS: calcd for C₁₃H₂₅N₂O₅S₂ [M + H]⁺ 353.1127; found 353.0808.

iii) Solid phase oligoureas and peptides synthesis under microwave irradiation:

General procedure A for solid phase oligourea synthesis under microwave irradiation using Boc strategy:

Oligomers were synthesized manually using Boc chemistry on a 50-100 μ mol scale starting from MBHA resin and under microwave irradiation. The first coupling step, consisted in the installation of linker **L1** and was performed with a solution of **L1** (3 eq) in DMF (3 mL), with BOP (5 eq) and DIEA (7 eq) as coupling reagents and the resin was shaken for 15 min at 70°C with a power of 25W. This step was performed twice and completion of the coupling was monitored by a Kaiser test. For each following coupling step, a solution of succinimidyl carbamate **A** (Figure PE.1) (1.5 eq) and DIEA (3 eq) in DMF (3 mL) was added to the resin, shaking was maintained for 15 min at 70 °C with a power of 25W. A double coupling was performed systematically. The resin was then filtered off and the resin was washed with DMF (5 $\times$ 2 mL). Completion of couplings was monitored with the chloranil test. Boc protecting group was removed using TFA (2 $\times$ 5 min). TFA was removed by filtration and the resin was washed with DCM (3 $\times$ 2 mL) and with DMF (3 $\times$ 2 mL). Finally, the resin was washed several times with DCM and dried under high vacuum.

Alloc deprotection on Orn^u side chain was performed by adding a solution of Pd(Ph₃)₄ (0.1 eq) in dry DCM (2 mL) under positive Argon atmosphere and phenylsilane (20 eq). The resin was mechanically shaken for 30 min. After resin filtration and washing with

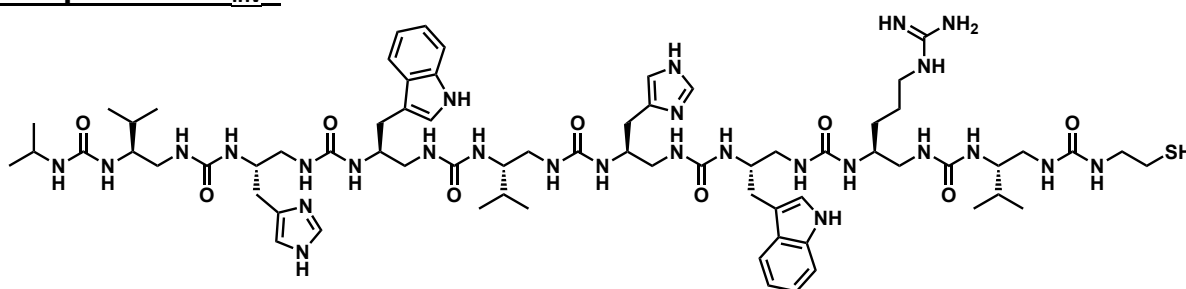
dry DCM (3×2 mL) this deprotection was repeated once in the same conditions. The resin was then washed several times with dry DCM (5×2 mL) and Kaiser's test indicated complete Alloc removal.

Guanidinylation of Orn^u side-chain was carried out in presence of 1H-pyrazole-1-carboxamide, HCl (5 eq) and DIPEA (5 eq.) in dry DMF (3 mL). The resin was mechanically shaken overnight and completion of the reaction was monitored with Kaiser's test.

τ -Tosyl protection on imidazole side chains was removed prior cleavage by using twice a solution of hydroxybenzotriazole (HOBt, 10 eq) in DMF for 15 min.

Oligourea release by disulfide bridge reduction was performed in the presence of 50 mM dithiothreitol solution (3 mL) in MeOH-Et₃N solvent mixture (11:1, v/v). The resin was mechanically shaken overnight at room temperature. The resin was then filtered off, washed several times with MeOH and the supernatant was evaporated. The crude was precipitated at 0°C with Et₂O and the recovered precipitate was solubilized in water/ACN solvent mixture to be freeze-dried. The crude oligourea was finally purified by preparative RP-HPLC using the appropriate gradient to a final purity >95% and freeze-dried.

Compound OL1_{inv} :



OL1_{inv} was synthesized on 75 μ mol scale, according to the general procedure **A** on Boc strategy. Yield after purification 18.5 mg, 13%. White powder; RP-HPLC t_R 3.64 min (linear gradient, 10-100% of B, 5 min, $\lambda = 200$ nm); HRMS calcd. for C₆₉H₁₁₂N₂₇O₉S [M+H]⁺ 1494.8857; found 1494.8882.

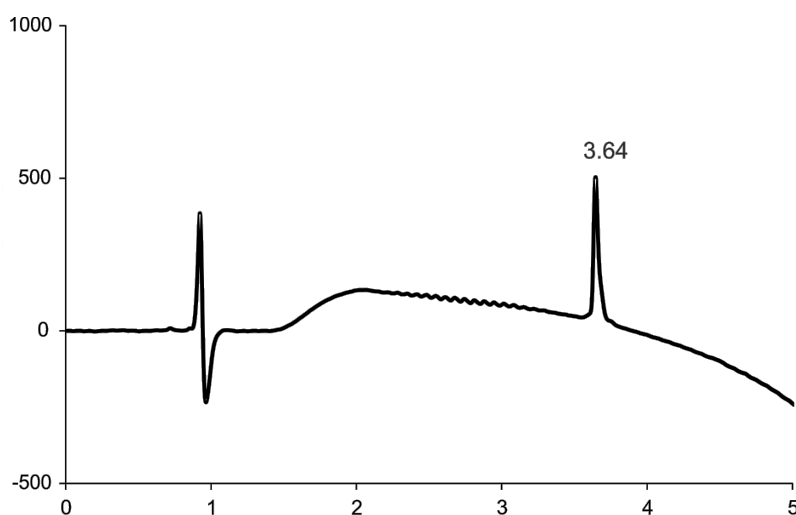


Figure PE.2 : RP-HPLC of **OL1_{inv}** after purification (10-100% of B in 5 min, $\lambda = 200$ nm).

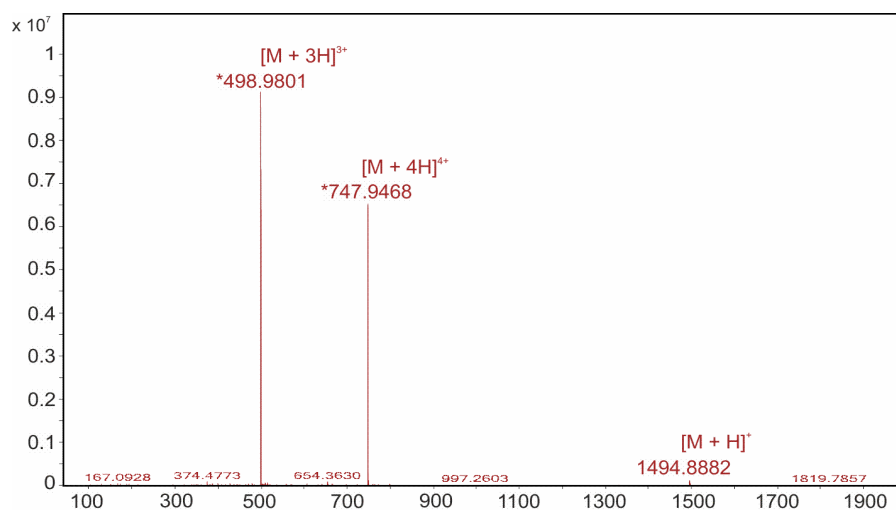
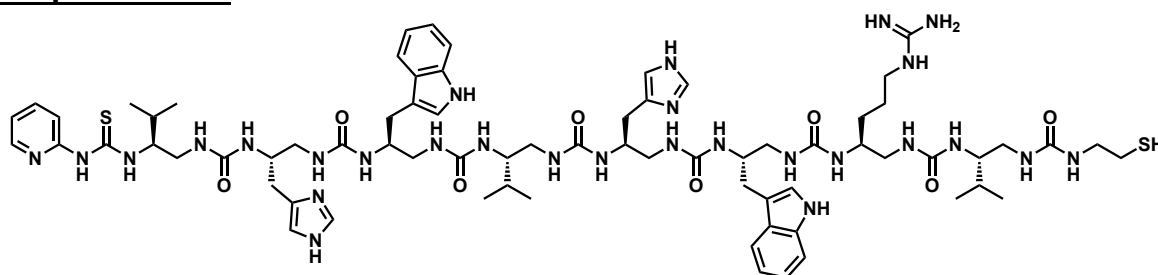


Figure PE.3: MS spectra of **OL1_{inv}**.

Compound OL5:



OL5 was synthesized on 75 μmol scale, according to the general procedure **A** on Boc strategy. Yield after purification 14 mg, 14%. White powder; RP-HPLC t_R 3.38 min (linear gradient, 10-100% of B, 5 min, $\lambda = 214$ nm); HRMS calcd. for $\text{C}_{71}\text{H}_{108}\text{N}_{28}\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1546.83; found 1547.04.

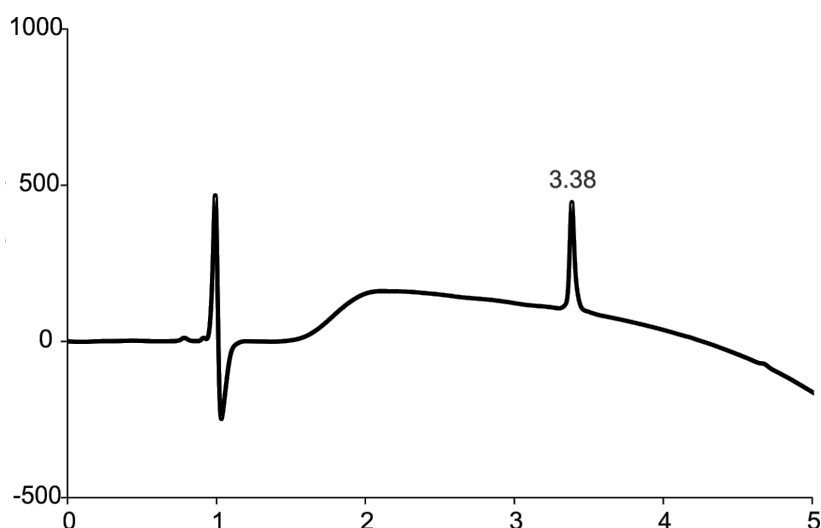


Figure PE.4 : RP-HPLC of **OL5** after purification (10-100% of B in 5 min, $\lambda = 200$ nm).

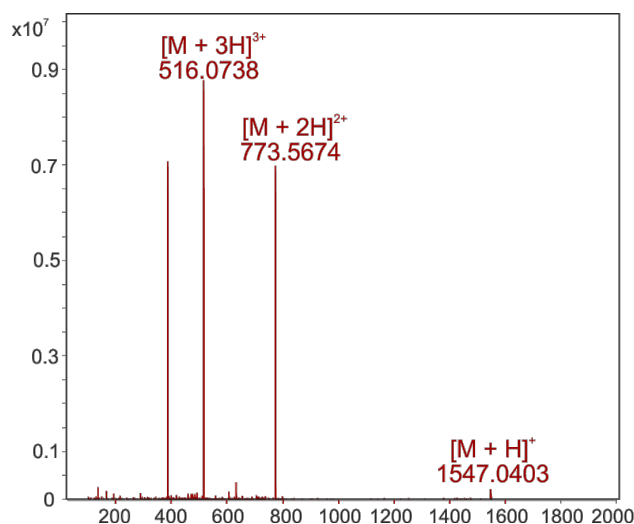
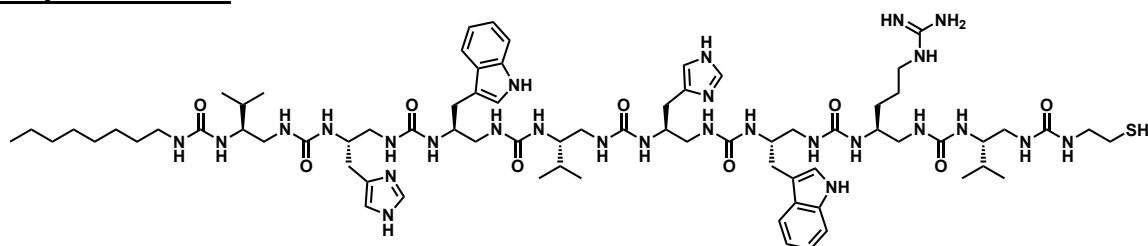


Figure PE.5 : MS spectra of **OL5**.

Compound OL6 :



OL6 was synthesized on 75 μmol scale, according to the general procedure **A** on Boc strategy. 6 mg, 6%; white powder; RP-HPLC t_R 4.40 min (linear gradient 10-100% of B in 5 min); HRMS calcd. for $\text{C}_{74}\text{H}_{121}\text{N}_{27}\text{O}_9\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1564.96 found 1565.14; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 782.98 found 783.11; $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 522.32 found 522.43.

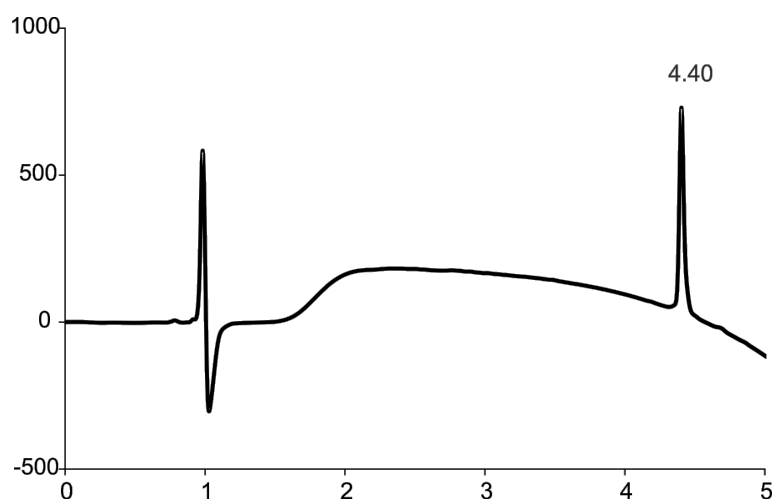


Figure PE.6: RP-HPLC of **OL6** after purification (10-100% of B in 5 min, $\lambda = 200$ nm).

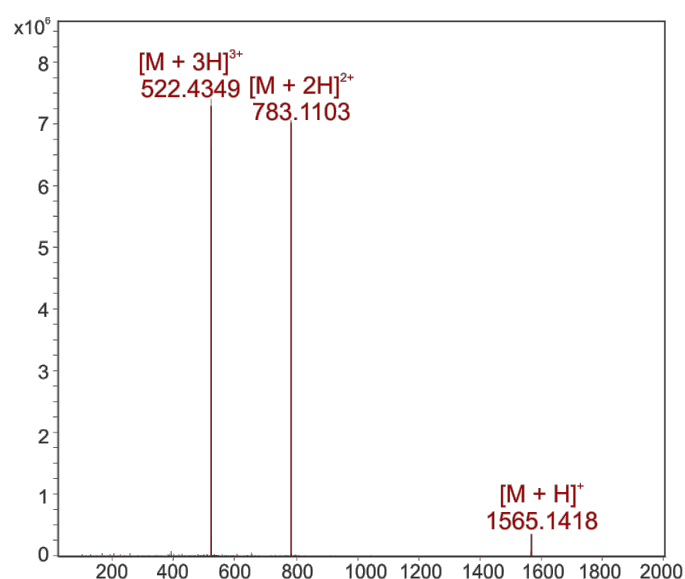
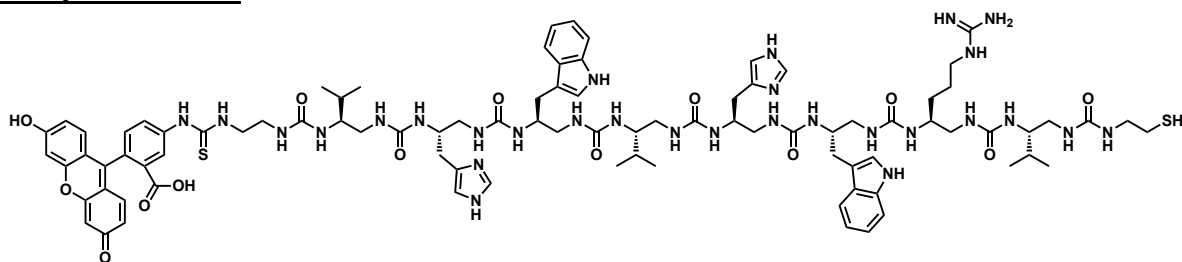


Figure PE.7: MS spectra of **OL6**.

Compound OL7:



OL7 was synthesized on 75 μmol scale, according to the general procedure **A** on Boc strategy. Yield after purification 6.4mg, 4.5%; white powder; RP-HPLC t_R 5.61 min (1st isomer) and 5.92 min (2nd isomer) (linear gradient 10-100% of B in 10 min); HRMS calcd. $\text{C}_{89}\text{H}_{121}\text{N}_{29}\text{O}_{14}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1885.91 found 1885.92, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 943.45 found 943.47.

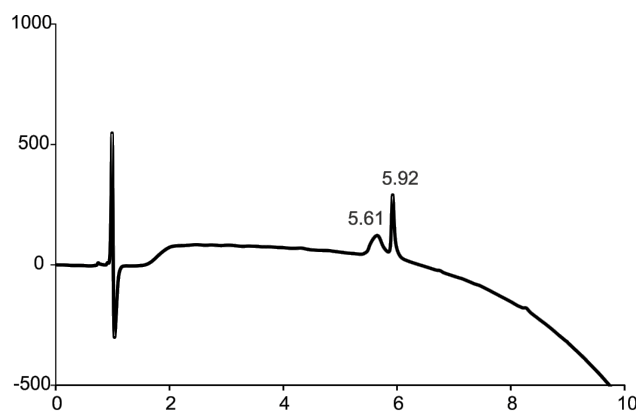


Figure PE.8 : RP-HPLC of **OL7** after purification (10-100% of B in 10 min, $\lambda = 200$ nm).

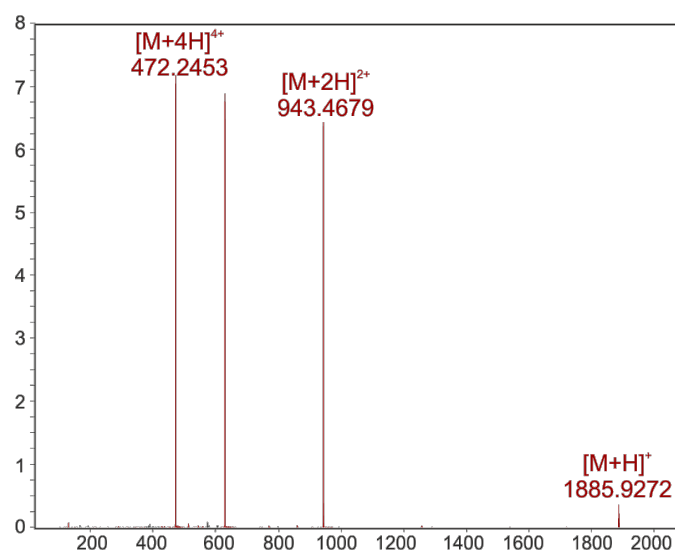


Figure PE.9 : MS spectra of **OL7**.

General procedure **B** for the solid phase synthesis of Cys-LAH4:

Cys-LAH4 peptide (H-CKKALLALALHHLAHLALHLALALKKA-NH₂) was synthesized on 50 μ mol scale on Rink Amide MBHA resin (0.35 mmol/g) by using 5-fold excess of reagent for the coupling step [0.2 M amino acid solution (in DMF) with 0.5 M HBTU (in DMF) and 1.0 M DIEA (in NMP)]. Couplings of N-Fmoc-(L)-His(Trt)-OH and Boc-Cys(Trt)-OH were performed twice at 50°C with microwaves (50 W) for 600 s. Other amino acid couplings were performed twice at 75°C, 50 W for 600 s. Fmoc removal was performed using a solution of 20% piperidine in DMF at 75°C with 155 W for 15 s then 90°C, 35 W, 50 s. A final Boc deprotection was performed to remove Boc group on cysteine residue.

After completion of the synthesis, the peptide resin was washed three times with DCM. Cleavage was performed by treatment with 5 mL of a freshly prepared TFA/EDT/TIS/H₂O (92.5/2.5/2.5/2.5; v/v/v/v) solution for 120 min at room temperature. The resin was then filtered off and the crude product was precipitated as TFA salts in presence of cold Et₂O. Cys-LAH4 was recovered in 35% yield after purification on semi-preparative RP-HPLC.

Compound Cys-LAH4:

Yield after purification 50 mg, 35%; white powder; RP-HPLC t_R 3.61 min (linear gradient 10-100% of B in 5 min); HRMS calcd. for $C_{135}H_{234}N_{40}O_{27}S$ $[M+2H]^{2+}$ 1441.81 found 1441.3385; $[M+4H]^{4+}$ 721.41 found 721.1552..

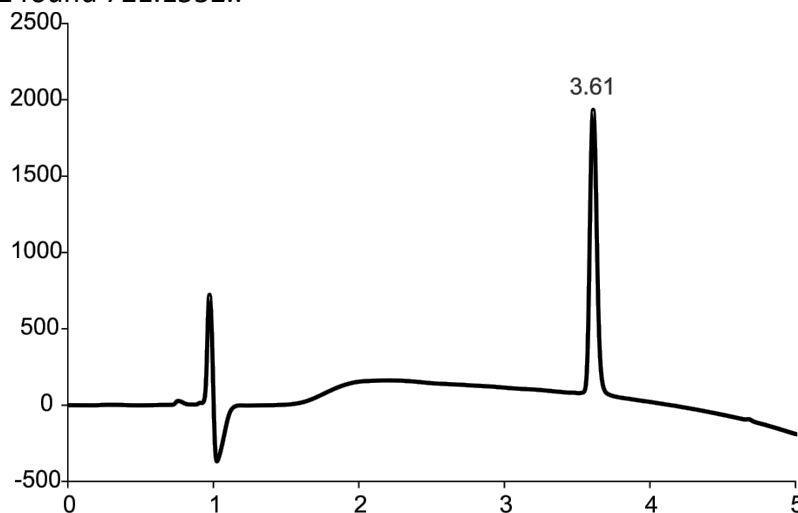


Figure PE.10: RP-HPLC of **Cys-LAH4** peptide after purification (10-100% of B in 10 min, $\lambda = 200$ nm).

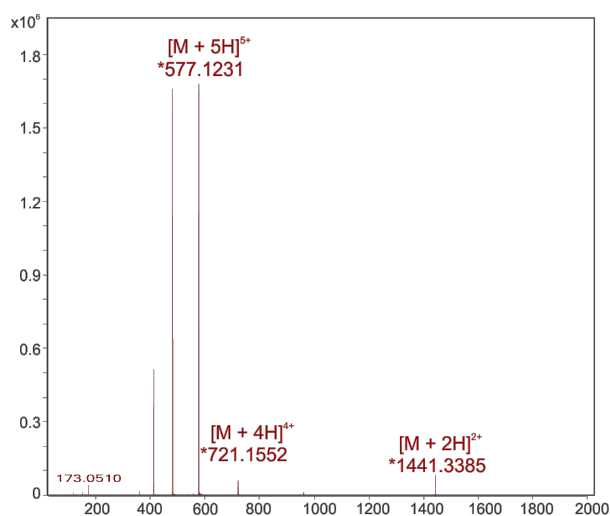
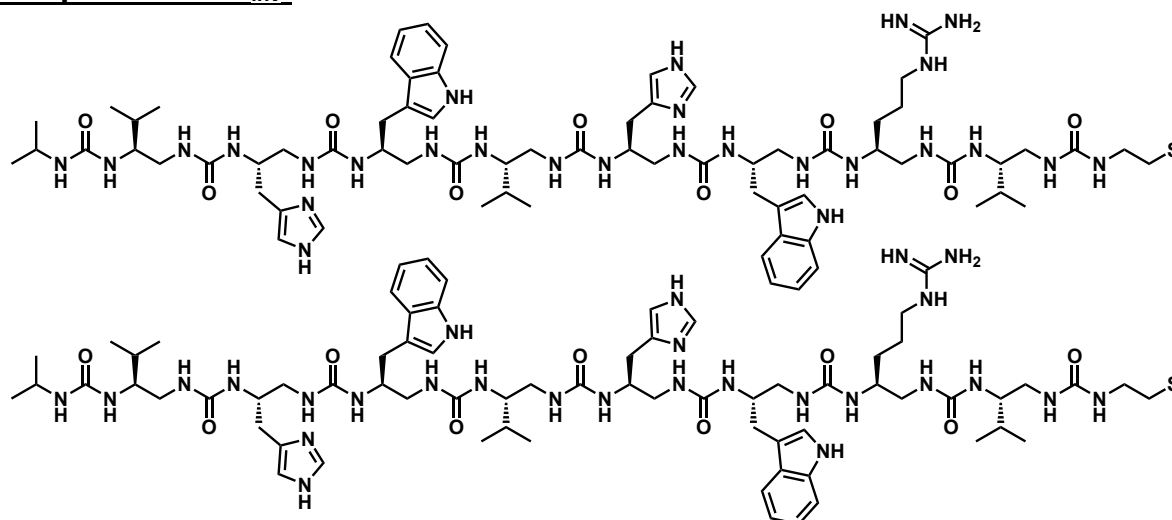


Figure PE.11: MS spectra of **Cys-LAH4**.

iv) General procedure C for the disulfide bridge homodimerization via NPys activation:

Mono-thiol oligourea **OL-SH** (1.0 eq, 4-5 mg) was dissolved in pure milliQ water and 50 μ L of 50 mM solution of NH_4OAc was added to reach a pH of 5. 0.45 eq of Bis(5-nitro-2-pyridyl)disulfide (NPys)₂ (45.4 mM in acetonitrile) was next added and the reaction was left overnight to ensure a complete dimerization. The crude was then neutralized with 0.1 % TFA in water solution and directly purified on semi-prep RP-HPLC.

Compound Dim1_{inv}:

Dim1_{inv} was prepared according to the general procedure **B** starting from 2.2 mg of **OL1_{inv}**. Yield after purification 1.2 mg, 54 %; white powder; RP-HPLC t_R 3.72 min (linear gradient 10-100% of B in 5 min); HRMS calcd. for $C_{138}H_{225}N_{54}O_{18}S_2$ $[M+5H]^{5+}$ 598.55 found 598.54, $[M+4H]^{4+}$ 747.18 found 747.58, $[M+2H]^{2+}$ 1494.87 found 1494.23.

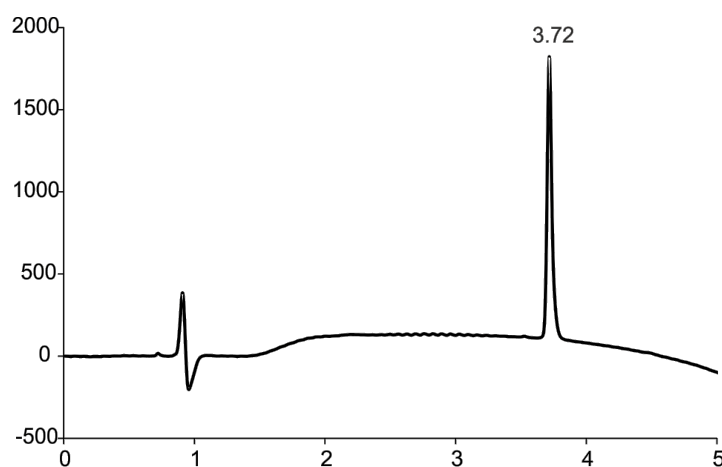


Figure PE.12 : RP-HPLC of **Dim1_{inv}** after purification (10-100% of B in 10 min, $\lambda = 200$ nm).

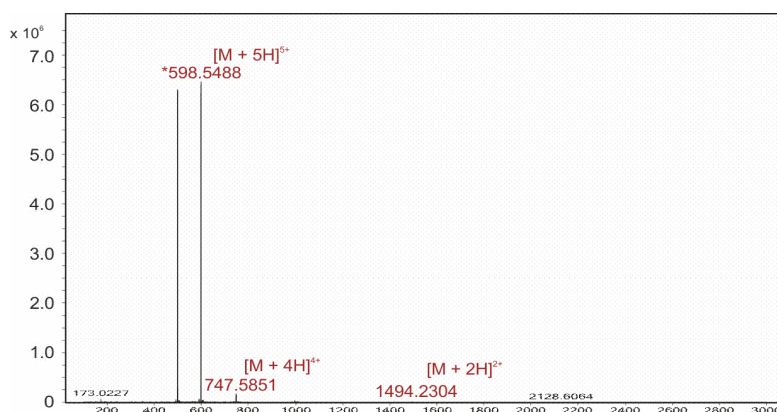
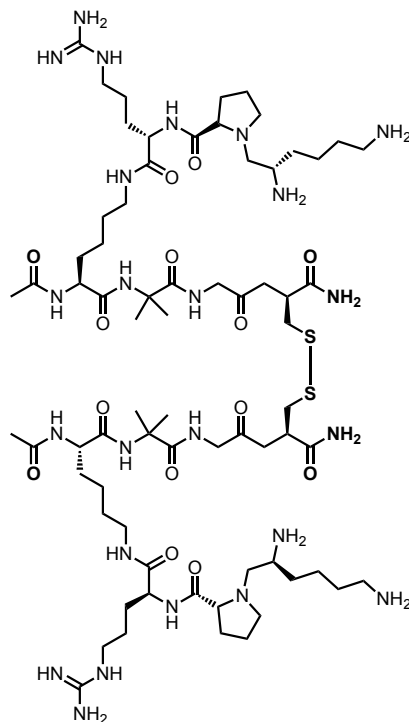


Figure PE.13 : MS spectra of **Dim1**.

v) General procedure D for the disulfide bridge homodimerization via DMSO oxydation:

Mono-thiol oligourea **OL-SH** (1.0 eq, 4-5 mg) was dissolved in 1 mL of 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 and 0.15 mL of DMSO was added. The reaction was left for two days after which RP-HPLC monitoring showed complete conversion of **OL-SH** into dimère.

Compound Dim3:



Yield after purification 3.6 mg, 72%, white powder; RP-HPLC t_R 3.62 min (linear gradient 10-100% of B in 5 min); HRMS calcd. for $C_{300}H_{568}N_{114}O_{54}S_2$ $[M+10H]^{10+}$ 670.9474 found 670.9510.

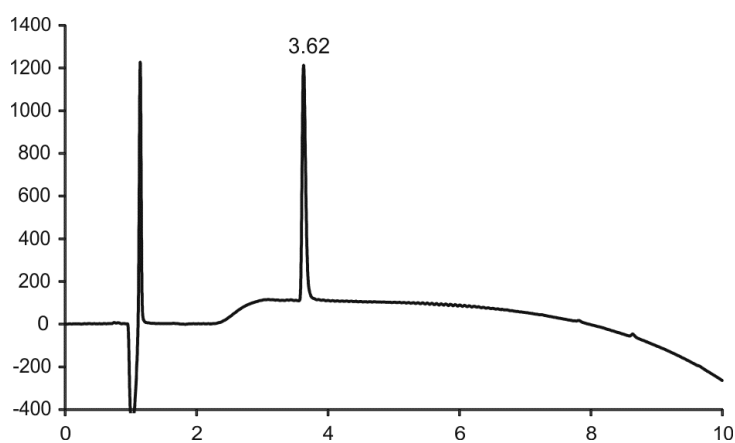


Figure PE.14 : RP-HPLC of **Dim3** after purification (10-100% of B in 10 min, $\lambda = 200$ nm).

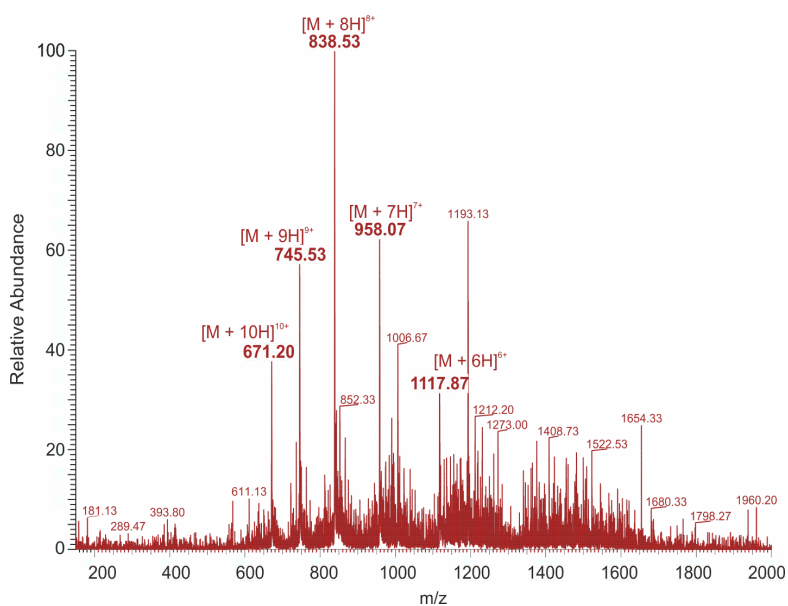
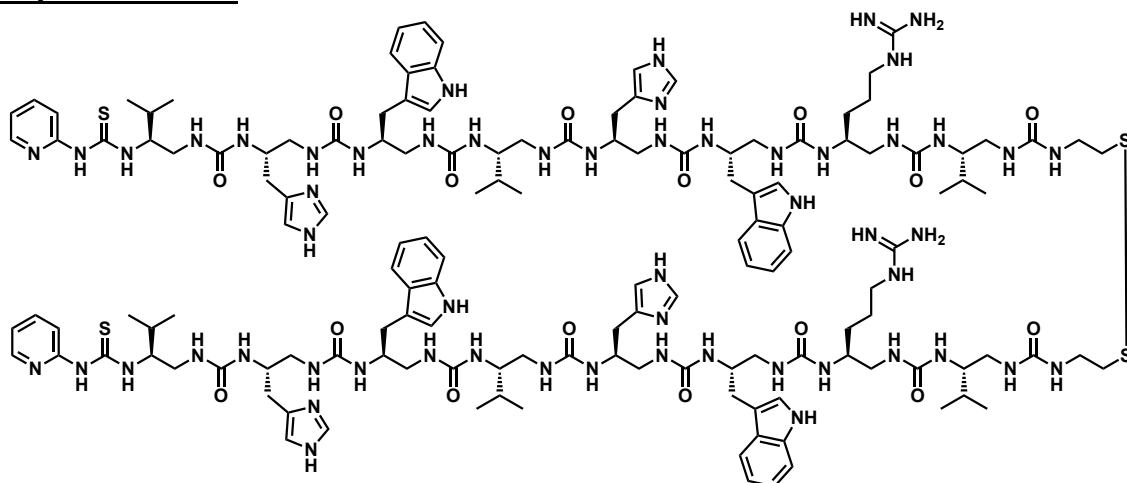


Figure PE.15 : MS spectra of Dim3.

Compound Dim5:



Yield after purification 0.7mg, 42%, white powder; RP-HPLC t_R 3.90 min (linear gradient 10-100% of B in 5 min); HRMS calcd. for $C_{142}H_{214}N_{56}O_{16}S_4$ $[M+3H]^{3+}$ 1030.21 found 1030.7076, $[M+4H]^{4+}$ 772.91 found 773.2996.

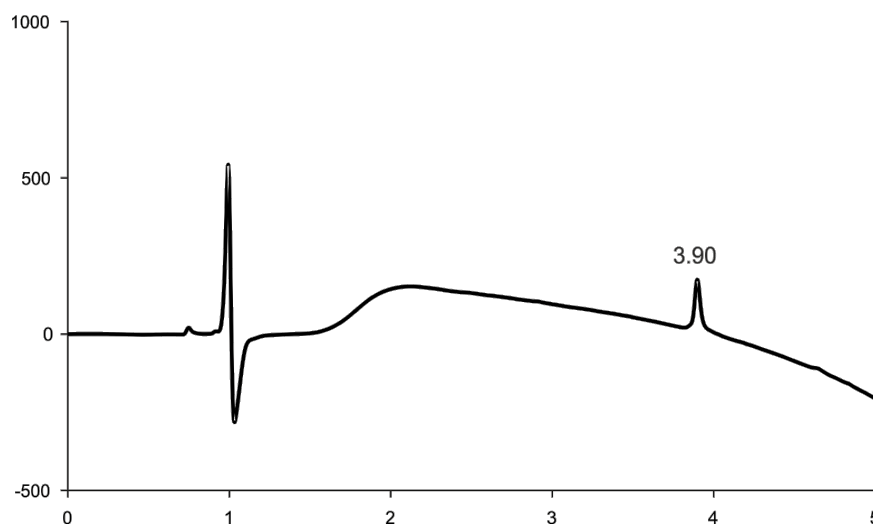


Figure PE.16 : RP-HPLC of **Dim5** after purification (10-100% of B in 10 min, $\lambda = 200$ nm).

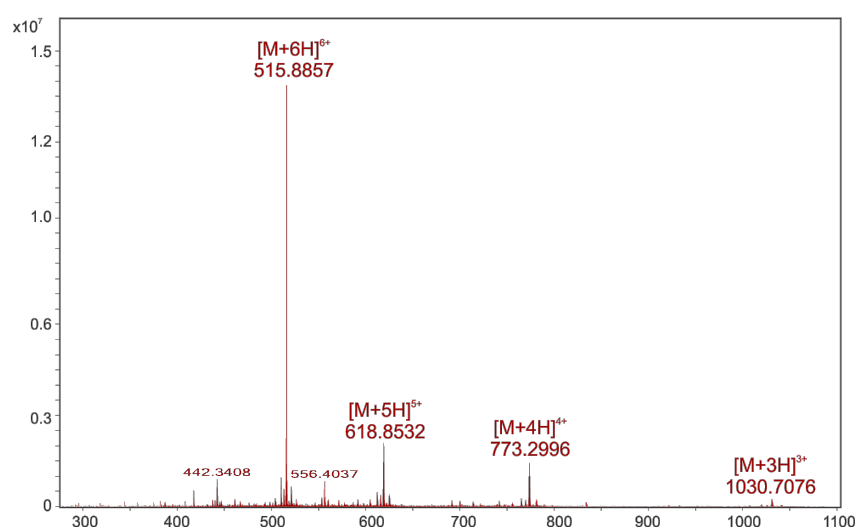
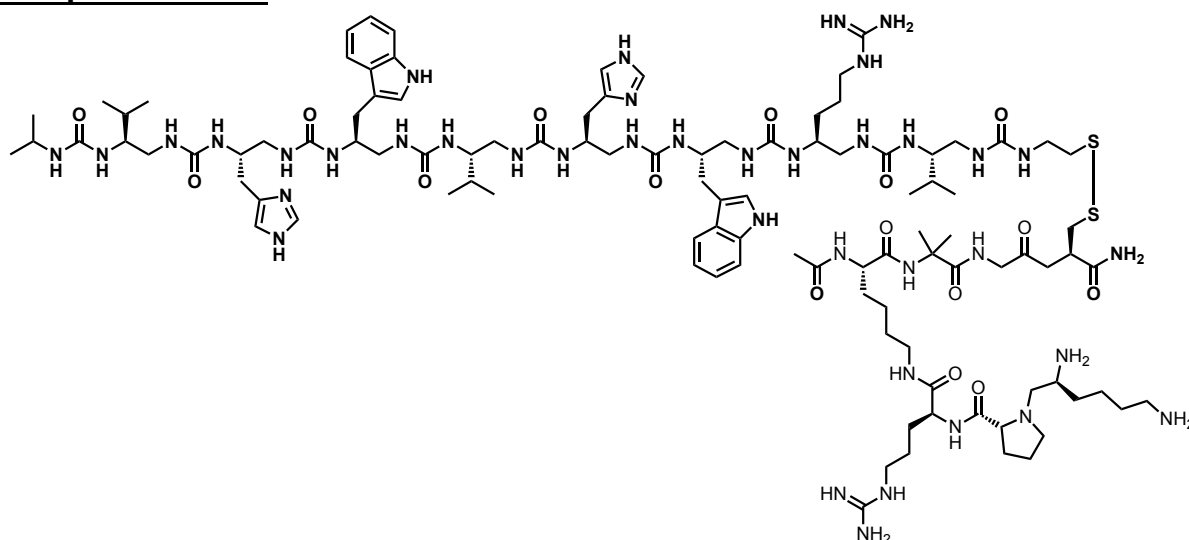


Figure PE.17: MS spectra of **Dim5**.

vi) General procedure E for the disulfide bridge heterodimerization :

One of the mono-thiol oligourea **OL-SH1** (1.0 eq, 4-5 mg) was dissolved in 200 μL of pure milliQ water and 100 μL of 20 mM solution of NH_4OAc was added to reach a pH of 7.5. 3.0 eq of Bis(5-nitro-2-pyridyl)disulfide (NPyS)₂ (45.4 mM in acetonitrile) was next added and the reaction was gently shaken for 15 min with spontaneous yellow coloration of the solution. The excess of (NPyS)₂ was removed by small extraction with DCM (5 x 300 μL) immediately followed by addition of the other mono-thiol oligourea **OL-SH2** (1.0 eq) dissolved in 100 μL of pure milliQ water. The reaction was left to react overnight and was monitored by RP-HPLC. The crude was then neutralized with 0.1 % TFA in water solution and directly purified on semi-prep RP-HPLC.

Compound Dim2:

Yield after purification 2 mg, 12%, white powder; RP-HPLC t_R 4.41 min (linear gradient 30-70% of B in 5 min); HRMS calcd. for $C_{219}H_{394}N_{84}O_{36}S_2$ $[M+9H]^{9+}$ 539.1310 found 539.2423, $[M+6H]^{6+}$ 808.1927 found 808.1950, $[M+4H]^{4+}$ 1211.7851 found 1211.7868.

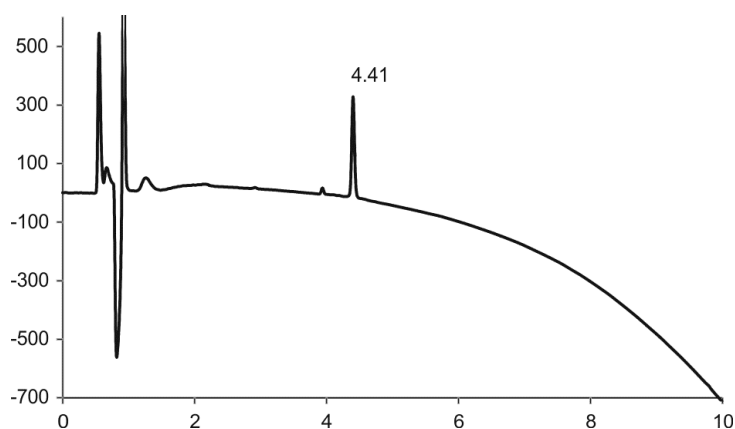


Figure PE.18 : RP-HPLC of **Dim2** after purification (10-100% of B in 10 min, $\lambda = 200$ nm).

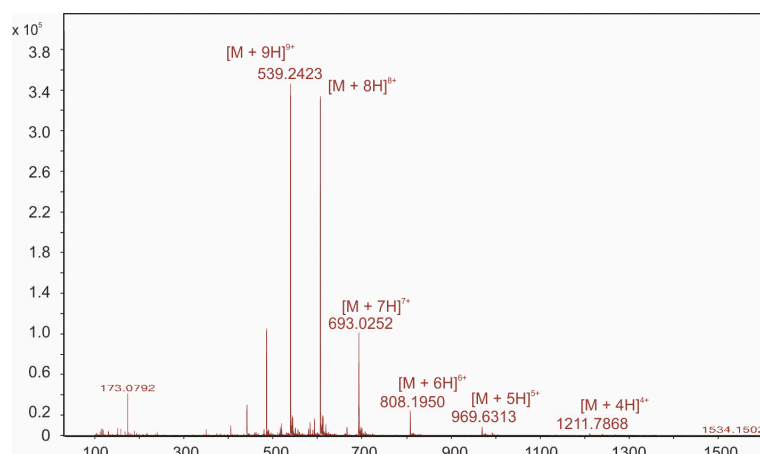
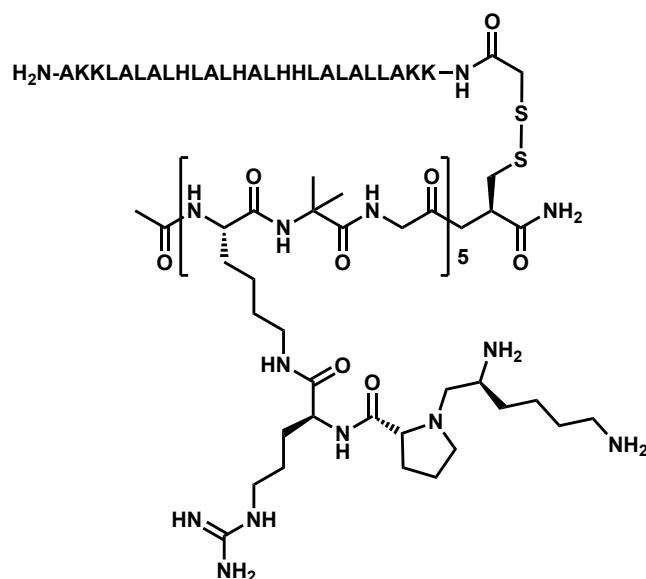


Figure PE.19 : MS spectra of **Dim2**.

Compound Dim4:

Yield after purification 2mg, 20%, white powder; RP-HPLC t_R 6.21 min (linear gradient 10-100% of B in 5 min); HRMS calcd. for $C_{285}H_{517}N_{97}O_{54}S_2$ $[M+10H]^{10+}$ 687.70 found 687.9320, $[M+8H]^{8+}$ 859.375 found 859.4261.

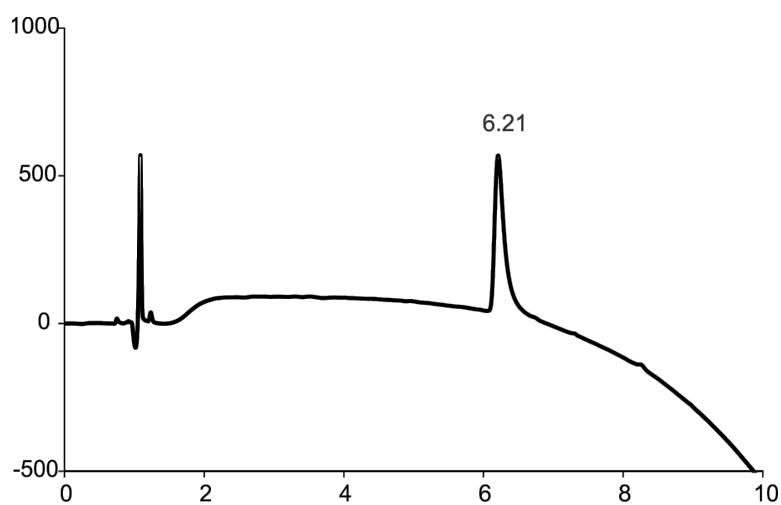


Figure PE.20 : RP-HPLC of **Dim4** after purification (10-100% of B in 10 min, $\lambda = 200$ nm).

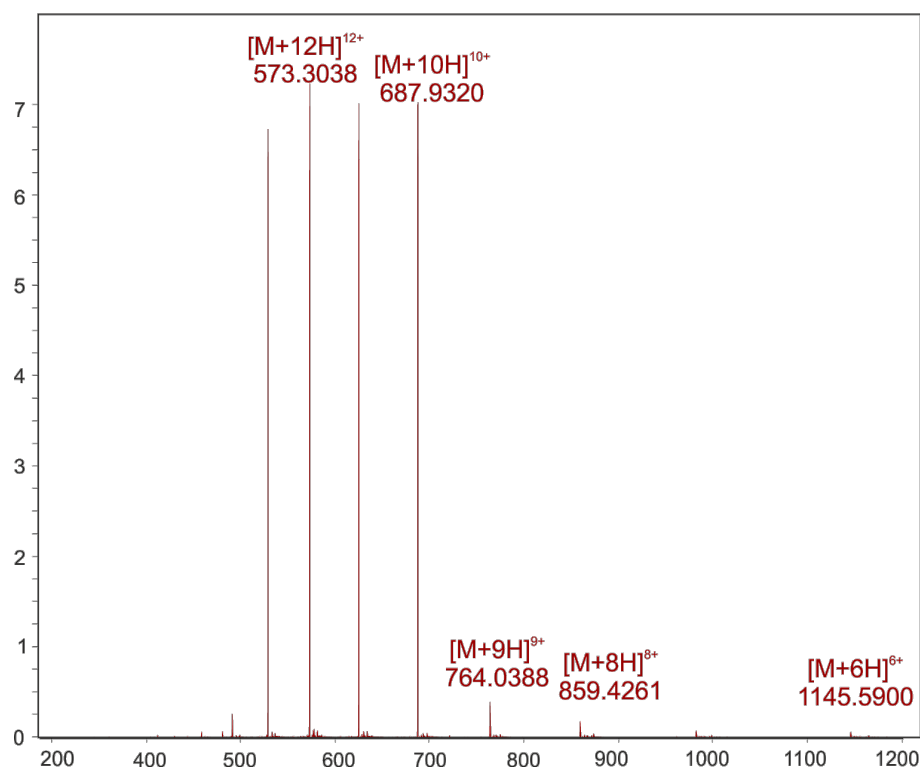
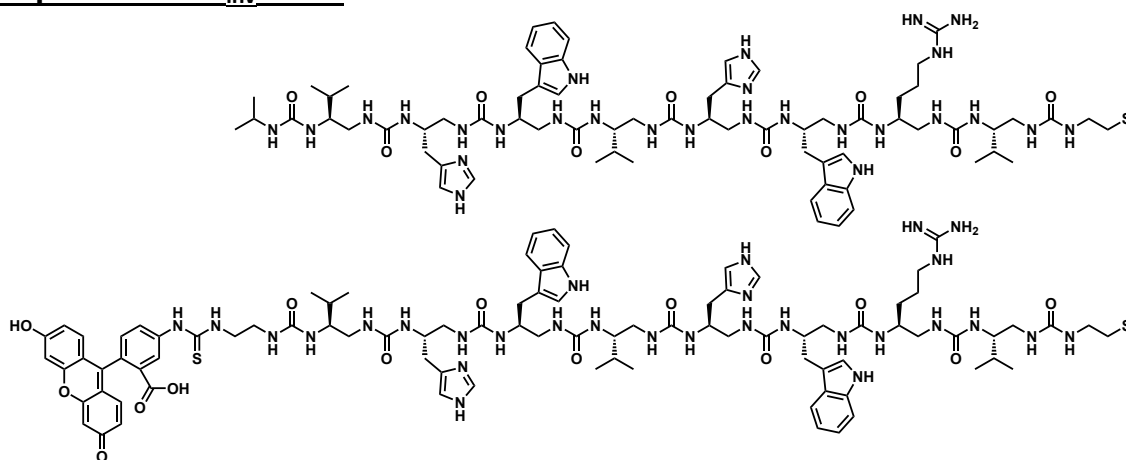


Figure PE.21: MS spectra of Dim4.

Compound Dim1_{inv}-FITC:



Yield after purification 2.4 mg, 37%, white powder; RP-HPLC t_R 6.03 min (linear gradient 10-100% of B in 5 min); HRMS calcd. for $C_{158}H_{230}N_{56}O_{23}S_3$ $[M+3H]^{3+}$ 1126.26 found 1126.92, $[M+5H]^{5+}$ 676.15, found 676.67.

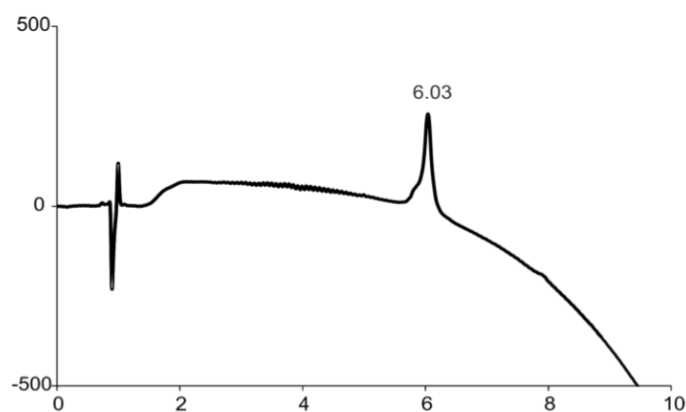


Figure PE.22 : RP-HPLC of Dim1_{inv}-FITC after purification (10-100% of B in 10 min, λ = 200 nm).

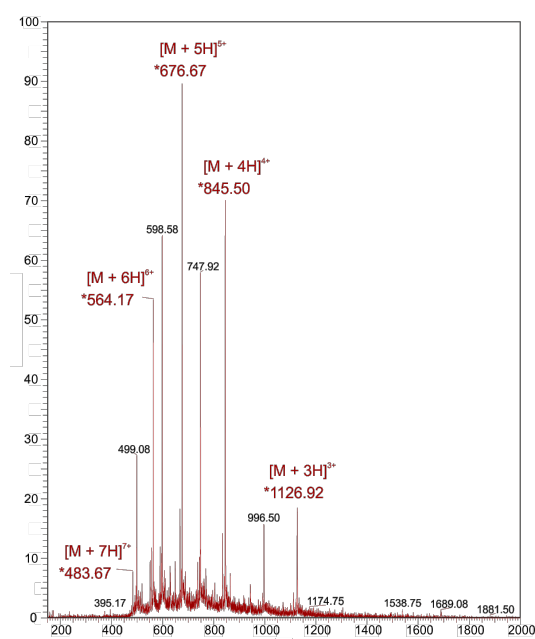


Figure PE.23 : MS spectra of Dim1_{inv}-FITC.

b) Biophysics and biology

i) Transfection reagents and cell culture

The cationic lipid DOTAP (N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride) and the branched PEI of 25 kDa (b-PEI 25000) were obtained from Sigma-Aldrich. A solution of 18 μ M of b-PEI was prepared in water and the pH was adjusted to 7.

The CPP peptides LAH4 (KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA-CONH₂; a kind gift from Pr. B. Bechinger), LAH4-L1 (KKALLAHLHLLALLALHLAHLALKKA-CONH₂; a kind gift from Dr. A.J. Mason) and Vpr55-82 (TGVEALIRILQQLLFHFRIGCRHSRIG-CONH₂; from Proteogenix, France) as well as the different foldamers and the foldamer-pseudopeptide hybrid were all dissolved at 1 mg/mL in water and stored at -20°C.

We used the following three cell lines: human embryonic kidney cells (HEK293), SV40 transformed human fetal lung fibroblasts (MRC5-V2), and human breast cancer cells (MDA-MB-231). The cells were cultured using Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; HEK293, MRC5-V2) or RPMI (MDA-MB-231). The culture media were supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10% of foetal calf serum (FCS; HyClone).

A549-Luc cells that stably express the reporter gene luciferase were established by Dr. J.-L. Coll's group (Université de Grenoble), by transfecting the human lung carcinoma cells A549 (CCL-185; American Type Culture Collection) with the pGL3-Luc plasmid (Clontech). The cells are grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 1% antibiotic solution (penicillin-streptomycin, Gibco) and maintained under 800 µg/mL of G418 selection antibiotic (Promega) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

ii) Preparation of the DNA complexes

Transfection complexes were prepared as follows: 1.5 µg of plasmid DNA and the desired amount of transfection reagent were diluted into 25 µL 150 mM NaCl and gently mixed. DNA complexes were formed at various molar ratios of nitrogen to DNA phosphate (*i.e.* at N/P=1, the amount of amino nitrogens present in the cationic compound is equal to the amount of negative charges carried by the phosphate groups of the plasmid, e.g. 1 µg DNA correspond to 3 nmoles of negative charges). After 20 min incubation, the mixture was diluted with culture medium.

iii) Preparation of the siRNA complexes

The desired amount of siRNA duplexes (targeting luciferase (siLuc) or control siRNA (siCTRL) and foldamer were each diluted in 20 µL of 150 mM NaCl. The samples were then mixed and incubated for 20-30 min at room temperature to favor association between siRNA and the oligourea. The mixture was finally diluted with serum-free medium to a final volume of 0.5 mL (for duplicates).

iv) Preparation of the protein complexes

The desired amount of protein and foldamer were each diluted in 20 µL of 150 mM NaCl. The samples were then mixed and incubated for 20-30 min at room temperature to favor association between protein and the oligourea. The mixture was then diluted with serum-free medium containing antibiotics to a final volume of 0.5 mL (for duplicates: 0.25 mL/well).

v) DNA retardation assay

DNA binding was studied by means of an agarose gel retardation assay. Briefly, plasmid DNA (1 µg) and increasing amounts of transfection agents were each diluted in 25 µl of 150 mM NaCl. DNA and the CPF were then mixed, and after a period of 20 min, samples (20 µl) were electrophoresed through a 1% agarose gel using Tris-borate-EDTA buffer. The DNA was visualized after SYBR Safe staining.

vi) Transfection experiments

pDNA transfection experiments

In vitro cell transfection experiments have been performed using the plasmid p-Luc (7.6 kb) which is an expression plasmid encoding the firefly luciferase gene under the control of the human cytomegalovirus (CMV) immediate-early promoter. DNA complexes were generated at different weight/weight ratios by mixing a constant amount of DNA with the desired amount of transfection reagent. Unless otherwise stated, the transfection experiments were done in 48-well plates using 0.75 µg of p-Luc per well.

For transfection, 0.25 mL/well of serum-free culture medium containing the DNA complexes were deposited into each well. After incubation for 2.5 h at 37°C the medium was replaced with fresh one containing serum and luciferase activity (in the cell lysate) was measured 28h-48h after transfection. Each experiment was carried out several times; within a series experiments were done in duplicates or triplicates. The luciferase activity was measured as previously described.⁷ Luciferase background was subtracted from each value and the protein content of the transfected cells was measured by Bradford dye-binding using the BioRad protein assay. The transfection efficiency is expressed as light units/s/mg protein and the reported values are the mean of duplicates or triplicates.

Transfection experiments in the presence of serum were realized using the same protocol as described above except that the DNA complexes were diluted in culture medium containing the desired amount of serum before addition to the cells.

Transfection of HEK293 cells with GFP as reporter gene

HEK293 cells plated in 48-well plates were transfected with **2** complexed to the GFP plasmid (1 µg of plasmid/well) which encodes for the GFP gene under the control of the CMV promoter (pGFP has a size of 3487 bp and was obtained from Plasmid Factory). After 2h incubation at 37°C, DMEM containing 10% serum was added to the cells. The GFP expression was evaluated 28h post-transfection by fluorescence microscopy.

Gene delivery in the presence of a proton pump inhibitor

MRC5-V2 cells were transfected either with DOTAP, b-PEI or with **2** in the absence or in the presence of the proton pump inhibitor concanamycin A (final concentration of 15 nM). After 24 h of incubation at 37°C, the transfection medium was removed and replaced with DMEM containing 10% serum. The luciferase activity was measured 28 h later. The transfection efficiency is expressed as light units/s/mg protein and is the mean of the duplicates.

Delivery of the siRNA targeting the luciferase

Twenty-four hours prior to transfection, 2.5×10^4 A549-Luc cells/well were seeded in 48-well culture plates.

For transfection, culture media was removed and replaced by 0.25 mL/well of serum-free RPMI containing the siRNA complexes. After incubation for 2.5 h at 37°C the medium was replaced with fresh one containing serum and luciferase activity in the cell lysate was measured 2 days after transfection. Each experiment was carried out several times; within a series experiments were done in duplicates. The foldamer/DOPE/siRNA complexes were generated by mixing the desired amounts of oligourea and DOPE prior to dilution with the siRNA solution. Transfection experiments in the presence of serum were realized using the same protocol as described above except that the complexes were diluted in culture medium containing the desired percent of serum before addition to the cells.

The luciferase activity was measured as previously described.^[8] Luciferase background was subtracted from each value and the protein content of the transfected cells was measured by Bradford dye-binding using the BioRad protein assay. The transfection efficiency is expressed as light units/s/mg protein and the values are the means of the duplicates. Error bars represent the standard deviation of the mean.

Silencing of Polo-like kinase 1

The experiments with siPLK1 were done in triplicates with a final concentration of siRNA of 50 nM/well. The siRNA and the foldamer were each diluted in 25 μ L of NaCl 150 mM. The samples were then mixed and incubated 20-30 min at room temperature. The mixture was diluted with culture medium to a final volume of 0.75 mL (for triplicates). For transfection, culture media was removed and replaced by 0.25 mL/well of RPMI containing the siRNA complexes. After incubation for 2.5 h at 37°C the medium was replaced with fresh one containing serum. After 2 days, the cell viability in each well was determined using a MTS assay.

siRNA sequences used

The siRNAs, provided in annealed form, were synthesized by Eurogentec. Sequences are as follows (with **TT** = DNA bases):

siLuc: sense strand = 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG A **TT**-3'; antisense strand = 5'-U CGA AGU ACU CAG CGU AAG **TT**-3'

siPLK1: sense strand = 5'-AGA **UCA** CCC **UCC** **UUA** AAU A UU-3'; antisense strand = 5'-UAU UUA **AGG** AGG GUG AUC UUU-3' (in bold blue : 2'-OMethylated modified nucleotides).

The control siRNA was obtained from Qiagen (AllStars Negative Control siRNA).

Protein transduction experiments

Twenty-four hours prior to transfection, 35×10^3 cells/well were seeded in 48-well culture plates.

For transduction, culture medium was removed and replaced by 0.25 mL/well of RPMI medium containing the protein/foldamer complexes.

Luciferase transduction experiments

After incubation for 2-4 h, the medium was removed and the cells were washed with 0.5 mL/well of PBS to remove the complexes that were remained in solution. The luciferase activity was then measured as described above.

BSA-FITC transduction experiments

For flow cytometry, cells are analyzed alive. After incubation for 3-4h, cells were washed with 0.5 mL/ well of PBS and were then detached from the plate using 0.2 mL/well of a 1:1 mixture PBS/Trypsin (v/v). Cells were then transferred into microtubes and cooled at 0°C before being analyzed with cytometer.

Saporine transduction experiments

After incubation for 3-4 h, culture medium containing the protein complexes was removed and replaced by fresh one containing serum. After 24h, the cell viability in each well was determined using MTT assay.

*vii) Cell viability assays*MTT:

The cell viability was determined on MDA-MB-231 cells by performing the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) assay. Briefly, one day after transfection (performed for 2h45 in serum-free medium), MTT was added into each well (0.5 mg/mL MTT). After incubation at 37°C for 3h, the medium was removed and 200 µL of DMSO was added to each well to dissolve the formazan crystals produced from the reduction of MTT by viable cells. Absorbance was then measured at 570 nm. Untreated cells were used as control (100% of cell viability). The MTT assay was performed in triplicates.

MTS :

The cell viability was determined on A549-Luc cells by performing the MTS assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt) (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay from Promega). This assay was performed using biological triplicates (same amount of foldamer/siRNA were added to 3 different wells). After 48h of incubation, the culture medium was removed and replaced with 300 µL/well of RPMI 10% FBS containing the MTS reagent (50 µL/well). After incubation at 37°C for 1h10, 50 µL of medium were withdrawn, then 150 µL of culture medium 10% serum were added to these samples and the absorbance at 490 nm (and 680 nm for background) was measured. Untreated cells were used as control (100% of cell viability).

Lactate deshydrogenase assay

The membrane permeabilization activity was measured as the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) from the cells. Notably, the LDH assay was performed using the same transfection plates that were used for the MTT assay. Therefore, DNA complexes were incubated with MDA-MB-231 cells in serum-free media. After incubation at 37°C for 2h45, an aliquot of the supernatant of each well was used for the measurement of the LDH activity. The transfection was allowed to proceed in order to perform one day later the MTT assay. The LDH release was measured using a commercially available kit (CytoTox- ONETM membrane integrity assay from Promega). Untreated cells were used as control.

viii) Total protein content

In parallel to the LDH and MTT assays, the same transfection experiment (i.e. using the same DNA formulations in terms of w/w ratios, a similar time of transfection, etc...) was performed in duplicates in order to: 1- check that the transfection assay was successful, and

2- measure the protein content after cell lysis. The protein content was measured by Bradford dye-binding using the BioRad protein assay.

ix) Particle size and zeta potential measurements

The size of the foldamer/DNA complexes was measured in pure water and in 150 mM NaCl. 4 µg of **2** and 1.5 µg DNA were each time diluted in 40 µl water or 150 mM NaCl. Both the solutions were left for 20 min at room temperature to allow the formation of the supramolecular assemblies, and the particle size was measured using a Zetasizer nano ZS (Malvern). The Zeta potential of the complexes was measured in 15 mM NaCl.

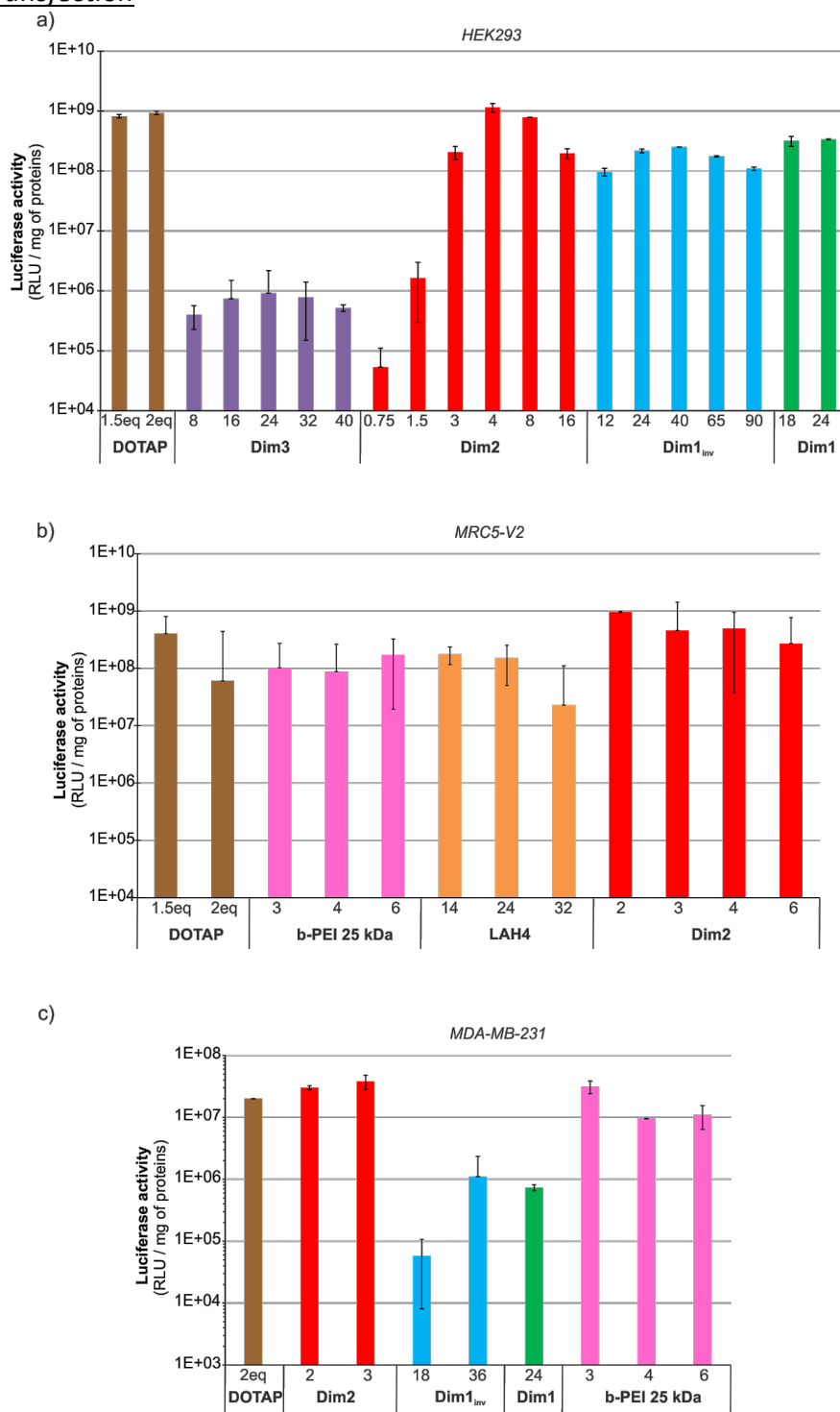
c) Transfection assaysi) DNA transfection

Figure V.24 : Transfection of three different cell lines with urea-based foldamers **Dim1**, **Dim1_{inv}**, **Dim2** as well as **Dim3**. Depending on the cell line, **b-PEI**, **DOTAP** or **LAH4** were used as positive control. The cell assays were performed in 48-well plates in duplicates with 0.75 μg of p-Luc/well. The transfection efficiency is expressed as light units/s/mg of protein and is the mean of the duplicates. The quantities of compound used are indicated under the bars and expressed in μg.

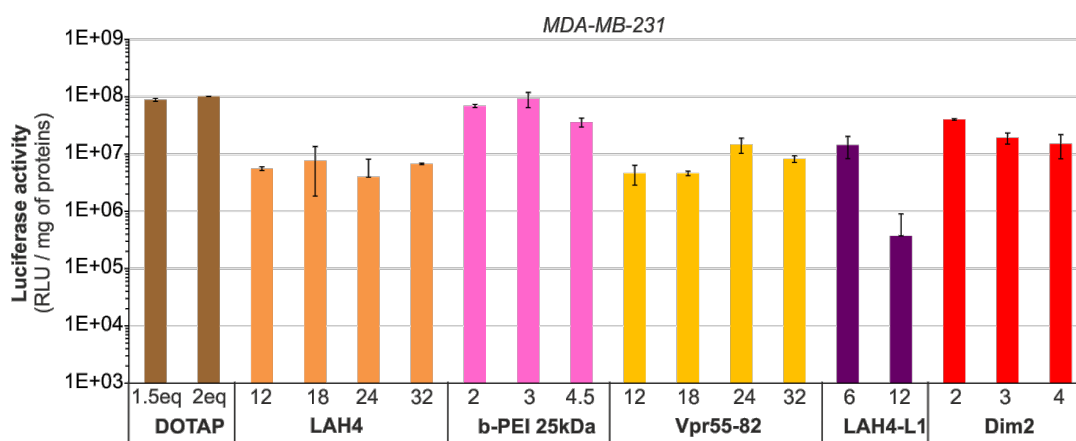


Figure PE.25 : Transfection of MDA-MB-231 cells with **Dim2** and with the three CPPs LAH4, LAH4-L1 and Vpr55-82. The cationic lipid DOTAP was also included as positive control. The cell assays were performed in 48-well plates in duplicates with 0.75 mg of p-Luc/well. The transfection efficiency is expressed as light units/s/mg of protein and is the mean of the duplicates. The quantities of compound used are indicated under the bars and expressed in μg.

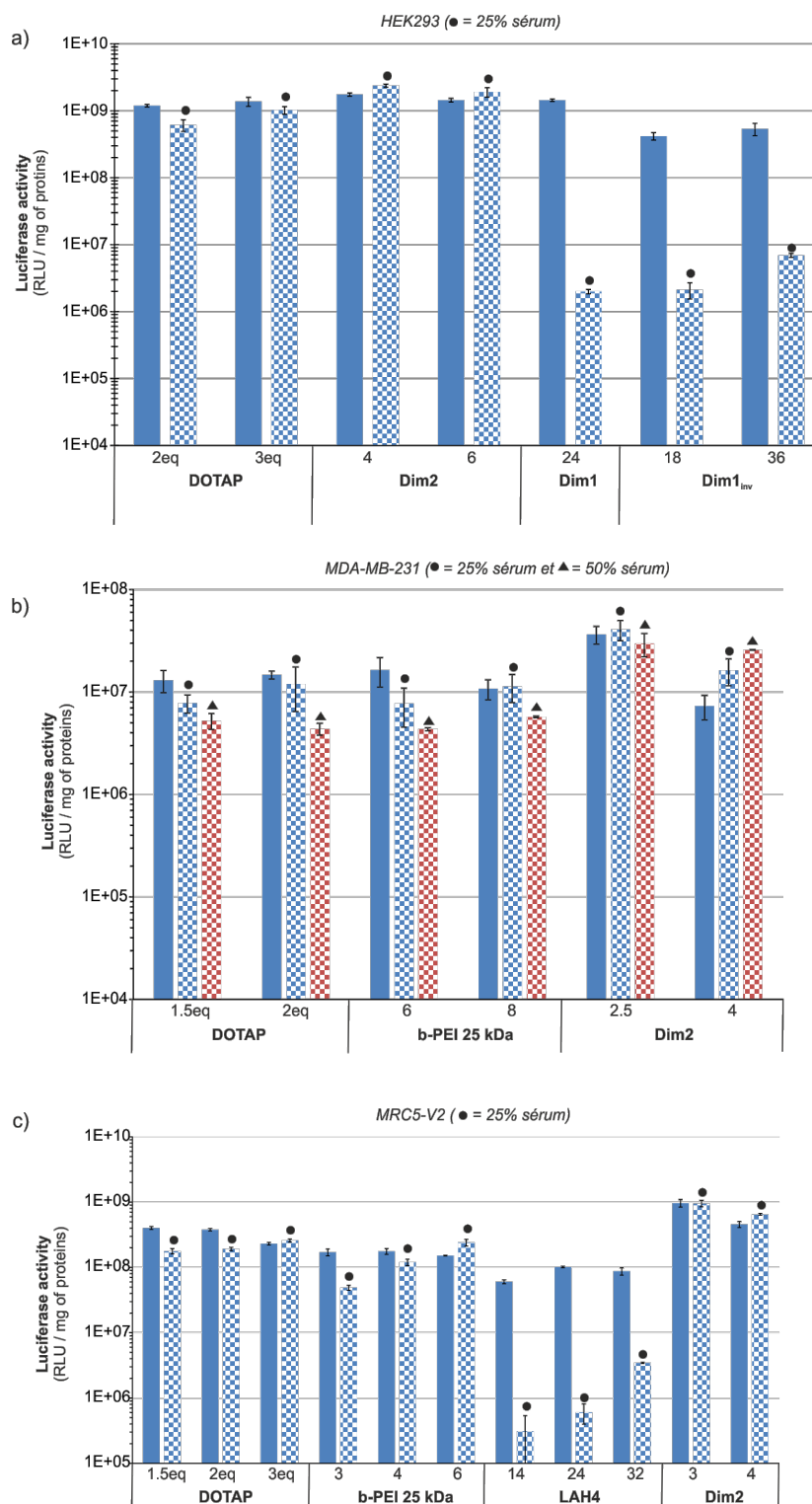


Figure PE.26: Transfection of three different cell lines in the absence or in the presence of 50% serum in cell media. Increasing amounts of urea-based foldamers **Dim1_{inv}**, **Dim2** et **Dim1** were mixed with a constant amount of p-Luc. LAH4, DOTAP and b-PEI were included as reference. The cell assays were performed in 48-well plates in duplicates with 0.75 mg of p-Luc/well. The transfection efficiency is expressed as light units/s/mg of protein and is the mean of the duplicates. Bars in blue indicate the transfection condition in serum free media. Bars with blue dots = with 25% serum and red dots = with 50% serum.

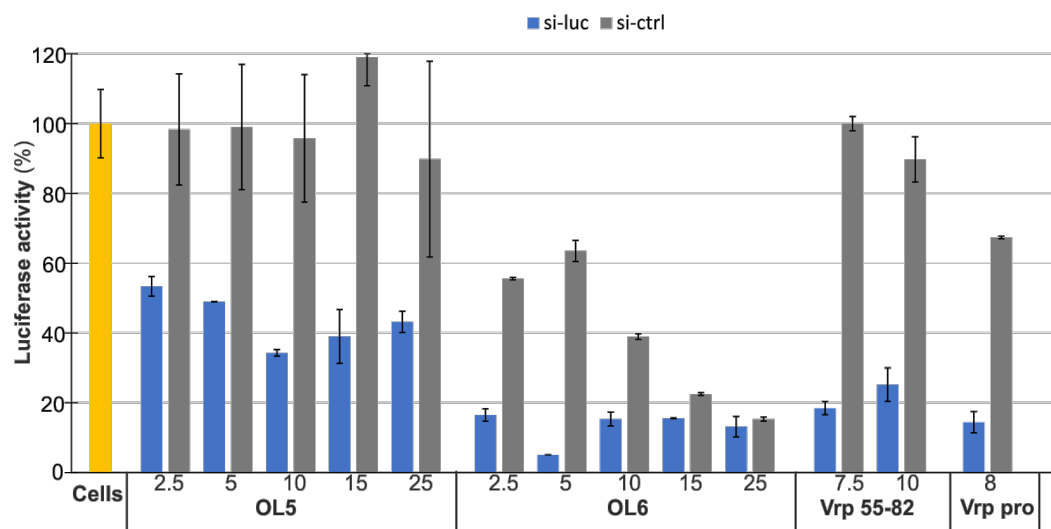
ii) *siRNA delivery*

Figure PE.27 : Delivery of si-luc in A549-luc cell line with urea-based foldamers **OL5** and **OL6** as well as CPPs Vpr55-82 and Vpr-pro. The cell assays were performed in 48-well plates in duplicates with 50 nM of siRNA/well. The transfection efficiency is expressed as percentage of luciferase activity compared to non-transfected cells and is the mean of the duplicates. The quantities of compound used are indicated under the bars and expressed in μg.

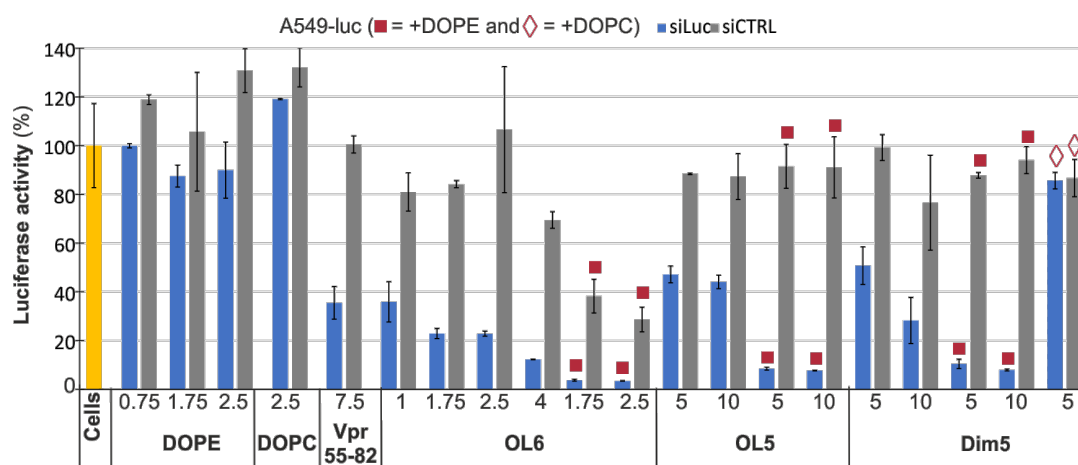


Figure PE.28 : Delivery of si-luc in A549-luc cell line with urea-based foldamers **OL5**, **OL6** and **Dim5** as well as CPP Vpr55-82 and lipids DOPE and DOPC. The cell assays were performed in 48-well plates in duplicates with 50 nM of siRNA/well in absence or in the presence of fusogenic lipids DOPE and DOPC (dots on the bars). The transfection efficiency is expressed as percentage of luciferase activity compared to non-transfected cells and is the mean of the duplicates. The quantities of compound used are indicated under the bars and expressed in μg.

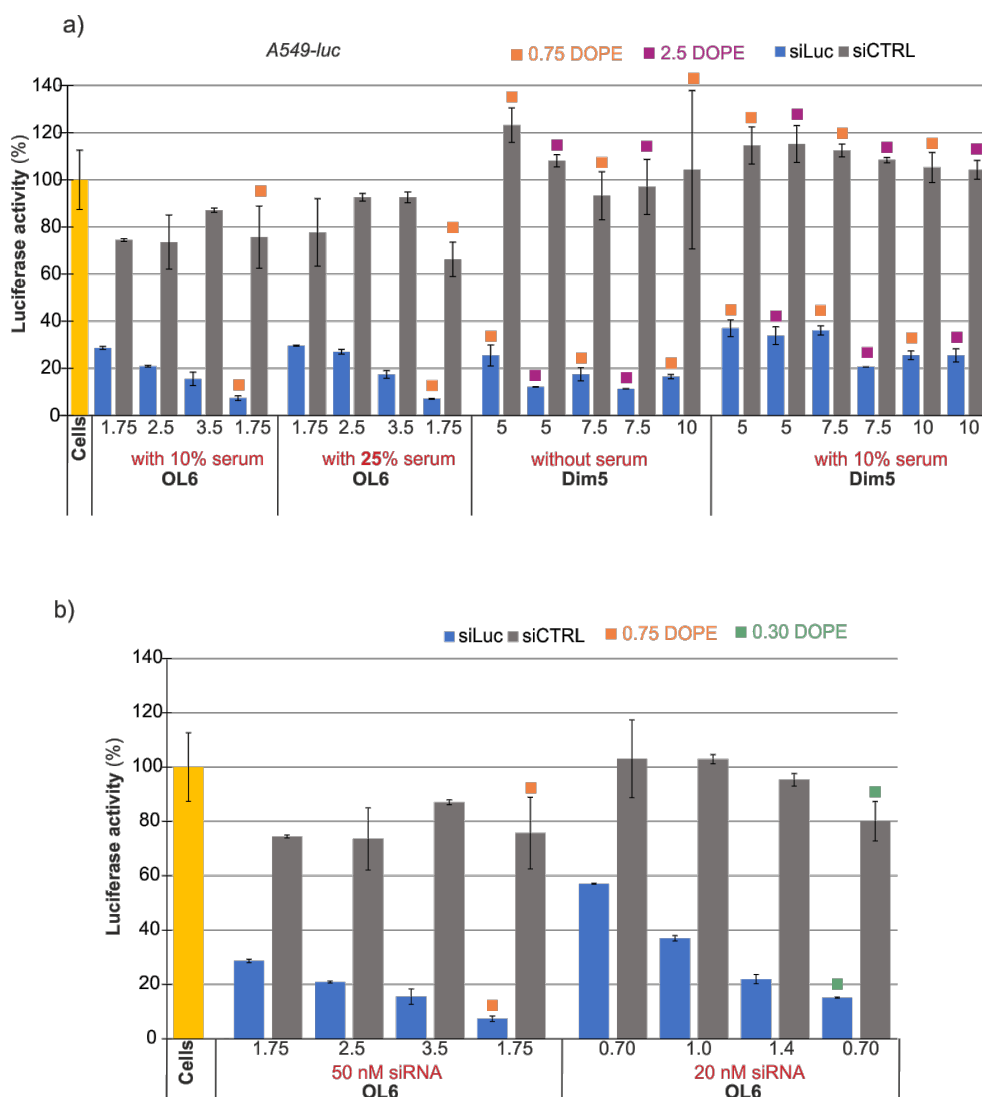


Figure PE.29 : (a) Delivery of si-luc in A549-luc cell line with urea-based foldamers **OL5**, **OL6** and **Dim5** in the absence or presence of serum rich media. The cell assays were performed in 48-well plates in duplicates with 50 nM of siRNA/well in absence or in the presence of fusogenic lipids DOPE (dots on the bars). (b) Delivery of si-luc in A549-luc cell line with urea based foldamer **OL6** for different quantity of siRNA (50 nM or 20 nM). The transfection efficiency is expressed as percentage of luciferase activity compared to non-transfected cells and is the mean of the duplicates. The quantities of compound used are indicated under the bars and expressed in μg .

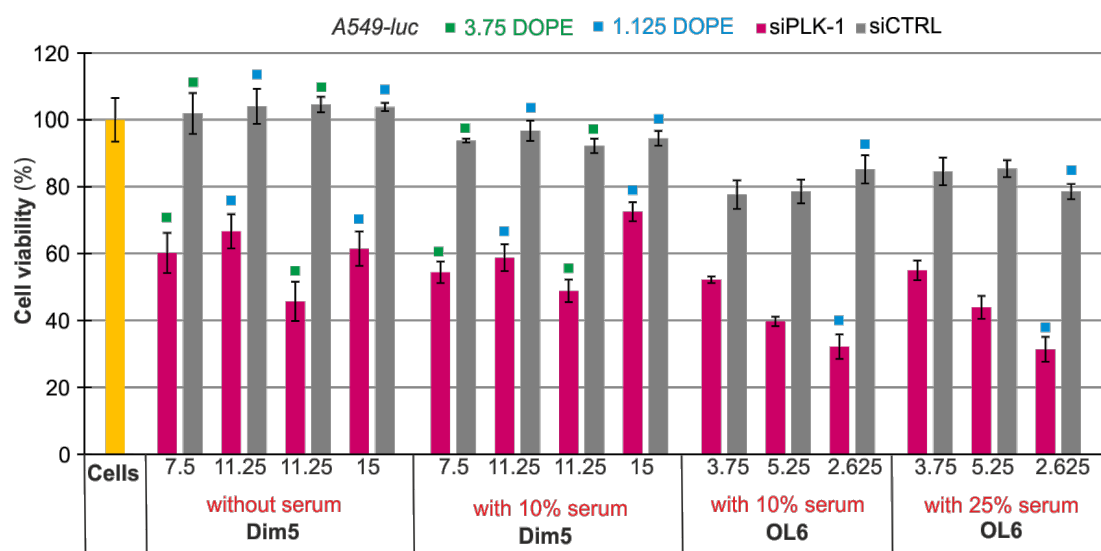


Figure PE.30 : Delivery of siPLK-1 in A549-luc cell line with urea-based foldamers OL6 and Dim5. The cell assays were performed in 48-well plates in duplicates with 50 nM of siRNA/well in absence or in the presence of fusogenic lipids DOPE (dots on the bars). The transfection efficiency is expressed as percentage of cell viability compared to non-transfected cells and is the mean of the triplicates. The quantities of compound used are indicated under the bars and expressed in μg . The transfection was performed in the absence or in the presence of serum as indicated under the bars.

iii) Protein delivery

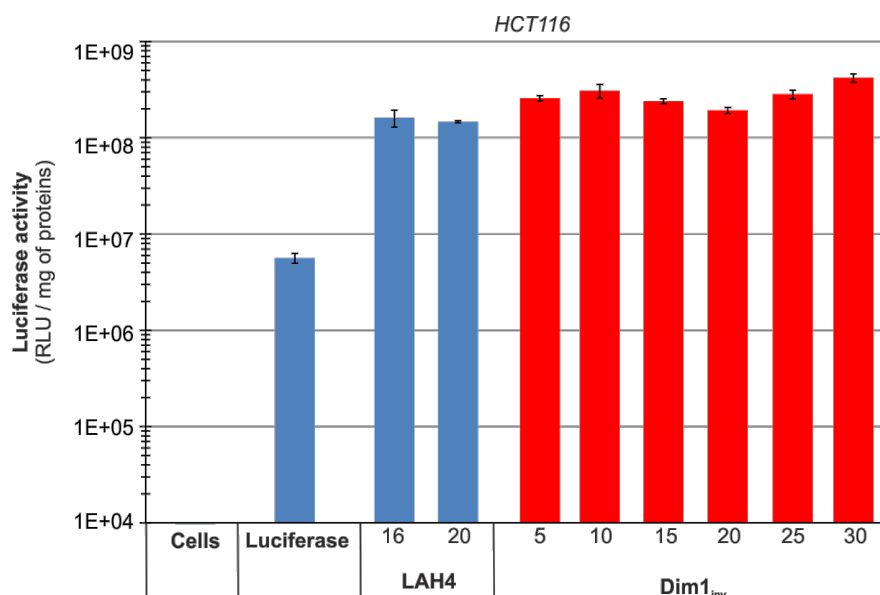


Figure V.31 : Transfection of luciferase protein in HCT116 cell line with urea-based foldamer **Dim1_{inv}** as well as peptide LAH4. Luciferase alone was used as negative control. The cell assays were performed in 48-well plates in duplicates with 2 μg of luciferase/well. The transfection efficiency is expressed as light units/s/mg of protein and is the mean of the duplicates. The quantities of compound used are indicated under the bars and expressed in μg .

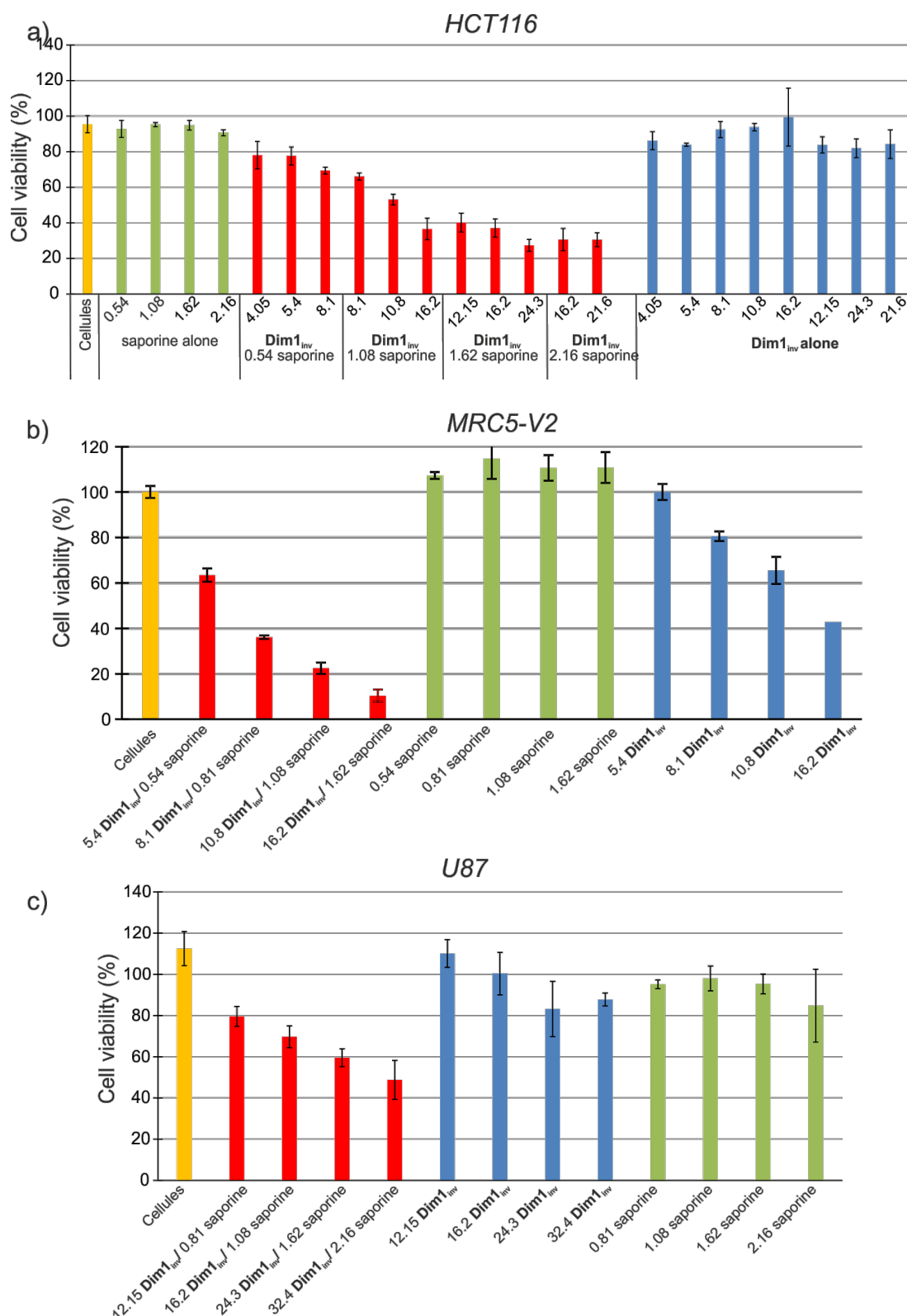


Figure V.32 : Transduction of saporine in three different cell lines with urea-based foldamers **Dim1_{inv}**. **Dim1_{inv}** and saporine alone were used as negative control. The cell assays were performed in 48-well plates. The transduction efficiency is expressed as percentage of cell mortality. The quantities of compound used are indicated under the bars and expressed in μg .

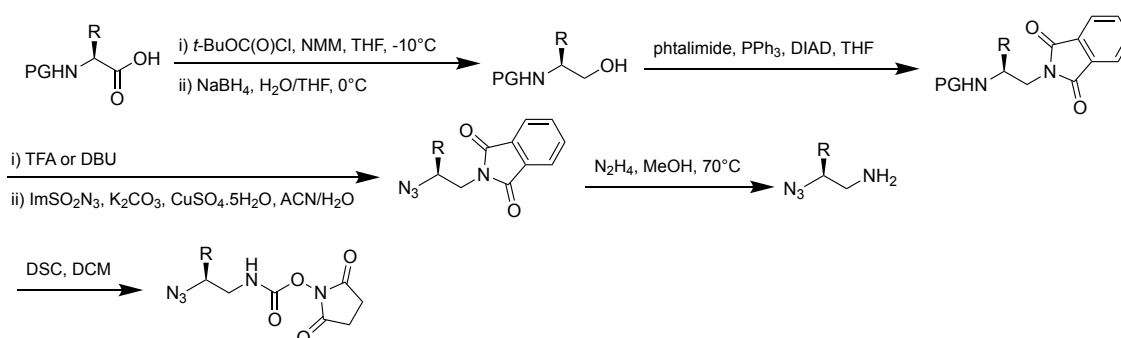
3) Experimental data of chapter 3

a) Experimental data of macrocyclisation project

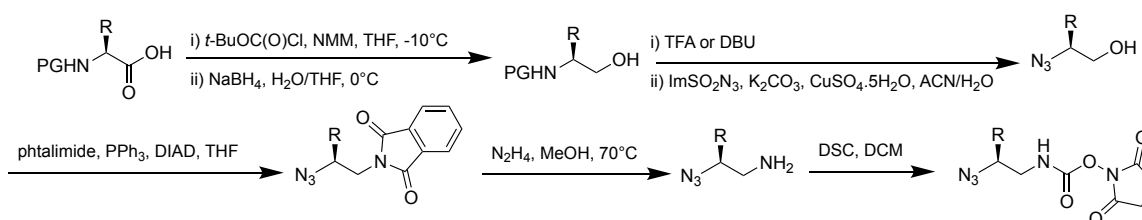
i) Synthesis of azide O-succinimidyl carbamates monomers

This procedure has been described previously by C. Douat et al.⁹

Route A:



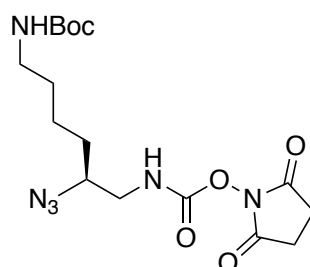
Route B:



Two different routes have been described for the synthetic procedure of the preparation of azido carbamates depending on the nature of side chain residue. Pathway A will be preferred when high volatility of the azido alcohol intermediate is suspected.

Tert-butyl-

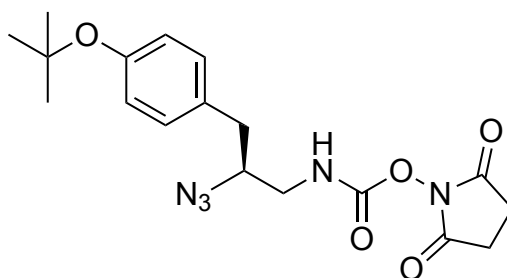
N-[(5S)-5-azido-6-({[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]carbonyl}amino)hexyl]carbamate (M^K):



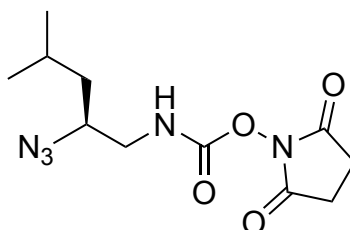
Fmoc-Lys(Boc)-OH (12 g, 25.6 mmol) was transformed according to *Route B*. The product was precipitated in Et₂O to afford 2g of N₃-Lys(Boc)-OSu as a white solid in 18% yield. ¹H

NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5.76 (bs, 1H, NH), 4.58 (bs, 1H, NH), 3.61 (m, 1H, CH), 3.46-3.26 (m, 2H, CH₂), 3.17 (q, 2H, CH₂, J = 6.1 Hz), 2.86 (s, 4H, 2 CH₂-OSu), 1.69-1.47 (m, 19H, Boc, CH₂ and H₂O); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.21, 156.69, 152.26, 62.16, 43.34, 40.39, 31.56, 28.97, 26.01, 23.05. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for C₁₆H₂₆N₆O₆ [M+H]⁺ 399.19138, found 399.19913.

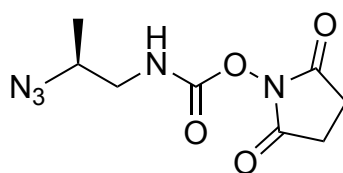
2,5-dioxopyrrolidin-1-yl N-[(2S)-2-azido-3-[4-(tert-butoxy)phenyl]propyl]carbamate (M^Y):



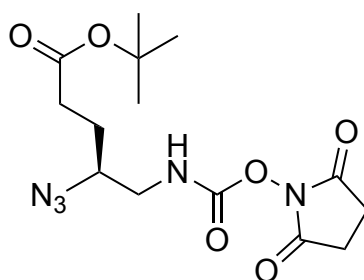
Fmoc-Tyr(tBu)-OH (10 g, 22 mmol) was transformed according to *Route B*. The product was precipitated in Et₂O to afford 2.1 g of N₃-Tyr(tBu)-OSu as a white solid in 25% yield. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 7.13 (d, J=8.5, 2H), 6.95 (d, J=8.5, 2H), 5.51 (t, J=5, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 2.87 (d, J=6, 1H), 2.83 (bp, 5H), 1.33 (s, 9H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz), δ (ppm): 169.88, 154.64, 151.68, 131.15, 129.90, 124.71, 78.68, 63.28, 45.06, 38.03, 28.93, 25.58. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for C₁₈H₂₃N₅O₅Na [M+Na]⁺ 412.1597, found 412.1607.

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl N-[(2S)-2-azido-4-methylpentyl]carbamate (M^L) :

Boc-Leu-OH (10 g, 43 mmol) was transformed according to *Route A*. The product was precipitated in Et₂O to afford 3.4 g of N₃-Leu-OSu as a white solid in 28% yield. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 5.69 (t, J=6, 1H), 3.65-3.56 (m, 1H), 3.46 (ddd, J=13.9, 6.8, 3.7, 1H), 3.14 (ddd, J=13.8, 8.2, 5.4, 1H), 2.83 (s, 4H), 1.87-1.70 (m, 1H), 1.51 (ddd, 14.6, 8.5, 6.2, 1H), 1.35 (ddd, J= 13.9, 8.1, 5.6, 1H), 0.96 (d, J= 6.6, 6H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz), δ (ppm): 169.97, 151.77, 77.58, 77.16, 76.74, 60.12, 45.73, 40.74, 25.58, 25.00, 22.92, 22.19; HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for C₁₁H₁₇N₅O₄Cl [M+Cl]⁻ 318.0969, found 318.0978.

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl N-[(2S)-2-azidopropyl]carbamate (M^A) :

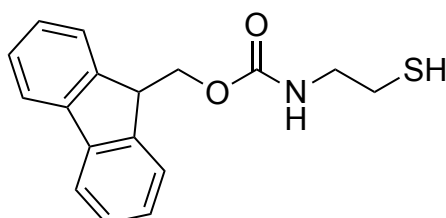
Boc-Ala-OH (10 g, 53 mmol) was transformed according to *Route A*. The product was precipitated in Et₂O to afford 2.5 g of N₃-Ala-OSu as a white solid in 20% yield. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm): 5.58 (bt, J=6, 1H), 3.81-3.71 (m, 1H), 3.41 (ddd, J=13.9, 7.0, 4.0, 1H), 3.14 (ddd, J= 13.7, 7.9, 5.4, 1H), 2.84 (s, 4H), 1.32 (d, J= 6.6, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz), δ (ppm): 169.90, 151.69, 77.51, 77.29, 76.66, 56.96, 46.57, 25.50, 16.66; HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for C₈H₁₁N₅O₄Cl [M+Cl]⁻ 276.0500, found 276.0490.

Tert-butyl (4S)-4-azido-5-([(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]carbonyl)amino)pentanoate (M^E) :

Fmoc-Glu(tBu)-OH (10g, 23.5 mmol) was transformed according to *Route B*. The product was precipitated in Et₂O to afford g of N₃-Tyr(tBu)-OSu as a white solid in 37% yield. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz), δ(ppm): 5.75 (bs, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.39 (m, 1H), 3.23 (m, 1H), 2.82 (s, 4H), 2.39 (m, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.45 (s, 9H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz), δ(ppm): 171.70, 169.41, 151.34, 80.81, 60.72, 44.68, 30.94, 27.76, 26.51, 21.16. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for C₁₄H₂₁N₅O₆ [M+H]⁺ 356.14918, found 356.15608.

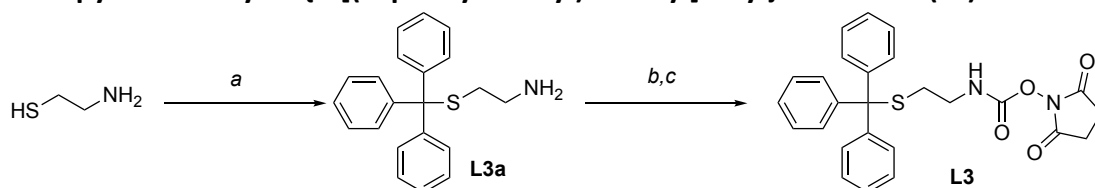
ii) Synthesis of linkers

9H-(fluoren-9-yl)methyl N-(2-sulfanylethyl)carbamate (L2):



Cysteamine (542 mg, 7.02 mmol) was dissolved in anhydrous DCM (15 mL) and cooled at 0°C. FmocCl (2.0 g, 7.72 mmol) previously dissolved in DCM (15 mL) was added to cysteamine. The reaction mixture was allowed to reach r.t and stirred for 16h. The crude was washed with KHSO₄ (1M, 2 x 15 mL) and brine (2 x 15 mL). After purification on column chromatography, 720 mg of pure compound were recovered with a yield of 34%. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.76 (d, 2H, J = 6 Hz), 7.58 (d, 2H, J = 6 Hz), 7.38 (m, 2H), 7.30 (m, 2H), 5.14 (bs, 1H), 4.45 (m, 2H), 4.24 (m, 1H), 3.38 (m, 2H), 2.66 (m, 2H).

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl N-{2-[(triphenylmethyl)sulfanyl]ethyl}carbamate (L3):

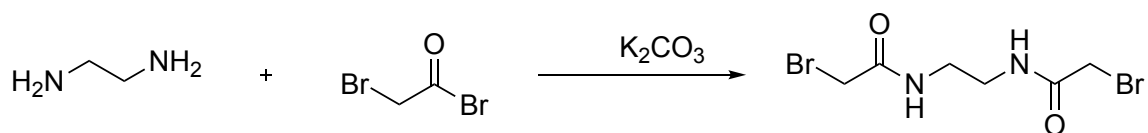


a: Trt-Cl, DCM/DMF; **b:** NMM, DCM; **c:** DSC, DCM

L3a was synthesized following the reported procedure described by Di Maro *et al.*¹⁰. The product was precipitated in a mixture MeOH/H₂O. The white solid obtained was washed two times with DCM and the product was directly engaged in the next step without further purification (quantitative yield). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.96 (br, 2H), 7.41-7.20 (m, 15H), 2.53-2.48 (m, 4H).

To a solution of **L3a** in anhydrous DCM (40 mL) was added NMM (2.0 eq, 31.8 mmol). After pH validation (8-9), DSC (1.2 eq, 16.86 mmol) was added and reaction was stirred for 2h. The solvent was concentrated under reduced pressure and the crude material, dissolved in 100 mL EtOAc, was washed with 1M KHSO₄ (2 x 50 mL), H₂O (50 mL), dried over MgSO₄ then concentrated under reduced pressure to give **L3** as white solid in a quantitative yield. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.47-7.23 (m, 15H), 5.30 (br, 1H), 3.01 (q, *J* = 6.38 Hz, 2H), 2.82 (s, 4H), 2.50 (t, *J* = 6.60 Hz, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.39, 151.40, 144.65, 129.63, 128.18, 126.98, 67.00, 40.84, 31.56, 25.50 ppm. HRMS-ESI *m/z* calcd. for C₂₆H₂₄N₂O₄Na [M + Na]⁺ 483.1349 found 483.1366.

2-bromo-N-[2-(2-bromoacetamido)ethyl]acetamide (**L4**):



L4 was synthesized as a white powder on a 10 mmole scale, following the procedure described by Kim *et al.*¹¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.34 (b, 2H), 3.85 (s, 4H), 3.35 (s, 4H).

iii) Synthesis of bis-thiol oligoureas

Loading of linker (L2) on 2-chlorotriyl chloride resin

2-chlorotriyl chloride resin (1.57 g, loading 1.14 mmol/g) is introduced in a 25 mL plastic syringe, then *N*-Fmoc cysteamine linker (1.07 g, 3.58 mmol) in solution in DCM (5 mL) is added on resin. The syringe is then shaken overnight using Stuart® Flask shaker. The resin was then filtered and washed with DCM (3 x 3 mL). A fresh solution of MeOH/DCM/DIEA (2 mL/ 18 mL/ 1 mL) was then added on the resin and the resin was shaken for 1 h. Then resin was then filtered and washed with MeOH (3 x 3 mL) then DCM (3 x 3 mL). Finally, resin was dried under high vacuum and the new loading was determined by UV dosing of the Fmoc piperidine adduct at 289 nm and 300 nm. A new loading of 0.68 mmol/g was measured.

General procedure F for solid phase oligourea synthesis under microwave irradiation using azide strategy:

Oligoureas were prepared on a 75 to 150 μmol scale. The Fmoc-cystamine clorotrityl resin (loading 0.68 mmol/g) was placed in a SPE tube (CEM), and pre-swelled in DCM for 1h. First deprotection of the resin Fmoc group was performed with a mixture of DMF/piperidine (8/2) under microwave irradiation (50W, 50°C for 8 min). Fmoc deprotection was monitored using Kaiser test. For each coupling step, the azide protected succinimidyl carbamate monomer (1.5 eq) and DIEA (3 eq) in DMF (2-3 mL) were successively added to the resin, and the reactor was placed inside the microwave oven (CEM Discover Bio) to be irradiated (25W, 70°C for 20 min). A double coupling was performed systematically. The resin was then filtered and washed with DMF (2 x 3 mL), DCM (2 x 3 mL) than DMF (2 x 3 mL) again. Reduction of the azide group was next performed under microwave assistance by swelling the resin in a mixture dioxane/water (7/3, 2-3 mL) and adding 1M PMe_3 solution in THF (10 eq relative to the resin loading), irradiating with 25W power, heating at 70°C for 30 min. The reduction reaction was repeating once. The resin was then filtered and washed with dioxane/water (7/3, 2 x 3 mL), then DCM (2 x 3 mL) and DMF (2 x 3 mL). For each coupling and reduction step, completion was monitored using chloranil test. End capping with linker **L3** was performed using the same coupling conditions than those used for the succinimidyl carbamate monomers. Finally, the resin was washed with DCM (2 x 3 mL) and was swelled in a mixture TFA/TIS/ H_2O /EDT (92.2:2.5:2.5:2.5, v/v/v/v) and left to react 5h. After that time, the resin was filtered off, washed with TFA (2 x 2 mL), DCM (2 x 2 mL) and the filtrate was evaporated under reduced pressure. After precipitation with cold Et_2O , the crude oligoureas were finally lyophilized then purified by preparative RP-HPLC using the appropriate gradient to a final purity > 95% and lyophilized.

Compound OL8:

OL8 was synthesized on 150 μmol scale, according to the general procedure F. Yield after purification 44 mg, 35%. White powder; RP-HPLC t_R 4.24 min (linear gradient, 10-100% of B, 5 min, λ = 214 nm); HRMS calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{63}\text{N}_{11}\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 830.43; found 830.5859.

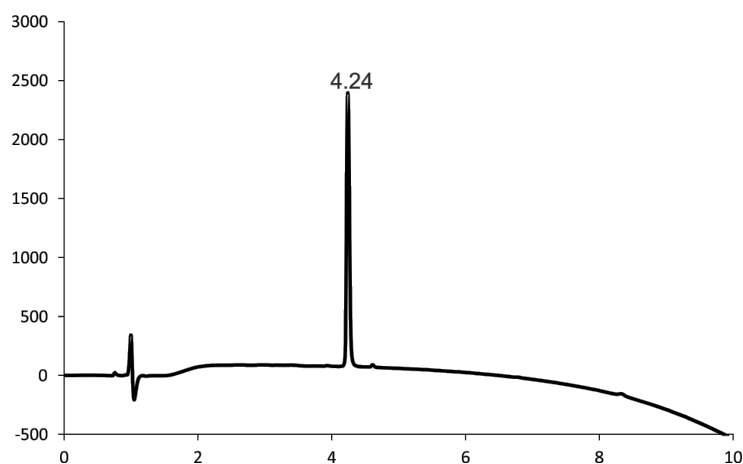


Figure V.33 : RP-HPLC of **OL8** after purification (10-100% of B in 10 min, λ = 200 nm).

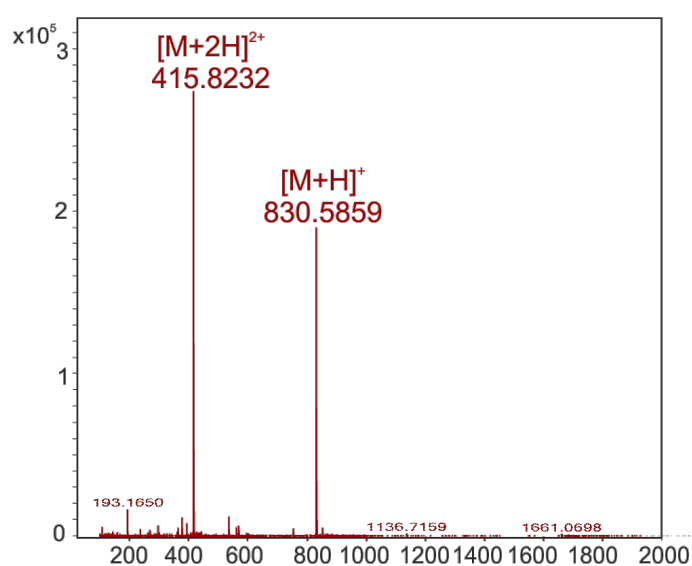


Figure V.34 : MS spectra of **OL8**.

Compound OL9:

OL9 was synthesized on 75 μ mol scale, according to the general procedure **F**. Yield after purification 20 mg, 21%. White powder; RP-HPLC t_R 4.69 min (linear gradient, 10-100% of B, 5 min, λ = 214 nm); HRMS calcd. for $C_{55}H_{102}N_{18}O_{13}S_2$ $[M+H]^+$ 1287.73; found 1287.7345.

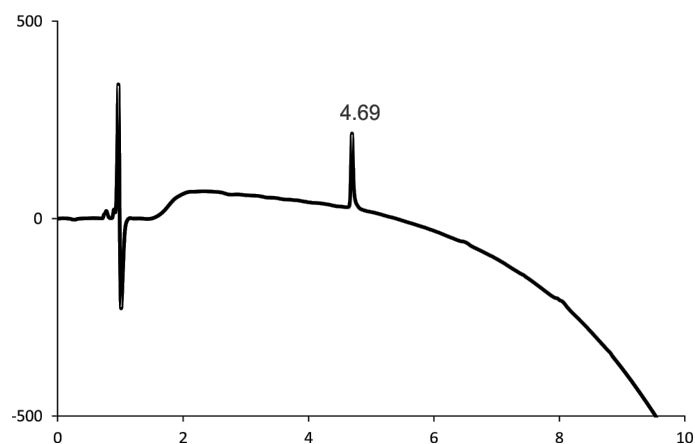


Figure V.35 : RP-HPLC of **OL9** after purification (10-100% of B in 10 min, $\lambda = 200$ nm).

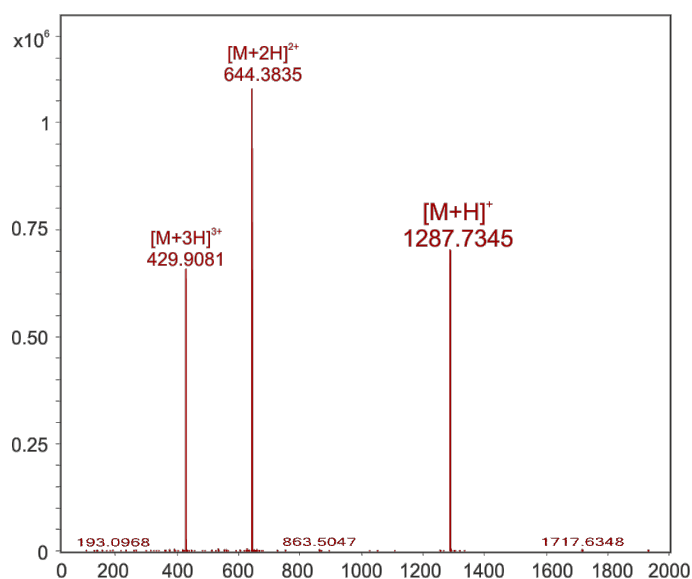


Figure V.36 : MS spectra of **OL9**.

Compound OL10:

OL10 was synthesized on 75 μ mol scale, according to the general procedure **F**. Yield after purification 13 mg, 10%. White powder; RP-HPLC t_R 7.02 min (linear gradient, 10-100% of B, 5 min, $\lambda = 214$ nm); HRMS calcd. for $C_{80}H_{152}N_{26}O_{17}S_2$ $[M+H]^+$ 1815.13; found 1815.3521.

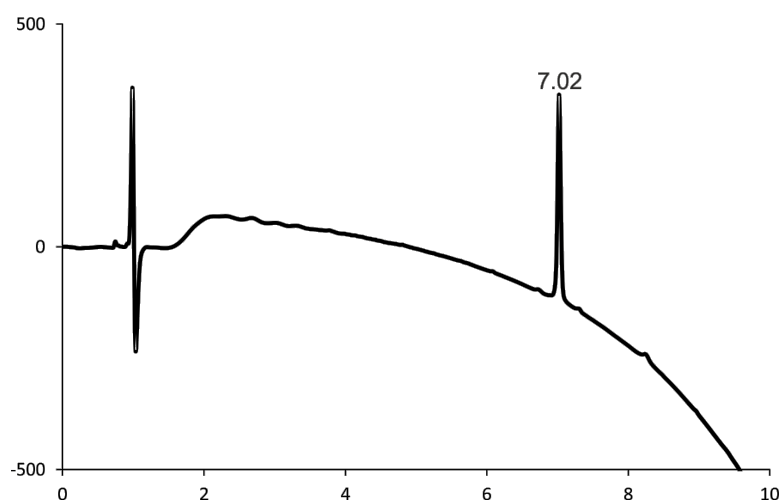


Figure V.37 : RP-HPLC of **OL10** after purification (10-100% of B in 10 min, $\lambda = 200$ nm).

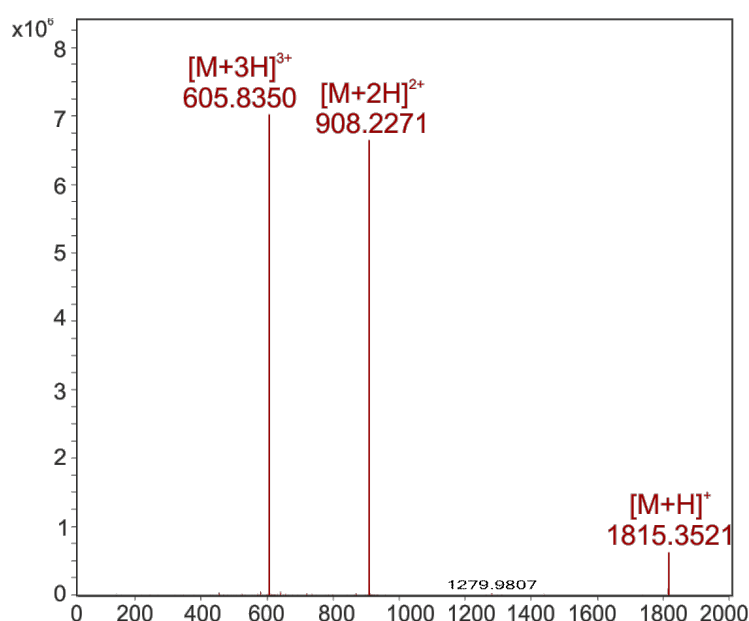
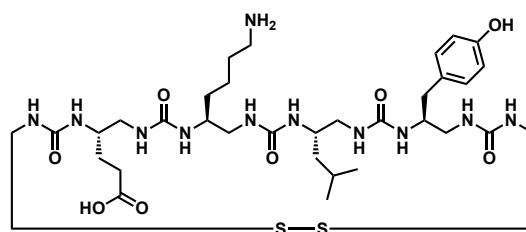


Figure V.38 : MS spectra of **OL10**.

iv) Synthesis of the macrocycles

General procedure **G** for the macrocyclisation *via* disulfide bridge formation

Bis-thiol oligourea (0.5 mg/mL) was dissolved in NH_4HCO_3 buffer (100 mM, pH 8) containing 20% DMSO. Reaction was let to react 25-72 h and followed by HPLC. Once completion was reached, 1 mL of TFA (5% in water) was added and the crude was freeze-dried before being purified on semi-preparative RP-HPLC.

Compound MC1 :

OL8 (8.85 mg) was cyclized using the general procedure **G**. Yield after purification 3 mg, 34%; RP-HPLC t_R 4.20 min (linear gradient 10-100% of B in 10 min); HRMS calcd. for $C_{35}H_{61}N_{11}O_8S_2$ $[M+H]^+$ 828.41, found 828.4267.

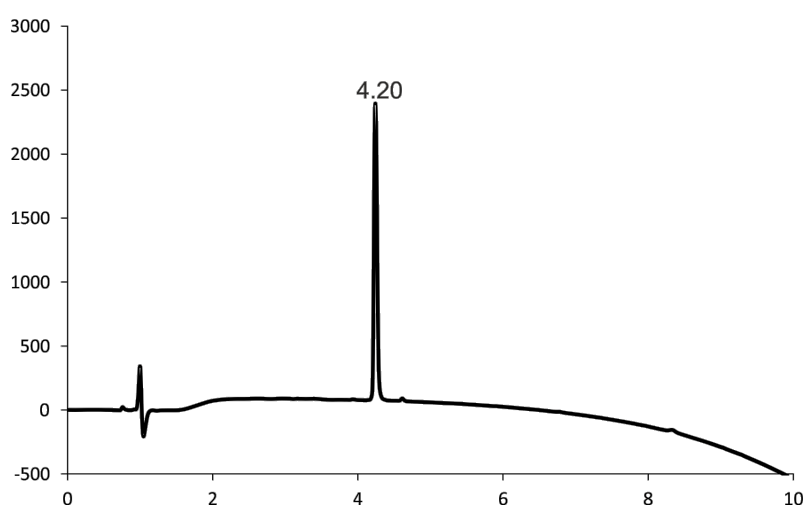


Figure V.39 : RP-HPLC of **MC1** after purification (10-100% of B in 10 min, $\lambda = 200$ nm).

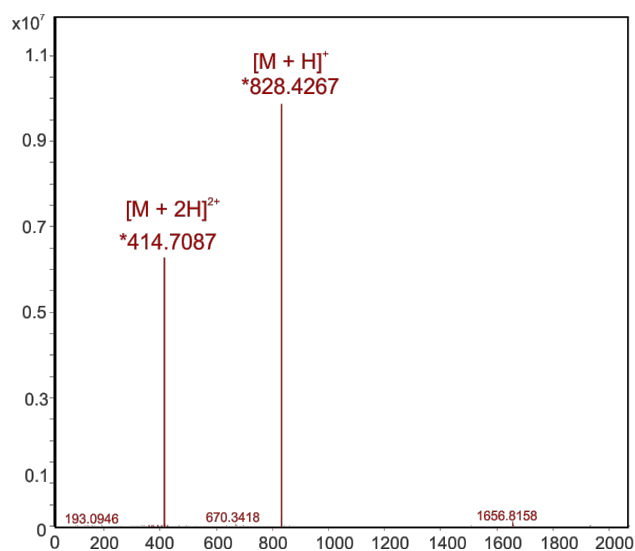
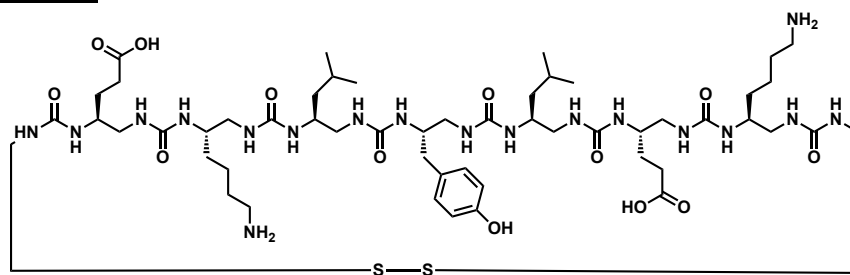


Figure V.40 : MS spectra of **MC1**.

Compound MC2 :

OL9 (1.63 mg) was cyclized using the general procedure **G**. Yield after purification 0.5 mg, 31%; RP-HPLC t_R 3.93 min (linear gradient 10-100% of B in 10 min); HRMS calcd. for $C_{55}H_{100}N_{18}O_{13}S_2$ $[M+H]^+$ 1285.72, found 1285.9110.

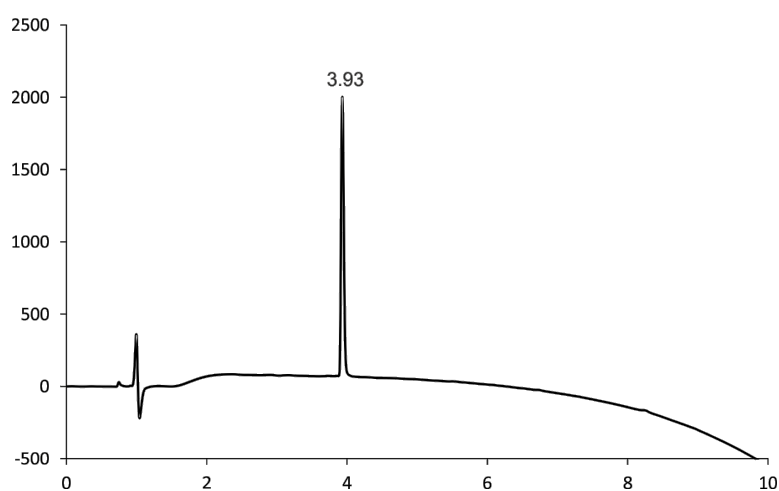


Figure V.41 : RP-HPLC of **MC2** after purification (10-100% of B in 10 min, $\lambda = 200$ nm).

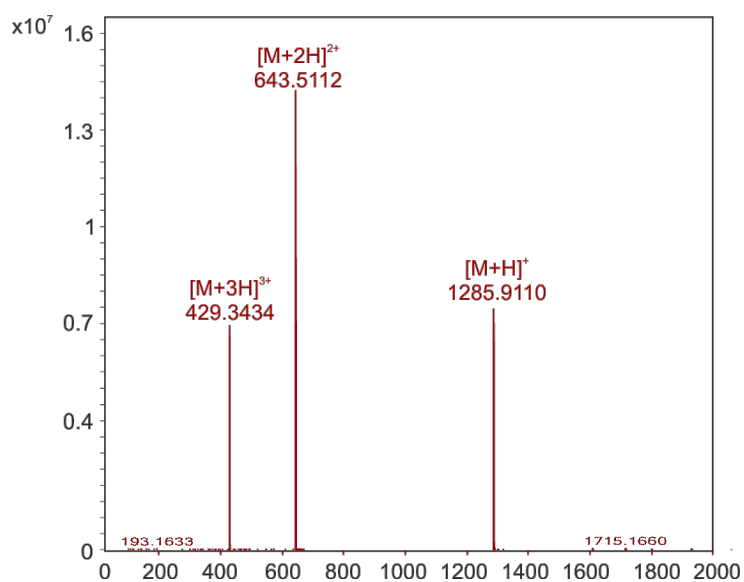
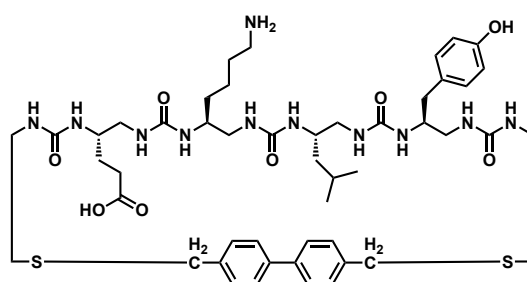


Figure V.42 : MS spectra of **MC2**.

General procedure H for macrocyclization *via* the introduction of an external linker and thioether bond formation:

Bis-thiol oligourea was dissolved in a mixture 5:5 ACN/ NH_4HCO_3 buffer (20 mM, pH 7.4) to reach a concentration of 0.5 mg/mL. Then, 3eq of TCEP were added and the solution was shaken 1h. Then the bis-bromo linker (1.5 eq) in solution in DMF (500 μL) was added and the reaction was followed by HPLC until completion (24-48h). The crude was then quenched with 1 mL TFA (5% in water) and freeze-dried before being purified on semi-preparative RP-HPLC.

Compound MC3:



OL8 (13.94 mg) was cyclized using the general procedure **H**. Yield after purification 4 mg, 24%; RP-HPLC t_R 6.22 min (linear gradient 10-100% of B in 10 min); HRMS calcd. for $\text{C}_{49}\text{H}_{73}\text{N}_{11}\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1009.51, found 1009.5247.

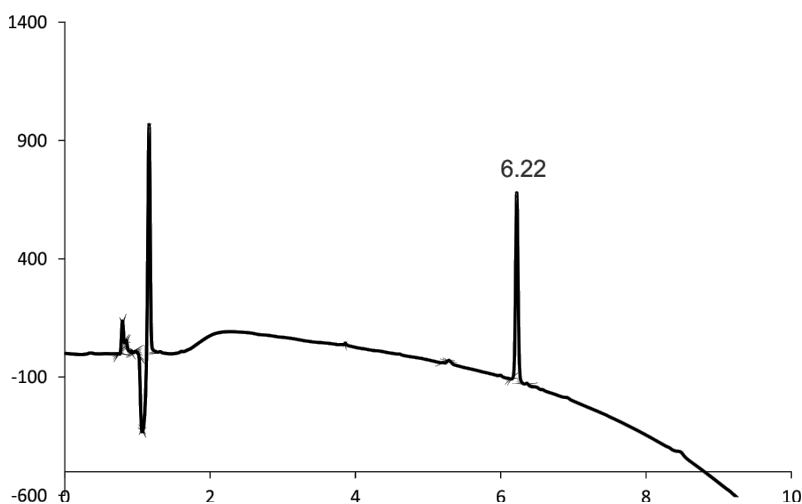


Figure V.43 : RP-HPLC of **MC3** after purification (10-100% of B in 10 min, $\lambda = 200$ nm).

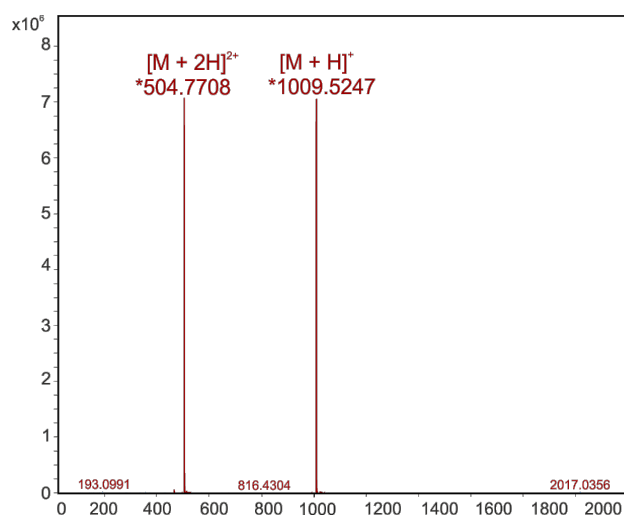
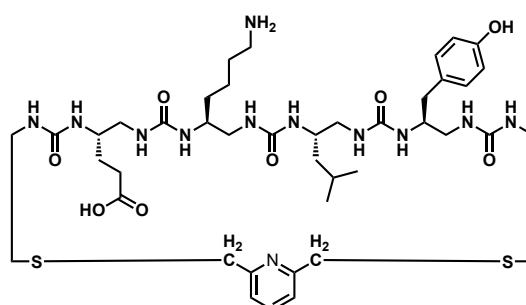


Figure V.44 : MS spectra of **MC3**.

Compound MC4 :



OL8 (3.5 mg) was cyclized using the general procedure **G**. Yield after purification 0.9 mg, 23%; RP-HPLC t_R 2.91 min (linear gradient 10-100% of B in 10 min); HRMS calcd. for $C_{42}H_{68}N_{12}O_8S_2$ $[M+H]^+$ 933.47, found 933.6403.

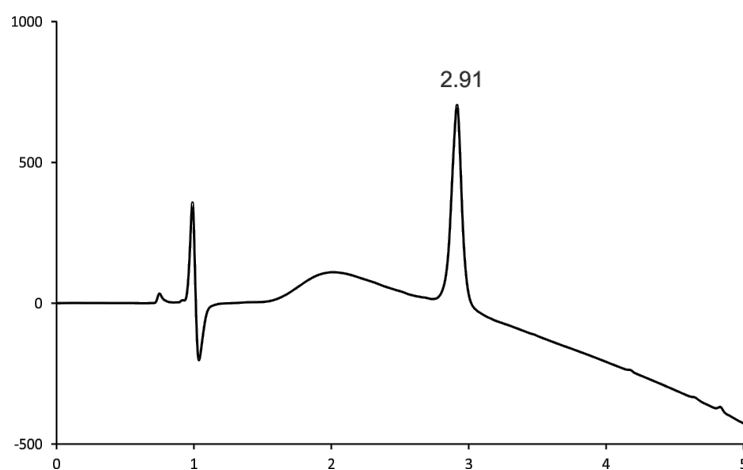


Figure V.45 : RP-HPLC of **MC4** after purification (10-100% of B in 5 min, $\lambda = 200$ nm).

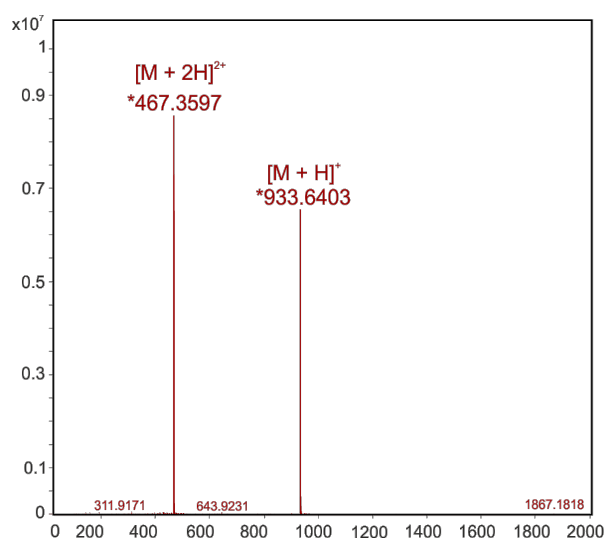
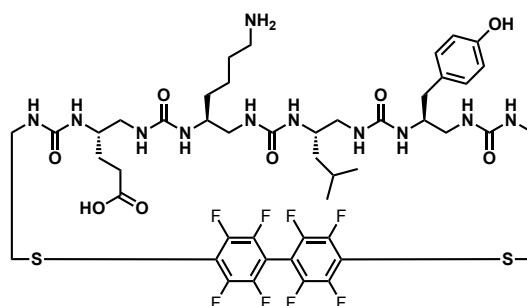


Figure V.46 : MS spectra of **MC4**.

Compound MC5 :



OL8 (4.4 mg) was cyclized using the general procedure **G**. Yield after purification 0.8 mg, 14%; RP-HPLC t_R 6.32 min (linear gradient 10-100% of B in 10 min); HRMS calcd. for $C_{47}H_{61}F_8N_{11}O_8S_2$ $[M+H]^+$ 1124.40, found 1124.5938.

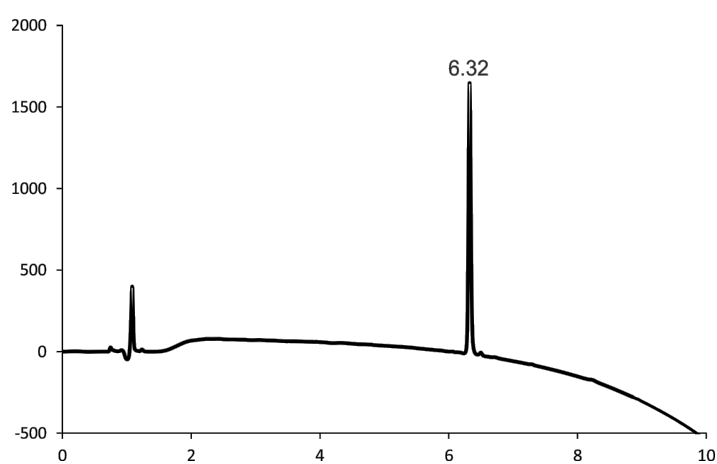


Figure V.47 : RP-HPLC of **MC5** after purification (10-100% of B in 10 min, $\lambda = 200$ nm).

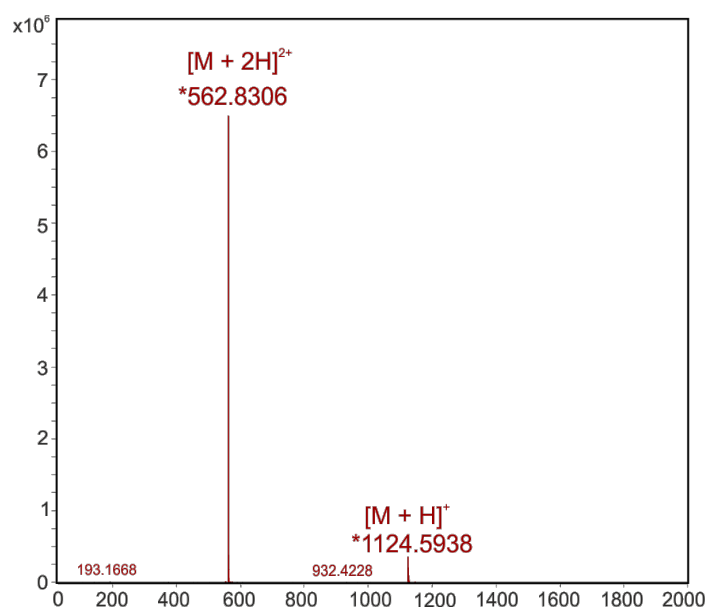
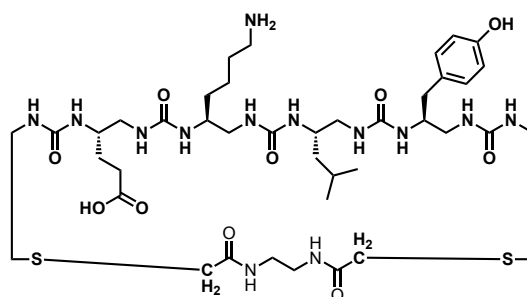


Figure V.48 : MS spectra of MC5.

Compound MC6 :



OL8 (4.0 mg) was cyclized using the general procedure **G**. Yield after purification 0.9 mg, 19%; RP-HPLC t_R 3.11 min (linear gradient 10-100% of B in 10 min); HRMS calcd. for $C_{41}H_{71}F_8N_{13}O_{10}S_2$ $[M+H]^+$ 970.49, found 970.6594.

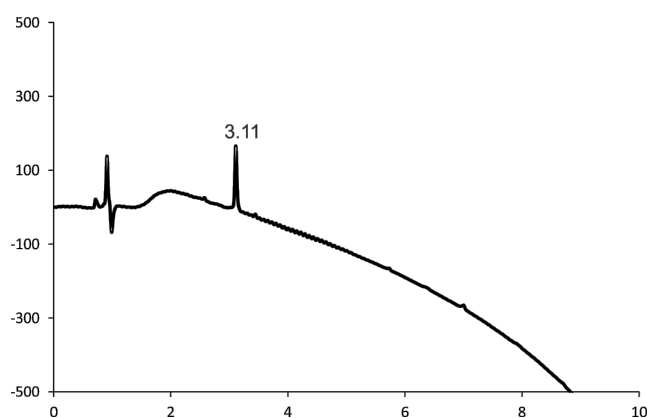


Figure V.49 : RP-HPLC of MC6 after purification (10-100% of B in 10 min, λ = 200 nm).

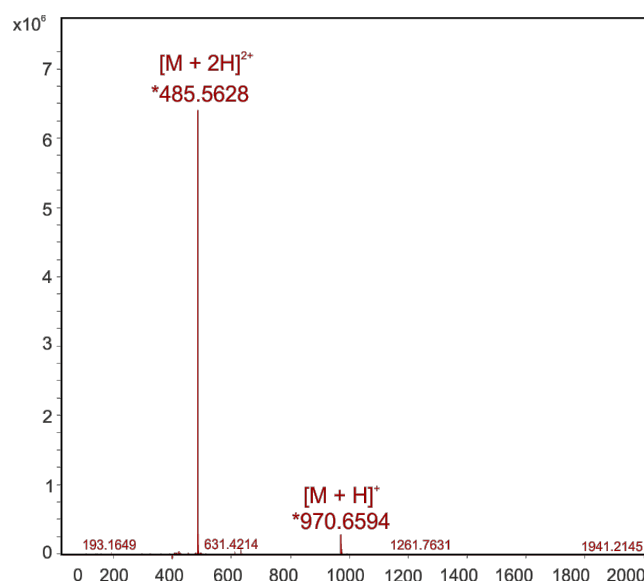


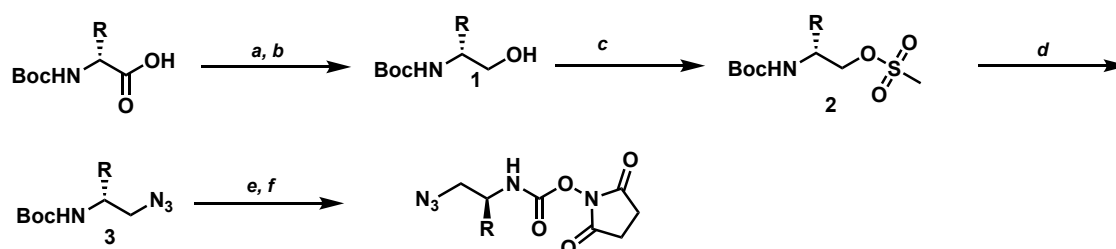
Figure V.50 : MS spectra of MC6.

b) Experimental data of meso oligoureas project

i) Synthesis of O-succinimidyl carbamates monomers

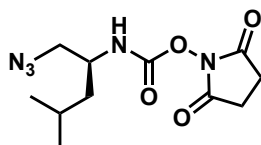
Synthesis of azido-succinimidyl carbamate monomers bearing side chain on C α

This procedure has been described previously by N. Pendem *et al.*¹²

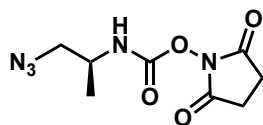


a: *t*BuOC(O)Cl, NMM, THF, -10°C; **b:** NaBH₄, H₂O; **c:** MsCl, Et₃N, DCM; **d:** NaN₃, DMF, 80°C; **e:** TFA; **f:** DSC, DCM

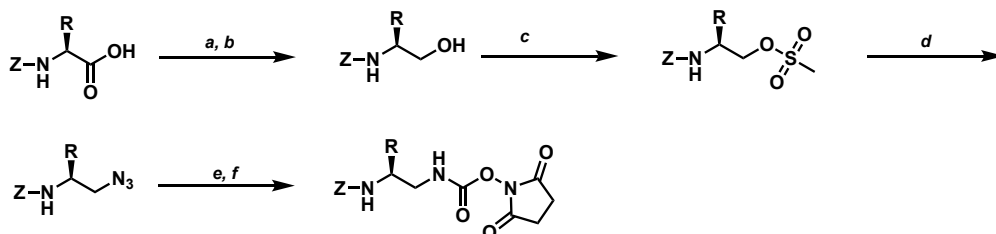
2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (3R)-3-(azidomethyl)-5-methylhexanoate (N₃-M^L_α) :



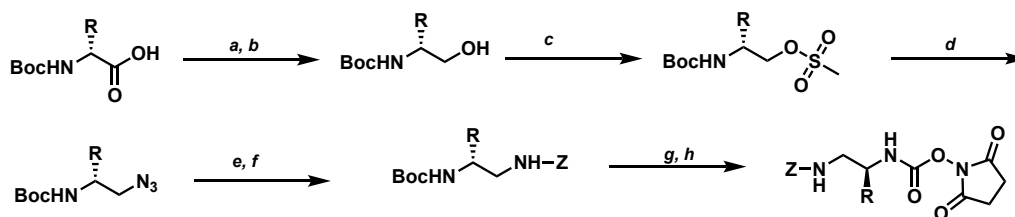
Boc-D-Leu-OH (10 g, 43.2 mmol) was transformed according to the route described above. The product was precipitated in Et₂O to afford 5.9 g of **N₃-M^L_α** as a white solid in 46% yield. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 5.30 (bs, 1H), 2.86 (m, 1H), 3.43 (dd, 2H, J = 30 Hz and J = 9 Hz), 2.82 (s, 4H), 1.67 (m, 1H), 1.51 (m, 1H), 1.40 (m, 1H), 0.96 (d, 6H, J = 6 Hz); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 169.77, 151.01, 70.74, 54.55, 50.94, 50.37, 44.38, 41.10, 25.49, 22.07. HRMS (ES⁺) calcd for C₁₁H₁₇O₄N₅ [M+H⁺]⁺ = 284.12805, found 284.13598.

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl (3R)-4-azido-3-methylbutanoate ($N_3-M^A_\beta$) :

Boc-D-Ala-OH (2.5 g, 12.5 mmol) was transformed according to the route described above. The product was precipitated in Et₂O to afford 1.2 g of $N_3-M^A_\beta$ as a white solid in 40% yield. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5.83 (m, 1H), 3.89 (m, 1H), 3.45 (dq, 2H), 2.82 (s, 4H), 1.28 (d, J = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.0, 150.80, 55.32, 47.96, 25.45, 17.88. HRMS (ES⁺) calcd. for C₈H₁₁N₅O₄Cl [M+Cl]⁺ 276.0500, found 276.0502.

Synthesis of Z-protected O-succinimidyl carbamate monomers ($Z-M^X_{\alpha/\beta}$) :**Route A:**

a: *t*BuOC(O)Cl, NMM, THF, -10°C; **b:** NaBH₄, H₂O; **c:** Et₃N, MsCl, DCM; **d:** NaN₃, DMF, 80°C; **e:** PPh₃, THF/H₂O, 70°C **f:** DSC, DCM

Route B:

a: *t*BuOC(O)Cl, NMM, THF, -10°C; **b:** NaBH₄, H₂O; **c:** Et₃N, MsCl, DCM; **d:** NaN₃, DMF, 80°C; **e:** PPh₃, THF/H₂O, 70°C **f:** Z-Cl, Et₃N, DCM; **g:** TFA; **h:** DSC, DCM

General procedure for N-protected amino alcohol formation :

The N-protected α -amino acid (10 mmol) was dissolved in anhydrous THF (30 mL) under N₂ atmosphere and the solution was cooled down at -10°C. After addition of NMM (1.2 mL, 11 mmol) and isobutylchloroformate (1.3 mL, 11 mmol), the mixture was stirred at -10°C for 30 min. The precipitated N-methylmorpholine hydrochloride was removed by filtration and washed with THF (2 x 30 mL). The filtrate and washings were added to a solution of NaBH₄ (0.76 g, 20 mmol) in water (5mL) at 0°C and the resulting solution was stirred at room temperature for 30 min. Reaction mixture was then quenched by adding water (30 mL). THF was removed using rotary evaporation and the crude was dissolved in ethyl acetate (50 mL). The organic layer was then washed twice with KHSO₄ (1M) (50 mL), then twice with a saturated solution of NaBH₄ (50 mL) followed by brine (50 mL). The organic

layer was then dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure to give the amino alcohol.

General procedure for alcohol to azide conversion:

The N-protected α -amino alcohol (10 mmol) was dissolved in DCM (30 mL) under argon atmosphere and the solution was cooled down at 0°C . After addition of Et_3N (1.4 mL, 10 mmol), methanesulfonyl chloride (850 μL , 11 mmol) was added and the reaction mixture was then stirred 1h. The crude was concentrated under reduced pressure and directly engaged in the next step.

The N-protected α -amino mesylate (10 mmol) was dissolved in DMF (60 mL) and NaN_3 (1.95 g, 30 mmol) was added. The reaction mixture was then heated at 80°C and stirred for 4h. The reaction mixture was cooled down and the crude was diluted in ethylacetate (100 mL). The organic layer was then washed twice with KHSO_4 (1M) (50 mL), twice with water (50 mL), then twice with brine (50 mL). The organic layer was then dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure to give N-protected α -amino azide which was directly engaged in the next step without further purification.

General procedure for the reduction of azide into amine:

The N-protected α -amino azide (10 mmol) was dissolved in a mixture THF/ H_2O (7:3) (50 mL). After addition of PPh_3 (2.88 g, 11 mmol), the reaction mixture was heated at 70°C and stirred for 3h. THF was evaporated and the crude material was dissolved in ethylacetate (50 mL), then amine was extracted twice with HCl (1M) (50 mL). The aqueous phase was then neutralized by adding K_2CO_3 powder. The amine was then extracted three times with ethyl acetate (50 mL). After drying over MgSO_4 , the solvent was not evaporated to dryness to avoid the loss of amine which may be quite volatile. Resulting amine was then directly engaged in the next step.

General procedure for Boc removal:

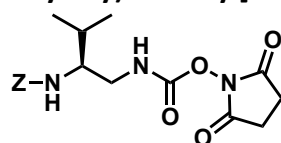
The N-Boc protected intermediate (10 mmol) was dissolved in pure TFA (10 mL) and left to react without stirring for 30 min. The TFA was removed under reduced pressure and the TFA salt was dried on vacuum line. No purification and no isolation of the TFA salts were done. They were directly engaged in the next step.

General procedure for the introduction of Z protecting group:

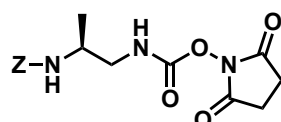
The free amine intermediate (10 mmol) was dissolved in DCM (30 mL) under argon atmosphere and the solution was cooled down at 0°C. After addition of Et₃N (1.4 mL, 10 mmol), benzylchloroformate (1.6 mL, 11 mmol) was added and the reaction mixture was then stirred 3h. The crude was washed twice with 1M KHSO₄ (50 mL), with brine (50 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude material was then purified on column chromatography to afford the expected Z-protected amine.

General procedure for the activation of amine into succinimidylcarbamate:

To a stirred suspension of disuccinimidyl carbonate (1.54 g, 6 mmol) in freshly distilled DCM (50 mL) was added a solution of Z-protected-3-X-propan-1-amine (5 mmol) in distilled DCM (50 mL). After 1h30, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the crude material was dissolved in ethylacetate (70 mL). The organic layer was washed with 1M KHSO₄ (2 x 30 mL), with brine (30 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to furnish activated carbamates as solids.

2,5-dioxypyrrolidin-1-yl (2S)-2-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-3-methylbutanoate (Z-M^V_β) :

Z-Val-OH (5 g, 19 mmol) was transformed according to Route A. The product was precipitated in Et₂O to afford 1.42 g of Z-Val^u-OSuc as a white solid in 19% yield. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.38 (bs, 5H), 5.99 (bs, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.82 (bs, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.43-3.26 (m, 2H), 2.82 (s, 4H), 1.82 (m, 1H), 0.96 (t, 6H). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 170.35, 157.83, 152.56, 136.83, 129.12, 67.78, 56.90, 45.53, 30.71, 27.47, 19.86, 18.60. HRMS (ES⁺) calcd for C₁₈H₂₃O₆N₃ [M+H⁺]⁺ = 378.15869; found 378.16589.

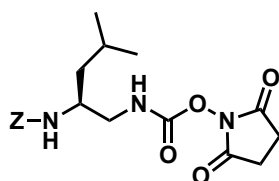
Tert-butyl**N-[(2S)-1-[[[(2,5-dioxypyrrolidin-1-yl)oxy]carbonyl]amino]propan-2-yl]carbamate (Z-M^A_β):**

Z-Ala-OH (5 g, 22 mmol) was transformed according to Route A. The product was precipitated in Et₂O to afford 1.59 g of Z-Ala^u-OSuc as a white solid in 21% yield. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.37 (bs, 5H, Ar), 5.97 (bs, 1H, NH), 5.12 (s, 2H, CH₂-Z), 4.81 (bs,

¹H, NH), 3.93 (m, 1H, CH), 3.42-3.25 (m, 2H, CH₂), 2.80 (s, 4H, OSu), 1.22 (d, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 169.93, 156.50, 152.09, 136.32, 132.11, 128.57, 67.05, 47.66, 47.17, 25.46, 18.24. HRMS (ES+) calcd for C₁₆H₂₀O₆N₃ [M+H⁺]⁺ = 350.12739; found 350.13402.

Tert-butyl-

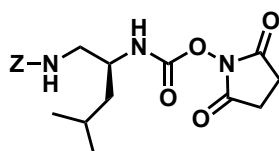
N-[(2S)-1-{{{(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy}carbonyl}amino}-4-methylpentan-2-yl]carbamate (Z-M^L_β):



Z-Leu-OH (5 g, 19 mmol) was transformed according to Route A. The product was precipitated in Et₂O to afford 1.03 g of Z-Leu^u-OSuc as a white solid in 15% yield. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.37 (bm, 5H, Ar), 5.98 (bs, 1H, NH), 5.12 (s, 2H, CH₂-Ar), 4.69 (bs, 1H, NH), 3.86 (m, 1H, CH), 3.43-3.19 (m, 2H, CH₂), 2.82 (s, 4H, OSu), 1.67 (m, 1H, CH), 1.34 (m, 2H, CH₂), 0.94 (d, 6H, 2 CH₃), ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 170.34, 157.42, 152.50, 136.80, 129.09, 67.66, 49.96, 47.72, 41.90, 25.98, 25.25, 23.49, 22.51. HRMS (ES+) calcd for C₁₉H₂₆O₆N₃ [M+H⁺]⁺ = 392. 17434; found 392. 18114.

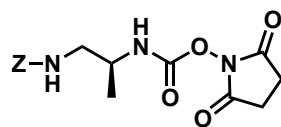
2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-

N-[(2R)-1-{{{(benzyloxy)carbonyl}amino}-4-methylpentan-2-yl]carbamate (Z-M^L_α):



Boc-D-Leu-OH (10 g, 40 mmol) was transformed according to Route B. The product was precipitated in Et₂O to afford 2.40 g of Z-Leu^u_{inv}-OSuc as a white solid in 15% yield. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ(ppm): 7.37 (bm, 5H, Ar), 5.59 (bs, 1H, NH), 5.15 (s, 2H, CH₂-Ar), 5.07 (bs, 1H, NH), 3.78 (m, 1H, CH), 3.44-3.17 (m, 2H, CH₂), 2.80 (s, 4H, OSu), 1.72 (m, 1H, CH), 1.41 (m, 2H, CH₂), 0.96 (d, 6H, 2 CH₃); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃), δ(ppm): 170.38, 157.85, 152.12, 136.98, 129.07, 128.72, 67.63, 52.53, 45.34, 41.83, 26.01, 25.24, 23.40, 22.74. HRMS (ES+) calcd for C₁₉H₂₅O₆N₃ [M+H⁺]⁺ = 392.17434, found 392.18188.

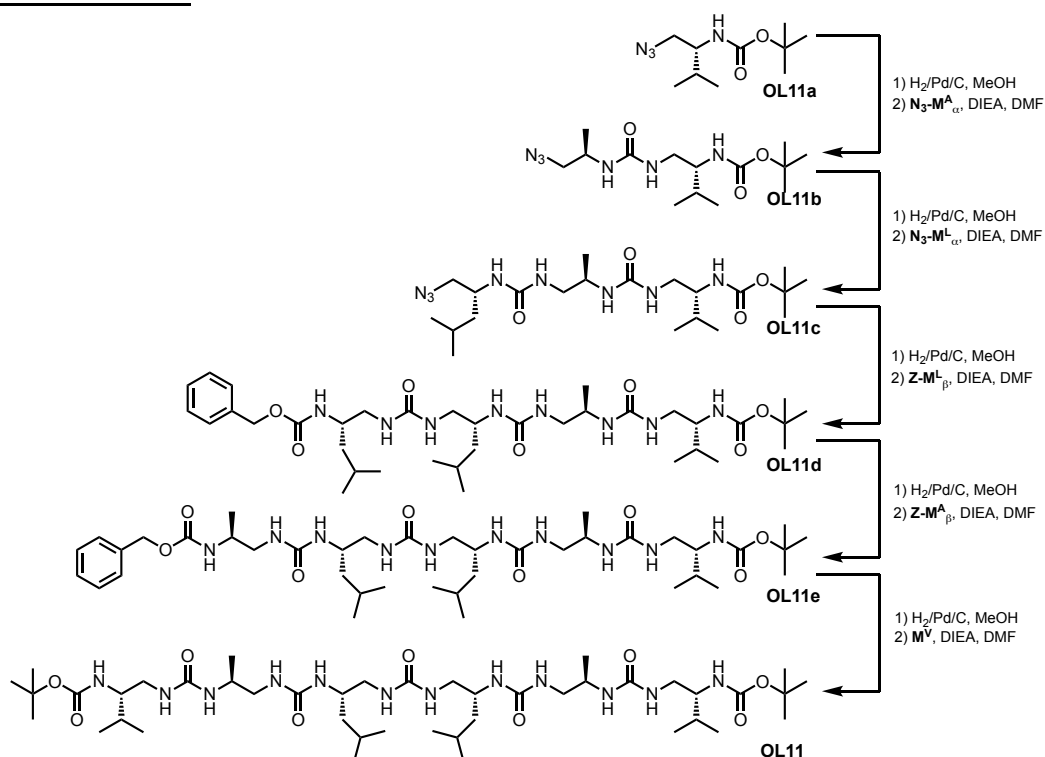
2,5-dioxopyrrolidin-1-yl N-[(2R)-1-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]propan-2-yl]carbamate ($Z-M^A_\alpha$):



Boc-D-Ala-OH (10 g, 52.85 mmol) was transformed according to Route B. The product was precipitated in Et₂O to afford 2.67 g of OSu-D-Ala-Z as a white solid in 15% yield. ¹H NMR (300MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.36 (m, 5H), 5.87 (bs, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.85 (bs, 1H), 3.28 (m, 2H), 2.81 (s, 4H), 1.58 (s, 9H), 1.26 (d, 3H). HRMS (ES⁺) calcd for C₁₆H₁₉O₆N₃ [M+H]⁺ = 350.12739, found 350.13443.

ii) Synthesis of meso and pseudo-meso oligopeuras in solution:

Compound OL11:



Dimer OL11b :

To a solution of **OL11a** (1.23 g, 5.38 mmol) in MeOH (20 mL) was added Pd/C (123 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gas was then removed using vacuum pump and a balloon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in

DMF (10 mL), were successively added DIEA (937 μ L, 5.38 mmol) and **N₃-M^A _{α}** (1.13 g, 5.92 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude then was dried under high vacuum. This step provided the expected dimer as a white solid without purification (1.38 g, 78%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃CN), δ (ppm): 5.27 (bs, 1H), 5.01 (bs, 2H), 3.83 (m, 1H), 3.35 (m, 1H), 3.28 (dd, 2H), 3.09 (m, 2H), 1.68 (m, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.09 (d, 3H), 0.86 (t, 6H).

Trimer OL11c :

To a solution of **OL11b** (800 mg, 2.6 mmol) in MeOH (15 mL) was added Pd/C (80 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gaz was then removed using vacuum pump and a ballon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (10 mL), were successively added DIEA (742 μ L, 3.64 mmol) and N₃-Leu^U_{inv}-OSuc (816 mg, 2.88 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude then was dried under high vacuum. This step provided the expected trimer as a white solid without purification (940 mg, 76%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃CN), δ (ppm): 5.43 (bs, 1H), 5.33 (m, 2H), 5.11 (bs, 1H), 5.00 (bs, 1H), 3.88 (m, 1H), 3.69 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.31 (m, 2H), 3.18 (m, 1H), 2.96 (m, 1H), 1.69 (m, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.33 (m, 2H), 1.12 (m, 1H), 1.05 (d, 3H), 0.97-0.87 (m, 12H).

Tetramer OL11d :

To a solution of **OL11c** (940 mg, 2.0 mmol) in MeOH (15 mL) was added Pd/C (94 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gaz was then removed using vacuum pump and a ballon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (10 mL), were successively added DIEA (314 μ L, 2.0 mmol) and ZNH-Leu^U-OSuc (783 mg, 2.0 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude then was dried under high vacuum. This step provided the expected tetramer as a white solid without purification (1.05 g, 73%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃CN), δ (ppm): 7.37 (m, 5H), 6.43 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 6.23 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 5.89 (bs, 1H), 5.45 (m,

4H), 5.05 (s, 2H), 4.93 (d, 1H, J = 9 Hz), 4.04 (m, 1H), 3.83 (m, 2H), 3.69-3.44 (m, 5H), 2.57-2.36 (m, 2H), 1.65 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.28 (m, 2H), 1.11 (m, 2H), 0.99-0.78 (m, 18H).

Pentamer OL11e :

To a solution of **OL11d** (1.0 g, 1.39 mmol) in MeOH (15 mL) was added Pd/C (100 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gas was then removed using vacuum pump and a balloon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (10 mL), were successively added DIEA (200 µL, 1.15 mmol) and ZNH-Ala^u-OSuc (444 mg, 1.39 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude then was dried under high vacuum (680 g, 72%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃CN), δ(ppm): 7.37 (m, 5H), 6.60 (b, 1H, J = 8.1 Hz), 6.46 (b, 1H, J = 8.1 Hz), 6.33 (bs, 1H), 5.70-5.58 (m, 4H), 5.43 (m, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.97 (d, 1H, J = 9 Hz), 4.04 (m, 1H), 3.87 (m, 3H), 3.60 (m, 3H), 3.48 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 2.72 (m, 1H), 2.52 (m, 1H), 1.68 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.31 (m, 2H), 1.21 (m, 2H), 1.09 (d, 6H), 0.96-0.85 (m, 18H)

Hexamer OL11:

To a solution of **OL11e** (228 mg, 0.28 mmol) in MeOH (8 mL) was added Pd/C (23 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gas was then removed using vacuum pump and a balloon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (10 mL), were successively added DIEA (45 µL, 0.28 mmol) and BocNH-Val^u-OSuc (100 mg, 0.29 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude then was dried under high vacuum. This step provided the expected hexamer as a white solid without purification (150 mg, 68%).

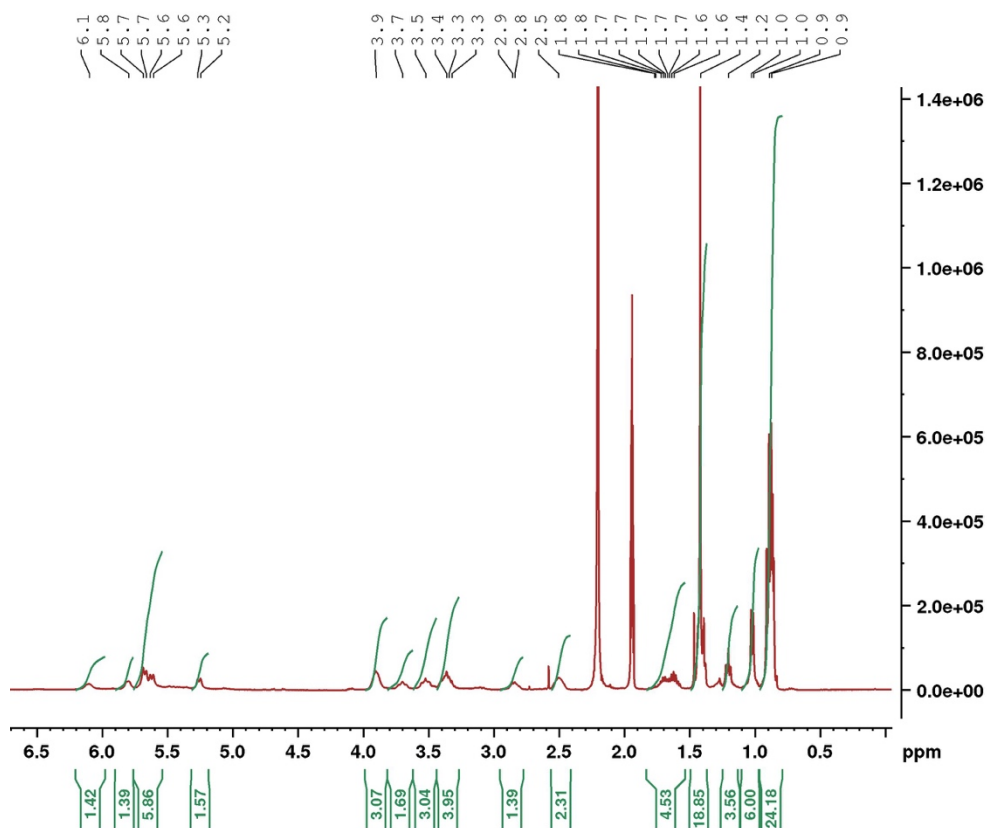
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN), δ(ppm): 6.11 (bs, 2H), 5.81 (bs, 2H), 5.70-5.60 (m, 6H), 5.25 (bs, 2H), 3.91 (m, 3H), 3.71 (m, 2H), 3.53 (m, 3H), 3.37 (m, 4H), 2.85 (m, 2H), 2.52 (m, 2H), 1.71 (m, 4H), 1.42 (s, 18H), 1.22 (m, 4H), 1.05 (d, 6H), 0.91 (m, 24H).

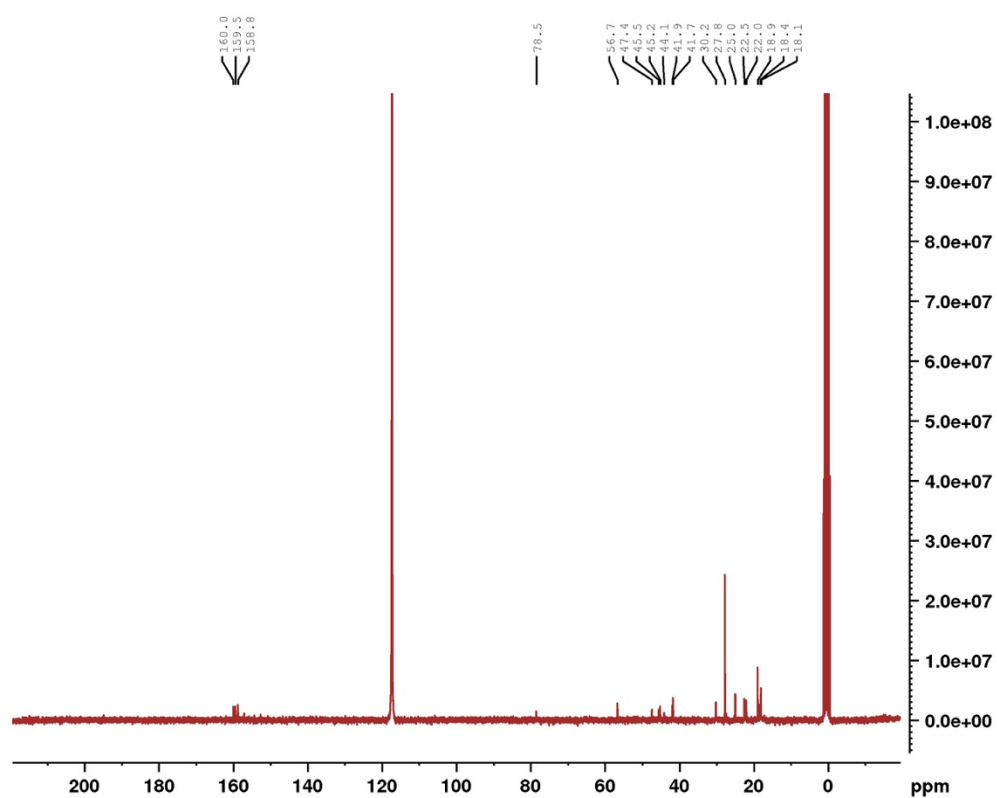
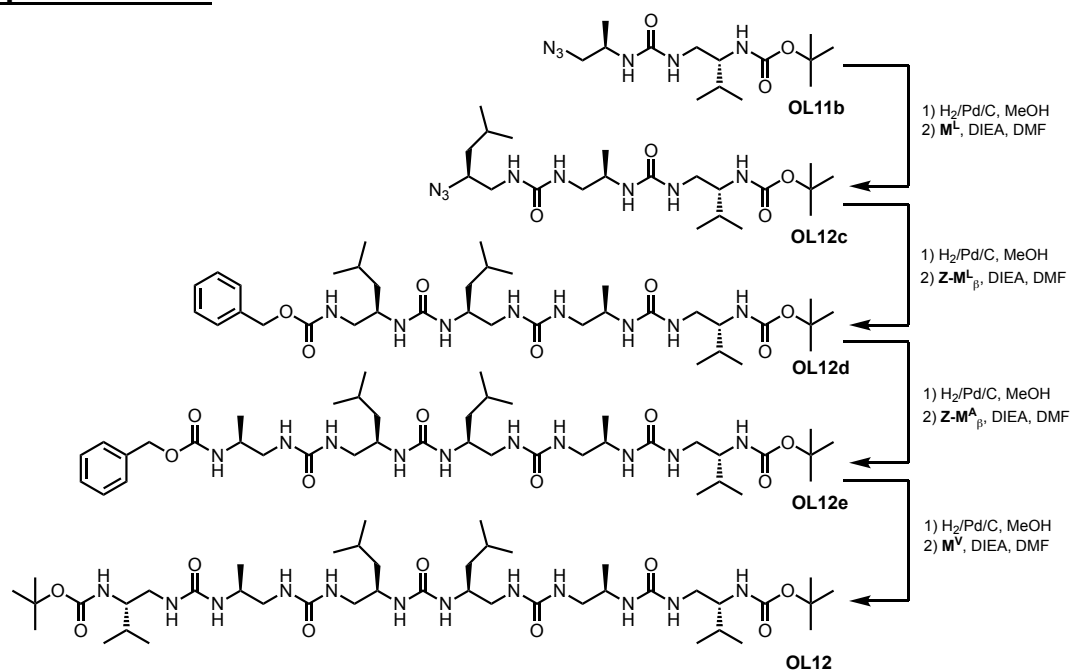
¹³C NMR (100 MHz, CD₃CN) δ(ppm): 160.0, 159.5, 158.8, 78.5, 56.7, 47.4, 45.5, 45.2, 44.1, 41.9, 41.7, 30.2, 27.8, 25.0, 22.5, 22.0, 18.9, 18.4, 18.1.

HRMS (ES⁺, MeOH) calcd for C₄₃H₈₆O₉N₁₂ = 913.65570; found 913.65918.

Table V-1 : ^1H NMR chemical shifts (ppm) of **OL11** in CD_3CN (400 MHz) at 293K.

Residue	NH	NH'	αCH^1	αCH^2	βCH	γCH	δCH	ϵCH	Term CH	$\Delta\delta(\alpha\text{CH})$
Leu	5.69	6.10	3.70	2.50	3.90	1.20	1.65	0.87	/	1.20
Ala	5.25	5.81	3.53	2.5	3.90	1.01	/	/	/	1.03
Val	5.62	5.69	3.35	2.84	3.36	1.65	0.85	/	/	0.51
Boc	/	/	/	/	/	/	/	/	1.43	/

 ^1H NMR :

^{13}C NMR :**Compound OL12 :**

Trimer OL12c:

To a solution of **OL11b** (325 mg, 1.0 mmol) in MeOH (15 mL) was added Pd/C (33 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gaz was then removed using vacuum pump and a balloon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (3 mL), were successively added DIEA (173 μ L, 1 mmol) and ZNH-Leu^u-OSuc (426 mg, 1.1 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude was dried under high vacuum. This step provided the expected trimer as a white solid without purification (390 mg, 68%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃CN), δ (ppm): 7.35 (m, 5H), 5.99 (bs, 1H), 5.33-5.55 (m, 4H), 5.16 (bs, 1H), 5.04 (s, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.19-3.47 (m, 4H), 2.99 (m, 1H), 1.65 (m, 3H), 1. 40 (s, 9H), 1. 27 (m, 2H), 1.09 (m, 1H), 1.00 (d, 3H), 0.89 (m, 12H).

Tetramer OL12d:

To a solution of **6** (390 mg, 0.67 mmol) in MeOH (15 mL) was added Pd/C (40 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gaz was then removed using vacuum pump and a balloon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (3 mL), were successively added DIEA (117 μ L, 1 mmol) and ZNH-Leu^{u_{inv}}-OSuc (289 mg, 1.1 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude was dried under high vacuum. This step provided the expected tetramer as a white solid without purification (216 mg, 50%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃CN), δ (ppm): 7.40 (m, 5H), 7.07 (bs, 1H), 5.76 (m, 1H), 5.66 (bs, 1H), 5.39 (m, 5H), 3.81 (bm, 6H), 3.54 (m, 3H), 3.33 (s, 2H), 2.88 (m, 4H).

Pentamer OL12e:

To a solution of **OL12d** (216 mg, 0.30 mmol) in MeOH (15 mL) was added Pd/C (22 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gaz was then removed using vacuum pump and a balloon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free

amine dissolved in DMF (3 mL), were successively added DIEA (52 μ L, 1 mmol) and ZNH-Ala^u-OSuc (115 mg, 0.33 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude was dried under high vacuum. This step provided the expected pentamer as a white solid without purification (200 mg, 80%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃CN), δ (ppm): 7.36 (m, 5H), 6.43 (bs, 1H), 5.96 (bs, 1H), 5.83 (bs, 1H), 5.64 (m, 2H), 5.55 (bs, 1H), 5.42 (bs, 1H), 5.33 (bs, 1H), 5.17 (bs, 1H), 5.09 (bs, 1H), 5.05 (s, 2H), 3.85 (m, 4H), 3.66 (m, 2H), 3.55 (m, 2H), 3.36 (m, 3H), 2.83 (m, 2H), 2.39 (m, 2H), 1.70 (m, 6H), 1.43 (s, 9H), 1.11 (d, 6H), 0.88 (m, 18H).

Hexamer OL12:

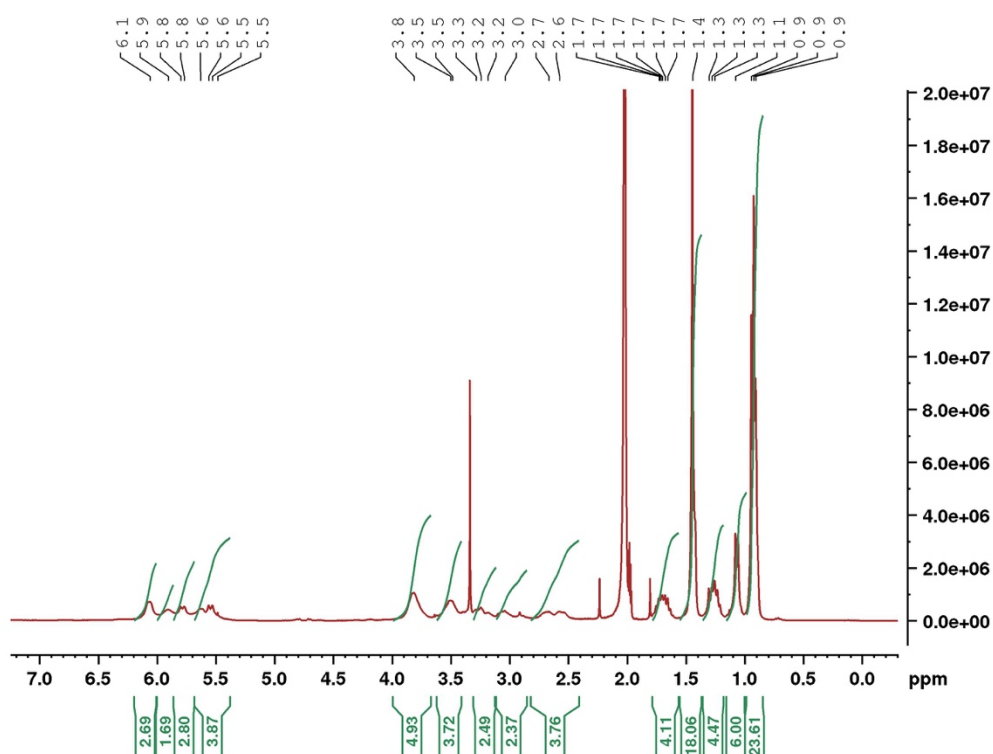
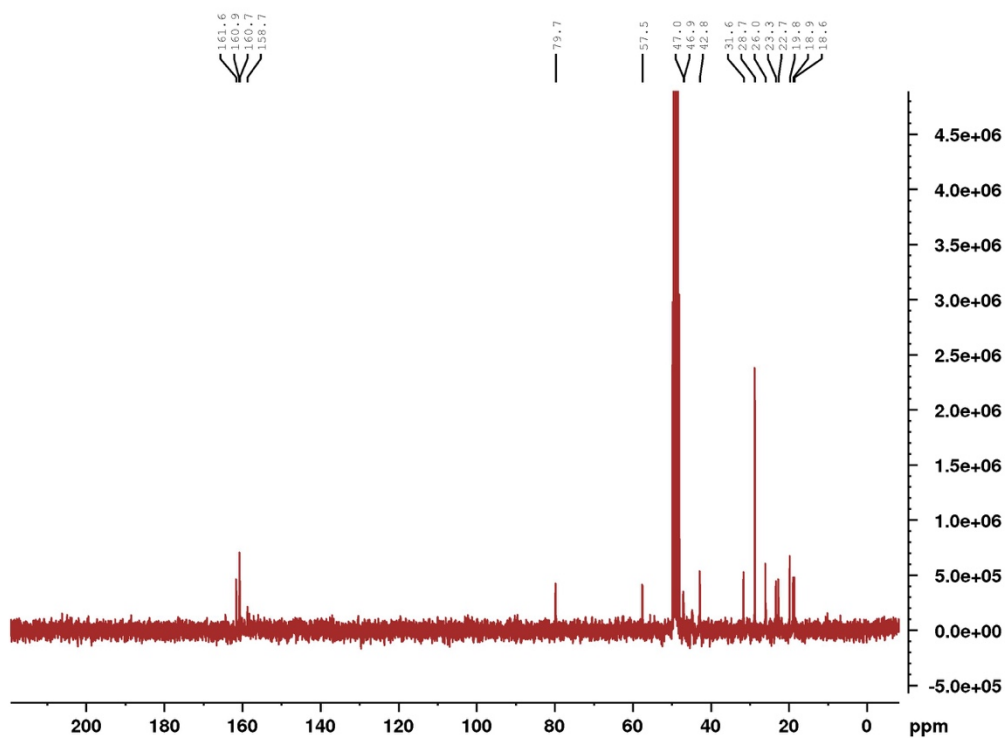
To a solution of **OL12e** (50 mg, 0.06 mmol) in MeOH (15 mL) was added Pd/C (5 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gaz was then removed using vacuum pump and a ballon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (3 mL), were successively added DIEA (12 μ L, 1 mmol) and BocNH-Val^u-OSuc (23 mg, 0.067 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude was dried under high vacuum. This step provided the expected hexamer as a white solid without purification (200 mg, 80%).

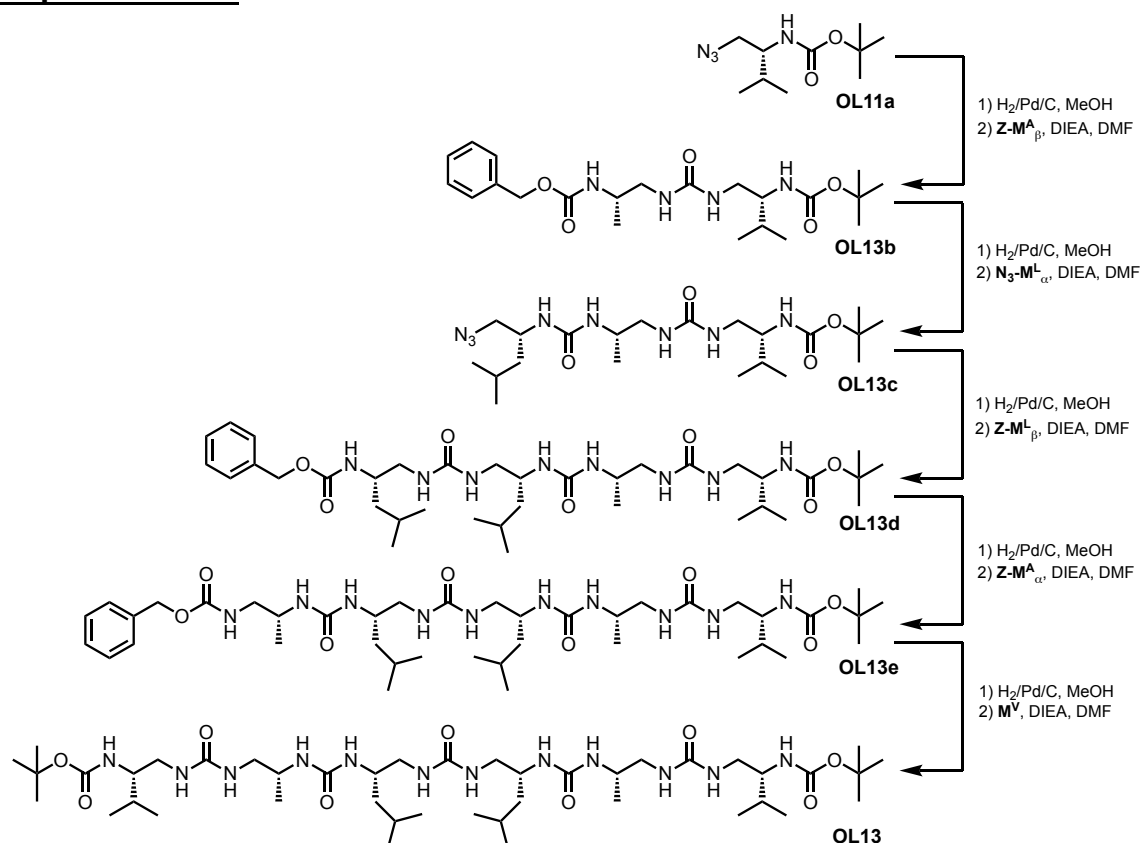
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN), δ (ppm): 6.10 (m, 3H), 5.86 (m, 2H), 5.75 (bs, 3H), 5.54 (bs, 4H), 3.83 (m, 5H), 3.68 (m, 4H), 3.37 (bs, 2H), 3.27 (m, 2H), 3.03 (bm, 4H), 1.69 (m, 4H), 1.44 (s, 18H), 1.33 (bm, 4H), 1.08 (d, 6H), 0.93 (m, 24H).

¹³C NMR (400 MHz, CD₃OH) δ (ppm): 161.6, 160.9, 160.7, 158.7, 79.7, 57.5, 47.0, 46.9, 42.8, 31.6, 28.7, 26.0, 23.3, 22.7, 19.8, 18.9, 18.7.

HRMS (ES+, MeOH) calcd for C₄₃H₈₆O₉N₁₂ [M+Na]⁺ 937.6533, found 937.6581.

The full attribution of the ¹H NMR signal were not possible due to a lack of signal on 2D NMR.

^1H NMR : **^{13}C NMR :**

Compound OL13:**Dimer OL13b:**

To a solution of **OL11a** (230 mg, 1.0 mmol) in MeOH (15 mL) was added Pd/C (23 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gas was then removed using vacuum pump and a balloon of H_2 was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (3 mL), were successively added DIEA (192 μL , 11.1 mmol) and ZNH-Ala^u-OSuc (524 mg, 1.5 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO_4 (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude was dried under high vacuum. This step provided the expected trimer as a white solid without purification (202 mg, 46%). ^1H NMR (300 MHz, CD_3OH), $\delta(\text{ppm})$: 7.35 (m, 5H), 6.90 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.33 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.12 (m, 1H), 5.94 (m, 1H), 3.67 (m, 1H), 3.37 (m, 1H), 3.20 (m, 2H), 3.06 (m, 2H), 1.68 (m, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.11 (d, $J = 6.60$ Hz, 3H), 0.90 (t, $J = 8.43$ Hz).

Trimer OL13c:

To a solution of **OL13b** (202 mg, 0.46 mmol) in MeOH (15 mL) was added Pd/C (20 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gaz was then removed using vacuum pump and a ballon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (3 mL), were successively added DIEA (88 µL, 0.51 mmol) and N³-Leu^u-OSuc (195 mg, 1.5 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude was dried under high vacuum. This step provided the expected trimer as a white solid without purification (77 mg, 35%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OH), δ(ppm): 6.36 (d, *J* = 9 Hz, 1H), 6.08 (m, 1H), 5.97 (m, 2H), 5.75 (d, *J* = 9 Hz, 1H), 3.91 (m, 2H), 3.71 (m, 1H), 3.43-3.36 (m, 2H), 3.28-3.18 (m, 2H), 3.08-2.91 (m, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.31 (m, 1H), 1.08 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.92 (m, 12H).

Tetramer OL13d:

To a solution of **OL13c** (77 mg, 0.163 mmol) in MeOH (5 mL) was added Pd/C (10 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gaz was then removed using vacuum pump and a ballon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (3 mL), were successively added DIEA (30 µL, 0.163 mmol) and Z-Leu^u-OSuc (77 mg, 1.2 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude was dried under high vacuum. This step provided the expected trimer as a white solid without purification (73 mg, 63%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OH), δ(ppm): 7.33 (m, 5H), 6.92 (d, *J* = 9 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 9 Hz, 1H), 6.33 (br, 1H), 6.23 (br, 1H), 6.12 (br, 1H), 6.02 (br, 1H), 5.75 (d, *J* = 9 Hz, 1H), 3.87- 3.63 (m, 4H), 3.51-3.38 (m, 3H), 3.20 (m, 1H), 3.07 (m, 1H), 2.77 (m, 1H), 2.70-2.59 (m, 2H), 1.72-1.56 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.25 (m, 3H), 1.00 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.89 (m, 18H).

Pentamer OL13e:

To a solution of **OL13d** (73 mg, 0.102 mmol) in MeOH (5 mL) was added Pd/C (10 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gas was then removed using vacuum pump and a balloon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (3 mL), were successively added DIEA (18 µL, 0.102 mmol) and Z-Ala^u-OSuc (43 mg, 1.2 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude was dried under high vacuum. This step provided the expected trimer as a white solid without purification (74 mg, 88%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OH), δ(ppm): 7.35 (m, 5H), 6.57 (d, *J* = 9 Hz, 1H), 6.43 (br, 1H), 6.25-6.13 (br, 3H), 6.08-5.95 (br, 3H), 5.83 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 5.68 (br, 1H), 3.92-3.66 (m, 7H), 3.56-3.39 (m, 5H), 3.07 (m, 1H), 2.73-2.61 (m, 2H), 1.66 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.30 (m, 3H), 1.09 (m, 6H), 0.91 (m, 18H).

Hexamer OL13:

To a solution of **OL13e** (74 mg, 0.09 mmol) in MeOH (5 mL) was added Pd/C (10 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gas was then removed using vacuum pump and a balloon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (3 mL), were successively added DIEA (15 µL, 0.102 mmol) and Z-Ala^u-OSuc (37 mg, 1.2 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude was dried under high vacuum. This step provided the expected trimer as a white solid without purification (14 mg, 17%).

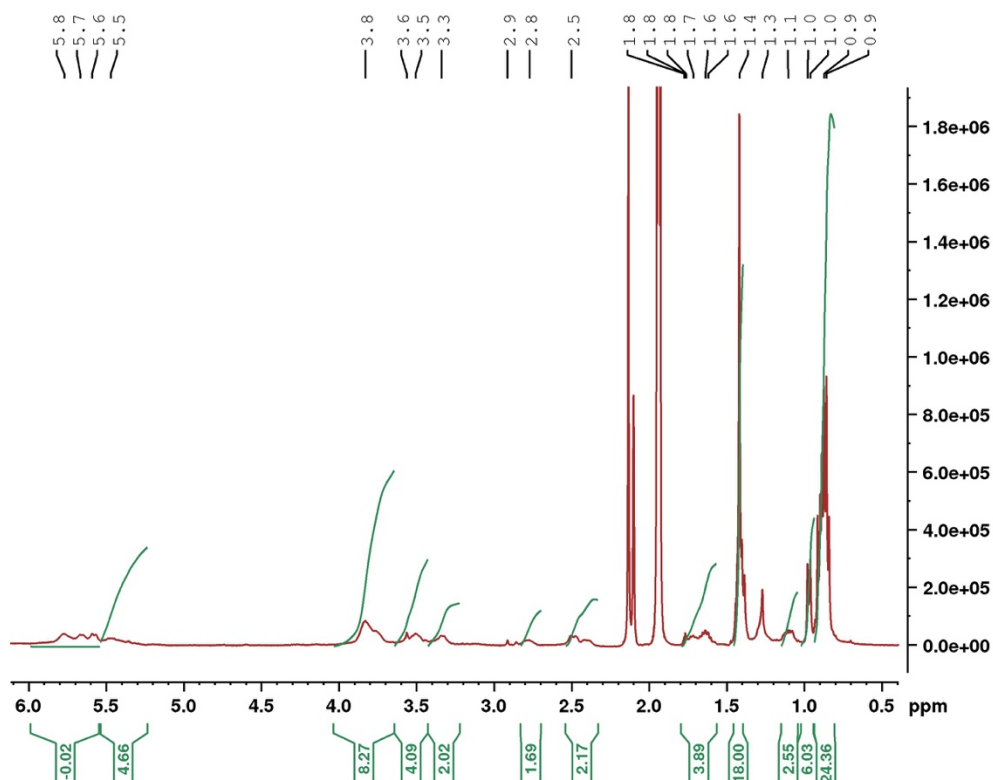
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN), δ(ppm): 5.77-5.59 (m, 7H), 5.47 (m, 5H), 3.83 (m, 8H), 3.56 (m, 4H), 3.34 (m, 2H), 2.77 (m, 2H), 2.50 (m, 2H), 1.77-1.62 (m, 4H), 1.42 (s, 18H), 1.10 (m, 2), 0.98 (d, *J* = 6 Hz, 6H), 0.86 (m, 24H).

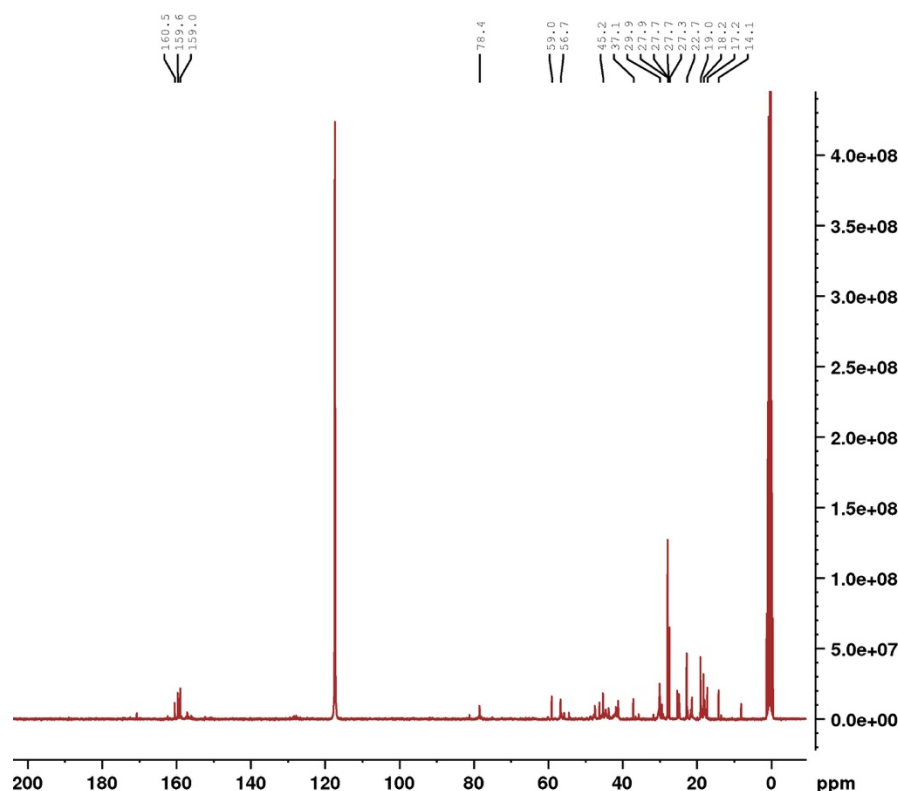
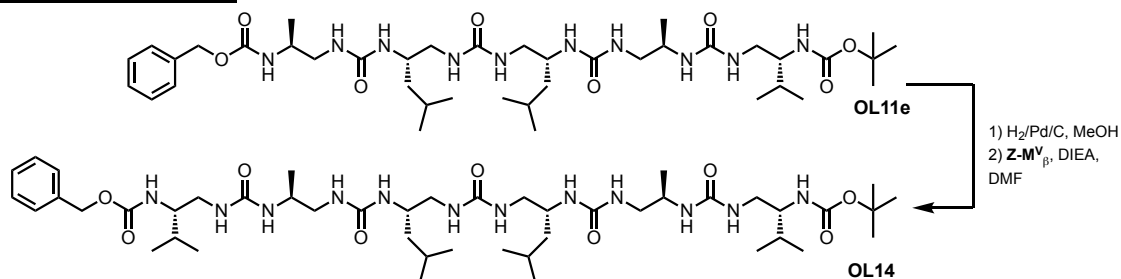
¹³C NMR (75 MHz, CD₃CN), δ(ppm): 160.5, 159.6, 159.0, 78.4, 59.0, 56.6, 45.2, 37.1, 29.9, 27.8, 27.7, 27.6, 27.3, 22.7, 19.0, 18.2, 17.2, 14.1.

HRMS (ES⁺, MeOH) calcd for C₄₃H₈₆O₉N₁₂ [M+Na]⁺ 937.6533, found 937.6599, [M+H]⁺ 915.6641, found 915.678.

Table V-2 : ^1H NMR chemical shifts (ppm) of **OL13** in CD_3CN (400 MHz) at 293K.

Residue	NH	NH'	αCH^1	αCH^2	βCH	γCH	δCH	ϵCH	Term CH	$\Delta\delta(\alpha\text{CH})$
Leu	5.57	5.41	3.76	2.40	3.84	1.64	1.09	0.86	/	1.36
Ala	5.73	4.45	3.79	2.47	3.79	0.93	/	/	/	1.32
Val	5.76	5.66	3.51	2.79	3.32	1.70	0.88	/	/	0.72
Boc	/	/	/	/	/	/	/	/	1.42	/

 ^1H NMR:

¹³C NMR:**Compound OL14 :**

To a solution of **OL11e** (254 mg, 0.31 mmol) in MeOH (8 mL) was added Pd/C (25 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gaz was then removed using vacuum pump and a ballon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (10 mL), were successively added DIEA (54 μ L, 0.31 mmol) and ZNH-Val^L-OSuc (128 mg, 0.34 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude then was dried under high vacuum. Purification of the crude by column chromatography (MeOH/DCM 5:95→10:90) provided the expected hexamer as a white solid (200 mg, 68%).

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN), δ (ppm) 7.38 (m, 5H), 6.22 (bs, 1H), 6.12 (bs, 1H), 5.96 (bs, 1H), 5.75-5.40 (m, 4H), 5.32-5.0 (m, 4H), 5.01 (br, 1H), 3.69 (m, 4H), 3.52 (m, 2H), 3.45 (m, 3H), 3.40 (m, 4H), 2.95 (m, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.47 (m, 3H), 1.72 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.31 (m, 2H), 1.05 (m, 6H), 0.88 (m, 24H).

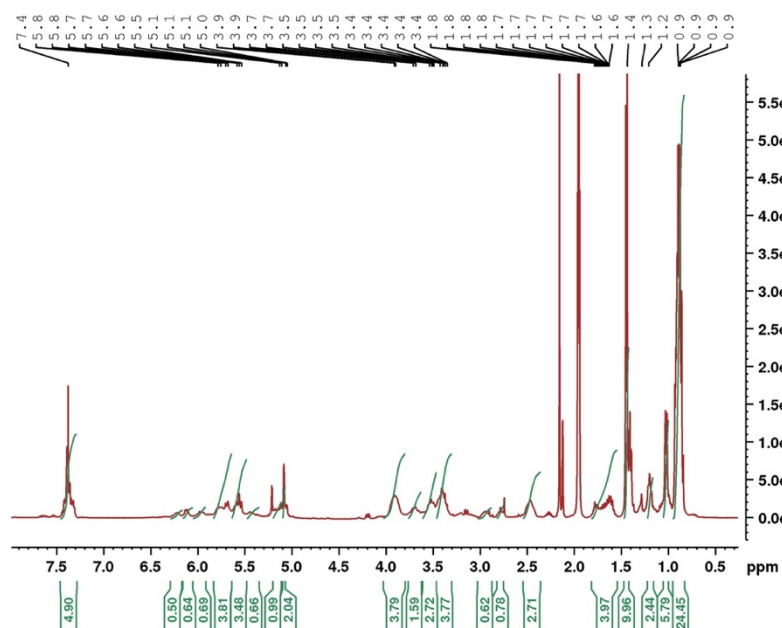
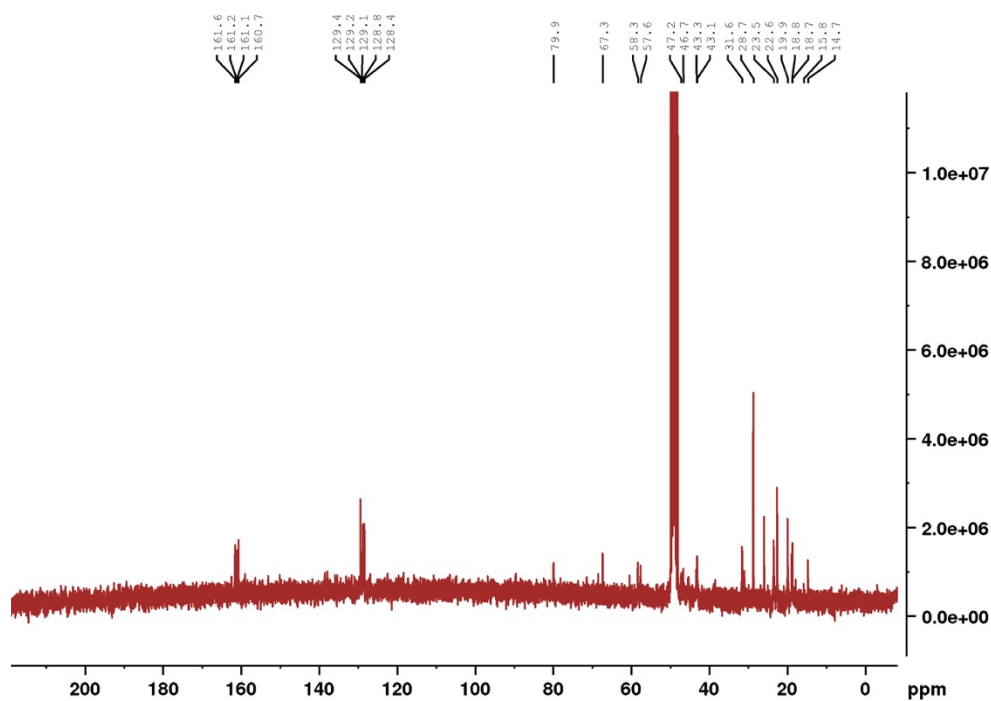
¹³C NMR (75 MHz, CD₃OH) δ (ppm): 161.6, 161.2, 161.1, 160.7, 129.4, 129.2, 129.1, 128.8, 128.4, 79.9, 67.3, 58.3, 57.6, 47.2, 46.7, 43.3, 43.1, 31.6, 28.7, 23.5, 22.6, 19.9, 18.8, 18.7, 15.8, 14.7.

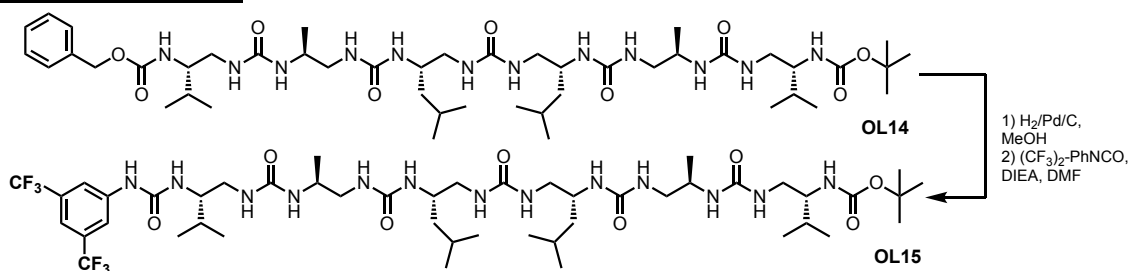
HRMS (ES+, MeOH) calcd for C₄₆H₈₄O₉N₁₂ [M+H]⁺ 949.6484, found 949.6625, [M+Na]⁺ 971.6382, found 971.6432.

Table V-3 : ¹H NMR chemical shifts (ppm) of **OL14** in CD₃CN (400 MHz) at 293K.

Residue		NH	NH'	CH ₂ ¹	CH ₂ ²	CH	γ CH	δ CH	ϵ CH	Term CH	$\Delta\delta(^{\alpha}\text{CH})$
	Ar	/		/	/		/		/	7.40 (Ar)	/
Val	- ^a	5.96	5.58	3.7	2.5	3.9	1.2	0.87	/	/	1.2
Ala	- ^a	5.74	5.15	3.5	2.45	3.93	1.05	/	/	/	1.05
Leu	- ^a	6.22	5.71	3.93	2.43	3.68	1.63	1.16	0.89	/	1.5
Leu	- ^a	5.44	5.41	3.38	2.58	3.9	1.69	1.19	0.89	/	0.8
Ala	- ^a	5.69	5.20	3.51	2.48	3.88	1.0	/	/	/	1.03
Val	- ^a	6.12	5.78	3.41	2.95	3.41	1.79	0.91	/	/	0.46
Boc		/	/	/	/	/	/	/	/	1.43	/

^aThe position of the residues could not be attributed.

^1H NMR: **^{13}C NMR:**

Compound OL15 :

To a solution of **OL14** (66 mg, 0.07 mmol) in MeOH (5 mL) was added Pd/C (7 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gaz was then removed using vacuum pump and a ballon of H_2 was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (10 mL), were successively added DIEA (12 μL , 0.07 mmol) and 3,5- $(\text{CF}_3)_2\text{PhNCO}$ (18 mg, 0.07 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO_4 (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude then was dried under high vacuum. Purification of the crude by column chromatography (MeOH/DCM 5:95 $\rightarrow$ 10:90) provided the expected hexamer as a white solid (30 mg, 40%).

^1H NMR (400 MHz, CD_3CN), $\delta(\text{ppm})$ 9.42 (m, 1H), 7.97 (s, 2H), 7.46 (s, 1H), 6.56 (b, 1H), 6.26 (b, 1H), 6.08 (b, 1H), 5.92 (d, 1H, $J = 10$ Hz), 5.83 (b, 2H), 5.69 (b, 2H), 5.58 (b, 1H), 5.40 (b, 2H), 4.98 (bs, 1H), 4.09-3.80 (m, 7H), 3.70-3.35 (m, 5H), 3.0 (d, 1H, $J = 16$ Hz), 2.65-2.48 (m, 3H), 2.30 (m, 2H), 1.78-1.56 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.28 (1H), 1.14 (1H), 1.10 (d, 3H), 1.01 (d, 3H), 0.98-0.79 (m, 24H).

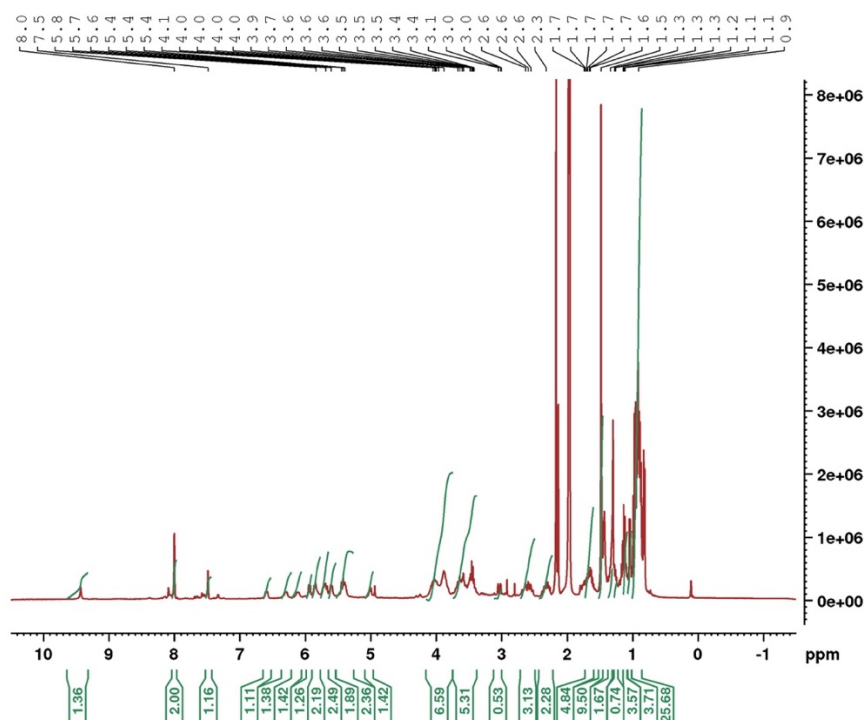
^{19}F (376 MHz, CD_3CN), $\delta(\text{ppm})$ -63.9.

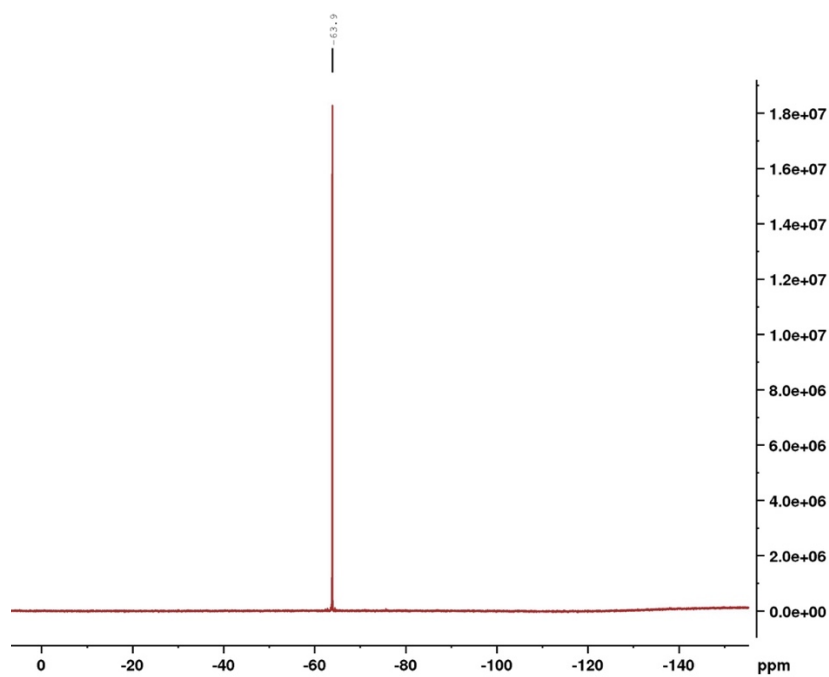
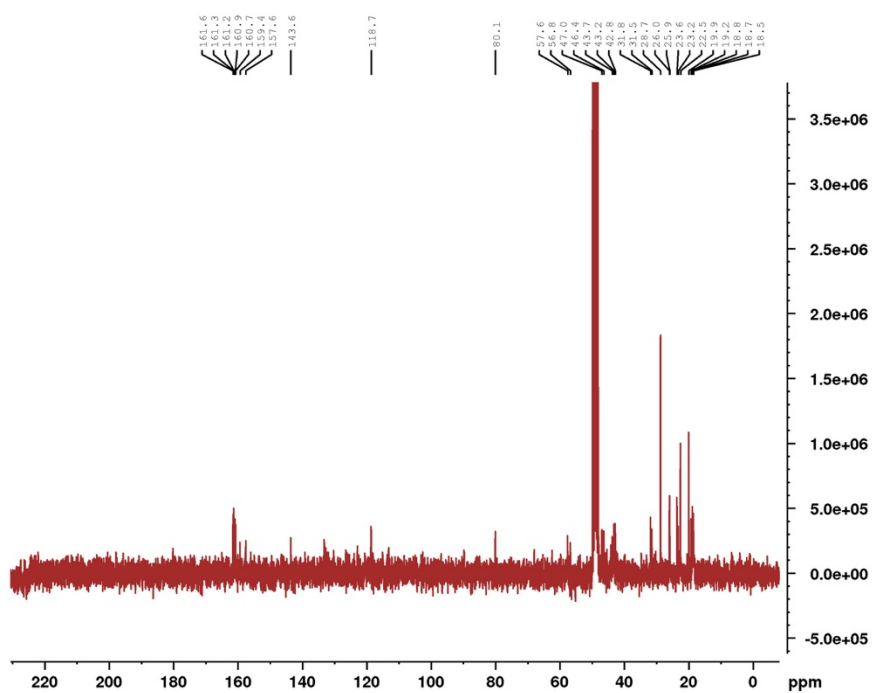
^{13}C NMR : (75 MHz, CD_3OH) $\delta(\text{ppm})$: 161.6, 161.3, 161.3, 160.9, 159.4, 157.6, 143.6, 118.7, 80.1, 57.6, 56.8, 47.0, 46.4, 43.7, 43.2, 42.8, 31.8, 28.7, 26.0, 25.9, 23.6, 23.2, 22.5, 19.9, 19.2, 18.8, 18.7, 18.5.

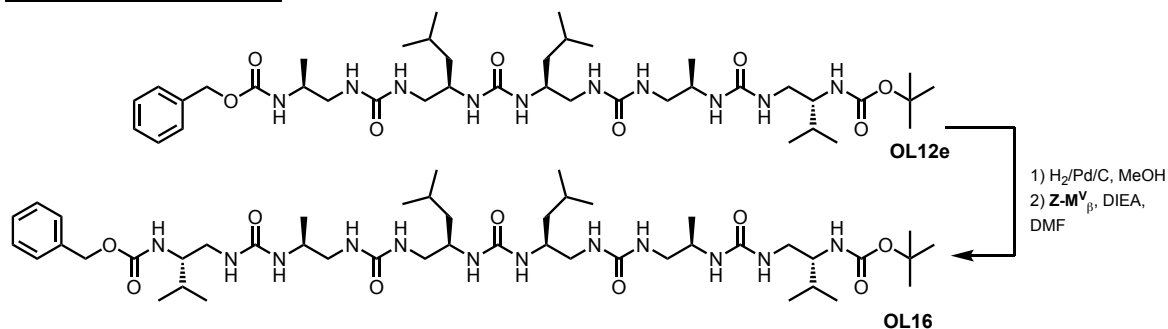
HRMS (ES $^+$, MeOH) calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{81}\text{O}_8\text{N}_{13}\text{F}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1079.6235, found 1070.6397, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1092.6133, found 1092.6194.

Table V-4 : ^1H NMR chemical shifts (ppm) of **OL15** in CD_3CN (400 MHz) at 293K.

Residue		NH	NH'	αCH^1	αCH^2	βCH	γCH	δCH	ϵCH	Term CH	$\Delta\delta(\alpha\text{CH})$
	ArNHCO	/	9.42	/	/	7.98	/	7.46	/	/	/
Val	1	5.38	5.40	3.58	2.54	3.42	1.65	0.87	/	/	1.04
Ala	2	5.58	4.98	3.53	2.26	4.06	1.01	/	/	/	1.27
Leu	3	6.56	5.83	3.65	2.33	4.0	1.67	1.14	0.88	/	1.32
Leu	4	5.90	5.80	4.0	2.65	3.83	1.64	1.28	0.8	/	1.35
Ala	5	5.66	6.08	4.02	2.59	3.87	1.1	/	/	/	1.43
Val	6	6.26	5.69	3.82	3.0	3.47	1.76	0.96	/	/	0.82
	Boc	/	/	/	/	/	/	/	/	1.43	/

 ^1H NMR:

^{19}F NMR : **^{13}C NMR :**

Compound OL16 :

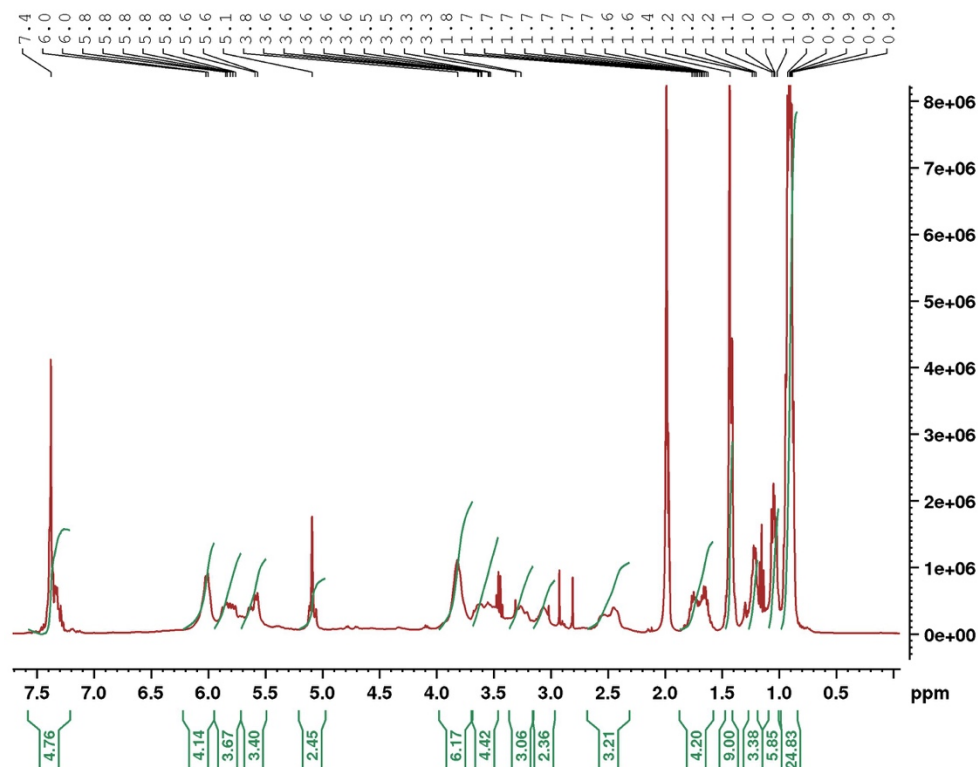
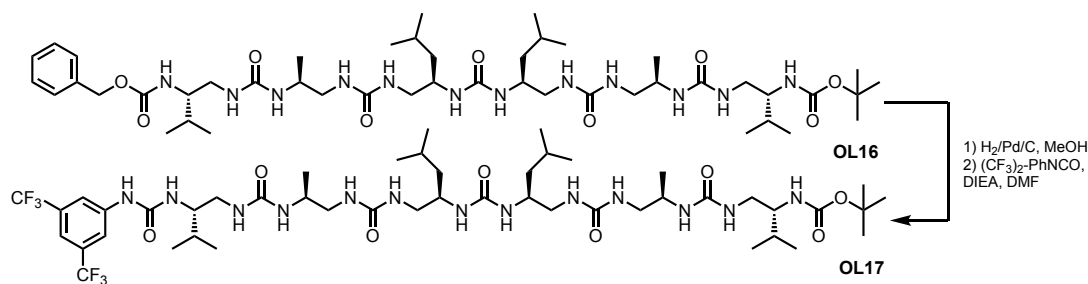
To a solution of **OL12e** (123 mg, 0.15 mmol) in MeOH (15 mL) was added Pd/C (13 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gaz was then removed using vacuum pump and a ballon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (3 mL), were successively added DIEA (26 µL, 1 mmol) and ZNH-Val^u-OSuc (57 mg, 0.15 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude was dried under high vacuum. This step provided the expected hexamer as a white solid without purification (33 mg, 23%).

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN), δ(ppm): 7.35 (m, 5H), 5.98 (br, 4H), 5.81-5.72 (brm, 4H), 5.61-5.49 (brm, 4H), 5.06 (s, 2H), 3.76 (brm, 6H), 3.63-3.42 (m, 4H), 3.27 (bm, 3H), 3.07 (b, 2H), 2.54-2.38 (bm, 3H), 1.73-1.59 (m, 4H), 1.39 (s, 9H), 1.18 (m, 4H), 0.99 (m, 6H), 0.86 (m, 24H).

¹³C NMR : Due to a low solubility in many solvent (acetonitrile, DCM, chloroform...), we were not able to acquire those data.

HRMS (ES+, MeOH) calcd for C₄₆H₈₄O₉N₁₂ [M+H]⁺ 949.6484, found 949.6626, [M+Na]⁺ 971.6382, found 971.6435.

The full attribution of the ¹H NMR signal were not possible due to a lack of signal on 2D NMR.

¹H NMR:**Compound OL17 :**

To a solution of **OL16** (33 mg, 0.035 mmol) in MeOH (5 mL) was added Pd/C (4 mg). The reaction mixture was flushed with Argon three times. Argon gaz was then removed using vacuum pump and a ballon of H₂ was connected to the flask. Reaction was stirred overnight. Palladium was then filtered off using Millipore filter and the crude was concentrated under reduced pressure then dried under high vacuum. To the resulting free amine dissolved in DMF (3 mL), were successively added DIEA (6 μL, 0.035 mmol) and 3,5-(CF₃)PhNCO (10 mg, 0.04 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 16h and the crude mixture was diluted in DCM (30 mL), washed twice with 1M KHSO₄ (15 mL) and once with brine (15 mL). The crude then was dried under high vacuum. Purification of the crude

by column chromatography (MeOH/DCM 5:95→10:90) provided the expected hexamer as a white solid (11 mg, 30%).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OH), δ(ppm) 9.07 (br, 1H), 8.01 (s, 2H), 7.49 (s, 1H), 6.50-6.3 (bm, 3H), 6.30-6.0 (m, 4H), 6.0-5.78 (bm, 4H), 3.97-3.76 (bm, 5H), 3.66 (m, 4H), 3.50 (m, 3H), 3.35-3.10 (m, 2H), 3.4 (m, 2H), 2.81 (m, 1H), 2.74 (m, 2H), 1.68 (m, 4H), 1.34-1.15 (bm, 4H), 1.60 (s, 9H), 1.42 (m, 4H), 0.90 (m, 30H).

¹⁹F NMR (376 MHz, CD₃OH), δ(ppm) :- 63.9, -64.1.

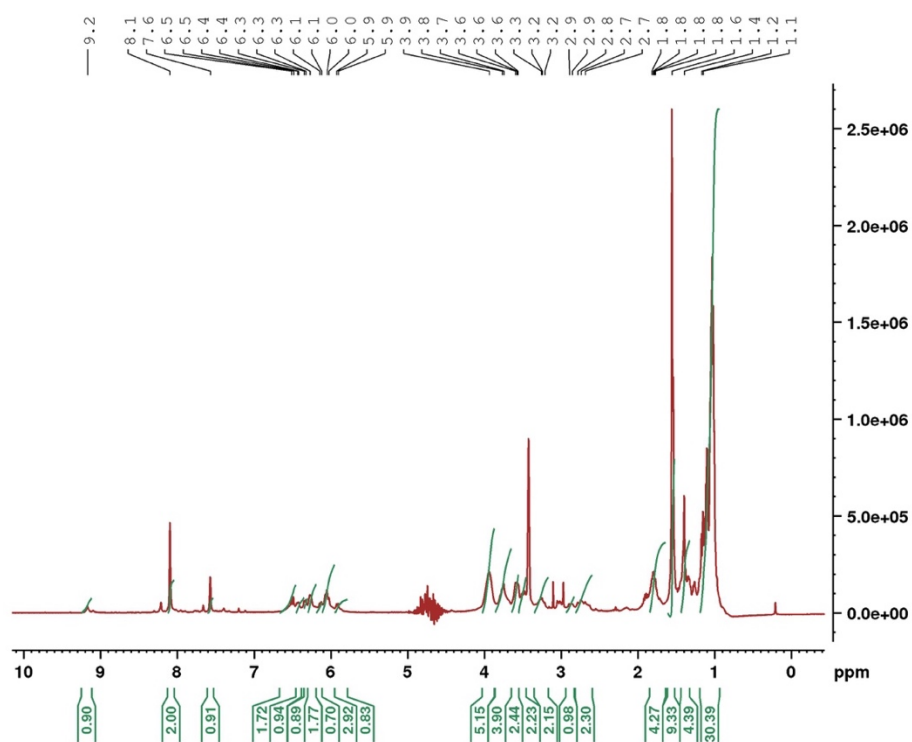
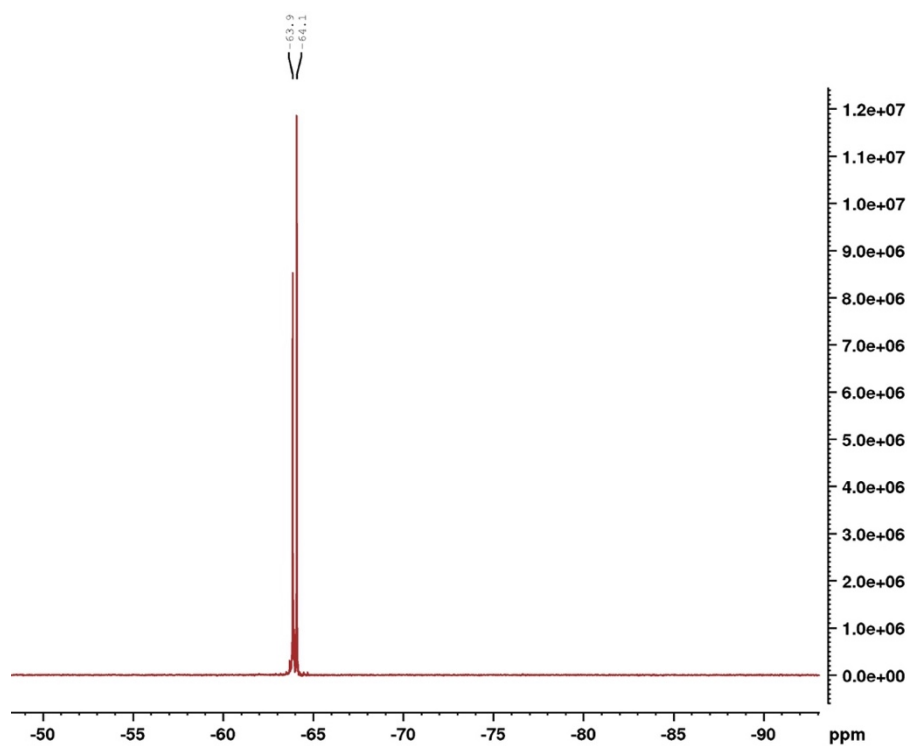
¹³C NMR : Due to a low solubility in many solvent (acetonitrile, DCM, chloroform...), we were not able to acquire those data.

HRMS (ES+, MeOH) calcd for C₄₇H₈₁O₈N₁₃F₆ [M+H]⁺ 1079.6235, found 1070.6368.

Table V-5 : ¹H NMR chemical shifts (ppm) of **OL17** in CD₃CN (400 MHz) at 293K.

Residue		NH	NH'	αCH ¹	αCH ²	βCH	γCH	δCH	εCH	Term CH	Δδ(αCH)
	ArNHCO	/	9.05	/	/	7.98	/	7.47	/	/	/
Val	- ^a	5.92	6.42	3.66	2.52	3.84	1.20	0.87	/	/	1.14
Ala	- ^a	6.03	6.30	3.57	2.76	3.70	0.99	/	/	/	0.81
Leu	- ^a	6.37	5.94	3.47	2.88	3.35	1.68	1.22	0.91	/	0.59
Leu	- ^a	5.78	6.13	3.79	2.62	3.79	1.66	1.26	0.91	/	1.35
Ala	- ^a	6.13	5.93	3.47	2.62	3.79	0.95	/	/	/	0.85
Val	- ^a	6.13	6.21	3.45	3.10	3.61	1.75	0.97	/	/	0.35
	Boc	/	/	/	/	/	/	/	/	1.43	/

^aThe position of the residues could not be attributed.

^1H NMR: **^{19}F NMR:**

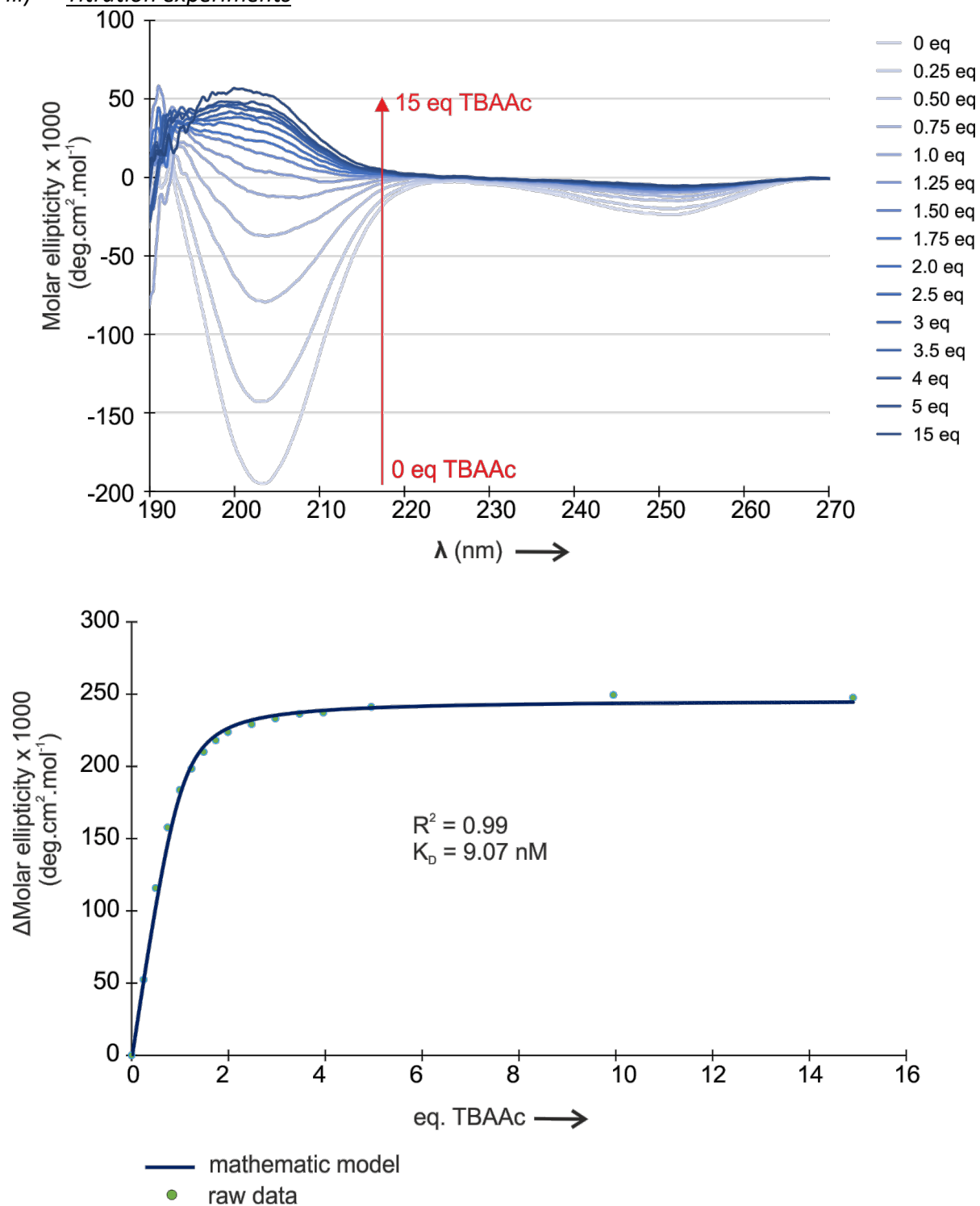
iii) *Titration experiments*

Figure PE.51: Molar ellipticity variation of **OL15** measured in acetonitrile at 25°C upon addition of increasing amounts of NBu₄Ac (TBAAc) and fitting of the variation of molar ellipticity with a model of a 1 :1 binding to determine the K_D value.

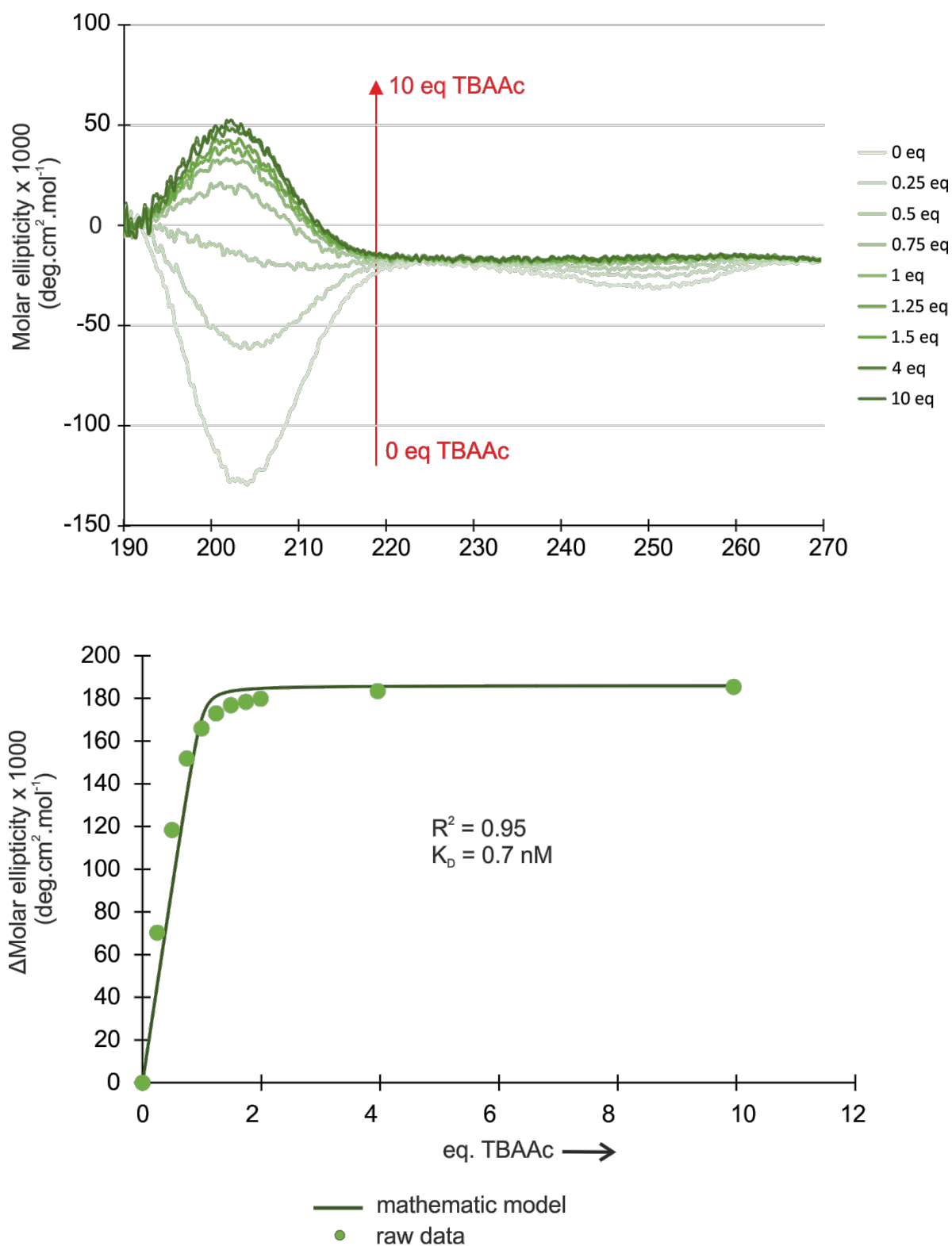


Figure V.52 : Molar ellipticity variation of **OL17** measured in acetonitrile at 25°C upon addition of increasing amounts of NBu₄Ac (TBAAc) and fitting of the variation of molar ellipticity with a model of a 1 : 1 binding to determine the K_D value.

Bibliography

- (1) IUCr. Acta Crystallographica Section A Volume 64, Part 1, January 2008
- (2) Nelli, Y.-R.; Douat-Casassus, C.; Claudon, P.; Kauffmann, B.; Didierjean, C.; Guichard, G. An activated building block for the introduction of the histidine side chain in aliphatic oligoureia foldamers. *Tetrahedron* **2012**, 68 (23), 4492–4500.
- (3) Fremaux, J.; Fischer, L.; Arbogast, T.; Kauffmann, B.; Guichard, G. condensation approach to aliphatic oligoureia foldamers: helices with n-(pyrrolidin-2-ylmethyl)ureido junctions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50 (48), 11382–11385.
- (4) Douat, C.; Bornerie, M.; Antunes, S.; Guichard, G.; Kichler, A. Hybrid Cell-Penetrating Foldamer with Superior Intracellular Delivery Properties and Serum Stability. *Bioconjug. Chem.* **2019**, 30 (4), 1133–1139.
- (5) Guichard, G.; Semetey, V.; Didierjean, C.; Aubry, A.; Briand, J.-P.; Rodriguez, M. Effective preparation of o-succinimidyl-2- (tert-butoxycarbonylamino)ethylcarbamate derivatives from β -amino acids. application to the synthesis of urea-containing pseudopeptides and oligoureias. *J. Org. Chem.* **1999**, 64 (23), 8702–8705.
- (6) Sun, Q.; Kang, Z.; Xue, L.; Shang, Y.; Su, Z.; Sun, H.; Ping, Q.; Mo, R.; Zhang, C. A collaborative assembly strategy for tumor-targeted siRNA delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (18), 6000–6010.
- (7) Brissault, B.; Kichler, A.; Leborgne, C.; Danos, O.; Cheradame, H.; Gau, J.; Auvray, L.; Guis, C. Synthesis, characterization, and gene transfer application of poly(ethylene glycol-b-ethylenimine) with high molar mass polyamine block. *Biomacromolecules* **2006**, 7 (10), 2863–2870.
- (8) Kichler, A.; Leborgne, C.; Savage, P. B.; Danos, O. Cationic steroid antibiotics demonstrate DNA delivery properties. *J. Controlled Release* **2005**, 107 (1), 174–182.
- (9) Douat-Casassus, C.; Pulka, K.; Claudon, P.; Guichard, G. Microwave-enhanced solid-phase synthesis of N,N'-linked aliphatic oligoureias and related hybrids. *Org. Lett.* **2012**, 14 (12), 3130–3133.
- (10) Di Maro, S.; Pong, R.-C.; Hsieh, J.-T.; Ahn, J.-M. Efficient solid-phase synthesis of FK228 analogues as potent antitumoral agents. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (21), 6639–6641.
- (11) Kim, Y. H.; Stites, W. E. Effects of excluded volume upon protein stability in covalently cross-linked proteins with variable linker lengths. *Biochemistry (Mosc.)* **2008**, 47 (33), 8804–8814.
- (12) Pendem, N.; Douat, C.; Claudon, P.; Laguerre, M.; Castano, S.; Desbat, B.; Cavagnat, D.; Ennifar, E.; Kauffmann, B.; Guichard, G. Helix-forming propensity of aliphatic urea oligomers incorporating noncanonical residue substitution patterns. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (12), 4884–4892.