



HAL
open science

Stabilisation et mimes de structures secondaires peptidiques : applications aux hélices alpha et feuillets beta

Camille Perdriau

► **To cite this version:**

Camille Perdriau. Stabilisation et mimes de structures secondaires peptidiques : applications aux hélices alpha et feuillets beta. Chimie organique. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0308 . tel-03515987

HAL Id: tel-03515987

<https://theses.hal.science/tel-03515987v1>

Submitted on 7 Jan 2022

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 DE SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ CHIMIE ORGANIQUE

Par Camille PERDRIAU

**Stabilisation et mimes de structures secondaires
peptidiques : applications aux hélices α et aux feuilletts β**

Sous la direction de : Gilles GUICHARD

Soutenue le 06 décembre 2019

Membres du jury :

Mme ONGERI Sandrine	Professeur de l'Université de Paris Sud	Rapporteur
M. AUCAGNE Vincent	Directeur de recherche CNRS, Université d'Orléans	Rapporteur
M. SAINLOS Matthieu	Directeur de recherche CNRS, Université de Bordeaux	Président
Mme DOLAIN Christel	Maître de conférences, Université de Bordeaux	Membre invité
Mme PASCO Morgane	Chargé de recherche CNRS, Université de Bordeaux	Membre invité
M. GUICHARD Gilles	Directeur de recherche CNRS, Université de Bordeaux	Directeur

Notes pour trop tard.

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Institut Européen de Chimie et Biologie de Pessac dans le laboratoire de Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjets. Je tiens donc à remercier, en premier lieu, les co-directeurs de l'IECB, le Dr. Jean-Louis Mergny et le Dr. Gilles Guichard ainsi que l'ancien co-directeur de l'IECB, le Prof. Ivan Huc. Je remercie également le Dr. Sophie Lecompte et le Dr. Erick Dufourc, actuelle et ancien directeur du CBMN ainsi que le Dr. Thierry Toupance, directeur de l'École Doctorale des Sciences Chimiques de l'Université Bordeaux, pour m'avoir tous donné la chance de travailler dans les meilleures conditions.

J'adresse mes vifs remerciements au Prof. Sandrine Ongerier et au Dr. Vincent Aucagne pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs. Un grand merci également au Dr. Matthieu Sainlos qui a fait partie de mon jury de suivi de thèse et a accepté de participer à ma soutenance en tant qu'examinateur.

Je tiens à remercier le Dr. Gilles Guichard pour m'avoir accueillie dans son équipe et m'avoir accordée sa confiance depuis mes stages de master. Merci pour toutes ces discussions enrichissantes sur la chimie des foldamères et vos conseils face aux difficultés rencontrées sur ces projets de thèse.

Des remerciements sincères sont adressés au Dr. Christel Dolain et Dr. Morgane Pasco qui ont co-encadré cette thèse. Votre aide et votre confiance tout au long de ces années ont été un vrai soutien. Vous m'avez beaucoup appris sur la rigueur scientifique et accompagnée pour produire un travail de qualité. Merci aussi de m'avoir reboostée quand les résultats escomptés n'étaient pas au rendez-vous.

Je remercie les personnes des plateaux techniques de l'IECB pour leurs expertises précieuses. Merci, à Axelle Grélard et Estelle Morvan pour leur gentillesse. Merci à Brice Kauffmann, pour les analyses cristallographiques dont les structures cristallines sont présentées dans ce manuscrit. Merci à Frédéric Rosu pour les expériences de spectrométrie de masse.

Un grand privilège qu'il m'ait été donné est celui d'avoir pu travailler dans un environnement intellectuel où les origines et les cultures se mélangent et collaborent harmonieusement entre elles.

Effectivement, une thèse c'est aussi des rencontres et des échanges tout aussi importants les uns que les autres. Je remercie chaleureusement les membres anciens et actuels de l'équipe Guichard dont Johanne, Mégane, Jérémie, Maxime, Sunghyun, Clément, Guillaume N. et Guillaume C, Arup, Aline, François et Antoine. Merci à Kévin et Cyril pour s'être impliqués sur le projet des feuillets lors de leurs stages et qui m'ont appris à exploiter mes compétences managériales. Merci aux personnes qui m'ont permis de passer de bons moments en dehors du labo : les Camille, les Antoine, Pedro, Stéfi, Alice, Maëlle, Arthur, Léonie, Laura et Claire.

Merci à Mimi pour nos échanges sur nos expériences de thésardes. Un grand merci à Loïc, mon binôme de fac, qui a partagé mes doutes et moments de stress depuis la L1 et maintenant à distance depuis les US. Ceci m'amène à remercier également mes amis Rochelais et plus particulièrement, Giulia et Camille qui ont su me redonner du courage (souvent autour d'un verre) durant ces quelques moments que l'on a passés ensemble ces 3 dernières années.

On apprend tellement des autres et le côté humain lié à cette ambiance de travail m'a permis d'en apprendre davantage sur moi-même et d'en ressortir grandie d'un point de vue professionnel et personnel grâce à certaines personnes.

Je tiens plus particulièrement à remercier Camille F, la chenille toulousaine qui se plie et se déplie... Nos pauses déjeuners à refaire le monde ont été d'un profond soutien et sources de fous rires décompressants.

Merci à Laura pour avoir été à mes côtés tout au long de cette thèse et de m'avoir aidé à gagner en assurance, tu as été une vraie amie ! Merci également à Juliette pour son soutien moral. Claire, ton aide et ta bienveillance furent précieuses ces derniers mois je te remercie pour ça.

Merci à Arthur de faire partie de ma vie, pour son soutien sincère lors de ces derniers mois, et pour le soleil qu'il y a fait renaître.

Enfin, merci à ma famille pour leur soutien indéfectible. Papa et maman votre amour et la confiance que vous avez à présent dans la vie me donnent chaque jour envie de me surpasser. Alice et Pierre-Emmanuel, ma sœur et mon frère à moi personnellement toute seule, que je n'ai pas choisis, mais je ne vous échangerais pour rien au monde. Même sur un fond de taquineries nous savons que l'on peut toujours compter les uns sur les autres. Papi, mamie, la fierté que vous portez à l'égard de la réussite de vos petits-enfants fait chaud au cœur même si, le plus important pour vous était que je trouve un pas. Je termine avec une profonde pensée pour mamie Oiseaux, je sais que tu veilles sur nous tout là-haut. Les valeurs que vous m'avez tous inculquées et principalement celle du travail m'ont permis de persévérer dans mes recherches.

Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à cette réussite !

Sommaire

Nomenclature et liste des abréviations	1
Introduction	7
Chapitre 1. Complémentarité entre la stabilisation et le développement de mimes artificiels des structures secondaires peptidiques.....	11
I. Enjeux thérapeutiques liés au développement de peptidomimes de structures secondaires. 13	
1) Anatomie des hélices α et feuillets β	13
2) Propension des acides aminés à stabiliser les structures secondaires	15
a) Stabilisations naturelles d'hélices α	16
b) Stabilisations naturelles de feuillets β	18
II. Méthodes chimiques de stabilisation de l'hélice α	20
1) Modifications ponctuelles du squelette peptidique	21
a) Incorporation d'acides aminés α,α -dialkylés.....	21
b) Insertion ponctuelle d'acides β - et γ -aminés.....	21
2) Modifications aux extrémités d'une hélice α en vue d'un effet <i>capping</i>	23
a) Blocs contraints comme « caps » de synthèse.....	23
b) Prothèses moléculaires de type foldamères et effet <i>capping</i>	24
c) Liaisons hydrogène de substitution comme « caps » de synthèse	25
3) Stabilisation d'hélices α via une macrocyclisation entre deux chaînes latérales.....	26
a) Cyclisations intramoléculaires.....	27
b) Cyclisations à deux composants.....	33
III. Méthodes chimiques de stabilisation de feuillets β : vers le développement d'architectures multi-brins artificielles.....	41
1) Mimes de coudes β	41
a) Coudes β bioinspirés d'acides aminés.....	41
b) Coudes β abiotiques	42
2) Mimes de brins β	44
3) Mimes de feuillets β	47
a) Insertion de coudes artificiels et macrocyclisation	47
b) Ponts disulfure.....	49
c) Motifs en épingle à cheveux originaux.....	50
4) Vers des feuillets β multi-brins.....	51
a) Feuilletts β multi-brins stabilisés par des liaisons hydrogène	51
b) Stabilisation par empilement aromatique	54
IV. Conclusion et objectifs de la thèse	55
Bibliographie.....	57

Chapitre 2. Développement d'agrafes peptidiques polaires de type guanidine	73
I. Stratégie de synthèse : introduction du motif guanidine lors de l'étape de macrocyclisation	76
1) Stratégie de guanidinylation sur support solide	76
2) Choix du groupement activateur GP ₃	79
3) Choix des groupements protecteurs sur les chaînes latérales des lysines	80
a) Couple Alloc/ivDde	81
b) Couple Alloc/Mtt	84
4) Etape de macrocyclisation.....	87
II. Champs d'application de l'agrafe peptidique guanidine.....	90
1) Macrocyclisation en (<i>i, i+4</i>) : influence de la position et de la taille du macrocycle.....	90
a) Synthèse des ponts guanidine entre les résidus [K6-K10] et [O2-O6]	90
b) Etudes conformationnelles en solution	91
2) Macrocyclisation en (<i>i, i+4</i>) : séquences peptidiques biologiquement actives.....	92
a) Séquence native du peptide S.....	92
b) Peptide PMI : inhibiteur de l'interaction p53/MDM2	95
c) Peptide SRC1-2 : interaction avec le récepteur nucléaire VDR	98
3) Macrocyclisation en (<i>i, i+7</i>)	101
III. Conclusion et perspectives	106
Bibliographie.....	108
Chapitre 3. Conception et synthèse de feuillets β multi-brins artificiels de type diamine-diacide .	113
I. Conception de nouveaux feuillets β multi-brins	115
1) Historique du projet	115
2) Vers des architectures multi-brins	117
a) Conception de foldamères diamine/diacide repliés en feuillet β	117
b) Analyse rétrosynthétique du foldamère à trois brins	118
c) Synthèse du motif brin-coude III.2	119
d) Activation des amines primaires de l'éthylène diamine	120
e) Activation de l'amine secondaire de la proline	122
3) Seconde approche rétrosynthétique.....	124
a) Couplage convergent avec formation des coudes β en fin de synthèse.....	124
b) Synthèse des fragments de la molécule cible à trois brins β_7	125
c) Synthèse de la molécule cible à trois brins β_7	130
4) Synthèse de la molécule cible à cinq brins β_8	132
a) Synthèse du motif coude-brin externe III.8	132
b) Saponification des fonctions esters terminales du feuillet β à trois brins β_7	133
c) Synthèse de la molécule cible à cinq brins β_8	134

II. Etudes structurales des molécules cibles à trois (β_7) et cinq brins (β_8)	134
1) Etude en solution	135
a) Analyse comparative par RMN ^1H de différents composés	135
b) Etude en solution du repliement du foldamère à trois brins β_7	138
c) Etude en solution du repliement du foldamère à cinq brins β_8	144
d) Comparaison du repliement en solution des foldamères à trois brins β_5 , β_6 et β_7 stabilisés par liaisons hydrogène	145
2) Etude structurale à l'état solide des foldamères multi-brins.....	147
III. Conclusion et perspectives	149
Bibliographie.....	152
Conclusion générale et perspectives	155
Partie expérimentale	161
I. General methods	163
II. Experimental data of chapter 2.....	164
1) General procedure for peptides synthesis using N-Fmoc strategy	164
2) Deprotection of orthogonal protective groups.....	169
a) General procedure for Alloc deprotection	169
b) General procedure for ivDde deprotection.....	173
c) General procedure for Mtt deprotection	174
3) Stapled peptides synthesis	175
a) Synthesis of P53	175
b) Synthesis of isothiocyanate derivatives 10 and 12	175
c) General procedure for thiourea formation	176
d) General procedure for guanidinylation.....	180
e) General procedure for Fmoc removal	183
4) Circular dichroism studies	187
5) Crystallography assays	191
III. Experimental data of chapter 3.....	191
1) Synthesis of precursor III.2 and compound 11	191
a) Synthesis of the turn-strand motif III.2	191
b) Synthesis of compound 11	193
2) Synthesis of cyclic ethylenediamine derivatives 8 , 14 , trisubstitued urea 17 and hydantoin derivative 21	194
a) Synthesis of 2-imidazolidinone 8 and compound 14	194
b) Synthesis of trisubstitued urea 17	195
c) Synthesis of hydantoin derivative 21	196

3) Synthesis of 3-stranded β -sheet foldamer β_7	196
a) Synthesis of precursor III.5	196
b) Synthesis of precursor III.4	198
c) Synthesis of 3-stranded foldamer β_7	200
4) Synthesis of 5-stranded β -sheet foldamer β_8	201
a) Synthesis of precursor III.8	201
b) Synthesis of diacid III.7	203
c) Synthesis of 5-stranded foldamer β_8	203
5) X-ray crystallographic data	204
References	206

Nomenclature et liste des abréviations

○ Liste des abréviations

Abs	Absorbance	A
Acm	Acétamidométhyle	
ACN	Acétonitrile	
AcOEt	Acétate d'éthyle	
ADN	Acide désoxyribonucléique	
Aib	Acide 2-aminoisobutyrique	
Alloc	Allyloxycarbonyle	
ARN	Acide ribonucléique	
Bn	Benzyle	B
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle	
Brine	Saumure	
Bu	Butyle	
Cbz (Z)	Carboxybenzyle	C
CD	<i>Circular Dichroism</i>	
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazole	
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>	
DCM	Dichlorométhane	D
Dde	Éthyle de 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxacyclohexylidène)	
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide	
DIEA	Diisopropyléthylamine	
DMF	diméthylformamide	
DMSO (-d₆)	Diméthylsulfoxyde (deutééré)	
DPT	Di-2-pyridylthionocarbonate	
DSC	Carbonate de <i>N,N</i> -disuccinimidyle	
DTT	Dithiothreitol	
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide	E
Éq.	Équivalent	
ESI-MS	<i>Electrospray ionisation mass spectrometry</i>	
EtOAc	Acétate d'éthyle	
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle	F
Fmoc-NCS	9-Fluorenylméthoxycarbonyl isothiocyanate	
H	Hydrogène	H
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>	
HOBt	Hydroxybenzotriazole	
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>	
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>	
<i>i</i>Bu	isobutyle	I
IC₅₀	Concentration inhibitrice médiane	

<i>i</i> Pr	isopropyle	
ivDde	1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidène)-3-méthylbutyle	
<i>J</i>	Constant de couplage	J
<i>K_a</i>	Constante d'association	K
<i>K_d</i>	Constante de dissociation	
<i>K_i</i>	Constante d'inhibition	
<i>l</i>	Longueur d'onde	L
MBHA	Methoxybenzhydrylamine	M
MeOH	Méthanol	
Me ou CH ₃	Méthyle	
Mtt	4-Méthyltrityle	
Mw	<i>Molecular weight</i>	
ND	Non déterminé	N
NMP	<i>N</i> -Méthyl-2-pyrrolidone	
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect Spectroscopy</i>	
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyle	P
PDB	<i>Protein data bank</i>	
PDZ	<i>Post Synaptic Density Protein (PSD-95)</i> Drosophila disc large supressor (Dlg-1) Zonula occludens-1 protein (Zo-1)	
PEG	Polyéthylène glycol	
pH	Potentiel hydrogène	
PH	Pont Hydrocarboné	
PyBOP	Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium	
Rés.	Résidu	R
Rfx	Reflux	
RMN	Résonance magnétique nucléaire	
ROESY	<i>Rotating-frame-overhauser spectroscopy</i>	
RP-HPLC	<i>Reverse phase high-perfromance liquid chromatography</i>	
RX	Rayons X	
Sec	Sélénocystéine	S
SPPS	<i>Solid phase peptide synthesis</i>	
TA	Température ambiante	T
TAMRA	5-carboxytétraméthylrhodamine	
TEA	Triéthylamine	
TFA	Acide trifluoroacétique	
TFE	2,2,2-trifluoroéthanol	
THF	Tétrahydrofurane	
TIS	triisopropylsilane	
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>	
<i>t_R</i>	Temps de rétention	

Trt	Trityle	
UV	Ultra-violet	U
VDR	Récepteur de la vitamine D	V
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine	
Vol	Volume	
2D	Deux dimensions	...
μW	Micro-ondes	

- Liste des formules chimiques utilisées

CDCl ₃	Chloroforme deutéré	C
CD ₃ CN	Acétonitrile deutéré	
CHCl ₃	Chloroforme	
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane	
HCl	Acide chlorhydrique	H
H ₂ O	Eau	
H ₂ SO ₄	Acide Sulfurique	
KHSO ₄	Hydrogénosulfate de potassium	K
LiOH	Hydroxyde de lithium	L
MgSO ₄	Sulfate de magnésium	M
NaH	Hydruure de sodium	N
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium	
NaOH	Hydroxyde de sodium	
NEt ₃	Triéthylamine	
Pd/C	Palladium sur charbon	P
Pd(PPh ₃) ₄	Palladium (0) tétrakis(triphénylphosphine)	
PhSiH	Phénylsilane	

- Nomenclature des acides aminés

Ala	Alanine	A	Leu	Leucine	L
Arg	Arginine	R	Lys	Lysine	K
Asn	Asparagine	N	Met	Méthionine	M
Asp	Acide aspartique	D	Phe	Phénylalanine	F
Cys	Cystéine	C	Pro	Proline	P
Glu	Acide Glutamique	E	Ser	Sérine	S
Gly	Glycine	G	Thr	Thréonine	T
His	Histidine	H	Tyr	Tyrosine	Y

Ile Isoleucine I **Val** Valine V

○ Unités

mm	millimètre	M	molaire
nm	nanomètre	mol	mole
Å	angström	mmol	milimole
°	degrés (angle)	μmol	micromole
°C	degrés Celsius	mL	millilitre
K	kelvin	μL	microlitre
kcal	kilocalorie	Hz	hertz
kDa	kilodalton	h	heure
g	gramme	min	minute
mg	milligramme	ppm	partie par million
δ	déplacement chimique	W	watt

○ Logiciels

Les figures ont été réalisées avec Chemdraw ultra 10 (CambridgeSoft®), Coreldraw 7 (Corel®), Blender (<http://www.blender.org>), PyMol 2.3 (Schrödinger®) et TopSpin 3.6 (Bruker®).

Introduction

Ce manuscrit rend compte d'études menées sur le développement de peptidomimes permettant d'accéder à des composés repliés en hélice α ou feuillet β de façon stable. Deux approches ont été abordées au cours de cette thèse : la stabilisation de la structure secondaire hélicoïdale d'un peptide par macrocyclisation et la conception de mimes artificiels de feuillet β multi-brins.

Le chapitre 1 décrit les enjeux thérapeutiques liés au développement de peptidomimes. Différentes stratégies utilisées pour développer des peptidomimes repliés en hélices α ou en feuillets β , qui sont les deux structures secondaires principales rencontrées au sein des protéines, sont présentées. Une première partie est donc consacrée à l'intérêt thérapeutique porté aux peptides et leurs modes de stabilisation naturels. La deuxième partie détaille les moyens mis à disposition pour stabiliser des hélices α grâce à l'introduction de motifs artificiels. La méthode de stabilisation *via* une macrocyclisation entre deux chaînes latérales d'un peptide est davantage discutée puisqu'elle est en lien avec l'un des projets de recherche de cette thèse. Un troisième volet concerne les stratégies développées jusqu'alors pour stabiliser des feuillets β ainsi que celles adaptées à la conception de feuillets β artificiels multi-brins. Les objectifs principaux de cette thèse seront exposés à la fin de ce chapitre.

Le deuxième chapitre concerne la mise au point d'une nouvelle méthode de cyclisation effectuée entre deux chaînes latérales d'un peptide pour stabiliser une structure en hélice α . Ce projet vise à introduire une fonction guanidine polaire au sein du macrocycle menant à des agrafes peptidiques originales. Les différentes étapes de la stratégie de synthèse établie sur une séquence peptidique modèle seront détaillées, ainsi que l'étude de l'influence de la taille et de la position du macrocycle. La stratégie de synthèse étendue à des peptides bioactifs impliqués dans des interactions protéine-protéine sera enfin présentée.

Le dernier chapitre retranscrit les résultats quant au développement de foldamères conçus pour se replier en feuillets β multi-brins. Ce projet ayant été initié par le Dr. Christel Dolain, les travaux précédemment effectués au laboratoire seront d'abord rapidement présentés. Les voies de synthèse mises en place afin d'obtenir de nouvelles molécules cibles seront ensuite décrites. Pour terminer, les études concernant le repliement adopté par ces foldamères seront détaillées.

Les perspectives de ces deux projets de recherche seront évoquées au cours de leurs conclusions respectives.

Chapitre 1. Complémentarité entre la stabilisation et le développement de mimes artificiels des structures secondaires peptidiques

I. Enjeux thérapeutiques liés au développement de peptidomimes de structures secondaires

L'industrie pharmaceutique s'est traditionnellement focalisée sur les petites molécules thérapeutiques en raison de leur facilité d'accès, leur importante diversité moléculaire et leurs bonnes propriétés pharmacologiques.^{1,2} Cependant, certains processus biologiques, tels que les interactions protéine-protéine, qui mettent en jeu de larges surfaces de reconnaissance sont plus difficiles à cibler avec des petites molécules. Ces dernières années, des avancées en biologie moléculaire ont permis de voir émerger des molécules biologiques (anticorps, hormones, facteurs de croissance...) comme agents thérapeutiques.^{3,4} Ces molécules présentent généralement de très bonnes affinités et sélectivités mais restent limitées à des cibles extracellulaires du fait de leur faible perméabilité cellulaire et ne peuvent être administrées que par voie intraveineuse la plupart du temps. Seuls quelques éléments de structures secondaires (hélices α et feuillet β) de ces molécules sont impliqués dans leur interaction avec la protéine partenaire et sont donc nécessaires pour leur activité biologique.⁵ C'est pour cela que les peptides aux caractéristiques intermédiaires entre les petites molécules et les protéines, représentent un enjeu thérapeutique intéressant.⁶ Leurs principaux inconvénients résident dans leur faible stabilité plasmatique et leur faible pénétration cellulaire notamment à cause de leur flexibilité conformationnelle ce qui limite pour l'instant leur développement thérapeutique.⁷ Deux solutions peuvent alors être envisagées : stabiliser la structure secondaire de peptides dans leur conformation bioactive ou développer des squelettes non naturels comme peptidomimes.^{3,8}

1) Anatomie des hélices α et feuillet β

Les catégories principales de structures secondaires issues des protéines sont les hélices α et les feuillet β qui furent découvertes par W. T. Astbury en 1933.⁹ Il a en effet été constaté par diffraction des rayons X sur des poils et cheveux mammaliens que la kératine, qui est une protéine composante majeure de ces résidus corporels, peut adopter une forme étendue ou ondulée comme une hélice. Quelques années plus tard, L. Pauling et R. Corey ont effectué une description approfondie de ces structures.^{10,11} Il en est ressorti que le squelette polypeptidique peut adopter soit une structure dite linéaire (brin β) dont la longueur de chaque résidu s'étend à environ 3,3 Å, soit une structure hélicoïdale.

La structure secondaire la plus répandue au sein des protéines est l'hélice α qui se définit par l'enroulement d'un squelette peptidique sur lui-même pour obtenir une hélice de pas droit comprenant 3,6 résidus/tour.¹² Le pas de l'hélice α correspond à 5,4 Å. Pour établir cette structure, chaque carbonyle (i) forme une liaison hydrogène intramoléculaire avec le groupement NH du quatrième résidu α -aminé suivant ($i+4$) (**Figure 1**). Les groupements C=O pointent alors vers l'extrémité C-terminale et les NH vers l'extrémité N-terminale induisant un moment dipolaire (3,45 D) au sein de l'hélice peptidique. La formation d'une hélice α est dite coopérative car plus la longueur de la chaîne principale augmente, plus l'hélice est stabilisée.

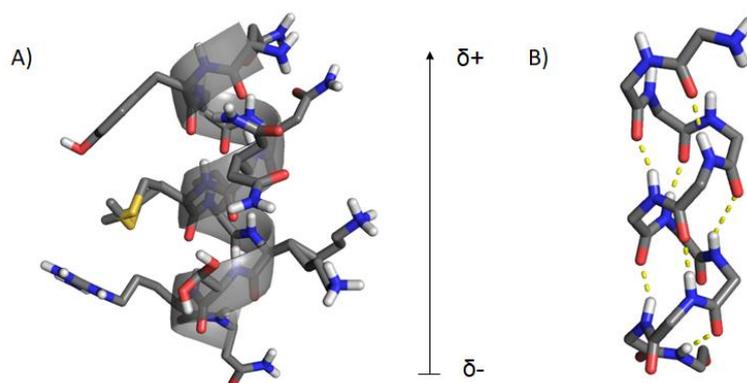


Figure 1 : Structure cristallographique de l'hélice α . A) Représentation d'une hélice α avec la projection des chaînes latérales. B) Représentation du squelette principal d'une hélice α . Les liaisons hydrogène caractéristiques sont en pointillés jaunes (PDB : 2RNS).

Le brin β se définit comme un arrangement linéaire d'acides aminés avec des liaisons amide coplanaires en projetant leurs chaînes latérales alternativement au-dessus et en-dessous du plan peptide.¹³ Pour se stabiliser, un brin β effectue des interactions intermoléculaires avec d'autres brins β environnants. La combinaison de deux ou plusieurs brins β , constitue des feuillets β qui peuvent interagir de deux manières : parallèle ou antiparallèle. En effet, quand les brins β alignés sont orientés dans la même direction, de l'extrémité *N*-terminale vers l'extrémité *C*-terminale, on parle d'un feuillet β parallèle. Par contre, lorsque les chaînes principales peptidiques composant ces brins successifs présentent des directions opposées, il s'agit d'un feuillet β antiparallèle. De plus, dans le cas des feuillets β parallèles, les liaisons hydrogène interbrins forment une série de cycles à 12 chaînons (**Figure 2A & B**). En revanche, dans les assemblages antiparallèles, les liaisons hydrogène sont perpendiculaires à l'axe des chaînes étirées et construisent alternativement des cycles à 10 et à 14 chaînons. Cette géométrie où les interactions $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$ se retrouvent en « face à face » confère aux feuillets β antiparallèles une meilleure stabilité qu'aux feuillets β parallèles (**Figure 2C & D**).

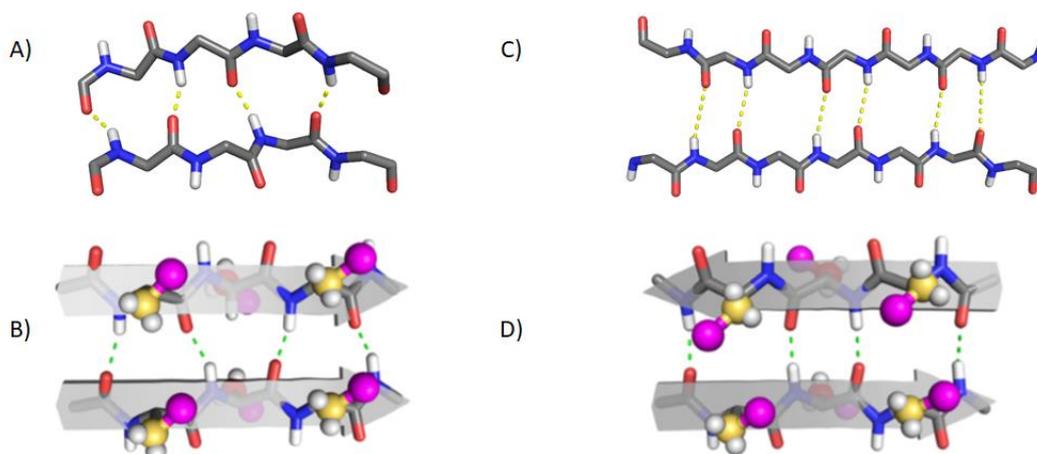
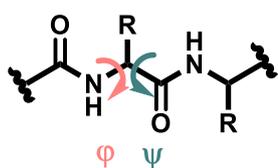


Figure 2 : Distinctions entre feuillets β parallèles et antiparallèles. A) Structure cristallographique d'un feuillet β parallèle (PDB : 1ZGG). B) Schéma de l'agencement des chaînes latérales d'un feuillet β parallèle. C) Structure cristallographique d'un feuillet β antiparallèle (PDB : 2NLQ). D) Schéma de l'agencement des chaînes latérales d'un feuillet β antiparallèle. Les sphères roses correspondent aux chaînes latérales.¹⁴

La forte propension des brins β à établir des liaisons hydrogène intermoléculaires induit une forte tendance de ces derniers à s'agréger et précipiter une fois isolés, ce qui complique l'étude de ces structures. L'enchaînement des brins fait souvent intervenir des boucles qui permettent de relier de manière covalente chaque brin entre eux pour stabiliser les interactions interbrins. Ces boucles sont nommées coudes β et s'inscrivent aussi bien dans des structures à deux brins que dans des architectures multi-brins.

L'arrangement des liaisons hydrogène définissant les structures secondaires est également corrélé à d'autres paramètres structuraux dont les rotations possibles autour des liaisons simples qui constituent la chaîne d'acides aminés. Ces rotations sont décrites par deux angles de torsion, ϕ et ψ , autour de la liaison CO-NH-C α -CO et de la liaison NH-C α -CO-NH respectivement (**Figure 3**). Toutes les valeurs des angles ϕ et ψ ne sont pas possibles car certaines peuvent conduire à des collisions entre atomes qui sont énergétiquement très défavorables. Les valeurs admissibles des angles de torsion pour le squelette polypeptidique ont été déterminées par G. N. Ramachandran.¹⁵ Ainsi, deux grandes zones de l'espace (ϕ , ψ) sont permises par les contraintes stériques : l'une comprend les angles de torsion des hélices de pas droit et l'autre ceux des feuillets β .



Feuillet β parallèle : (ϕ , ψ) = (-120°, 115°)
Feuillet β antiparallèle : (ϕ , ψ) = (-140°, 135°)
Hélice- α : (ϕ , ψ) = (-60°, -45°)

Figure 3 : Angles de torsion des liaisons peptidiques. Les valeurs moyennes des angles de torsion sont données pour les hélices α et feuillets β .

La séquence primaire d'une protéine détermine sa structure tertiaire active ce qui prouve l'importance de certains résidus au sein d'un polypeptide pour la stabilisation des structures secondaires. Le repliement des peptides dépend donc intimement des propriétés intrinsèques de chaque résidu protéinogène.

2) Propension des acides aminés à stabiliser les structures secondaires

La prédiction des structures secondaires des protéines à partir de leur simple enchaînement d'acides aminés a fait l'objet de nombreuses études. P. Y. Chou et G. D. Fasman ont analysé les structures cristallographiques de vingt-neuf protéines et procédé à des calculs statistiques afin d'établir la récurrence à laquelle les différents acides aminés sont rencontrés au sein de chaque structure secondaire.^{16,17} En 1987, R. W. Williams a comparé différents modèles empiriques établis jusqu'alors concernant les tendances générales de chaque résidu à adopter une structure en hélice α , en brin β ou en coude (**Tableau 1**).¹⁸ Les fréquences normalisées de chaque conformation ont été calculées d'après la fraction de résidus de chaque acide aminé qui se trouvait dans cette conformation, divisée par cette fraction pour tous les résidus. L'apparition aléatoire d'un acide aminé donné dans une conformation donnerait une valeur d'une unité. Une valeur supérieure à 1 indique une préférence pour un type particulier de structure secondaire. Il en est ressorti que les résidus aliphatiques, Ala, Leu, Glu ou Met, situés au cœur d'un segment peptidique sont plus propices à la structuration hélicoïdale. Il a

également été constaté que les résidus Val, Tyr, Cys et Ile sont les plus fréquemment rencontrés au centre des structures étendues (brins β). Ces résultats ont permis de prendre en considération l'hypothèse selon laquelle la nature des chaînes latérales portées par les résidus peptidiques influe sur la stabilisation d'une structure secondaire aux dépens d'une autre.

Tableau 1 : Préférences conformationnelles des acides α -aminés déterminées par R. W. Williams.¹⁸

Acides α -aminés	Préférence hélice α	Préférence feuillet β
Ala	1,41	0,72
Arg	1,21	0,84
Asn	0,76	0,48
Asp	0,99	0,39
Cys	0,56	1,40
Gln	1,27	0,98
Glu	1,59	0,52
Gly	0,43	0,58
His	1,05	0,80
Ile	1,09	1,67
Leu	1,34	1,22
Lys	1,07	0,74
Met	1,30	1,14
Phe	1,16	1,33
Pro	0,34	0,31
Ser	0,57	0,96
Thr	0,76	1,17
Trp	1,02	1,35
Tyr	0,74	1,45
Val	0,90	1,87

a) Stabilisations naturelles d'hélices α

Dans les années 90, les peptides courts sont devenus des modèles d'étude pour déterminer quels acides aminés sont les plus propices à propager la structuration en hélice α . Les premières théories de transition pelote statistique-hélice- α de Zimm-Bragg et de Lifson-Roig rapportèrent qu'il était impossible pour un peptide de moins de vingt résidus de former une hélice α .^{19,20} Ces modèles sont limités car ils ne prennent en compte que le paramètre de nucléation de l'hélice et celui de la propension pour chaque acide aminé protéinogène.²¹ Quelques années plus tard, R. L. Baldwin a conçu un peptide comportant dix-sept résidus à base d'alanines apte à se replier en hélice α ce qui fut un tournant majeur pour parvenir à prédire la stabilité d'un court segment hélicoïdal.²² Cette même équipe a également étudié la propension pour chaque acide aminé à stabiliser un repliement en hélice α à l'aide d'expériences basées sur une stratégie « hôte-invité ».²³ Ces analyses consistent à varier sélectivement la nature d'un résidu (invité) de courts peptides modèles comme séquences hôtes. Il a donc mis en évidence la tendance pour chaque acide α -aminé à stabiliser la structure hélicoïdale en mesurant la part d'hélicité de chaque peptide modifié *via* des expériences de dichroïsme circulaire.²⁴ D'autres aspects de stabilisation de l'hélice α résultant d'interactions entre les chaînes latérales furent ensuite pris en compte pour de courts fragments peptidiques.²⁵

i. Stabilisations intra-chaînes au cœur de l'hélice α

Un repliement en hélice α peut se voir stabilisé en renforçant son macrodipôle par la présence de résidus chargés aux extrémités du fragment peptidique.²⁶ Cet élément de stabilisation explique notamment la fréquence de certains résidus, mentionnés précédemment, à se retrouver sur l'une ou l'autre des extrémités de l'hélice α . Ce fait a été particulièrement observé par R. L. Baldwin sur le peptide C constitué de 13 résidus et issu de la ribonucléase A.²⁷ Ce dernier peut être isolé de la RNase A par un clivage au CNBr pour former une structure hélicoïdale dans l'eau à basse température. Dans ce cas, les résidus Glu2⁻ et His12⁺ situés aux extrémités du peptide stabilisent *via* des interactions électrostatiques avec le macrodipôle, la formation de l'hélice α (**Figure 4**).

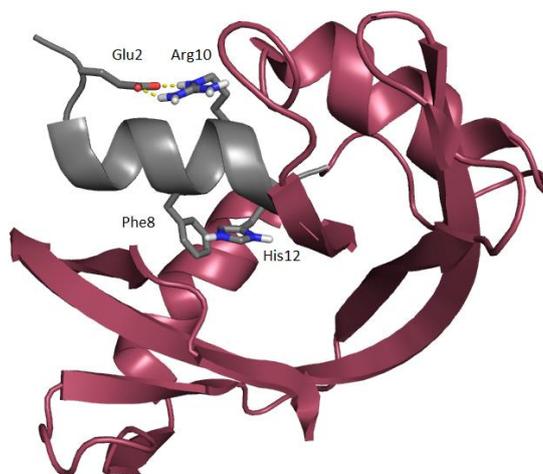


Figure 4 : Structure cristallographique de la Ribonucléase A. Le peptide C est représenté en hélice grise (PDB : 7RSA).

Historiquement, cette hélice a fourni le premier exemple de structuration autonome d'un peptide court issu de la séquence naturelle d'une protéine. Les études menées sur la formation d'hélices α dans les peptides dérivés de la ribonucléase A ont révélé d'autres interactions spécifiques entre les chaînes latérales qui aident à en stabiliser la structure. En effet, l'équipe de R. L. Baldwin a mis en évidence des interactions clés telles que le pont salin entre les résidus Glu2⁻ et Arg10⁺ ou encore l'interaction cation- π entre le résidu His12⁺ et Phe8 (**Figure 4**).^{28,29}

Ces observations ont été généralisées pour stabiliser un repliement en hélice α sur de courtes séquences peptidiques *via* des interactions entre des chaînes latérales polaires.³⁰ La stabilisation d'hélices α a également été observée par l'incorporation de résidus Glu⁻ et Lys⁺ formant un pont salin sur des peptides en ($i, i+4$).²² De plus, il a également été observé que des effets hydrophobes peuvent favoriser d'une structure hélicoïdale. Les travaux de R. L. Baldwin et S. Padmanabhan ont notamment mis en évidence l'importance de l'effet hydrophobe entre les résidus Tyr et Leu/Val placés en ($i, i+4$) dans des peptides synthétiques à base d'alanines.^{31,32} De la même manière, J. Doig *et al.* ainsi que l'équipe de L. Serrano ont démontré qu'une interaction Phe-Met/Cys pouvait également stabiliser une hélice α en ($i, i+4$).^{33,34}

ii. Stabilisation de l'hélice α via un effet de *capping*

Il a été mentionné auparavant que le repliement en hélice α se caractérise par un réseau de liaisons hydrogène à deux centres impliquant les carbonyles (i) et les NHs ($i+4$) de la chaîne peptidique. Néanmoins, ce processus s'interrompt aux extrémités de l'hélice. En l'absence de terminaison, aucun accepteur ni donneur de liaisons hydrogène supplémentaire n'est disponible pour stabiliser le dernier tour de l'hélice α . Cet effet peut devenir néfaste pour les courts fragments hélicoïdaux car ce dernier tour d'hélice peut englober jusqu'aux deux tiers des résidus responsables de leur structuration. Au sein de séquences peptidiques naturelles, des éléments de *capping* ont été identifiés pour stabiliser une hélice α . Ils se décrivent comme des portions peptidiques très courtes apportées aux extrémités de l'hélice pour en stabiliser la structure.³⁵

La présence de groupements donneurs de liaisons hydrogène à l'extrémité C-terminale et, a contrario, accepteurs de liaisons hydrogène à l'extrémité N-terminale stabilise le repliement en hélice. Ces stabilisations mettent en jeu des interactions avec les NHs amides non impliqués naturellement dans le réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires. Au sein des protéines, il a été constaté que les acides aminés Ser, Pro, et Asn sont fréquemment retrouvés parmi les trois résidus précédant l'extrémité N-terminale indiquant leur implication dans de potentiels effets *capping*.^{16,36} Par exemple, des corrélations NOEs ont été mises en évidence à l'extrémité N-terminale du peptide Lyutide démontrant un effet *capping* imposé par le motif Ser-Glu-Ser-Glu (SEDE).³⁷ De plus, le motif *capping box* qui est le modèle le plus décrit pour verrouiller l'hélice α à l'extrémité N-terminale des peptides fait fréquemment intervenir les résidus Ser et Asn.^{38,39} Les résidus Gly, His et Pro ont tendance à stabiliser l'hélice α lorsqu'ils succèdent aux résidus placés à l'extrémité C-terminale.^{40,41} Ces acides aminés favorisent donc un effet *capping* aux extrémités C-terminales.⁴² Ainsi, des motifs de *capping* ont pu être créés en apportant des résidus naturels, judicieusement choisis selon l'extrémité ciblée, grâce à l'identification des acides α -aminés propices à la stabilisation de l'hélice α .⁴³

Les effets des interactions entre les chaînes latérales de résidus composant de courtes séquences hélicoïdales ont pu être analysés par des expériences de CD et RMN afin d'établir des théories de transition pelote statistique-hélice α plus complètes.^{44,45,46,47} Ces concepts ont été étendus aux protéines ainsi, C. N. Pace et J. M. Scholtz ont prouvé que les résultats entre les deux échelles (peptide et protéine) étaient très similaires.^{48,49,50,51} A. J. Doig, R. L. Baldwin et C. A. Rohl ont notamment introduit une approche de Lifson-Roig qui intègre les interactions entre les chaînes latérales ainsi que les interactions de *capping*.^{52,53,54,33,55,24} Ces études ont conduit au développement d'outils de calcul tel que AGADIR pour prédire la stabilité des séquences peptidiques vis-à-vis d'une structuration en hélice α par le biais d'algorithmes informatiques.⁵⁶ Les notions ainsi acquises permettent, entre autres, de stabiliser des peptides de synthèse par l'introduction adéquate de résidus aminés aux positions les plus favorables pour l'enroulement hélicoïdal.

b) Stabilisations naturelles de feuilletts β

Contrairement à l'hélice α , un brin β seul est peu stable car très peu d'interactions locales interviennent dans la stabilisation des structures étendues. En effet, au sein d'une hélice,

chaque résidu communique de façon intramoléculaire l'information du repliement à ses voisins générant la propagation de la structure, tandis qu'un brin β met en jeu des interactions intermoléculaires pour obtenir un feuillet β stable.^{57,58} La stabilisation d'un feuillet β requiert donc la formation de liaisons hydrogène interbrins induites par les chaînes principales mais il entretient également des interactions entre les chaînes latérales des brins β . Des analyses statistiques et thermodynamiques ont alors été effectuées à partir d'un peptide consensus en doigt de zinc⁵⁹ et du domaine B1 de la protéine G de staphylocoques^{60,61} selon une stratégie « hôte-invité ».⁶² Le remplacement, tour à tour, d'un même résidu par chaque acide aminé sur ces séquences ont permis de montrer que des résidus présentant des chaînes alcanes et aromatiques ont une forte tendance à stabiliser les feuillets β . Ces résultats ont donc traduit l'importance de l'effet hydrophobe entre les chaînes latérales pour stabiliser ce repliement comme par exemple, entre les paires de résidus Phe/Leu, Phe/Phe et Phe/Tyr. Ces expériences ont également révélé que les feuillets peuvent être stabilisés *via* des interactions électrostatiques entre des résidus chargés tels que Glu⁻/Arg⁺ et Glu⁻/Lys⁺.

Ces interactions sont plus importantes dans les paires de résidus situées dans un cycle à 14 chaînons fermé par deux liaisons hydrogène (NHB) des feuillets antiparallèles que dans celles de cycles à 12 chaînons (HB), ou dans les feuillets parallèles (**Figure 5**). Ce fait est principalement dû à l'orientation des chaînes latérales au sein des motifs NHB qui peuvent plus facilement interagir entre elles, ce qui peut conférer une meilleure stabilité aux feuillets β antiparallèles. De ce fait, des analyses statistiques ont été menées séparément pour les feuillets parallèles et antiparallèles afin de déterminer les appariements entre résidus préférentiellement formés dans ces deux arrangements.^{63,64}

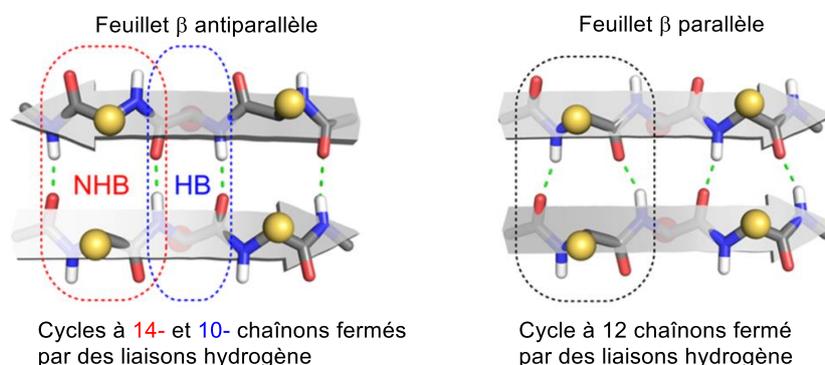


Figure 5 : Comparaison des motifs NHB et HB des feuillets β antiparallèles avec les feuillets β parallèles.

Dans tous les cas, les interactions dites en « face à face » entre les chaînes latérales des feuillets β font généralement intervenir des contacts hydrophobes entre les résidus Val, Leu, Ile ou Phe (**Figure 6**). Pour établir ce type d'interactions, les chaînes latérales peuvent être distribuées d'une manière alignée ou décalée entre deux brins. Par ailleurs, la structure type feuillet β peut également se voir stabilisée par l'interdigitation de chaînes latérales sachant que cet agencement favorise des contacts principalement hydrophobes (**Figure 6A**).¹⁴ Enfin, les chaînes latérales peuvent également s'organiser selon une interdigitation complémentaire nommée *knobs holes* où un résidu se retrouve coincé dans un trou généré par la présence de petits résidus comme l'alanine ou la glycine en face de celui-ci (**Figure 6B**). Ce type d'agencement fait

intervenir des interactions type Van der Waals ou un effet hydrophobe mais relève particulièrement de la complémentarité stérique en deux résidus se faisant face.

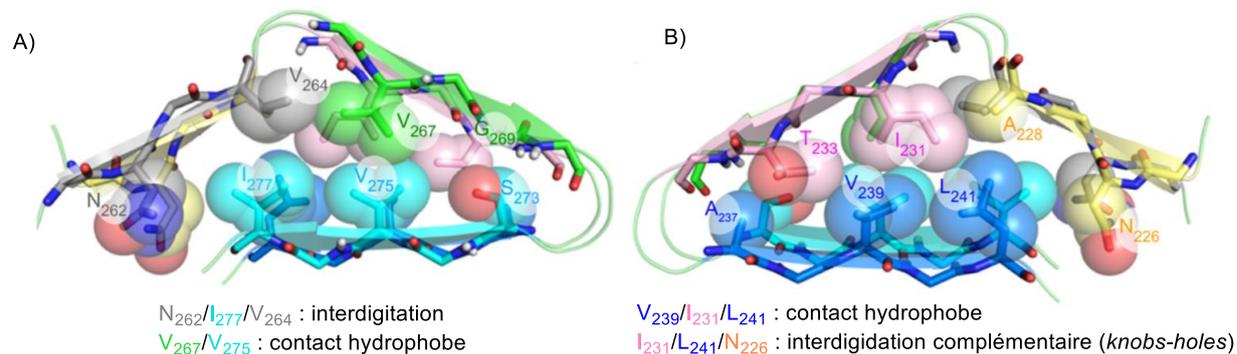


Figure 6 : Structure cristallographique des résidus 218-289 d'un feuillet β issu de la protéine prion HET-s. A) Interactions entre chaînes latérales par effet hydrophobe et interdigitation. B) par contact hydrophobe et *knobs holes*.

Un autre mode de stabilisation naturel des feuillets β est la cyclisation intramoléculaire qui peut être effectuée sur le squelette principal formant ainsi un peptide cyclique ou entre deux chaînes latérales. L'antibiotique gramicidine S, par exemple, est un cyclodecapeptide noté *cyclo(-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-)*₂ adoptant une structure en feuillet β à deux brins reliés entre eux par deux coudes.⁶⁵ Il a également été observé que les protégrines adoptent des structures en épingle à cheveux, *i.e.* où deux brins sont reliés par un coude β , stabilisées par des ponts disulfure entre des cystéines.⁶⁶ D'ailleurs, il a été observé par S. S. Harwig que le remplacement de ces cystéines par des alanines a mené à une perte d'activité antimicrobienne résultant de la diminution de la stabilité de la structure.⁶⁷

Pour conclure, l'ensemble de ces études a conduit à une meilleure compréhension des interactions stabilisant les structures secondaires afin de guider les chimistes dans le développement de molécules synthétiques repliées en hélices α ou feuillets β . Il est maintenant possible de prévoir *in silico* ou *de novo* le repliement qu'adoptera un fragment peptidique à partir de son seul enchaînement d'acides aminés.^{68,69,70} Malgré tout, les stabilisations proposées par l'introduction de motifs stabilisateurs comme les *capping* ne résolvent pas les soucis relatifs à l'utilisation des peptides comme médicaments. En effet, les peptides ainsi optimisés ne sont pas forcément plus aptes à résister à la protéolyse que leurs équivalents non structurés. Une solution pour résoudre ces problèmes serait l'introduction de motifs artificiels.

II. Méthodes chimiques de stabilisation de l'hélice α

La prédiction de la structure secondaire d'un peptide est un bon point de départ pour développer des peptidomimes stables à visée thérapeutique. Néanmoins, de courts fragments peptidiques isolés retiennent difficilement leur structuration qui est souvent stabilisée par la protéine d'interaction, ce qui altère leur activité biologique. Des méthodes de stabilisation ont émergé pour améliorer certaines propriétés pharmacologiques des peptides à savoir : la perte de structuration de courts fragments peptidiques, le manque de perméabilité membranaire et de résistance à la protéolyse.

Nous verrons qu'il est possible d'introduire des motifs non naturels au cœur d'une séquence peptidique pour contraindre le repliement en hélice α . Les méthodes artificielles utilisées pour stabiliser les extrémités N-terminales afin d'apporter un effet *capping* seront également évoquées. Enfin, nous nous intéresserons plus particulièrement à la macrocyclisation entre les chaînes latérales de deux résidus d'un même peptide. Ces stratégies permettent de contraindre la structuration et visent à améliorer les propriétés pharmacologiques de peptides hélicoïdaux.

1) Modifications ponctuelles du squelette peptidique

La stabilisation des structures secondaires en hélice α peut mettre en jeu des modifications ponctuelles au sein du squelette peptidique par l'incorporation de motifs artificiels. Ces derniers dérivent souvent d'acides α -aminés qui sont modifiés pour contraindre ou nucléer la structuration en hélice α .

a) Incorporation d'acides aminés α,α -dialkylés

Un haut degré de stabilisation d'hélices α a pu être amené en contraignant l'espace conformationnel accessible aux acides aminés d'une séquence peptidique. Ce concept met en œuvre l'effet Thorpe-Ingold relatifs aux $C\alpha$ tétrasubstitués.⁷¹ L'incorporation de résidus achiraux comme l'acide α -aminoisobutyrique (Aib) à différents emplacements d'un peptide permet d'amorcer le repliement en hélice α . Dans le cas de l'Aib, l'effet Thorpe-Ingold impose les valeurs des angles de torsion ϕ et ψ de (+60 ; +30) et (-60 ; -30) respectivement (**Figure 7**).

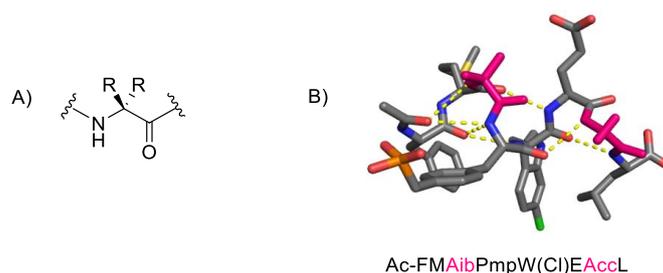


Figure 7 : A) Nomenclature des acides aminés α,α -dialkylés. B) Structure cristalline d'un octamère peptidique contenant des acides aminés α,α -dialkylés en rose (PDB: 2GV2). Pmp = phosphonométhylphénylalanine ; Acc = acide 1-aminocyclopropanecarboxylique.⁷²

C'est ainsi que divers dérivés d'acides aminés α,α -dialkylés furent employés pour promouvoir et stabiliser des conformations hélicoïdales de peptides biologiquement actifs.^{73,74}

b) Insertion ponctuelle d'acides β - et γ -aminés

Il a été démontré que des acides α -aminés peuvent être associés à d'autres acides aminés non naturels en vue de la stabilisation de structures hélicoïdales.^{75,76,77} Le terme foldamère a été introduit pour la première fois par S. H. Gellman et se définit par tout oligomère synthétique capable d'adopter une structure compacte et bien définie.⁷⁸ Ceux-ci peuvent être homogènes mais aussi hétérogènes en alternant, par exemple, des monomères dérivés d'acides aminés différents. Ils ne sont pas reconnus par les protéases plasmatiques ce qui leur confère une meilleure stabilité que les peptides.

Les monomères les plus étudiés sont les acides β -aminés pour remplacer ponctuellement des résidus naturels au sein d'une séquence peptidique (**Figure 8A & B**). Les acides β -aminés sont des homologues des acides α -aminés comportant un méthylène supplémentaire entre l'amine primaire et l'acide carboxylique (**Figure 8B**). Selon le modèle de substitution des carbones en position 2 et 3 de la chaîne principale, ils peuvent être répartis en trois catégories : β^2 , β^3 , $\beta^{2,3}$. Les motifs alternant les acides α - et β -aminés stabilisant des structures hélicoïdales sont : α/β (1 :1), $\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha\alpha\beta$ et $\alpha\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ avec approximativement 25 % à 50 % de monomères β pour des chaînes de 38 résidus.^{79,80,81,82,83} La comparaison des structures cristallographiques entre le peptide α GCN4-pLI, une variante du régulateur de transcription des levures GCN4, et des analogues α/β^3 montrent la proximité conformationnelle des différentes structures (**Figure 8D & E**).⁸⁴ La seule différence est la présence d'environ un atome de carbone supplémentaire par tour d'hélice pour les peptides α/β . Les différents hybrides α/β ont été utilisés pour mimer des α -peptides bioactifs visant à inhiber des interactions protéine-protéine.^{85,86,87} S. H. Gellman et W. D. Fairlie ont notamment démontré que l'insertion du motif de répétition $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ où les résidus β sont cycliques pour mimer le domaine BH3 du peptide BIM conduit à un ligand puissant sélectif des protéines BCL-X_L et MCL-1, régulant l'apoptose. Le temps de demi-vie du peptide α/β est 120 fois supérieur au peptide naturel en présence de protéinases K ce qui traduit une nette amélioration face à la protéolyse par l'introduction ponctuelle d'acides β -aminés.⁸⁸

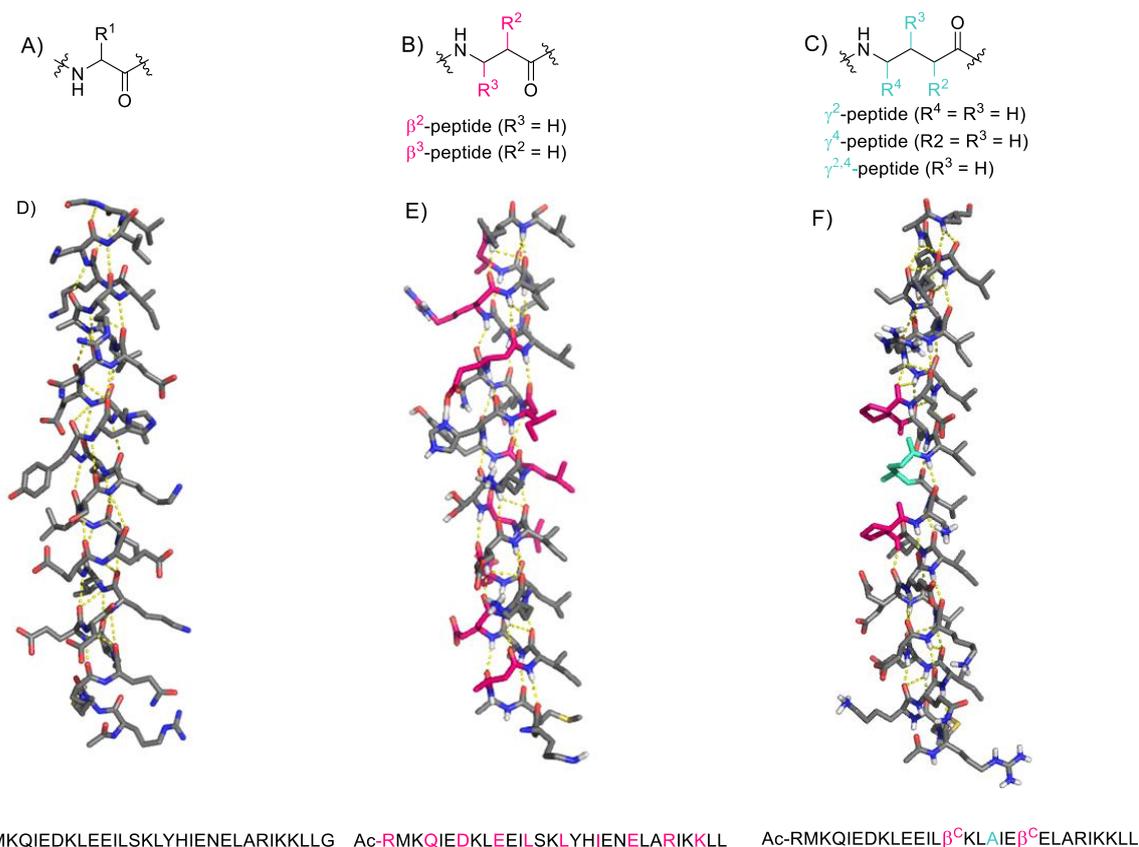


Figure 8 : Nomenclature et structures cristallographiques de peptides α , α/β et $\alpha/\beta/\gamma$. Nomenclature d'un acide A) α -aminé, B) β -aminé et C) γ -aminé. Structures cristallographiques D) du peptide GCN4-pLI (PDB : 1GCL)⁸⁴, E) d'un peptide α/β pourvu d'un motif $\alpha\alpha\beta$ (PDB : 3C3G) et F) d'un peptide $\alpha/\beta/\gamma$ pourvu du motif $\alpha\gamma\alpha\alpha\beta$ (PDB : 4HJD). β^C = acide β -aminé cyclique type APC.

L'équipe de S. H. Gellman a démontré que l'hexade type $\alpha\gamma\alpha\alpha\beta\alpha$ reproduit à l'identique la projection des chaînes latérales sur une face de l'hélice α , à partir d'expériences de RMN 2D et de structures cristallographiques (**Figure 8C, D&F**).^{89,90} Un acide γ -aminé contient trois carbones sur sa chaîne principale alors, l'association d'un résidu β avec un résidu γ constitue une chaîne carbonée égale au nombre d'atomes d'un α -tripeptide (**Figure 8D & F**).⁹¹ Le motif $\alpha\gamma\alpha\alpha\beta\alpha$ permet donc de mimer parfaitement un tour d'hélice α correspondant à un heptade d'acides α -aminés (**Figure 9**). C'est un modèle récent de foldamère hybride qui devrait se voir rapidement appliqué pour moduler des interactions protéine-protéine. En 2016, des premiers peptides $\alpha/\beta/\gamma$ avec des motifs de répétition différents de $\alpha\gamma\alpha\alpha\beta\alpha$ ont été utilisés pour inhiber l'interaction p53/MDM2, impliquée dans le processus de l'apoptose, et démontrent une protection améliorée contre la protéolyse.⁹²

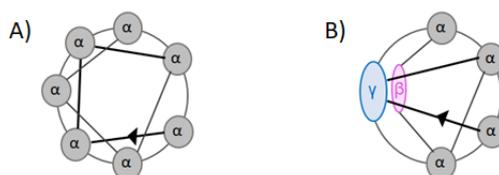


Figure 9 : Peptides hybrides $\alpha/\beta/\gamma$. Représentation schématique de la répartition des résidus dans les motifs suivants A) Heptade α/α . B) Hexade $\alpha\gamma\alpha\alpha\beta\alpha$.

2) Modifications aux extrémités d'une hélice α en vue d'un effet *capping*

a) Blocs contraints comme « caps » de synthèse

Les hélices α peuvent être stabilisées par l'introduction de motifs artificiels à ses extrémités qui instaurent des contraintes conformationnelles. Les approches connexes aux *capping* naturels des structures hélicoïdales sont les liaisons hydrogène de substitution ou l'apport d'un bloc synthétique contraint. D'un point de vue historique, D. S. Kemp *et coll.* ont conçu un bloc contraint constitué de trois cycles enchevêtrés nommé Ac-Hel.^{93,94} La particularité de ce motif cyclique est d'induire la conformation hélicoïdale, à l'extrémité N-terminale, en orientant de manière adéquate des carbonyles des trois premiers résidus peptidiques. Ce système court s'apparente donc à un effet *capping* car il est lié de manière covalente à une chaîne polypeptidique et lui communique son information conformationnelle.

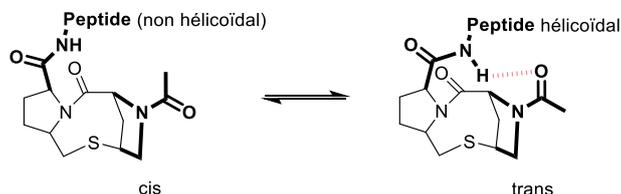


Figure 10 : Représentation de l'équilibre entre les deux conformères à trois cycles inducteurs (ou non) de la structure du bloc contraint de D. S. Kemp.

Lorsque l'inducteur d'hélice Ac-Hel adopte une conformation *trans*, relative à l'une des prolines qu'il contient, ceci favorise en partie la structuration en hélice α (**Figure 10**). Au contraire, si la proline rattachée au groupement acétyle adopte une conformation *cis*, le carbonyle de ce groupement est projeté vers le solvant alors la nucléation de l'hélice n'a pas lieu. L'équilibre

entre ces deux conformères est devenu un inconvénient car il est difficilement possible d'observer exclusivement la conformation qui stabilise des séquences peptidiques bioactives.

En 2016, l'équipe de D. P. Fairlie a quant à elle démontré la capacité d'un pentapeptide cyclique à nucléer l'hélice α au sein de peptides courts.⁹⁵ Celui-ci est composé d'un motif Ac-(cyclo-1,5)-[KAXAD]-NH₂ stabilisé par un lien covalent de type lactame entre le résidu Lys1 et Asp5 (**Figure 11**).⁹⁶ La structure de ce pentapeptide a été déterminée en solution par RMN et correspond bien à une hélice α (**Figure 11**). Ce pentapeptide constitue donc la séquence peptidique la plus courte se repliant en hélice α définie par trois liaisons hydrogène. Ce motif a ensuite été introduit sur un peptide palindromique naturellement non-structuré. La caractérisation de la structure résultante a été effectuée par RMN et il est advenu que le pentapeptide a bien induit une structuration en hélice α pour le peptide ciblé. Le pourcentage d'hélicité mesuré par CD est en accord avec les structures établies en solution. En effet, le peptide modifié a atteint 92 % d'hélicité lorsque le motif de *capping* artificiel fut combiné au peptide à l'extrémité C-terminale contre 67 % d'hélicité lorsqu'il est placé à l'extrémité N-terminale. Enfin, lorsque ce même peptide contient le motif cyclique aux deux extrémités, l'hélicité a été déterminée à 100 %. Ainsi, le dérivé Ac-(cyclo-1,5)-[KAXAD]-NH₂ est un excellent inducteur d'hélice α et des expériences de dégradation enzymatiques effectuées sur le composé cyclique où X=R (Arg) ont démontré sa résistance à la protéolyse.⁹⁷



Figure 11 : Structure du motif de *capping* Ac-(cyclo-1,5)-[KARAD]-NH₂ déterminée par RMN. Superposition d'une hélice α idéale (jaune) avec le pentapeptide cyclique (en vert).

b) Prothèses moléculaires de type foldamères et effet *capping*

En 2006, S. H. Gellman a développé des peptides hybrides de type $\alpha\beta+\alpha$ où le segment α/β (1 : 1) est positionné à l'extrémité N-terminale d'un peptide mimant le domaine BH3 d'un peptide interagissant avec BCL-X_L.⁹⁸ Le segment comprenant le foldamère mixte α/β est assimilable à une prothèse moléculaire induisant un effet *capping*. La structure cristallographique d'un de ces peptidomimes en complexe avec la protéine a montré que le foldamère conserve le mode d'interaction du peptide natif (**Figure 12A**).

Au sein de notre équipe nous avons développé une classe de foldamères comportant des liaisons urées entre les résidus peptidiques et les propriétés de repliement de ces oligomères peptidomimétiques ont fait l'objet d'études approfondies.^{99,100,101} Des analyses structurales à haute résolution en solution et à l'état solide ont permis de montrer que ces oligomères adoptent des structures en hélice droite 2,5 bien définies, stabilisées par un réseau de liaisons hydrogène à trois centres.^{102,103} Une stratégie entreprise au sein de notre équipe consiste à stabiliser des hélices α lorsque des oligomères sont combinées à l'extrémité N- ou C-terminale

à un peptide très court sachant que les motif urées résistent à la protéolyse (**Figure 12B**).¹⁰⁴ La combinaison de foldamères mixtes oligoamide-oligourée revient à induire un effet *capping* sur le segment peptidique grâce à la forte propension hélicoïdale des segments oligourées situés aux deux extrémités.^{105,106}

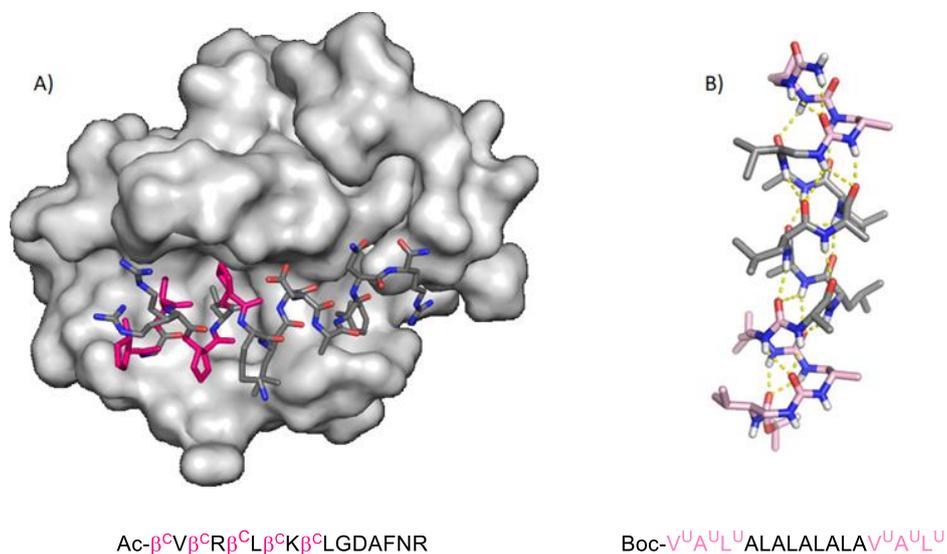


Figure 12 : Structures cristallographiques de foldamères induisant un effet *capping* sur un court fragment peptidique. A) Foldamère hybride type $\alpha\beta+\alpha$ (PDB : 3FDM) en interaction avec la protéine BCL-X_L. Les résidus β sont représentés en rose. B) Foldamère hybride oligoamide/oligourée (gris/rose) (CCDC : 1041244).

c) Liaisons hydrogène de substitution comme « caps » de synthèse

Une autre méthode clé a fait ses preuves pour induire un effet *capping* au sein de fragments peptidiques : la HBS pour *Hydrogen Bond Surrogates*. Cette stratégie consiste à remplacer une liaison hydrogène intramoléculaire naturelle en ($i, i+4$) par un lien covalent de type C=O-X-Y-N, sur l'extrémité N-terminale d'un peptide (**Figure 13A**).¹⁰⁷ Un aspect attractif de ce concept est la préservation des chaînes latérales du squelette peptidique qui ne nécessite pas de modifications préalables. Ainsi, des liens hydrazones et hydrocarbonés ont été proposés comme liaisons hydrogène de substitution, par A. C. Satterthait et P. S. Arora respectivement.^{108,109,110} Des études par RMN et dichroïsme circulaire ont confirmé qu'introduire ces motifs HBS à l'extrémité N-terminale de fragments peptidiques permet, effectivement, d'induire la formation d'une hélice α et d'apporter une résistance à la dégradation protéolytique.^{111,112,113,114}

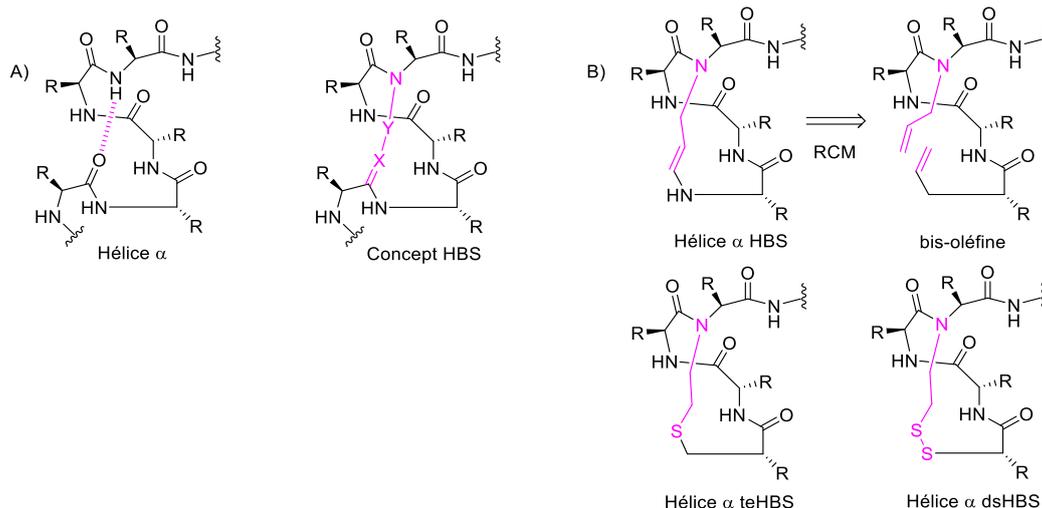


Figure 13 : Principe de l'HBS. Nucléation de l'hélice α en remplaçant la liaison hydrogène en ($i, i+4$) du N-terminal (C=O...H-N) par une liaison covalente (C=X-Y-N). Liaison hydrogène de substitution (HBS) de l'hélice α via une liaison carbone-carbone obtenue par RCM entre deux oléfines. Hélice α teHBS (thioéther) et dsHBS (disulfure) en ($i, i+4$).

Les développements actuels concernant les HBS sont les cycles formés par des ponts disulfure et thioéther (**Figure 13B**).¹¹⁵ D'ailleurs, des études menées à partir de tripeptides cyclisés par un pont disulfure pour pré-organiser l'hélice α , ont confirmé les informations quant à l'aptitude de certains résidus à favoriser la nucléation de l'hélice α . C'est un tournant important dans la consolidation de structures hélicoïdales puisque seule la propension des acides aminés à propager ou non cette conformation a été largement étudiée et moins leurs propensions à la nucléer.^{21,116} Il est apparu que l'alanine et la leucine, positionnées sur le cycle, permettent d'induire la formation de l'hélice α alors que la lysine et l'acide aspartique sont plus néfastes.

La possibilité de concevoir un système universel reste un défi constant pour stabiliser et/ou initier le repliement en hélice α , il est donc souvent judicieux de combiner plusieurs stratégies pour obtenir les meilleurs résultats. Par ailleurs, l'action de contraindre un peptide par le biais d'une macrocyclisation pour influencer, initier et propager son repliement peut également s'effectuer entre deux chaînes latérales.

3) Stabilisation d'hélices α via une macrocyclisation entre deux chaînes latérales

Le concept d'agrafes peptidiques est devenu un outil à part entière pour renforcer l'hélicité des peptides.⁷ Cette stratégie permet d'améliorer la résistance d'un peptide face à la protéolyse ainsi que sa perméabilité cellulaire voire même son activité biologique. Les agrafes peptidiques sont plus communément appelées « stapled peptides » et résultent d'une macrocyclisation entre deux chaînes latérales d'une même séquence peptidique. Pour ce faire, deux résidus de la même face de l'hélice sont identifiés pour ensuite être remplacés soit par deux autres résidus réactifs comme la lysine, l'asparagine ou la cystéine soit par des résidus non-naturels. Ainsi, selon la longueur de leurs chaînes latérales on favorisera une macrocyclisation en ($i, i+3/4$), ($i, i+7$) et parfois même ($i, i+11$) (**Figure 14**).¹¹⁷

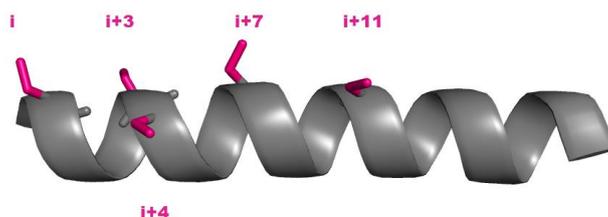


Figure 14 : Positions possibles à agraffer. Résidus séparés par un tour d'hélice ($i, i+3/4$), deux tours d'hélice ($i, i+7$) ou trois tours d'hélice ($i, i+11$).

Le peptide se verra alors rigidifié et sa conformation en hélice α sera d'autant plus stabilisée. L'objectif ici est de comparer les différentes techniques de macrocyclisation, pour former ces agrafes peptidiques, par rapport à leur accès synthétique et surtout leur potentiel thérapeutique. Il existe deux catégories d'agrafes peptidiques : l'une issue d'une réaction intramoléculaire (**Figure 15A**) et l'autre résultant d'une réaction intermoléculaire faisant intervenir un connecteur externe bifonctionnel pour fermer le macrocycle (**Figure 15B**).

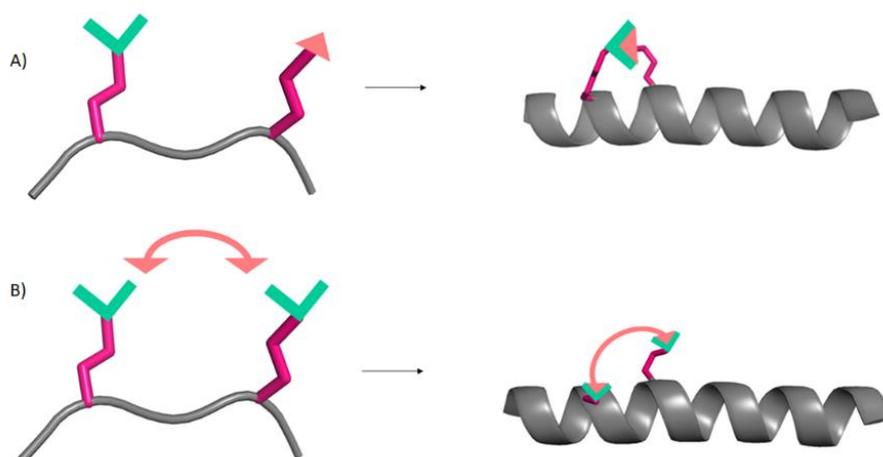


Figure 15 : Stratégies de synthèse d'agrafes peptidiques. A) Macrocycle intramoléculaire issu d'une réaction entre deux chaînes latérales d'un peptide. B) Macrocycle intermoléculaire formé par l'ajout d'un connecteur externe (réaction à deux composants).

a) Cyclisations intramoléculaires

i. Macrocycles hydrocarbonés

Les macrocycles hydrocarbonés sont obtenus suivant une réaction de métathèse cyclisante entre deux oléfines portées par deux dérivés d'acides aminés. Le premier pont hydrocarboné fut synthétisé en 1998 par R. H. Grubbs et H. E. Blackwell qui ont rapporté la formation de ce macrocycle en solution, entre deux O-allyl sérine en ($i, i+4$) via une catalyse au ruthénium (**Figure 16A**).¹¹⁸ Bien que l'agrafe peptidique ne renforçât pas significativement l'hélicité du peptide, ce fut la preuve de concept qu'il est possible de réaliser des réactions de métathèse cyclisante (RCM) entre les chaînes latérales de peptides hélicoïdaux. Deux ans plus tard, l'équipe de L. Verdine s'appuya sur ces résultats pour démontrer la stabilisation du peptide C issu de la ribonucléase A par des macrocycles hydrocarbonés en ($i, i+4$) et ($i, i+7$), en introduisant également des acides aminés α, α -dialkylés.¹¹⁹ Ils ont alors prouvé qu'il est possible

de synthétiser des ponts de différentes tailles et de stéréochimies différentes puisque les oléfines sont portées par des acides aminés quaternaires (**Figure 16B**). De plus, dans leur étude, la macrocyclisation est effectuée sur support solide avant le clivage du peptide et non en solution comme dans l'exemple évoqué précédemment. L'ensemble des informations décrites fut une réelle avancée en démontrant que pour stabiliser une hélice α , la taille et la position du macrocycle sont déterminantes.

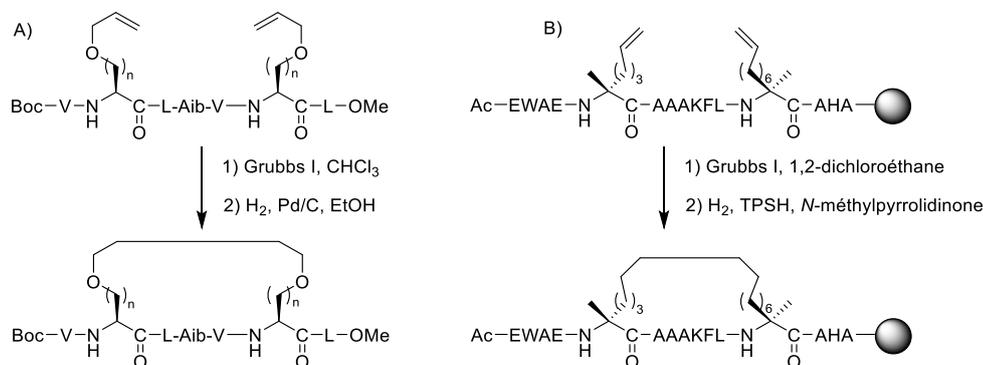


Figure 16 : Synthèses de ponts hydrocarbonés. A) Macrocyclisation entre des résidus O-allylsérine. B) Macrocyclisation à partir d'acides aminés α,α -dialkylés.

Les peptides ainsi obtenus furent analysés par dichroïsme circulaire et il s'est avéré qu'un pont en $(i, i+7)$ améliorait significativement l'hélicité du peptide. En parallèle, ils ont observé que la stabilité vis-à-vis de la protéolyse par la trypsine était également améliorée, comparativement à son homologue natif et, celui uniquement stabilisé par la présence d'acides aminés α -méthylés. Fort de ce constat, L. Verdine s'est entouré de collaborateurs pour développer des hélices α stabilisées par des ponts hydrocarbonés afin de cibler des interactions protéine-protéine. Le premier essai publié se fit sur BID BH3 qui est un peptide interagissant avec la famille de protéines BCL-2. Les résultats obtenus ont montré que le macrocycle hydrocarboné non seulement permit d'accroître l'hélicité du peptide, jusqu'à 87 % contre 16 % d'hélicité observée chez son analogue natif, mais aussi sa résistance à la protéolyse *in vitro* et *in vivo*.¹²⁰ Le peptide ainsi modifié se liait avec la protéine BCL-2 avec une meilleure affinité que le peptide initial et provoquait bien l'apoptose des cellules leucémiques. En effet, lorsque le peptide non modifié et celui avec le pont hydrocarboné furent soumis à des tests de fluorescence dans des cellules cancéreuses, seules celles traitées avec l'agrafe peptidique furent visibles. Ceci s'explique par le fait que l'ajout d'un macrocycle apolaire favorise ici la perméabilité cellulaire permettant au peptide agrafe d'accéder au cytoplasme et d'interagir avec BCL-2 pour provoquer la mort programmée des cellules cancéreuses. Par la suite, cette méthode de macrocyclisation a été adaptée pour cibler d'autres interactions telles que l'intégrase du VIH-1 avec le co-facteur LEDGF/p75 ou p53/MDM2 (**Figure 17A**).^{121,122} Un mime du peptide p53 stabilisé par un pont hydrocarboné fut amené jusqu'aux essais cliniques, en 2013, en tant qu'inhibiteur de l'interaction p53-MDM2/MDMX.¹²² En effet, l'entreprise Aileron Therapeutics a mené, avec succès, des essais cliniques en phase I et sont maintenant en phase II grâce au composé ALRN-6924 qui est un peptidomime macrocyclique de p53. Ce composé pourrait être prescrit pour traiter des cancers tels que la leucémie myéloïde aiguë, le lymphome T périphérique ou encore le syndrome myélodysplasique.

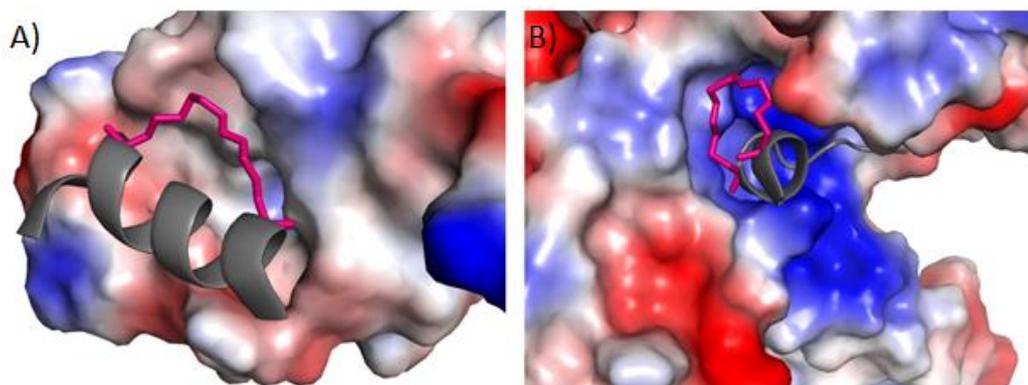


Figure 17 : Agrafes peptidiques hydrocarbonées. A) Interaction p53/MDM2 où le macrocycle hydrocarboné est positionné dans une poche hydrophobe (PDB : 3V3B). B) Peptide stabilisé par un pont hydrocarboné qui intervient à l'interface protéine/peptide du motif 14-3-3/exoenzyme S de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB : 4N84).

On ne peut nier l'impact thérapeutique dû à l'essor de la stabilisation d'hélices peptidiques par ces macrocycles hydrocarbonés sachant que ceux-ci sont facilement accessibles de façon synthétique.¹²³ Etant donné le caractère apolaire des ponts hydrocarbonés, ils sont généralement introduits au niveau des résidus hydrophobes du peptide et peuvent donc participer à l'interaction peptide/protéine. T. N. Grossman et son équipe ont mis en évidence la contribution de la chaîne hydrocarbonée d'un peptide macrocyclisé à l'interaction avec la surface d'une protéine permettant l'inhibition de son activité (**Figure 17B**).¹²⁴ En effet, ils ont synthétisé un analogue macrocyclisé de l'exoenzyme S (ES), un agent pathogène bactérien, qui est un peptide non structuré interagissant avec la protéine adaptatrice humaine 14-3-3 ; provoquant ainsi des infections chez l'Homme. Dans ce cas, le pont carboné (ES_{PH}) participe non seulement à la stabilisation structurale mais aussi à l'interaction grâce à la contribution du macrocycle hydrophobe qui rend le peptide plus affiné vis-à-vis de 14-3-3 : $K_D(ES_{PH}) = 41 \text{ nM}$ vs $K_D(ES) = 1,14 \mu\text{M}$. Ainsi, le choix de l'emplacement et la taille du macrocycle est un point crucial pour renforcer les propriétés structurales et l'activité biologique du peptide associé. De plus, bien qu'il ait été observé que ce type d'agrafes peptidiques soit capable de pénétrer les cellules, les paramètres moléculaires conduisant à une meilleure pénétration cellulaire n'ont pas tous été identifiés. Une étude proposée par L. D. Walensky a tout de même apporté des éléments de réponse comme le fait qu'une agrafe peptidique extrêmement hydrophobe et trop chargée positivement, sont des facteurs menant à la lyse des membranes cellulaires.¹²⁵ En criblant différents analogues du peptide BIM BH3, interagissant avec des protéines BCL-2, ils ont démontré qu'il est préférable de placer le macrocycle hydrocarboné à la barrière amphipathique de l'hélice α et d'ajuster le point isoélectrique du peptide ($pI < 9.76$) pour obtenir un peptide capable de pénétrer les cellules. De plus, les peptides possédant une hélicité trop élevée ($h > 97 \%$) provoquent une lyse des membranes cellulaires. Alors, l'hydrophobie, l'emplacement du macrocycle et le pourcentage d'hélicité résultant sont les trois paramètres significatifs pour la pénétration des peptides possédant un macrocycle carboné.

ii. Ponts de type lactame

Le premier macrocycle entre deux chaînes latérales reporté dans la littérature, a mis en jeu la formation intramoléculaire d'un lien amide entre deux résidus en ($i, i+4$). Cette

macrocyclisation est donc possible entre deux chaînes latérales d'acides aminés naturels tels que la lysine et l'asparagine comme l'ont développé Felix *et al.* en 1988 (**Figure 18**). Synthétiquement parlant, les acides aminés protéogènes sont faciles d'accès et aisément incorporés lors de la synthèse peptidique. Il n'y a pas de modification ultérieure requise hormis le choix d'un jeu de groupements protecteurs orthogonaux sur les résidus portant les fonctions réactives pour la lactamisation. A l'image des motifs hydrocarbonés, plusieurs études ont été réalisées par la suite pour évaluer la position, la longueur des chaînes latérales et donc la taille optimale du macrocycle pour des systèmes peptidiques donnés.^{126,97} Les acides aminés utilisés pour former ces ponts sont des couples alliant la fonction amine primaire de la lysine ou l'ornithine avec l'acide carboxylique de l'aspartate ou de l'acide glutamique. Bien que la réaction de lactamisation soit très répandue, ceci limite la taille des macrocycles en accédant au maximum à des agrafes en $(i, i+4)$. En réponse à cet inconvénient, il est envisageable de faire des multiples ponts sur une même hélice α ou d'utiliser des chaînes latérales plus longues obtenues par la modification synthétique d'acides α -aminés et accéder à des macrocycles en $(i, i+7)$.¹²⁶

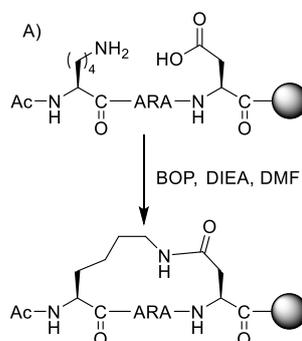


Figure 18 : Synthèse d'un pont lactame entre une lysine et un résidu acide glutamique.

Les ponts de type lactame furent appliqués à plusieurs interactions protéine-protéine améliorant ainsi l'hélicité et la résistance protéolytique des peptides et même l'activité biologique.^{127,128,129} Cependant, ces ponts lactames améliorent-ils réellement la perméabilité cellulaire? En effet, les peptides stabilisés par ces ponts qui sont allés au-delà des caractérisations *in vitro* ont été uniquement étudiés sur des cibles biologiques extra-cellulaires ou liées à des membranes. En 2017, l'équipe d'A. S. Ulrich a tenté d'apporter des éléments de réponse en comparant la capacité de pénétration cellulaire de quatre peptides linéaires à leurs équivalents cyclisés en $(i, i+4)$ par un pont lactame. Ils ont observé que la stabilisation de la conformation hélicoïdale apportée par les macrocycles en solution aqueuse n'a pas d'impact sur leur capacité de pénétration cellulaire.¹³⁰ En réalité c'est plutôt la capacité de repliement au contact des membranes (donc en milieu lipidique) qui joue un rôle primordial et aucune contribution des ponts lactame n'a pu être mise en évidence dans cette étude. Ce point est moins critique pour les ponts apolaires hydrocarbonés inertes qui possèdent, alors, une capacité intrinsèque à pénétrer les cellules et atteindre le cytosol principalement grâce à leur hydrophobie.¹³¹

iii. Ponts de type triazole : macrocyclisation par cycloaddition

La réaction de cycloaddition dipolaire 1,3 entre un alcène et un azoture catalysée au cuivre (I) (CuAAC) est une technique de ligation chimique biocompatible développée plus récemment que ses semblables hydrocarbonés ou les ponts lactame. C'est en 2008 que M. Chorev et A. M. D'Ursi rapportèrent une première génération d'agrafes peptidiques avec un pont triazole substitué en positions 1 et 4 résultant de cette réaction (**Figure 19A**).¹³² Cette étape se fit en solution après clivage du peptide de la résine et déprotection des chaînes latérales. La chimiosélectivité est permise *via* l'introduction d'un résidu porteur d'un groupement azoture sur sa chaîne latérale en *i* et d'un autre arborant un motif propargylique en (*i+4*) afin de réaliser la cycloaddition 1,3-dipolaire. Le peptide référent est issu de l'hormone parathyroïde et les observations par dichroïsme circulaire et RMN ont montré la formation d'une structure hélicoïdale, que ce soit pour le peptide avec macrocycle lactame ou celui avec le motif triazole. De plus, il est apparu que la longueur de chaîne optimale pour obtenir un macrocycle stabilisateur d'une hélice α , dans ces cas-là, comprend cinq à six méthylènes (sans compter les trois atomes du triazole inclus dans le pont). Par la suite ces motifs triazole furent expérimentés pour inhiber l'interaction BCL-9/ β -caténine avec un ou deux macrocycles.¹³³ Les résultats *in vitro* étaient encourageants puisque l'affinité avec la protéine β -caténine mesurée était légèrement meilleure que le peptide linéaire. En effet, le peptide linéaire présentait une valeur $K_i = 0,60 \mu\text{M}$ tandis que le peptide macrocyclisé optimal correspondant a pu descendre jusqu'à un K_i égal à $0,13 \mu\text{M}$. De plus, ces agrafes peptidiques ont résisté à la protéolyse lors de l'incubation en milieu cellulaire.

En parallèle, une réaction de cycloaddition alternative pour obtenir un macrocycle de type pyrazidine trisubstituée a été développée et celle-ci est induite par une irradiation aux ultraviolets (**Figure 19B**). Cette méthodologie fut adaptée pour la synthèse d'inhibiteurs de l'interaction p53-MDM2/MDMX et en dépit des essais de fluorescence qui démontrent une forte affinité des peptides macrocyclisés vis-à-vis des deux protéines, ceux-ci pénétraient difficilement les cellules.¹³⁴ Cet inconvénient fut rectifié *via* la modification de la séquence peptidique par l'incorporation de résidus chargés positivement tels que la lysine et l'histidine.

Ces macrocycles obtenus par des réactions de cycloaddition figurent comme une stratégie émergente et prometteuse. En effet, Frankiewicz *et al.* ont comparé en 2013 les macrocycles hydrocarbonés, lactame et triazole en (*i, i+4*) sur une même séquence dérivée du peptide intestinal vasoactif et seul le composé issu de la cycloaddition indiqua une structure hélicoïdale.¹³⁵ Par ailleurs, la cycloaddition de Huisgen nécessite des acides aminés modifiés faciles d'accès et les conditions de cyclisation sont à présent bien optimisées.

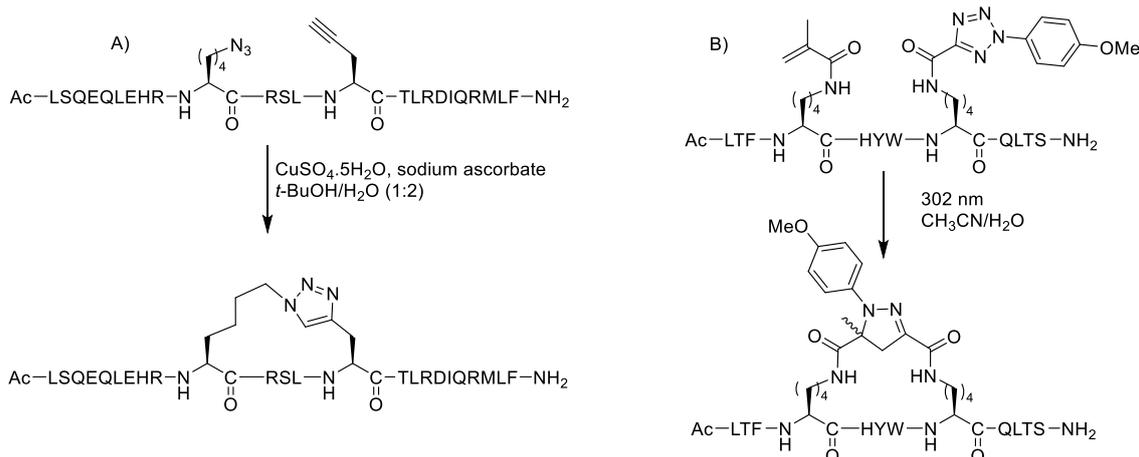


Figure 19 : Réaction de cycloaddition menant à A) un pont triazole et B) un macrocycle de type pyridazine.

iv. Pont disulfure et thioéther

Les ponts disulfure entre deux résidus cystéine sont connus pour leur rôle structural important au sein des protéines. En s'inspirant de ce fait, P.G. Schultz et ses collaborateurs ont formé un pont disulfure en (*i*, *i*+7) entre des acides aminés de configurations *D* et *L* porteurs de groupements thiol sur leurs chaînes latérales.¹³⁶ Ces fonctions étaient sélectivement protégées par des groupements acétamidométhyle (Acm) qui sont simultanément ôtés pour procéder ensuite à l'oxydation en présence d'iode entraînant la formation du macrocycle (**Figure 20A**). En comparant les données d'hélicité révélées par dichroïsme circulaire, il s'avère qu'il y a une nette amélioration de repliement en hélice pour le peptide cyclisé comparativement à son précurseur linéaire. Malheureusement, bien que cette technique soit la première démonstration pour obtenir une agrafe peptidique type disulfure stabilisatrice de l'hélice α , très peu d'exemples furent rapportés dans la littérature depuis. La limite majeure associée à ces ponts disulfure est leur instabilité en milieu réducteur comme, par exemple, en présence de glutathion dans le milieu biologique, ce qui restreint leur application aux interfaces protéine-protéine et leur passage intracellulaire.

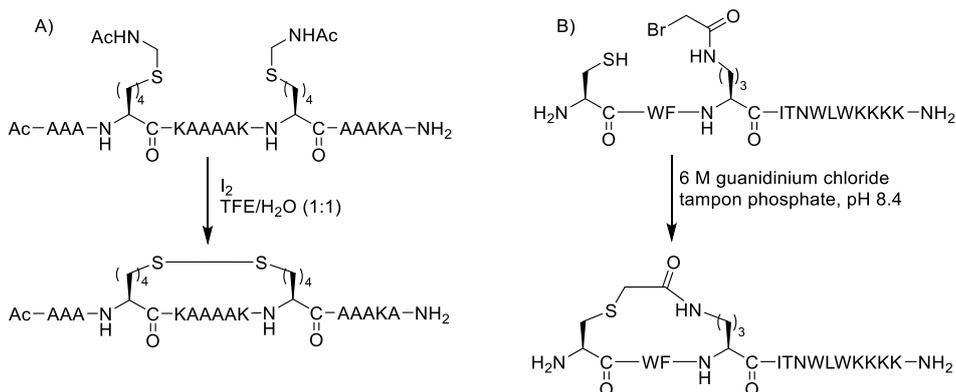


Figure 20 : Voies de synthèse de ponts disulfure et thioéther. A) Synthèse d'un macrocycle disulfure selon P. G. Schultz. B) Synthèse d'un macrocycle thioéther selon P. E. Dawson.

Une autre stratégie mettant en jeu un résidu cystéine a été développée plus récemment pour former un lien covalent de type thioéther. Le premier protocole pour obtenir ce motif fut établi par F. M. Brunel et P. E. Dawson qui proposèrent de substituer l'halogène du groupe α -

bromoamide, présent sur une chaîne latérale, par le thiol d'une cystéine en ($i, i+3/4$) (**Figure 20B**).¹³⁷ Ce macrocycle thioéther a été introduit sur des épitopes de peptides issus de la glycoprotéine gp41 de l'enveloppe du VIH comme méthode potentielle de développement de vaccin combattant la fusion de ce virus. L'optimisation de la séquence peptidique comportant le macrocycle thioéther a mené à des composés possédant une meilleure affinité vis-à-vis de l'anticorps spécifique 4E10 de la protéine gp41 comparativement aux composés non cyclisés.¹³⁸

Récemment, une nouvelle chimie dite thiol-ène a été mise en place pour synthétiser un macrocycle thioéther en version intramoléculaire. Cette réaction est davantage utilisée pour macrocycliser en intermoléculaire ce qui sera évoqué dans la partie suivante. Le lien thioéther peut être réalisé sur support solide entre une cystéine protégée par un groupement trityl et un acide aminé dont la chaîne latérale porte une fonction alcène.^{139,140} La réaction de cyclisation effectuée sous irradiation aux ultra-violets repose sur un mécanisme de chimie radicalaire. Le peptide interagissant avec le site de liaison de la protéine co-activatrice du récepteur d'estrogène α fut cyclisé selon cette approche et démontra une meilleure affinité que le ligand natif. L'agrafe peptidique type thioéther est, à ce jour, à un stade précoce de développement et son application à d'autres cibles biologiques reste à montrer.

En résumé, une large gamme de réactions chimiques sont à disposition pour stabiliser l'hélicité de peptides par macrocyclisation entre deux chaînes latérales et demeurent une piste sérieuse pour des applications thérapeutiques. Toutefois, les enjeux actuels poussent les chimistes à développer des structures toujours plus complexes et fonctionnalisées ce pourquoi, les macrocyclisations grâce à l'insertion d'un lien externe attirent de plus en plus l'attention.

b) Cyclisations à deux composants

La macrocyclisation à deux composants implique un connecteur bifonctionnel qui réagit par complémentarité avec deux chaînes latérales d'acides aminés du peptide d'intérêt. La plupart de ces réactions sont réalisées en solution pour éviter de potentiels problèmes d'isolement des sites réactifs sur résine. De plus, comparativement aux agrafes peptidiques formées selon un chemin intramoléculaire, il y a plus de chances de générer des sous-produits non désirés lors de la macrocyclisation qui devient donc plus complexe. Mais, l'atout majeur de cette approche intermoléculaire est de générer facilement de la diversité moléculaire et allège souvent le nombre d'étapes de synthèse des macrocycles.

i. Criblage de réactions à deux composants

Pour former un macrocycle par l'ajout d'un connecteur bifonctionnel il existe deux stratégies de synthèse. La première consiste en un couplage intermoléculaire entre ce connecteur et une chaîne latérale du peptide pour former un précurseur linéaire. Il s'ensuit un couplage intramoléculaire entre la deuxième fonction du connecteur et le résidu réactif donnant ainsi naissance au macrocycle (**Figure 21A**). Cette approche fut notamment utilisée pour réaliser de façon séquentielle des ponts bis-lactame en ($i, i+7$) entre les chaînes latérales de deux acides glutamiques protégées par des groupements orthogonaux.¹⁴¹ Une deuxième stratégie a été mise au point et repose sur la formation en une seule étape du macrocycle entre les deux chaînes latérales et le connecteur homo-bifonctionnel. Selon cette méthodologie, la formation

d'un produit secondaire est fréquemment observée résultant d'un double couplage du connecteur menant à un peptide linéaire dont les deux chaînes latérales réactives sont couplées, chacune, avec un connecteur (**Figure 21B**). Cet inconvénient n'est pas retrouvé lors de couplages intramoléculaires et s'ajoute aux risques de polymérisation. Selon la nature des connecteurs, trois types de réactions sont généralement mises en jeu pour lier ce dernier avec chaque chaîne latérale : soit l'alkylation, l'arylation sur les résidus cystéine et lysine ou l'acylation pour les résidus glutamine/acide aspartique et lysine.

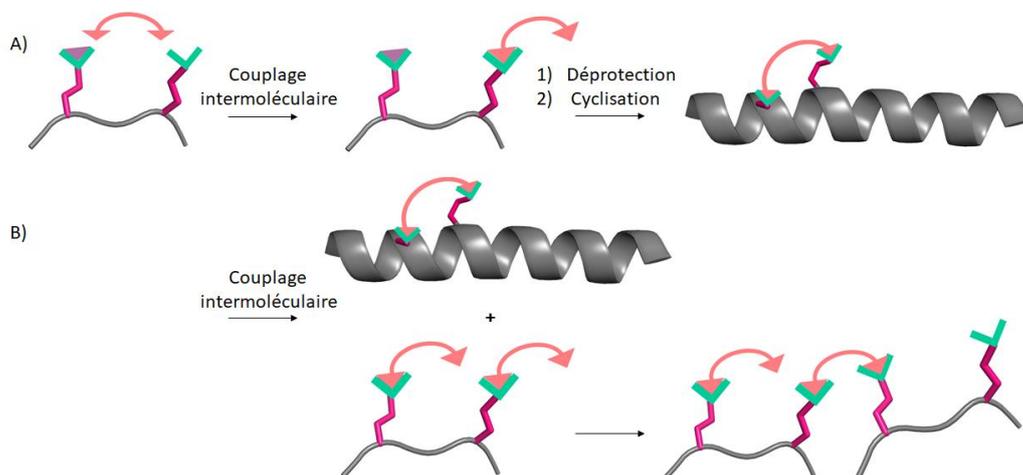


Figure 21 : Représentation schématique des stratégies de développement d'agrafes peptidiques à deux composants. A) Insertion du connecteur (orange) en intermoléculaire sur une chaîne latérale puis macrocyclisation intramoléculaire après déprotection sélective du groupement protecteur en violet. B) Macrocyclisation intermoléculaire à deux composants menant à la formation du produit désiré et de sous-produits de couplage.

Malgré les complications synthétiques, plusieurs exemples d'agrafes peptidiques formées *via* le processus énoncé ont été décrits. Par exemple, K. Fujimoto a rapporté une série de connecteurs activés par deux carbamates de succinimide. Ces fonctions réagissent chacune avec l'un des deux résidus peptidiques présentant une fonction amine primaire telle que la lysine ou l'ornithine.¹⁴² La formation de ponts bis-lactame est alors favorisée sachant que plusieurs résidus peptidiques ont été criblés pour optimiser la taille des macrocycles (**Figure 22**).

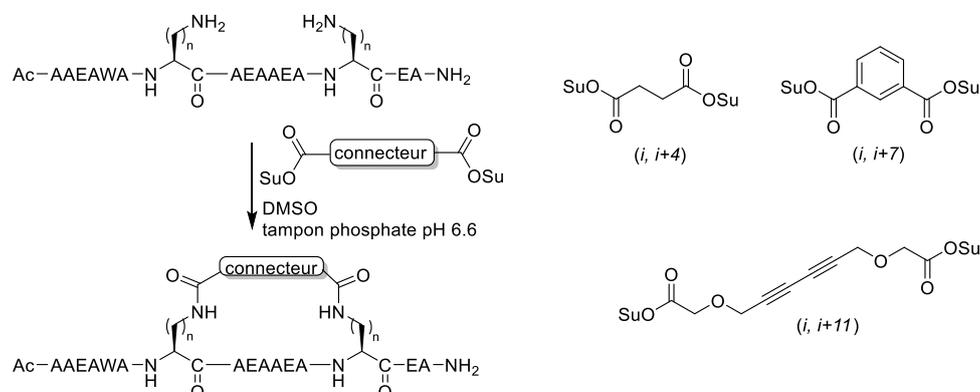


Figure 22 : Méthode de synthèse d'un pont bis-lactame de K. Fujimoto et les différents connecteurs insérables qui permettent de moduler la taille des macrocycles.

En parallèle, des peptidomimes macrocycliques ont été proposés, cette-fois, en s'appuyant sur la synthèse d'un pont bis-thioéther et tout comme leurs analogues bis-lactame, les fonctions thiols furent liées de manière covalente selon plusieurs connecteurs. H. Jo *et al.* ont étudié un large panel de systèmes bis-électrophiles pour former des macrocycles entre deux cystéines en (*i, i+4*).¹⁴³ La logique derrière cette étude était d'élucider lequel de ces connecteurs stabiliserait avantageusement une hélice α et, réagirait de manière efficace pour avoir une étape de cyclisation la plus propre possible. Le composé qui a répondu au mieux à ces deux conditions est le dibromo-*m*-xylène qui, par la suite, a été utilisé pour inhiber la calpaïne, une protéase à cystéines dépendante du calcium (**Figure 23A**). Pour compléter les méthodes de synthèse de ponts bis-thioéther, il est envisageable de procéder à des réactions thiol-ène comme l'équipe de D.H-C. Chou l'a démontré avec différents connecteurs types diènes reliant deux cystéines (**Figure 23B**).¹⁴⁴

Cette voie de synthèse robuste a permis de développer des macrocycles adaptables à des peptides synthétiques et d'autres impliqués dans des interactions protéine-protéine comme p53. Finalement, pour illustrer l'étendue des voies de synthèse de macrocycles bis-thioéther, B. L. Pentelute a mis au point une réaction de substitution nucléophile aromatique (**Figure 23C**).¹⁴⁵ Dans ce cas deux cystéines réagissent, sous leur forme thiolate, avec une molécule aromatique perfluorée. Par le biais de cette réaction, ils ont synthétisé un peptide macrocyclique qui se lie au domaine C-terminal de la protéine formant la capsid du VIH-1. Le peptide ainsi modifié améliora l'affinité avec la protéine, la pénétration cellulaire et la stabilité face à la protéolyse de son homologue linéaire.

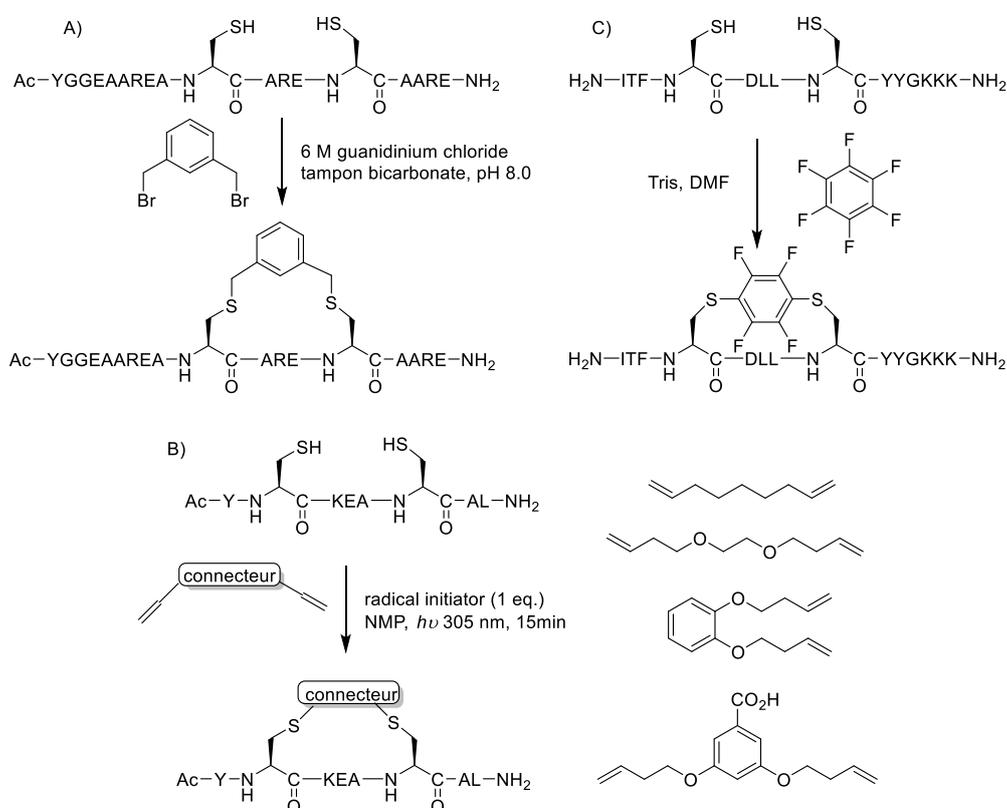


Figure 23 : Méthodes de synthèse de ponts bis-thioéther. A) Macrocyclisation par S_N2 . B) Macrocyclisation par réaction thiolène et divers connecteurs diènes pour des réactions thiol-ène. C) Macrocyclisation par S_NAr .

En 2018, l'équipe de D. P. Fairlie a développé une méthode d'alkylation de sélénocystéines générant des agrafes peptidiques bis-sélénoéther *via* l'introduction d'un connecteur externe.¹⁴⁶ Cette stratégie a été développée sur un peptide analogue à p53 inhibiteur de l'interaction p53/MDM2 nommé PDI. La synthèse de la séquence peptidique a été effectuée sur support solide avec l'ajout de dérivés d'acides aminés de type Fmoc-Sec(Trt)-OH disponibles commercialement. Le peptide a ensuite été détaché de la résine dans des conditions acides pour être mis en présence de dithiothreitol (DTT), un agent réducteur, favorisant la formation d'un disélénoïde (**Figure 24**). Le peptide ainsi cyclisé a été isolé avant de procéder à la macrocyclisation avec le connecteur qui a permis d'accéder à un pont bis-sélénoéther en (*i*, *i*+7). Le procédé a ensuite été étendu à des macrocycles en (*i*, *i*+4), et (*i*, *i*+11). La voie de synthèse établie est rapide et la formation de potentiels sous-produits est amoindrie par l'ajout du DTT. De plus, l'alkylation des sélénocystéines a pu être effectuée sur une gamme de pH plus large que pour l'alkylation usuelle de cystéines. Des mesures par CD ont révélé que l'ensemble des agrafes peptidiques synthétisées démontraient une hélicité de deux à quatre fois supérieure à celle du peptide linéaire. Les connecteurs assurant la meilleure contrainte et donc la plus haute hélicité selon la distance envisagée entre les chaînes latérales sont indiqués **Figure 24**. Enfin, cette étude a démontré un gain d'activité inhibitrice de l'interaction p53/MDM2 pour les peptides cyclisés comparativement au peptide de référence linéaire. Par exemple, le macrocycle en (*i*, *i*+7) affichant la meilleure hélicité dans sa catégorie présente une valeur IC₅₀ = 31,2 nM contre IC₅₀ = 577 nM pour le peptide de référence PDI, déterminées *via* des tests de polarisation de fluorescence compétitive. Cette méthode de macrocyclisation originale et récente a montré des résultats prometteurs pour inhiber une interaction protéine-protéine.

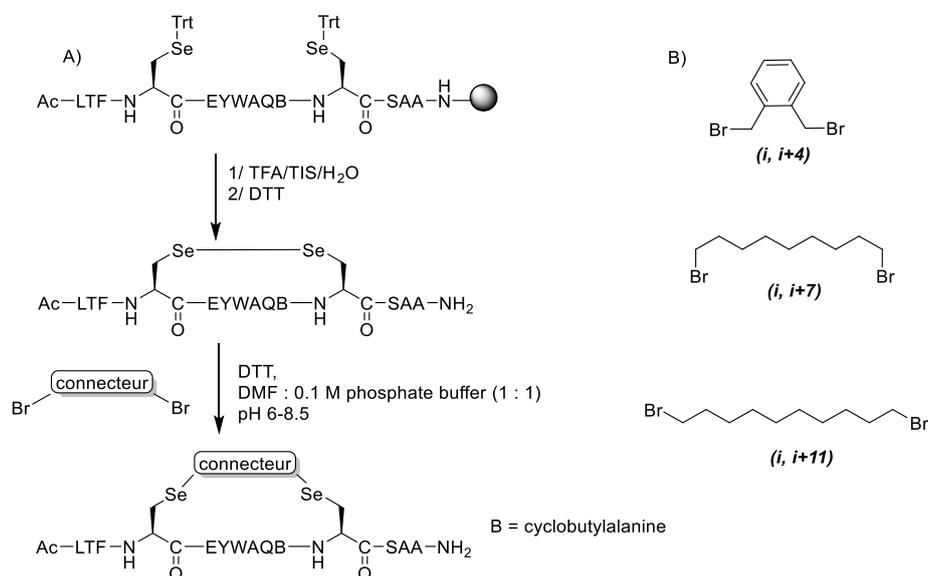


Figure 24 : Formation d'un pont bis-sélénoéther. A) Synthèse d'un macrocycle appliqué en (*i*, *i*+7). B) Connecteurs donnant les meilleurs résultats d'hélicité pour les différentes distances de macrocyclisation.

Les techniques à deux composants discutées ci-dessus illustrent la diversité des approches synthétiques possibles pour stabiliser des hélices α . Dans la plupart des cas, ce sont des acides aminés protéinogènes qui sont utilisés, ce qui renforce la facilité d'accès à ces motifs cyclisés. Cependant, des optimisations de synthèse peuvent être requises pour limiter les réactions d'oligomérisation non désirées. Désormais, la diversité apportée par le développement

d'agrafes peptidiques à deux composants donne lieu à la conception de macrocycles, avec des propriétés physicochimiques ou biologiques variées.

ii. Macrocyclus dynamiques

La possibilité de contrôler l'hélicité d'un peptide en utilisant les rayons UV et/ou visible est idéale pour évaluer les effets de changements conformationnels sur des systèmes biologiques. L'hélicité peptidique peut être rendue commutable en jouant sur l'isomérisation du groupement introduit sur le macrocycle. Ceci fut démontré par J. R. Kumita avec un connecteur basé sur l'isomérisation de l'azobenzène introduit en ($i, i+7$) entre deux cystéines (**Figure 25**).¹⁴⁷ En partant d'un peptide non hélicoïdal avec le connecteur *trans*-azobenzène il a été observé la formation d'une hélice α après 5 minutes d'irradiation aux UV. Ce résultat coïncide avec l'inversion de configuration vers le *cis*-azobenzène et ce phénomène est réversible lorsque le peptide est à nouveau plongé dans le noir quelques heures. Ce type de macrocycle est aussi applicable pour nucléer l'hélicité d'un peptide en ($i, i+4$) mais provoque une déstabilisation en ($i, i+11$). La technique de liaison *via* un pont azobenzène fut alors transposée en ($i, i+3/4/7$) sur des peptides se liant avec la protéine oncogène BCL-X_L et montra que l'activation par irradiation corrèle tout à fait avec l'interaction du peptide avec cette protéine.¹⁴⁸ Ceci signifie que la forme *cis*-azobenzène stabilise bien l'entité hélicoïdale qui est donc apte à interagir avec BCL-X_L.

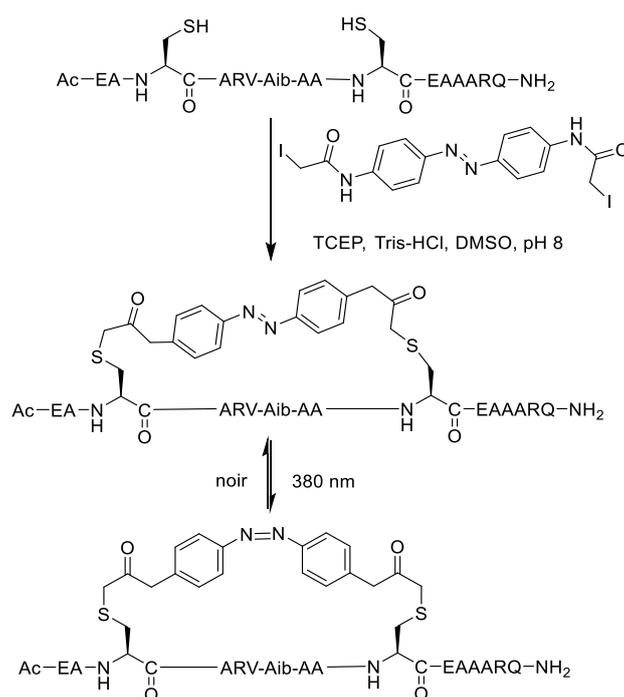


Figure 25 : Méthode de synthèse du pont bis-thioéther lié par le motif diazo-benzène.

Ce lien agissant comme un photo-interrupteur a également été utilisé pour réguler l'endocytose médiée par la clathrine. L'endocytose par vésicules recouvertes de la protéine clathrine est une voie majeure d'internalisation dans les cellules de nombreux récepteurs transmembranaires. Cette voie d'endocytose requiert l'action concertée de dizaines de protéines dont les adaptateurs AP-2 qui assurent la connexion entre les triskèles de clathrine, les récepteurs et d'autres protéines accessoires.¹⁴⁹ Le concept mis au point par P. Gorostiza fut

de cibler une sous-unité du récepteur AP-2 avec une agrafe peptidique photocummutable.¹⁵⁰ Il devient alors possible d'envoyer des signaux « marche/arrêt » pour sélectionner les éléments à internaliser dans les cellules.

En 2015, A.B. Smith a décrit la formation réversible d'un macrocycle entre deux cystéines liées de manière covalente par un motif S-tétrazine (**Figure 26**).¹⁵¹ Sous irradiation UV, il est possible de défaire ce pont en relarguant ainsi du diazote et générant des fonctions thiocyanates sur les cystéines. Les thiocyanates sont ensuite convertis en thiols pour réagir à nouveau avec le dérivé de tétrazine selon un processus cyclique. Ici le but n'est pas nécessairement de stabiliser une hélice α mais ils ont pu démontrer la possibilité d'introduire une sonde fluorescente *via* une réaction de rétro Diels-Alder sur la tétrazine.

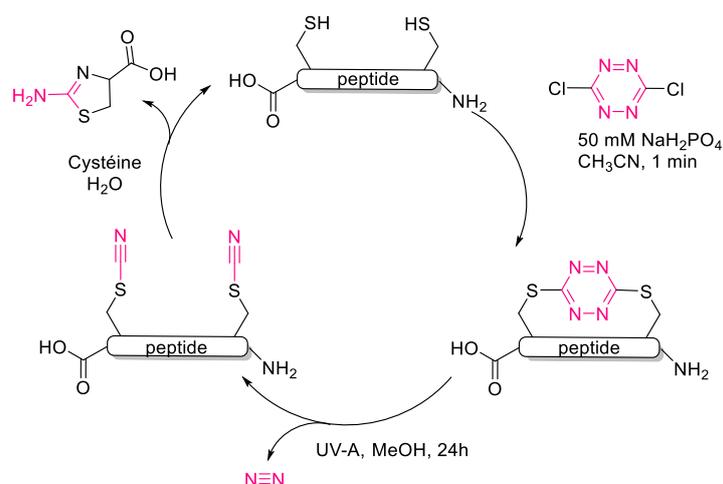


Figure 26 : Réversibilité du motif S,S-tétrazine. Pont bithioéther formé par S_NAr sur la 1, 4-dichlorotétrazine puis l'irradiation UV permet de rétablir les fonctions thiols.

Ces deux séries viennent donc compléter les agrafes peptidiques déjà existantes et leurs propriétés physico-chimiques pourraient se voir adaptées à des interactions protéine-protéine *in vivo*.

Les agrafes peptidiques ont été principalement employées pour contraindre une séquence peptidique linéaire à adopter sa conformation bioactive hélicoïdale et étudier les propriétés de perméabilité cellulaire et de résistance aux protéases des peptides ainsi stabilisés. Toutefois, la plupart des méthodes discutées jusqu'à présent ne permettent pas de fonctionnaliser le macrocycle ce qui peut être requis pour des utilisations biologiques.

iii. Fonctionnalisation d'agrafes peptidiques

Le développement de macrocycles fonctionnalisés s'appuie généralement sur des méthodes de macrocyclisation classiques mais inclut l'introduction d'une fonction réactive sur le connecteur. Les stratégies qui permettent des fonctionnalisations sont les réactions de cycloaddition CuAAC, l'arylation de deux cystéines ou encore la chimie thiol-ène. Le groupe de D. R. Spring appliqua la chimie « double clic » à l'interaction p53/MDM2 avec des liens bis-alcynes différemment fonctionnalisés (**Figure 27A & B**).¹⁵² Après l'incorporation d'azidoornithines séparées par six résidus dans la séquence peptidique, un motif 3,5-diéthynylbenzène fonctionnalisé réagit avec les groupements azoture pour obtenir le composé

cyclisé. Divers substituants ont été introduits sur le motif benzylique comme un marqueur fluorescent dit TAMRA pour 5-carboxytétraméthylrhodamine ou des arginines pour améliorer la pénétration cellulaire.¹⁵³

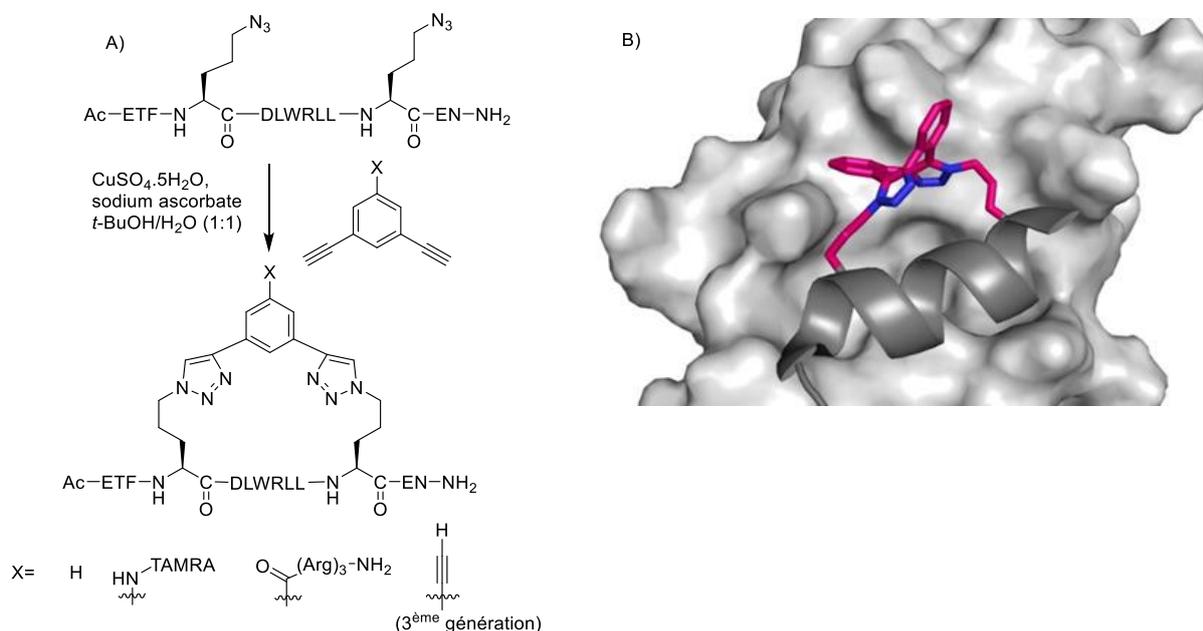


Figure 27 : A) Stratégie de synthèse d'un macrocyle bis-triazole et son site de fonctionnalisation. B) Structure cristallographique du peptide p53 macrocyclisé en (i, i+7) via un pont bis-triazole et son interaction avec MDM2 (PDB : 5AFG).

En 2017, D. S. Pedersen proposa quant à lui une autre génération d'agrafes peptidiques issues de cette même approche en utilisant cette fois le 1,3,5-triéthynylbenzène pour lier les deux motifs triazole (**Figure 27A**).¹⁵⁴ Une troisième fonction alcyne sur le macrocyle est donc libre afin d'être conjuguée avec une sonde fluorescente, radiomarquée ou pour réaliser une dimérisation. Les substitutions nucléophiles entre deux composants formant un pont bis-thioéther permettent également de fonctionnaliser des agrafes peptidiques.¹⁵⁵

En parallèle, P. E. Dawson a synthétisé de manière efficace un macrocyle à partir du 1,3-dichloroacétone entre deux cystéines ou homocystéines.¹⁵⁶ De plus, la cétone peut être convertie en oxime substituée par un élément de fonctionnalisation (**Figure 28**). Ce macrocyle, avec la fonction cétone, fut testé sur le peptide-S issu de la ribonucléase-S en position (i, i+4). La co-cristallisation de cette agrafe peptidique avec la protéine en question a montré que le macrocyle stabilise bien la conformation hélicoïdale du peptide et surtout, il pointe vers la surface exposée au solvant. Ceci laisse présager qu'une potentielle fonctionnalisation ne perturberait pas l'interaction avec la ribonucléase S.

Chapitre 1. Complémentarité entre la stabilisation et le développement de mimes artificiels des structures secondaires peptidiques

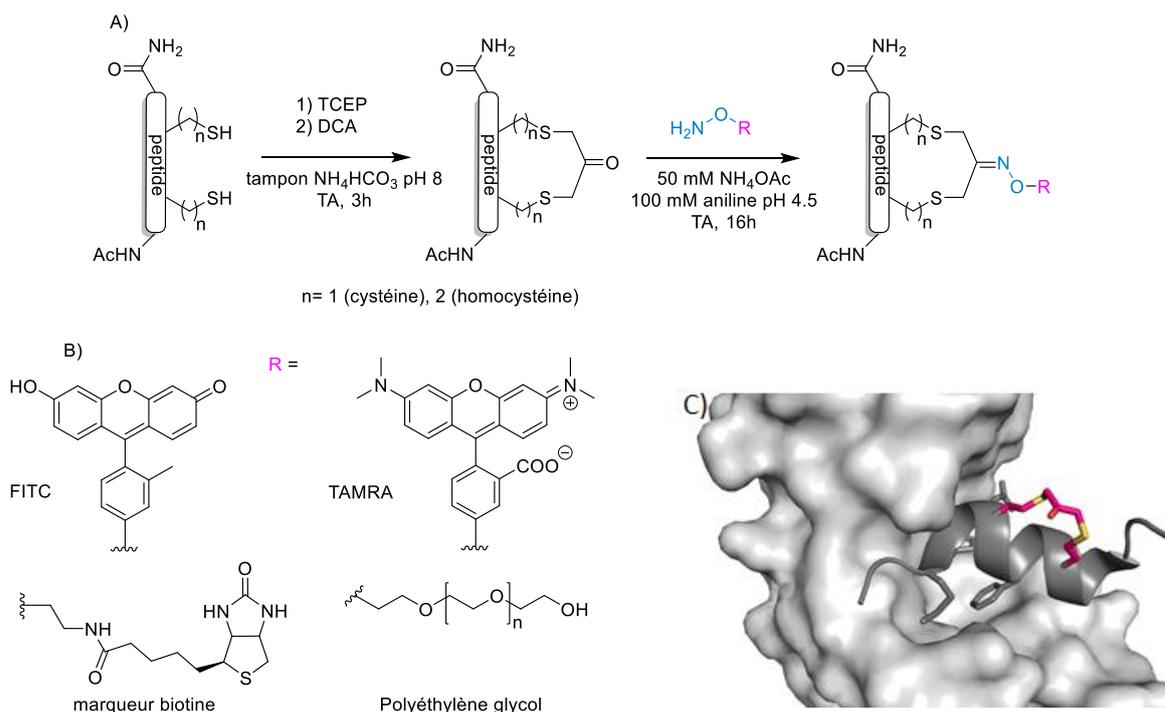


Figure 28 : Ponts bis-thioéther fonctionnalisables par une fonction oxime. A) Voie de synthèse passant par un macrocycle avec une cétone puis une conversion en oxime fonctionnalisée. B) Fonctionnalités potentielles pour l'ensemble des agrafes peptidiques. C) Structure cristallographique d'un macrocycle bis-thioéther lié par une cétone sur le peptide-S en interaction avec la protéine-S (PDB : 1CJQ).

Une macrocyclisation plus récente à partir du dibromomaléimide assorti d'une fonction alcyne a été utilisée pour contraindre la conformation hélicoïdale du peptide-S formant ainsi un dérivé bis-thioéther en $(i, i+4)$ (**Figure 29**).¹⁵⁷ La fonction alcyne peut donc réagir par « chimie clic » avec des azotures eux-mêmes fonctionnalisés par la fluorescéine, l'éthylène glycol ou la biotine.

158

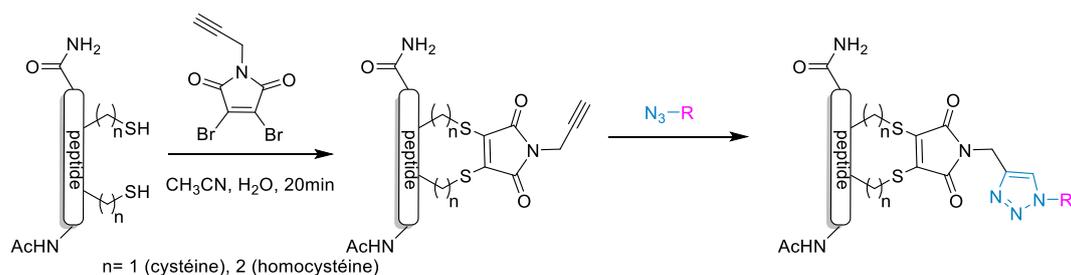


Figure 29 : Fonctionnalisation d'un pont bis-thioéther grâce à un motif maléimide. Le dibromomaléimide est introduit via une $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$, puis sa fonction alcyne réagit avec un azoture apportant une fonctionnalisation.

Pour conclure, les différentes méthodes de stabilisation de structures secondaires ont été évoquées pour rendre compte des avancées et des limites concernant chacune d'entre elles. Il s'avère que pour les hélices α , la macrocyclisation entre deux chaînes latérales est une méthode prometteuse pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques de peptides à visée thérapeutique dont leur résistance à la protéolyse. Cependant, bien qu'il existe de nombreux motifs de macrocyclisation, peu d'entre eux sont rapportés avec des données *in vivo* ou *in cellulo*. En effet, la plupart des peptides développés en phase clinique ciblent uniquement des protéines extracellulaires. Les mécanismes qui régissent la pénétration cellulaire des peptides

macrocyclisés restent encore incompris et ceux-ci nécessitent bien souvent une optimisation de leurs séquences avec notamment l'apport de résidus chargés positivement, comme l'arginine ou l'histidine. La question qui se pose alors est : comment introduire une nouvelle chimie pour construire des macrocycles et apporter de nouvelles propriétés aux agrafes peptidiques ? Effectivement, le développement de macrocycles avec de nouveaux motifs ciblant des interactions protéine-protéine intracellulaires reste un défi de taille. De plus, il a été démontré qu'il est possible de faire intervenir directement le macrocycle hydrocarboné d'une agrafe peptidique à une interface peptide-protéine grâce à une interaction hydrophobe. Il pourrait être intéressant de développer un macrocycle polaire qui serait apte à interagir avec des protéines par le biais de liaisons hydrogène tout en stabilisant la structure hélicoïdale de son peptide.

III. Méthodes chimiques de stabilisation de feuillets β : vers le développement d'architectures multi-brins artificielles

L'agrégation de certaines protéines menant à des feuillets β insolubles est responsable de nombreuses pathologies neurologiques. Ces dernières se caractérisent par la formation de fibrilles d'amyloïdes issues d'agrégats formés par des feuillets β protéiques. Dans ce contexte, la communauté scientifique cherche à développer des peptidomimes aptes à inhiber les interactions protéine-protéine engendrant notamment l'agrégation des feuillets β . Alors, des méthodes de stabilisation de structures type feuillets β ont également émergé dans l'espoir d'amener certains peptides structurés à devenir de potentiels médicaments, ciblant entre autres des maladies neurodégénératives.¹⁵⁹ Plusieurs stratégies ont été conçues pour stabiliser de courtes structures étendues mais ne permettent pas d'obtenir les mêmes résultats avec des feuillets β multi-brins.^{160,5} Ceci résulte principalement de la tendance des brins β à s'agréger et précipiter une fois isolés lorsqu'ils comportent un nombre de brins importants. Or, bien que la plupart des interactions protéine-protéine fait intervenir un à deux brins β , celles provoquant la formation de fibrilles résultent de l'assemblage de nombreux brins β .¹⁶¹ Le développement de peptidomimes entièrement artificiels s'est avéré nécessaire pour obtenir des architectures multi-brins stables permettant de mieux comprendre voire contrôler le repliement des feuillets β multi-brins.

Au cours de cette partie nous nous attarderons sur les méthodes conçues pour développer des mimes stabilisés d'éléments structuraux, c'est-à-dire de brins et coudes β , formant les feuillets β . Ensuite nous verrons comment l'utilisation de ces outils de stabilisation dont celle des foldamères a permis d'accéder à des architectures complexes stables et assimilables aux feuillets β multi-brins naturels.

1) Mimes de coudes β

a) Coudes β bioinspirés d'acides aminés

Les résidus α -aminés proline sont fréquemment rencontrés en position $i+1$ des coudes car ils provoquent une déstabilisation de l'organisation étendue d'une structure notamment par leur

absence de groupement NH, donneur de liaisons hydrogène. De plus, la structure cyclique rigide d'une proline permet l'orientation nécessaire pour la formation du coude. Des comparaisons ont été effectuées entre des coudes à deux résidus constitués de la D-proline ou L-proline liant deux brins peptidiques dans des solvants apolaires puis en solution aqueuse principalement par l'équipe de P. Balaram.^{162,163} Ces études ont démontré que l'insertion de la D-proline (D-Pro) est plus propice au repliement en épingle à cheveux que son homologue naturel. Par exemple, en s'appuyant sur la séquence composée des seize derniers résidus N-terminaux de l'ubiquitine, S. H. Gellman a prouvé, par RMN, que des coudes β D-Pro-Ala ou D-Pro-Gly peuvent nucléer ce repliement, par contre, celui-ci est aboli lors du remplacement de la D-Pro par la L-Pro. Ce pourquoi le motif D-Pro a souvent été utilisé pour développer des mimes de coudes β dérivés d'acides aminés. De plus, lors de la conception de feuillets β antiparallèles, H. E. Stanger et S. H. Gellman ont également observé que le repliement en feuillet β d'un peptide modèle en milieu aqueux, est moins probant avec le motif L-Asp-Gly qu'avec l'analogue D-Pro-Gly.¹⁶⁴ Ces observations ont marqué un point de départ pour développer une multitude de mimes de coudes β dérivés de la D-Pro. En effet, il a été observé que l'introduction d'un résidu D-Pro en position $i+1$ accompagné en position $i+2$ d'un acide β , γ ou δ aminé artificiel permet de stabiliser des structures à deux brins antiparallèles (**Figure 30**).¹⁶⁵ Il est apparu que l'acide aminé achiral et non protéinogène, α -aminobutyrique (Aib) ou homoalanine, peut également conduire à la structuration en épingle à cheveux lorsqu'il est combiné à un acide aminé *D* ou achiral comme la glycine.¹⁶⁶ J. S. Nowick a rapporté que l'acide aminé ornithine peut induire un repliement en coude β comparable au modèle D-Pro-Gly.¹⁶⁷

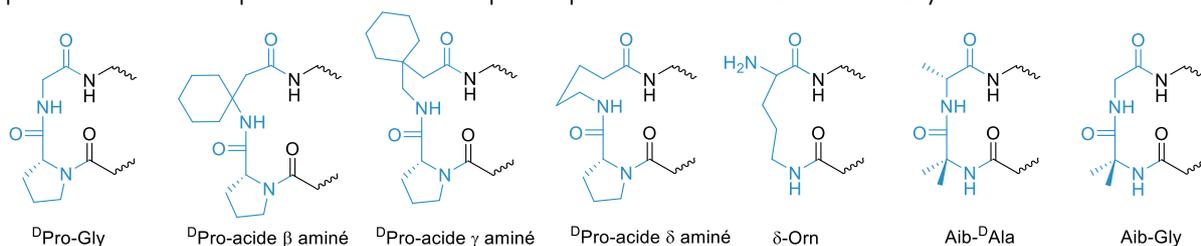


Figure 30 : Coudes α,β - ; α,γ - ; α,δ -aminés ; δ -ornithine et dérivés d'Aib.

b) Coudes β abiotiques

i. Coudes artificiels formant des feuillets β parallèles

De son côté, S. H. Gellman a développé des motifs non naturels stabilisés par des liaisons hydrogène intramoléculaires apportant plus de flexibilité avec notamment le motif D-Pro-DADME (prolyl-(1,1-diméthyl)-1,2-diaminoéthyl) ou l'unité CHDA (acide *S,R* / *R,S-cis*-cyclohexanedicarboxylique)-Gly.¹⁶⁸ Ceux-ci ont la particularité d'induire la formation de feuillets β parallèles contrairement aux modèles précédemment énoncés et aux coudes β naturels (**Figure 31**). Il est également possible d'utiliser un dérivé diamine, comprenant un motif aziridine, pour obtenir un repliement en feuillet β parallèle en alignant deux brins peptidiques liés par leurs extrémités N-terminales à ce coude artificiel.¹⁶⁹ La conception de ces coudes synthétiques a permis de stabiliser des feuillets β parallèles alors que ces derniers sont moins stables à l'état naturel que leurs homologues antiparallèles.

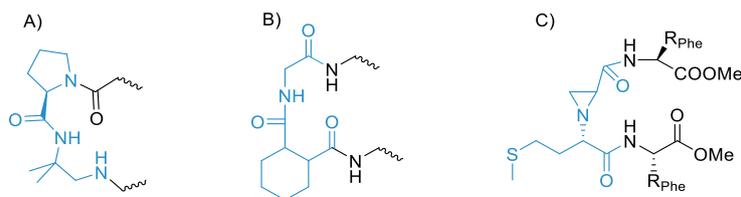


Figure 31 : Mimes de coudes β formant des feuilletts β parallèles : A) D-Pro-DADME. B) unité CHDA-Gly et C) Aziridine.

ii. Insertion de coudes β rigides

En parallèle, une seconde catégorie de socles artificiels mimant des coudes β a vu le jour. Ils sont composés d'hétérocycles saturés ou insaturés engendrant des structures étendues entre deux brins peptidiques (**Figure 32**). On retrouve, par exemple, des molécules tricycliques qui renforcent la rigidité nécessaire pour former des motifs en épingle à cheveux tels que les phenoxathiin-10,10-dioxines et dibenzofuranes.^{170,171} Ces derniers furent davantage étudiés notamment pour modifier le domaine B1 de la protéine G chez la bactérie du genre *Streptococcus*.¹⁷² Cette étude menée par G. Lippens a démontré que le feuillet β natif n'est pas nucléé grâce à la formation du coude β naturel mais plutôt *via* des interactions tertiaires. Des mimes de coudes β peuvent aussi être bicycliques à base de 2,2-dipipéridine ou son analogue au squelette entièrement carboné, tous deux développés par J.W. Kelly.^{173,174} On trouve aussi des motifs plus complexes comme les dérivés de la tétrahydroisoquinoline et d'azadioxabicyclo[3.2.1]octane ainsi que les dérivés proline des spirobarbiturates.^{175,176,177} Il existe également des modèles monocycliques comme des dérivés du triazole ou plus récemment de la 2,5-dicétopipérazine qui a été rapporté par l'équipe de S. Ongeri.^{178,179}

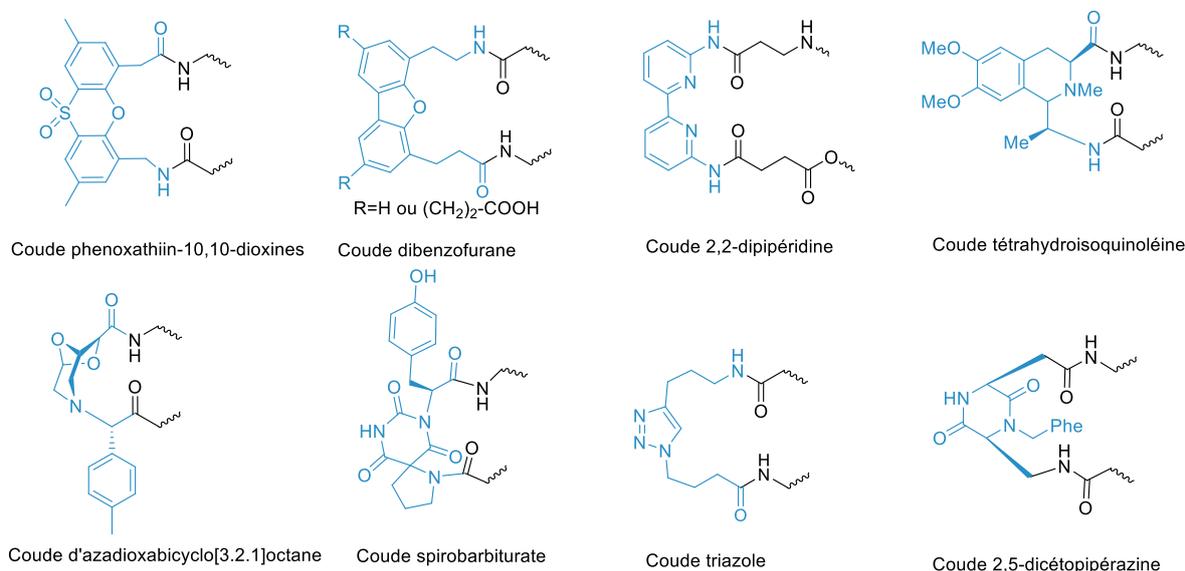


Figure 32 : Mimes de coudes β hétérocycliques.

iii. Coudes β dynamiques

Une alternative singulière, de par sa réversibilité, pour mimer les coudes β est l'utilisation de motifs allyliques constitués de l'unité azo-benzène par A. D. Hilvert.¹⁸⁰ Il s'avère que

l'introduction de cette unité dans une séquence peptidique sous sa conformation *cis* permet d'en nucléer le repliement en épingle à cheveux. Cet isomère *cis* est obtenu par photo-activation de l'isomère *trans* qui, quant à lui, défavorise la structuration en épingle à cheveux (Figure 33).

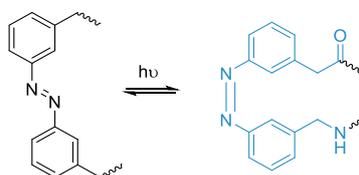


Figure 33 : Mime de coudes β type azo-benzène.

La diversité observée parmi l'ensemble des mimes de coudes β énoncés leur confère des propriétés différentes (rigidité, solubilité) et permet de moduler les activités biologiques de certains peptidomimes. En effet, il a été démontré que ces unités artificielles induisent la formation de feuillettes β repliés en épingles à cheveux et peuvent être impliquées dans des interactions protéine-protéine ou protéine-ARN.¹⁸¹

2) Mimes de brins β

Nous allons évoquer à présent les stratégies employées pour stabiliser des feuillettes β en contraignant artificiellement des structures étendues c'est-à-dire les brins β . De manière générale, la conception d'un brin β stable réside dans l'introduction d'une unité apte à générer à la fois les liaisons hydrogène interbrins et l'orientation adéquate des chaînes latérales pour assembler un feuillet β .

i. Introduction ponctuelle de motifs artificiels

Il est possible de stabiliser un brin β par l'introduction d'éléments structuraux qui renforcent la structure étendue. Le motif cyclopropane, notamment, permet d'induire une structuration en coude ou en brin β selon sa configuration, lorsqu'il est inséré au sein d'un oligomère (Figure 34). Cette ambivalence, mise en évidence par A. Mizuno, s'explique par la dualité entre les configurations *cis* et *trans* du cyclopropane et de la configuration du carbone C1' qui peuvent favoriser soit un repliement en coude β soit la formation d'un brin étendu, tous deux étant stables.¹⁸²

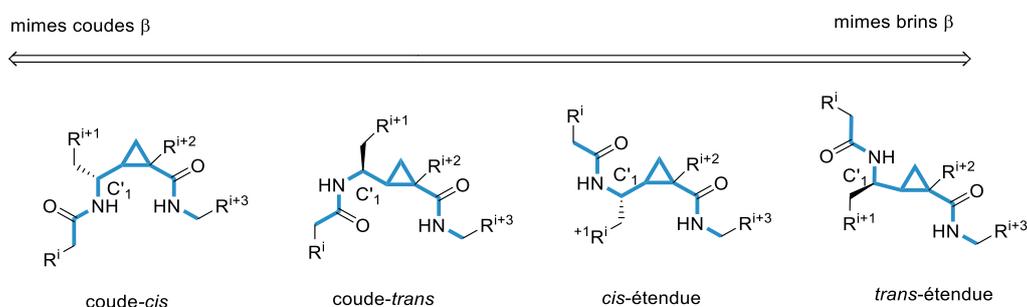


Figure 34 : Mimes de brins et coudes β avec le motif cyclopropane.

La formation de feuillettes β anti-parallèles stables peut aussi résulter de l'insertion de

dihydropyrazinones et de dihydropyridinones au sein de séquences peptidiques comme illustré sur la **Figure 35**.¹⁸³ Ces composés cycliques dérivant d'acides aminés naturels comme la leucine ou le glutamate ont été synthétisés par P. A. Bartlett et permettent de rigidifier une structure, tout en préservant les chaînes latérales requises dans des interactions protéine-protéine. D'ailleurs, des peptidomimes de brins β contenant des motifs 4,5-dihydro-2(3H)pyrazinone ont démontré une résistance à la protéolyse en tant que ligands du domaine PDZ de protéines.

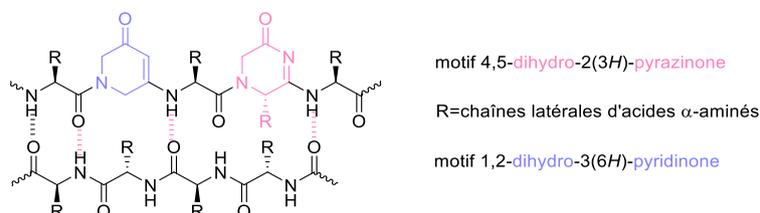


Figure 35 : Brins β stabilisés par des motifs dihydropyridinones et dihydropyrazinones.

Une dernière unité artificielle appelée « Hao », contenant la fonction hydrazine suivie de l'acide 5-amino-2-méthoxybenzoïque puis l'acide oxalique, permet de consolider des structures étendues.¹⁸⁴ Ce motif conçu par J. S. Nowick peut être facilement incorporé au sein des peptides lors de leur synthèse sur support solide ou en solution en présence d'agents de couplages peptidiques de type carbodiimides. Les brins β alternant ce motif avec des acides α -aminés façonnent un réseau de liaisons hydrogène complémentaires aux brins β peptidiques sur une face pour assembler le feuillet β (**Figure 36**). Sur l'autre face, la propagation de liaisons hydrogène est bloquée par l'unité Hao limitant ainsi les phénomènes d'agrégation.

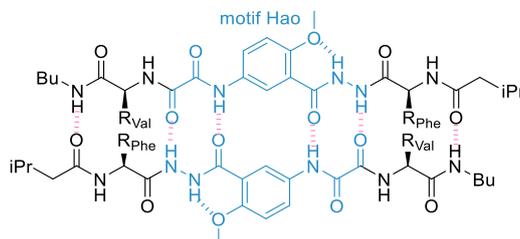


Figure 36 : Brins β stabilisés par le motif Hao. Le cycle benzénique rigidifie la structure étendue tout en limitant les interactions intermoléculaires.

ii. Mimes de brins à base de foldamères

L'intégration d'un élément cyclique au niveau d'un brin est une méthode fréquemment utilisée dans la conception de mimes de brin β car le motif cyclique apporte de la rigidité pour maintenir un système étendu (**Figure 37**). En 1988, D. S. Kemp a proposé un motif polycyclique composé d'épindolidione qui engendre la formation de feuillettes β antiparallèles.¹⁸⁵ Le polycycle adopte une structure étendue optimale assimilée à un brin β et offre des donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène susceptibles d'intervenir dans des liaisons hydrogène interbrins.

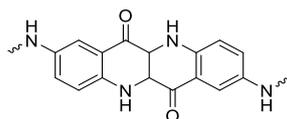


Figure 37 : Mime de brins β à base d'épindolidiones.

Par la suite, les foldamères, oligomères artificiels capables de se replier en structures compacts et bien définies, ont également été employés pour développer des mimes de brins β à partir de monomères hétérocycliques (Figure 38). Par exemple, Hirschmann *et al.* ont proposé des mimes de brins polycycliques à base de pyrrolinones.¹⁸⁶ Ce motif possède des atomes d'azote dont le caractère basique est comparable à celui des peptides et des carbonyles capables de former des liaisons hydrogène intramoléculaires. Les structures obtenues par diffraction des rayons X ont montré que les polypyrrolinones trisubstituées en 3,5,5 présentent des groupements carbonyles accepteurs de liaisons hydrogène reproduisant parfaitement la position de ceux d'un feuillet β polypeptidique. Le remplacement de la liaison amide par une unité 1,2,3-triazole engendre également la formation de brins étendus stabilisés par des interactions dipôle-dipôle.¹⁸⁷ Plus récemment, des motifs dérivés d'imidazolidin-2-one ou de 2,2-disubstituées-indolin-3-one reliés par des alcynes qui adoptent également des structures étendues ont été décrits par l'équipe de A.D. Hamilton.^{188,189,190} Un dernier exemple de mime de brin étendu est l'oligomère alternant des motifs pipéridine et pipéridinone développé par K. Burgess en 2015. Celui-ci offre la possibilité d'inclure des substituants (R) sur l'unité pipéridinone qui peuvent correspondre aux chaînes latérales d'acides α -aminés.¹⁹¹

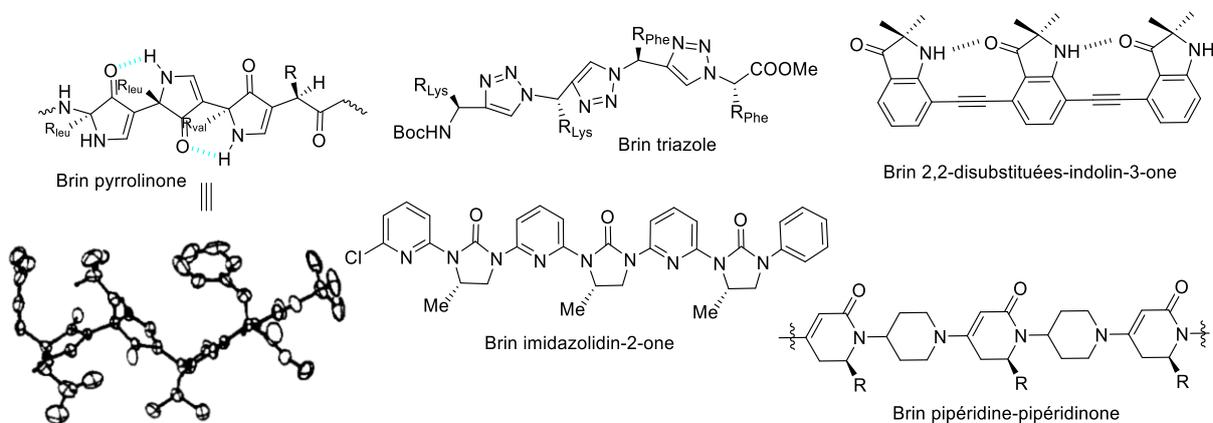


Figure 38 : Mimes de brins β à base de foldamères.

Enfin, des foldamères hybrides Aib/Amb (acide 3-amino-5-bromo-2-méthoxybenzoïque) développés par G. J. Sanjayan *et coll.* ont permis de reconstituer des liaisons hydrogène inter-brins mimant celles dans les feuilletts β naturels.¹⁹² On peut observer ce réseau de liaisons hydrogène sur la structure cristallographique publiée par cette équipe (Figure 39) qui vise à obtenir un mime de feuillet β multi-brins.

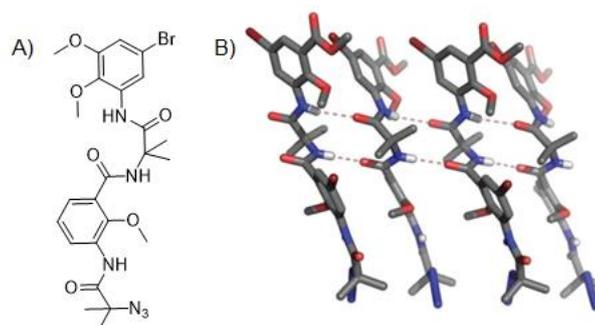


Figure 39 : Mime de brin β à partir d'un foldamère hybride Aib/Amb. A) Structure chimique du foldamère. B) Structure cristallographique d'un foldamère multi-brins hybride Aib/Amb.

3) Mimes de feuillets β

Une première approche pour stabiliser des feuillets β a été d'incorporer un coude β artificiel entre deux brins pour promouvoir ce repliement. Plus précisément, l'idée est d'insérer un lien covalent entre deux brins peptidiques afin d'établir des liaisons hydrogène entre eux et donc de façonner une structure dite en épingle à cheveux (**Figure 40**). Cette dernière est le motif de feuillet β le plus simple fréquemment retrouvé dans les protéines. Le lien covalent aide à préorganiser la structuration en feuillet β de la même manière qu'un coude β naturel induit le changement de direction au sein d'une séquence peptidique pour favoriser les interactions des brins polypeptidiques.

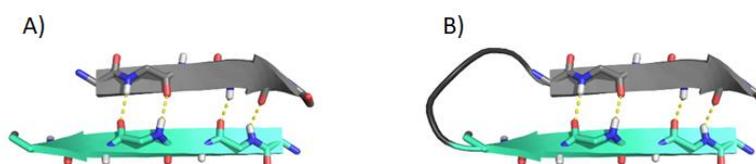


Figure 40 : Représentation schématique de deux brins formant un motif en épingle à cheveux. A) Deux brins β naturels B) Deux brins peptidiques liés par un coude artificiel.

A ce jour, plusieurs stratégies ont été recensées pour stabiliser artificiellement le modèle structuré épingle à cheveux (β -hairpin) comme l'insertion de coudes synthétiques, l'incorporation de motifs contraignant la structure étendue de brins β ou encore la macrocyclisation entre deux brins β .

a) Insertion de coudes artificiels et macrocyclisation

Au début du 21^{ème} siècle, S. H. Gellman *et coll.* ont prouvé qu'insérer les coudes artificiels D-Pro-DADME et Gly-CHDA (**Figure 41**) entre deux brins peptidiques peut favoriser leur repliement en feuillet β parallèle dans l'eau. Plus précisément, le coude D-Pro-DADME a été caractérisé comme un connecteur type diamine qui a pu induire une structuration en épingle à cheveux lorsqu'il est lié aux extrémités C-terminales des deux brins.¹⁹³ A l'inverse, le coude Gly-CHDA décrit comme un connecteur diacide, se lie aux extrémités N-terminales de deux brins afin de générer leur alignement parallèle.¹⁹⁴ Afin de promouvoir le repliement en épingle à cheveux, cette équipe a également pris en compte l'insertion de résidus hydrophobes pour

favoriser les interactions entre chaînes latérales (Leu/Phe) ou des interactions par empilement aromatique (Phe/Phe). De plus, le composé obtenu avec le coude Gly-CHDA contient, au niveau de l'ouverture, deux résidus polaires de charges opposées (Lys⁺, Glu⁻) permettant une interaction électrostatique entre leurs chaînes latérales qui stabilise la structure. Dans les deux cas, plusieurs résidus basiques (*e.g.* Arg) ont été introduits au sein des brins instaurant une charge nette positive afin d'éviter des phénomènes d'agrégation dans l'eau à un pH neutre ou légèrement acide. Les structures de ces deux feuillettes β ont alors été déterminées par des expériences de RMN 2D notamment par l'observation des corrélations ^1H - ^1H dans l'espace (NOE, ROE) en milieu aqueux.

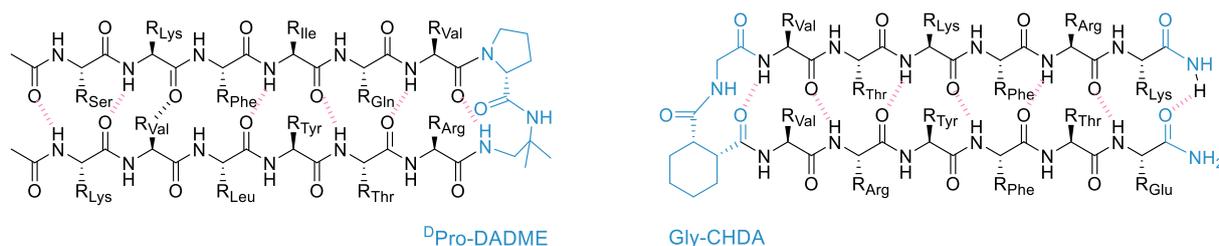


Figure 41 : Feuillettes β parallèles hydrosolubles étudiés par S. H. Gellman.

Ensuite, l'exemple ci-dessous illustre la possibilité de combiner des mimes de coudes β et l'incorporation de motifs artificiels au sein des brins peptidiques pour obtenir des architectures repliées en épingle à cheveux. L'équipe de S. Ongeri a développé un peptidomime de feuillet β alliant deux motifs artificiels : le motif Hao au sein des brins et le coude artificiel 2,5-dicétopipérazine (Figure 42).¹⁷⁹ La stabilité de cette structure relève également d'interactions hydrophobes entre les chaînes latérales des résidus présents sur les brins (Val, Gly, Ile). Dans ce cas, la formation du motif en épingle à cheveux a été caractérisée par des expériences de RMN en solvant protique (méthanol) et ont été corroborés à des études de modélisation dont la dynamique moléculaire. Une de leurs études a montré que ce type de feuillettes β a permis d'empêcher l'oligomérisation et la formation de fibrilles d'amyloïdes β ($\text{A}\beta_{1-42}$).¹⁹⁵ Par ailleurs, cette même équipe a rapporté en 2018 qu'un composé replié en épingle à cheveux en faisant intervenir le motif Hao et un coude β dérivant de la pipéridine était également capable de moduler l'agrégation des amyloïdes- β .¹⁹⁶

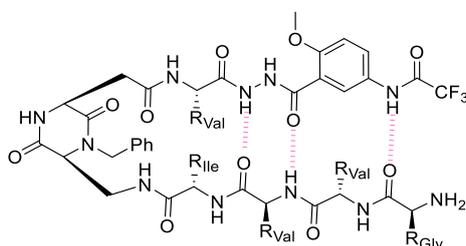


Figure 42 : Feuillet β en épingle à cheveux possédant un coude β type dicétopipérazine.

Une autre technique utilisée pour stabiliser le repliement en épingle à cheveux est la macrocyclisation qui consiste à insérer deux coudes artificiels entre deux brins β . Par exemple, S. H. Gellman a démontré la possibilité de former des macrocycles en utilisant deux mimes de coudes β différents pour induire la formation de feuillettes β parallèles stables dans l'eau (Figure 43). Dans ce cas-là les brins β sont composés d'acides aminés naturels et l'induction de

l'orientation des brins en parallèle est favorisée grâce au coude Gly-CHDA qui relie les extrémités N-terminales entre elles et au motif D-Pro-DADME assurant la jonction aux extrémités C-terminales, comme précédemment expliqué.

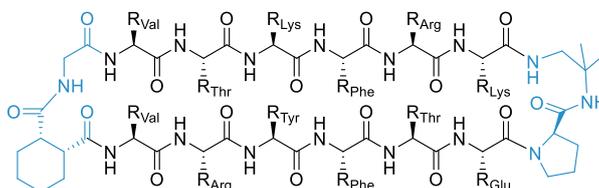


Figure 43 : Mime d'un feuillet β parallèle macrocyclique de S. H. Gellman.

Par la suite, J. S. Nowick a rapporté que deux brins β présentant l'unité artificielle Hao peuvent être joints de manière covalente à chaque extrémité par un motif δ -ornithine assurant le rôle de coude β . Des macrocycles de 42 à 54 atomes sont alors obtenus présentant un repliement en épingle à cheveux en milieu aqueux (Figure 44).¹⁹⁷

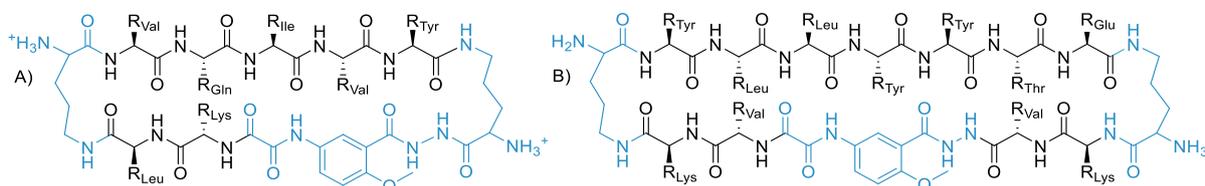


Figure 44 : Macrocyces comprenant le motif Hao et la δ -ornithine officiant comme mimes de coudes β . A) Macrocycle inhibiteur de l'agrégation de la protéine *tau*. B) Macrocycle inhibiteur de la microglobuline humaine.

Des études ont démontré que ces macrocycles permettent de contrôler des interactions protéine-protéine notamment en devenant des ligands de la protéine *tau* ou de la microglobuline- β_2 humaine ($h\beta_2M$) afin d'inhiber leurs agrégations.^{198,14} Ces macrocycles sont construits de la façon suivante : la séquence peptidique sur le premier brin β va reconnaître et être complémentaire des feuillettes β de la protéine visée tandis que le second brin, avec l'unité Hao, bloque l'extension du feuillet β en question et donc l'agrégation de la protéine cible.

Les différents exemples énoncés ici ont donc montré le potentiel de l'introduction de coudes artificiels pour stabiliser des feuillettes β comportant deux brins en milieu aqueux et pouvant servir à moduler des interactions protéine-protéine.

b) Ponts disulfure

Afin de promouvoir l'alignement adéquat d'un feuillet β , il est également possible d'établir des ponts covalents entre deux chaînes latérales de deux brins adjacents. La formation d'un pont disulfure entre deux brins est une méthode possible permettant une structuration type épingle à cheveux et requiert inéluctablement la présence de résidus cystéines. Ces dernières doivent, de préférence, se situer au centre de chaque brin ou être réparties tout au long du peptide, si celui-ci est long, afin de former des ponts inter-brins successifs.¹⁹⁹ H. Andersen *et coll.* ont notamment démontré qu'un pont disulfure peut être encore plus efficace que le mime de coude β « D-Pro-L-Pro » pour nucléer des structures en feuillettes β type épingle à cheveux (Figure 45A).²⁰⁰

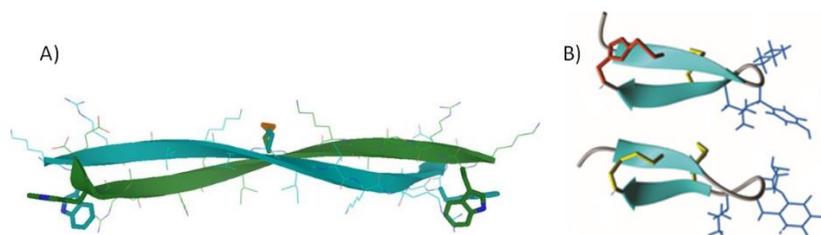


Figure 45 : Peptidomimes de feuillet β à deux brins et ponts disulfure. A) Pont disulfure nucléant la formation d'un feuillet β à deux brins d'Andersen. B) Remplacement d'un pont disulfure entre deux chaînes latérales (jaune) par un pont triazole (rouge) pour stabiliser la conformation active.

Pour une application aux interactions protéine-protéine, la sensibilité des liens disulfure face à un environnement réducteur reste problématique, ce pourquoi il peut être intéressant de varier la nature des macrocycles pour mimer ces ponts disulfure. Une alternative au motif disulfure a été proposée par l'équipe de A. Brust et se caractérise par un macrocycle possédant un motif triazole pouvant améliorer la stabilité des peptides face aux potentielles réductions en milieu biologique (**Figure 45B**).²⁰¹ Ce dernier a été introduit au sein d'un peptide riche en résidus cystéines et il a été observé que la structure résultante se superpose parfaitement à celle du peptide initial comportant uniquement des ponts disulfure.

c) Motifs en épingle à cheveux originaux

Bien que le développement de méthodes permettant de lier de manière covalente deux brins peptidiques pour promouvoir leur repliement en feuillet β a été largement décrit, de récentes avancées ont également proposé l'utilisation de liens non-covalents.²⁰² Des stratégies originales pour nucléer le repliement en épingle à cheveux entre deux brins peptidiques ont alors émergé. L'une d'entre elles consiste à utiliser un phénomène de coordination avec un métal de transition pour obtenir la formation *in situ* de structures en feuillet β (**Figure 46**). En effet, induire la formation de complexes hétérobidentates $[MX_2-(L_C.L_N)]$ est possible entre deux ligands peptidiques fonctionnalisés par une phosphine en position C-terminale (L_C) pour l'un et N-terminale (L_N) pour l'autre.²⁰³ Ces ligands peptidiques sont alors à-mêmes à se lier au platine (II) ou rhodium (I) pour s'organiser exclusivement en feuillet β antiparallèles à deux brins (**Figure 46A**). Enfin, l'équipe de H. Kraatz a démontré qu'il est possible de structurer un feuillet β *via* la chélation de deux brins par un motif ferrocène où les liaisons hydrogène intra-brins se croisent (**Figure 46B**).^{204,205} Ce type de coude β non-covalent permettrait de former soit des feuilletts parallèles soit antiparallèles.

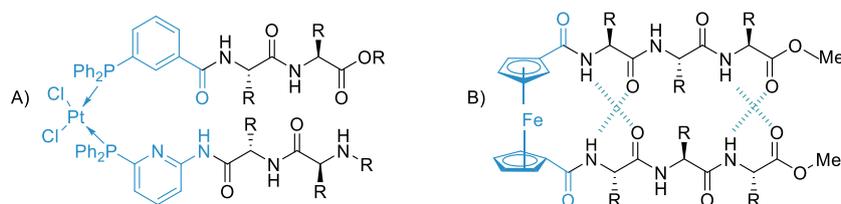


Figure 46 : Nucléation du repliement en épingle à cheveux A) par chélation du Pt (II) et B) par complexation au ferrocène.

Pour conclure, la stabilisation des feuillets β est possible grâce à l'introduction de motifs artificiels pour mimer des coudes β ou des brins β . De plus, les coudes β artificiels jouent un rôle majeur dans la nucléation de structures en épingle à cheveux. Combiner plusieurs stratégies de stabilisation a également démontré des applications aux interfaces protéine-protéine. A présent nous allons voir dans quelles mesures ces systèmes optimisant le repliement en épingle à cheveux peuvent être appliqués aux feuillets β multi-brins. En effet, des alternatives ont également vu le jour pour réussir à reproduire des feuillets β multi-brins rencontrés dans la nature à partir de squelettes non-naturels.

4) Vers des feuillets β multi-brins

a) Feuillets β multi-brins stabilisés par des liaisons hydrogène

i. Stabilisations de feuillets β multi-brins

Les feuillets β multi-brins parfois appelés « structures super-secondaires » interviennent dans les maladies liées aux amyloïdes (comme la maladie d'Alzheimer), et sont un réel défi synthétique car sujets à des phénomènes d'agrégation. La formation de fibrilles résultantes de ces agrégations est une composante essentielle de ces maladies. Un objectif est alors de réussir à stabiliser des feuillets β multi-brins qui adoptent une conformation serpentée alternant des boucles (ou coudes β) avec un maximum de brins β . D'ailleurs, cette démarche a notamment permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle la formation d'un feuillet β est coopérative perpendiculairement au plan *i.e.* en augmentant le nombre de brins. En effet, il a été démontré, principalement par S. H. Gellman, qu'un feuillet β à trois brins et deux boucles est plus stable que les équivalents à deux brins β en épingle à cheveux.^{206,207} Cette affirmation a découlé d'études réalisées sur des systèmes modèles où les boucles ont été stabilisées avec les motifs D-Pro-L-Gly ou L-Asn-L-Gly évoqués auparavant (**Figure 47A & B**).^{208,209} Ces feuillets β adoptent un repliement antiparallèle stabilisé par des coudes artificiels qui est rarement observé dans l'eau du moins, sans l'apport d'un solvant organique (méthanol).

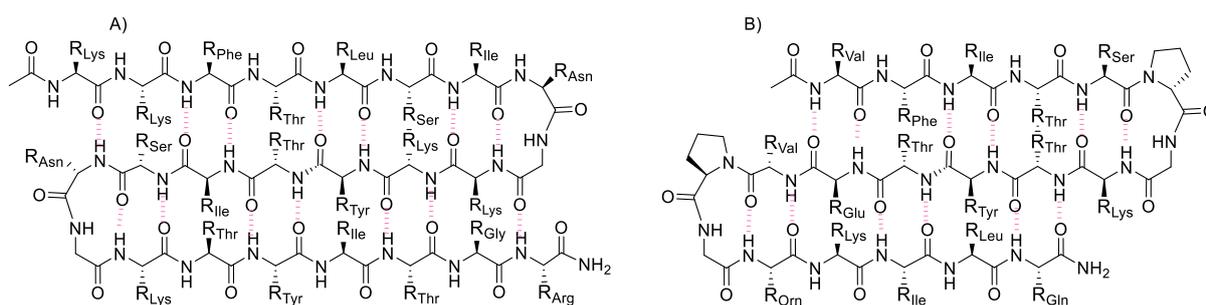


Figure 47 : Feuilletts β à trois brins stabilisés par des pseudo-coudes β . A) Feuilletts à trois brins de M. S. Searle et G. J. Sharman avec le coude L Asn- L Gly. B) Feuilletts β de H. L. Schenck et S. H. Gellman avec le coude D-Pro- L Gly.

Le brin artificiel de D. S. Kemp avec un motif polycyclique composé d'épindolidione a également été utilisé pour former des feuillets β antiparallèles serpentés lorsqu'il est incorporé au sein d'une séquence peptidique (**Figure 48**).^{210,185} Dans ce cas, le polycycle ainsi introduit adopte une structure étendue qui contraint le repliement en feuillet β à l'aide de coudes β naturels. De plus, la stabilisation de la structure fait intervenir un réseau de liaisons hydrogène inter-

brins de part et d'autre du brin central avec le motif épindolidione. La résolution des structures obtenues en variant les différents substituants R a été effectuée en solution *via* des expériences de RMN dans le DMSO-*d*₆ et à l'état solide par diffraction des rayons X. L'une d'entre elles seulement était soluble dans l'eau.

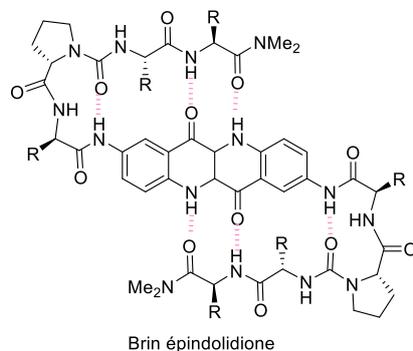


Figure 48 : Mime de feuillet β à trois brins dont l'un dérivé d'épindolidiones.

Il n'existe pas d'étude supplémentaire sur la stabilisation de feuillets β multi-brins et les méthodes décrites jusqu'alors ne semblent pas convenir à des applications biologiques étant donné leur faible solubilité en milieu aqueux. Pour le moment les règles qui régissent l'assemblage des feuillets multi-brins et donc leur agrégation ne sont pas maîtrisées, ce qui ne permet pas d'entrevoir une potentielle stratégie de stabilisation générale des feuillets β multi-brins. Cependant, des alternatives ont également vu le jour pour réussir à reproduire des feuillets β multi-brins rencontrés dans la nature à partir de squelettes non-naturels : les foldamères.

ii. Foldamères repliés en feuillets β multi-brins

A ce jour, il existe peu d'exemples de foldamères adoptant un repliement serpenté *via* un réseau de liaisons hydrogène. Les travaux de P. Balaram *et coll.* ont montré la synthèse d'un feuillet à trois brins et deux coudes D-Pro-Gly à base d'hybrides de peptides α/β (**Figure 49**).²¹¹ L'analyse structurale en solution dans des solvants polaires tels que le méthanol ou l'eau, a révélé une agrégation des feuillets β ainsi obtenus. Cette observation s'explique vraisemblablement par la compétitivité des solvants pour former des liaisons intermoléculaires avec les brins exposés et rend compte de la difficulté d'étudier ces structures. Par la suite, l'équipe d'A. Hamilton a su combiner de courts fragments étendus à des motifs diphénylalcynes assurant le rôle de coude β pour accéder à des structures comportant trois, cinq et sept brins β (**Figure 49B & C**).²¹² Dans ce cas-là, le bicycle aromatique assure la rigidité et l'alignement antiparallèle des brins stabilisés par les liaisons hydrogène intramoléculaires. L'enjeu à présent est de jouer sur la nature des chaînes latérales pour rendre les molécules hydrosolubles et allonger les brins bien que cela risque de faire apparaître des problèmes d'agrégation.

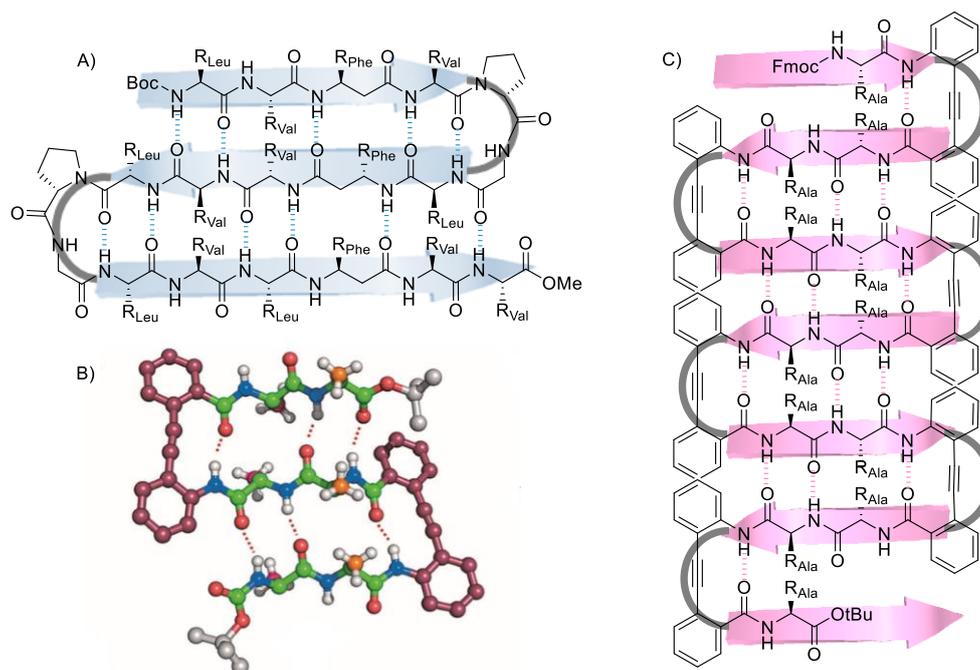


Figure 49 : Mimes de feuillets multi-brins stabilisés via des liaisons hydrogène intramoléculaires. A) Structure chimique à trois brins développée par P. Balam. B) Structure cristalline d'un feuillet à trois brins et C) Structure du feuillet β avec le coude diphenylalcyne à sept brins développés par A. Hamilton.

Le dernier exemple publié par N. Gopi en 2016 consiste à insérer des acides aminés *E*-vinyliques, comme l' α,β -déhydro- γ -Leu, afin de restreindre la flexibilité des brins peptidiques.²¹³ Des coudes stabilisés par le motif D-Pro-Gly sont utilisés pour obtenir la structure serpentine et l'ensemble a été synthétisé sur support solide (**Figure 50A**). Plusieurs structures cristallographiques furent obtenues de ces mimes à trois brins apportant ainsi des informations sur les processus d'agrégation des feuillets β naturels (**Figure 50B**). En effet, les structures obtenues s'apparentent au réseau de liaisons hydrogène d'un feuillet β antiparallèle. De plus, l'agencement tridimensionnel d'un de ces peptidomimes, superposé avec un peptide aléatoire comme la α -cobratoxine, confirme que ces hybrides pourraient mimer les feuillets β multi-brins des protéines.

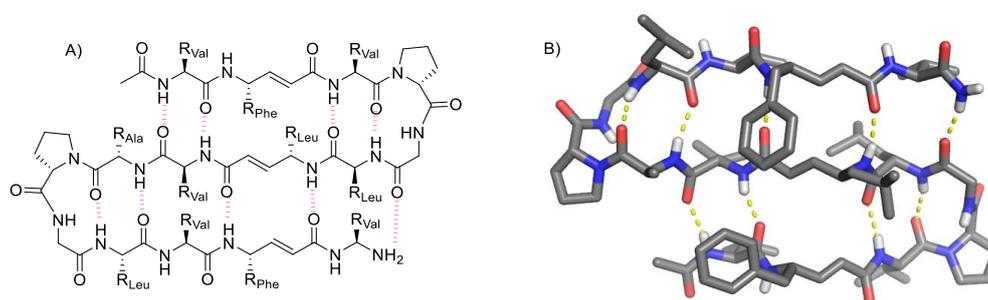


Figure 50 : Mime de feuillets à trois brins de N. Gopi à base de foldamères. A) Hybride d'acides aminés- $\alpha/\alpha,\beta$ -déhydro- γ -Phe et α,β -déhydro- γ -Val. B) Sa structure cristallographique montrant les 9 liaisons hydrogène intramoléculaires formant des cycles à 14 ou 18 atomes.

Il semble que les informations relatives à l'assemblage intermoléculaire de ces hybrides soient proches des processus naturels. Outre l'agrégation latérale des brins *via* les fonctions amides exposées au solvant, la contribution des interactions hydrophobes entre les chaînes latérales

est aussi responsable de l'empilement vertical. Ce dernier implique également les fonctions amides des coudes β qui sont verticales au plan et ces liens peptidiques peuvent alors interagir intermoléculairement avec leurs homologues ou des molécules de solvants polaires. Ceci mène inexorablement à la formation d'agrégats entraînant la précipitation des feuillets β artificiels et naturels. Ces travaux retranscrivent des modèles qui aident à comprendre l'autoassemblage de fibrilles d'amyloïdes et qui s'inscriraient dans la conception de biomatériaux.

b) Stabilisation par empilement aromatique

L'équipe d'Ivan Huc a quant à elle développé des foldamères repliés en feuillets β multi-brins stabilisés par empilement aromatique en milieu organique. Ici, le motif 4,6-dinitro-1,3-phénylènediamine constitue un pseudo-coude β permettant l'orientation parallèle des brins linéaires aromatiques liés par fonctions amides (**Figure 51**).^{214,215} Ils ont pu obtenir des architectures jusqu'à cinq brins adoptant une conformation dite « serpentée » *i.e.* alternant des motifs brins et coudes. Plus récemment, le même mime de coude β fut combiné à des dérivés de diaza-anthracènes comme pseudo-brins pour induire la formation de feuillets β courbés. La stabilisation par empilement aromatique de ce dernier a également été étudiée pour s'inscrire dans un assemblage plus complexe type hélice-feuillet-hélice.²¹⁶

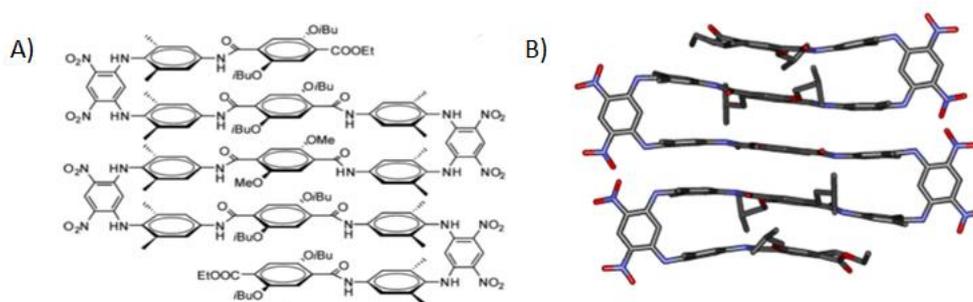


Figure 51 : Feuillet multi-brins stabilisés par empilement aromatique. A) Structure moléculaire d'un foldamère à trois brins composés de coudes 4,6-dinitro-1,3-phénylènediamine. B) Structure cristalline de ce foldamère.

L'ensemble des exemples évoqués jusqu'à présent montrent à quel point la Nature est une réelle source d'inspiration pour développer des modèles chimiques complexes tels que les mimes de feuillets β . Nous avons pu voir qu'ajouter un élément structural spécifique peut être décisif pour promouvoir et stabiliser le repliement en épingle à cheveux. Toutefois, pour accéder à des structures plus complexes, comparables aux feuillets β multi-brins, il faut souvent faire face à des problèmes d'insolubilité et donc d'agrégation engendrant la précipitation des molécules étudiées. Alors, le façonnage de ces structures peut être facilité en privilégiant l'utilisation de foldamères et en travaillant avec des mimes de brins courts, ce qui n'empêche pas d'obtenir des architectures avec des applications biologiques variées. Effectivement, les foldamères représentent une large gamme de molécules stables permettant de moduler différentes interactions protéine-protéine mais pour le moment leur potentiel en tant que médicament reste en questionnement.^{217,218}

IV. Conclusion et objectifs de la thèse

La chimie du médicament est basée depuis toujours sur l'exploitation et la transformation de substances médicinales naturelles mais cette source s'épuise. En parallèle, les peptides sont peu utilisés dans l'industrie pharmaceutique bien qu'ils aient connu un développement significatif depuis quelques dizaines d'années, notamment grâce à la mise au point de méthodes de production, chimiques en phase solide ou biologiques telles qu'en phage display. Les peptides offrent plusieurs avantages par rapport aux petites molécules qui constituent les médicaments traditionnels : (1) ils offrent une efficacité, une sélectivité et une spécificité remarquables, (2) les produits de dégradation des peptides ne sont pas toxiques (3) ils s'accumulent peu dans les tissus en raison de leur temps de demi-vie court. Ce dernier point peut également devenir un inconvénient lorsqu'il est question de durée d'action. Effectivement, en dépit des avantages qu'offrent les peptides par rapport aux petites molécules, leur développement pharmaceutique se heurte à des limites. Ces dernières sont liées à leur faible capacité à traverser les barrières membranaires, leur tendance à la non-structuration, à leur faible durée de demi-vie ou encore à la difficulté de comprendre leurs mécanismes d'action.

Le répertoire des méthodes de stabilisation des conformations bioactives fourni au cours de ce chapitre a permis de rendre compte des solutions apportées pour surmonter ces problèmes. Au fil du temps, plusieurs stratégies de stabilisation de structures secondaires se sont profilées en partant des motifs naturels stabilisateurs jusqu'au développement de molécules totalement artificielles, en passant par l'apport d'éléments stabilisateurs artificiels sur des séquences peptidiques.

Pour enrichir ce registre, cette thèse a pour objectif de rapporter deux nouvelles stratégies de développement de peptidomimes, l'une concerne la stabilisation d'une structure hélicoïdale et l'autre, la conception de foldamères comme mimes de feuilletts β multi-brins.

Le chapitre 2 sera consacré au premier objectif concernant l'introduction d'un macrocycle entre deux chaînes latérales qui présente un nouveau motif : la fonction guanidine (**Figure 52**). Les aspects novateurs quant à l'utilisation de ce motif seront exposés pour ensuite s'attarder sur le développement d'une stratégie de synthèse robuste de ponts guanidine. Ces derniers seront appliqués à de courts peptides biologiquement actifs pour en stabiliser la structure en hélice α qui est elle-même impliquée dans des interactions protéine-protéine.

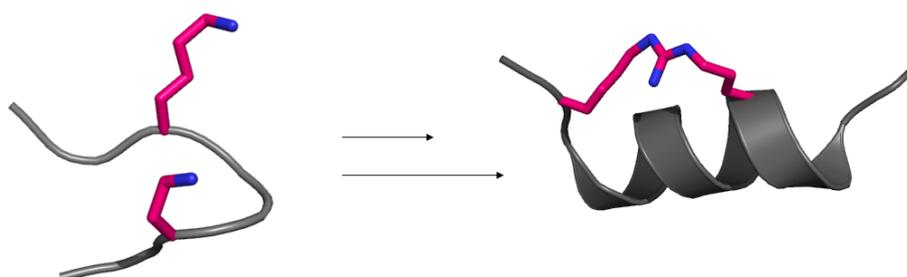


Figure 52 : Conception de ponts guanidine entre deux chaînes latérales pour stabiliser une structure en hélice α peptidique.

Le deuxième volet de ma thèse vise à concevoir des foldamères multi-brins mimant la structuration des feuillets β multi-brins naturels. L'idée est de parvenir à la synthèse d'architectures alternant des brins et coudes artificiels stabilisés par des liaisons hydrogène (**Figure 53**). L'historique quant aux résultats obtenus précédemment au sein du laboratoire sera effectué pour restituer le contexte de ce second projet de thèse. Ensuite, les synthèses multi-étapes et résultats quant à la structuration des foldamères ainsi obtenus seront détaillés.

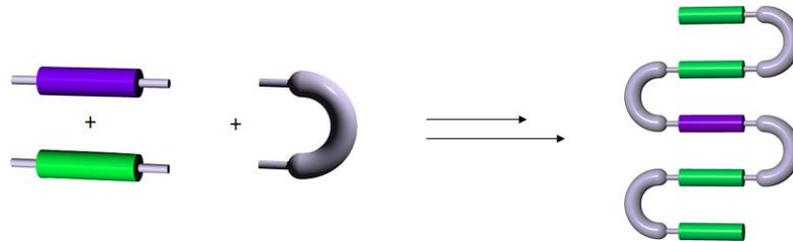


Figure 53 : Conception de feuillets multi-brins à base de foldamères alternant des brins et coudes artificiels.

Bibliographie

- (1) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1997, 86 (1), 3–25. The Article Was Originally Published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 46 (1), 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0).
- (2) Lipinski, C. A. Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, 1 (4), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>.
- (3) Valeur, E.; Guéret, S. M.; Adihou, H.; Gopalakrishnan, R.; Lemurell, M.; Waldmann, H.; Grossmann, T. N.; Plowright, A. T. New Modalities for Challenging Targets in Drug Discovery. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, 56 (35), 10294–10323. <https://doi.org/10.1002/anie.201611914>.
- (4) Adang, A. E. P.; Hermkens, P. H. H.; Linders, J. T. M.; Ottenheijm, H. C. J.; Staveren, C. J. van. Case Histories of Peptidomimetics: Progression from Peptides to Drugs. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1994**, 113 (2), 63–78. <https://doi.org/10.1002/recl.19941130202>.
- (5) Modell, A. E.; Blosser, S. L.; Arora, P. S. Systematic Targeting of Protein–Protein Interactions. *Trends in Pharmacological Sciences* **2016**, 37 (8), 702–713. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.008>.
- (6) Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. The Future of Peptide-Based Drugs. *Chemical Biology & Drug Design* **2013**, 81 (1), 136–147. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12055>.
- (7) Fosgerau, K.; Hoffmann, T. Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions. *Drug Discovery Today* **2015**, 20 (1), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>.
- (8) Grauer, A.; König, B. Peptidomimetics - A Versatile Route to Biologically Active Compounds. *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, 2009 (30), 5099–5111. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200900599>.
- (9) Atsburry, W.T.; Woods, H.J.; X-Ray studies of the structure of hair, wool, and related fibres. II.- the molecular structure and elastic properties of hair keratin. *Containing Papers of a Mathematical or Physical Character* **1933**, 232, 707-720. <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rsta.1934.0010>.
- (10) Pauling, L.; Corey, R.; Branson, H.; The Pleated Sheet, A New Layer Configuration of Polypeptide Chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **1951**, 37 (5), 251-256.
- (11) Pauling, L.; Corey, R.; Branson, H.; The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **1951**, 37(4), 205-211.
- (12) Eisenberg, D. The Discovery of the α -Helix and β -Sheet, the Principal Structural Features of Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100 (20), 11207–11210. <https://doi.org/10.1073/pnas.2034522100>.
- (13) Sewald, N.; Jakubke, H.-D. *Peptides: Chemistry and Biology*; Wiley-VCH: Weinheim, **2002**.

- (14) Cheng, P.-N.; Pham, J. D.; Nowick, J. S. The Supramolecular Chemistry of β -Sheets. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (15), 5477–5492. <https://doi.org/10.1021/ja3088407>.
- (15) Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *Journal of Molecular Biology* **1963**, *7* (1), 95–99. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(63\)80023-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(63)80023-6).
- (16) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. Empirical Predictions of Protein Conformation. *Annual Review of Biochemistry* **1978**, *47* (1), 251–276. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.47.070178.001343>.
- (17) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. Conformational Parameters for Amino Acids in Helical, β -Sheet, and Random Coil Regions Calculated from Proteins. *Biochemistry*. **1974**, *13* (2), 211-222.
- (18) Williams, R. W.; Chang, A.; Juretić, D.; Loughran, S. Secondary Structure Predictions and Medium Range Interactions. *Biochemistry Biophysics. Acta* **1987**, *916* (2), 200–204. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(87\)90109-9](https://doi.org/10.1016/0167-4838(87)90109-9).
- (19) Zimm, B. H.; Bragg, J. K. Theory of the Phase Transition between Helix and Random Coil in Polypeptide Chains. *Journal of Chemical Physics* **1959**, *31* (2), 526–535. <https://doi.org/10.1063/1.1730390>.
- (20) Lifson, S.; Roig, A. On the Theory of Helix—Coil Transition in Polypeptides. *Journal of Chemical Physics* **1961**, *34* (6), 1963–1974. <https://doi.org/10.1063/1.1731802>.
- (21) Miller, S. E.; Watkins, A. M.; Kallenbach, N. R.; Arora, P. S. Effects of Side Chains in Helix Nucleation Differ from Helix Propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111* (18), 6636–6641. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322833111>.
- (22) Marqusee, S.; Baldwin, R. L. Helix Stabilization by Glu...Lys+ Salt Bridges in Short Peptides of de Novo Design. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, *84* (24), 8898–8902. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.8898>.
- (23) Rohl, C. A.; Fiori, W.; Baldwin, R. L. Alanine Is Helix-Stabilizing in Both Template-Nucleated and Standard Peptide Helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **1999**, *96* (7), 3682–3687.
- (24) Scholtz, J. M.; Qian, H.; York, E. J.; Stewart, J. M.; Baldwin, R. L. Parameters of Helix-Coil Transition Theory for Alanine-Based Peptides of Varying Chain Lengths in Water. *Biopolymers* **1991**, *31* (13), 1463–1470. <https://doi.org/10.1002/bip.360311304>.
- (25) Chakrabartty, A.; Baldwin, R. L. Stability of α -helices. *Advances in Protein Chemistry* **1995**, *46*, 141-176.
- (26) Hol, W. G. The Role of the Alpha-Helix Dipole in Protein Function and Structure. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **1985**, *45* (3), 149–195.
- (27) Shoemaker, K. R.; Fairman, R.; Kim, P. S.; York, E. J.; Stewart, J. M.; Baldwin, R. L. The C-Peptide Helix from Ribonuclease A Considered as an Autonomous Folding Unit. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **1987**, *52*, 391–398. <https://doi.org/10.1101/SQB.1987.052.01.045>.
- (28) Fairman, R.; Shoemaker, K. R.; York, E. J.; Stewart, J. M.; Baldwin, R. L. The Glu 2- ... Arg 10+ Side-Chain Interaction in the C-Peptide Helix of Ribonuclease A. *Biophysical Chemistry* **1990**, *37* (1–3), 107–119. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(90\)88012-h](https://doi.org/10.1016/0301-4622(90)88012-h).
- (29) Shoemaker, K. R.; Fairman, R.; Schultz, D. A.; Robertson, A. D.; York, E. J.; Stewart, J. M.; Baldwin, R. L. Side-Chain Interactions in the C-Peptide Helix: Phe 8 ... His 12+. *Biopolymers* **1990**, *29* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/bip.360290104>.

- (30) Shi, Z.; Olson, C. A.; Bell, A. J.; Kallenbach, N. R. Stabilization of α -helix Structure by Polar Side-chain Interactions: Complex Salt Bridges, Cation- π Interactions, and C-H ... O H-bonds. *Peptide Science* **2001**, *60* (5), 366–380. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2001\)60:5<366::AID-BIP10177>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2001)60:5<366::AID-BIP10177>3.0.CO;2-5).
- (31) Padmanabhan, S.; Baldwin, R. L. Tests for Helix-Stabilizing Interactions between Various Nonpolar Side Chains in Alanine-Based Peptides. *Protein Science* **1994**, *3* (11), 1992–1997. <https://doi.org/10.1002/pro.5560031111>.
- (32) Padmanabhan, S.; Marqusee, S.; Ridgeway, T.; Laue, T. M.; Baldwin, R. L. Relative Helix-Forming Tendencies of Nonpolar Amino Acids. *Nature* **1990**, *344* (6263), 268–270. <https://doi.org/10.1038/344268a0>.
- (33) Stapley, B. J.; Rohl, C. A.; Doig, A. J. Addition of Side Chain Interactions to Modified Lifson-Roig Helix-Coil Theory: Application to Energetics of Phenylalanine-Methionine Interactions. *Protein Science* **1995**, *4* (11), 2383–2391. <https://doi.org/10.1002/pro.5560041117>.
- (34) Viguera, A. R.; Serrano, L. Side-Chain Interactions between Sulfur-Containing Amino Acids and Phenylalanine in α -Helices. *Biochemistry* **1995**, *34* (27), 8771–8779. <https://doi.org/10.1021/bi00027a028>.
- (35) Presta, L. G.; Rose, G. D. Helix Signals in Proteins. *Science* **1988**, *240* (4859), 1632–1641. <https://doi.org/10.1126/science.2837824>.
- (36) Dasgupta, S.; Bell, J. A. Design of Helix Ends: Amino Acid Preferences, Hydrogen Bonding and Electrostatic Interactions. *International Journal of Peptide and Protein Research* **2009**, *41* (5), 499–511. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1993.tb00470.x>.
- (37) Lyu, P. C.; Wemmer, D. E.; Zhou, H. X.; Pinker, R. J.; Kallenbach, N. R. Capping Interactions in Isolated α -Helices: Position-Dependent Substitution Effects and Structure of a Serine-Capped Peptide Helix. *Biochemistry* **1993**, *32* (2), 421–425. <https://doi.org/10.1021/bi00053a006>.
- (38) Zhou, H. X.; Lyu, P.; Wemmer, D. E.; Kallenbach, N. R. Alpha Helix Capping in Synthetic Model Peptides by Reciprocal Side Chain-Main Chain Interactions: Evidence for an N Terminal “Capping Box.” *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **1994**, *18* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/prot.340180103>.
- (39) Harper, E. T.; Rose, G. D. Helix Stop Signals in Proteins and Peptides: The Capping Box. *Biochemistry* **1993**, *32* (30), 7605–7609. <https://doi.org/10.1021/bi00081a001>.
- (40) Preißner, R.; Bork, P. On α -Helices Terminated by Glycine: 1. Identification of Common Structural Features. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, *180* (2), 660–665. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)81116-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)81116-7).
- (41) Aurora, R.; Srinivasan, R.; Rose, G. D. Rules for Alpha-Helix Termination by Glycine. *Science* **1994**, *264* (5162), 1126–1130. <https://doi.org/10.1126/science.8178170>.
- (42) Forood, B.; Feliciano, E. J.; Nambiar, K. P. Stabilization of Alpha-Helical Structures in Short Peptides via End Capping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1993**, *90* (3), 838–842. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.3.838>.
- (43) Gong, Y.; Zhou, H. X.; Guo, M.; Kallenbach, N. R. Structural Analysis of the N- and C-Termini in a Peptide with Consensus Sequence. *Protein Science* **1995**, *4* (8), 1446–1456. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040802>.
- (44) Park, S. H.; Shalongo, W.; Stellwagen, E. Modulation of the Helical Stability of a Model Peptide by Ionic Residues. *Biochemistry* **1993**, *32* (47), 12901–12905. <https://doi.org/10.1021/bi00210a044>.

- (45) Merutka, G.; Lipton, W.; Shalongo, W.; Park, S. H.; Stellwagen, E. Effect of Central-Residue Replacements on the Helical Stability of a Monomeric Peptide. *Biochemistry* **1990**, *29* (32), 7511–7515. <https://doi.org/10.1021/bi00484a021>.
- (46) Gans, P. J.; Lyu, P. C.; Manning, M. C.; Woody, R. W.; Kallenbach, N. R. The Helix–Coil Transition in Heterogeneous Peptides with Specific Side-Chain Interactions: Theory and Comparison with CD Spectral Data. *Biopolymers* **1991**, *31* (13), 1605–1614. <https://doi.org/10.1002/bip.360311315>.
- (47) Andrews, M. J. I.; Tabor, A. B. Forming Stable Helical Peptides Using Natural and Artificial Amino Acids. *Tetrahedron* **1999**, *55* (40), 11711–11743. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)00678-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00678-X).
- (48) Myers, J. K.; Pace, C. N.; Scholtz, J. M. A Direct Comparison of Helix Propensity in Proteins and Peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94* (7), 2833–2837. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.2833>.
- (49) Myers, J. K.; Pace, C. N.; Scholtz, J. M. Helix Propensities Are Identical in Proteins and Peptides. *Biochemistry* **1997**, *36* (36), 10923–10929. <https://doi.org/10.1021/bi9707180>.
- (50) Blaber, M.; Zhang, X.; Lindstrom, J. D.; Pepiot, S. D.; Baase, W. A.; Matthews, B. W. Determination of α -Helix Propensity within the Context of a Folded Protein: Sites 44 and 131 in Bacteriophage T4 Lysozyme. *Journal of Molecular Biology* **1994**, *235* (2), 600–624. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1016>.
- (51) Horovitz, A.; Matthews, J. M.; Fersht, A. R. α -Helix Stability in Proteins. *Journal of Molecular Biology* **1992**, *227* (2), 560–568.
- (52) Doig, A. J. Recent Advances in Helix–Coil Theory. *Biophysical Chemistry* **2002**, *101–102*, 281–293. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00170-9](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00170-9).
- (53) Doig, A. J.; Chakrabarty, A.; Klingler, T. M.; Baldwin, R. L. Determination of Free Energies of N-Capping in α -Helices by Modification of the Lifson-Roig Helix-Coil Theory To Include N- and C-Capping. *Biochemistry* **1994**, *33* (11), 3396–3403. <https://doi.org/10.1021/bi00177a033>.
- (54) Rohl, C. A.; Doig, A. J. Models for the 3.10-Helix/Coil, π -Helix/Coil, and α -Helix/3.10-Helix/Coil Transitions in Isolated Peptides. *Protein Science* **1996**, *5* (8), 1687–1696.
- (55) Rohl, C. A.; Chakrabarty, A.; Baldwin, R. L. Helix Propagation and N-Cap Propensities of the Amino Acids Measured in Alanine-Based Peptides in 40 Volume Percent Trifluoroethanol. *Protein Science* **1996**, *5* (12), 2623–2637. <https://doi.org/10.1002/pro.5560051225>.
- (56) Fisinger, S.; Serrano, L.; Lacroix, E. Computational Estimation of Specific Side Chain Interaction Energies in α Helices. *Protein Science* **2001**, *10* (4), 809–818.
- (57) Jr, D. L. M. Context Is a Major Determinant of β -Sheet Propensity. **1994**, *371*, 4.
- (58) Finkelstein, A. V. Predicted Beta-Structure Stability Parameters under Experimental Test. *Protein Engineering*. **1995**, *8* (2), 207–209.
- (59) Blasie, C. A.; Berg, J. M. Electrostatic Interactions across a β -Sheet. *Biochemistry* **1997**, *36* (20), 6218–6222. <https://doi.org/10.1021/bi962805i>.
- (60) Minor, D. L.; Kim, P. S. Context Is a Major Determinant of β -Sheet Propensity. *Nature* **1994**, *371* (6494), 264–267. <https://doi.org/10.1038/371264a0>.
- (61) Smith, C. K.; Withka, J. M.; Regan, L. A Thermodynamic Scale for the β -Sheet Forming Tendencies of the Amino Acids. *Biochemistry* **1994**, *33* (18), 5510–5517. <https://doi.org/10.1021/bi00184a020>.

- (62) Smith, C. K.; Regan, L. Construction and Design of β -Sheets. *Accounts of Chemical Research* **1997**, *30* (4), 153–161. <https://doi.org/10.1021/ar9601048>.
- (63) Wouters, M. A.; Curmi, P. M. G. An Analysis of Side Chain Interactions and Pair Correlations within Antiparallel β -Sheets: The Differences between Backbone Hydrogen-Bonded and Non-Hydrogen-Bonded Residue Pairs. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **1995**, *22* (2), 119–131. <https://doi.org/10.1002/prot.340220205>.
- (64) Fooks, H. M.; Martin, A. C. R.; Woolfson, D. N.; Sessions, R. B.; Hutchinson, E. G. Amino Acid Pairing Preferences in Parallel β -Sheets in Proteins. *Journal of Molecular Biology* **2006**, *356* (1), 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.008>.
- (65) Llamas-Saiz, A. L.; Grotenbreg, G. M.; Overhand, M.; van Raaij, M. J. Double-Stranded Helical Twisted β -Sheet Channels in Crystals of Gramicidin S Grown in the Presence of Trifluoroacetic and Hydrochloric Acids. *Acta Crystallographica D* **2007**, *63* (3), 401–407. <https://doi.org/10.1107/S09074444906056435>.
- (66) Fahrner, R. L.; Dieckmann, T.; Harwig, S. S. L.; Lehrer, R. I.; Eisenberg, D.; Feigon, J. Solution Structure of Protegrin-1, a Broad-Spectrum Antimicrobial Peptide from Porcine Leukocytes. *Chemistry & Biology* **1996**, *3* (7), 543–550. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(96\)90145-3](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(96)90145-3).
- (67) Harwig, S. S.; Waring, A.; Yang, H. J.; Cho, Y.; Tan, L.; Lehrer, R. I. Intramolecular Disulfide Bonds Enhance the Antimicrobial and Lytic Activities of Protegrins at Physiological Sodium Chloride Concentrations. *European Journal of Biochemistry* **1996**, *240* (2), 352–357. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0352h.x>.
- (68) Koga, N.; Tatsumi-Koga, R.; Liu, G.; Xiao, R.; Acton, T. B.; Montelione, G. T.; Baker, D. Principles for Designing Ideal Protein Structures. *Nature* **2012**, *491* (7423), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11600>.
- (69) King, N. P.; Sheffler, W.; Sawaya, M. R.; Vollmar, B. S.; Sumida, J. P.; André, I.; Gonen, T.; Yeates, T. O.; Baker, D. Computational Design of Self-Assembling Protein Nanomaterials with Atomic Level Accuracy. *Science* **2012**, *336* (6085), 1171–1174. <https://doi.org/10.1126/science.1219364>.
- (70) Cooper, S.; Khatib, F.; Treuille, A.; Barbero, J.; Lee, J.; Beenen, M.; Leaver-Fay, A.; Baker, D.; Popović, Z.; players, F. Predicting Protein Structures with a Multiplayer Online Game. *Nature* **2010**, *466* (7307), 756–760. <https://doi.org/10.1038/nature09304>.
- (71) Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Peggion, C. Control of Peptide Conformation by the Thorpe-Ingold Effect (α -Tetrasubstitution). *Biopolymers* **2001**, *60* (6), 396–419. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2001\)60:6<396::AID-BIP10184>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2001)60:6<396::AID-BIP10184>3.0.CO;2-7).
- (72) H. Stammer, C. Cyclopropane Amino Acids: 2,3- and 3,4-Methanoamino Acids. *Tetrahedron* **1990**, *46* (7), 2231–2254. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)82005-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)82005-6).
- (73) Bellanda, M.; Mammi, S.; Geremia, S.; Demitri, N.; Randaccio, L.; Broxterman, Q. B.; Kaptein, B.; Pengo, P.; Pasquato, L.; Scrimin, P. Solvent Polarity Controls the Helical Conformation of Short Peptides Rich in α -Tetrasubstituted Amino Acids. *Chemistry - A European Journal* **2007**, *13* (2), 407–416. <https://doi.org/10.1002/chem.200600719>.
- (74) Sakurai, K.; Schubert, C.; Kahne, D. Crystallographic Analysis of an 8-Mer P53 Peptide Analogue Complexed with MDM2. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (34), 11000–11001. <https://doi.org/10.1021/ja063102j>.
- (75) Nair, R. V.; Vijayadas, K. N.; Roy, A.; Sanjayan, G. J. Heterogeneous Foldamers from Aliphatic-Aromatic Amino Acid Building Blocks: Current Trends and Future Prospects:

- Heterogeneous Peptide Foldamers. *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, 35, 7763–7780. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201402877>.
- (76) Horne, W. S.; Gellman, S. H. Foldamers with Heterogeneous Backbones. *Accounts of Chemical Research* **2008**, 41 (10), 1399–1408. <https://doi.org/10.1021/ar800009n>.
- (77) Roy, A.; Prabhakaran, P.; Baruah, P. K.; Sanjayan, G. J. Diversifying the Structural Architecture of Synthetic Oligomers: The Hetero Foldamer Approach. *Chemical Communications* **2011**, 47 (42), 11593–11611. <https://doi.org/10.1039/C1CC13313F>.
- (78) Gellman, S. H. Foldamers: A Manifesto. *Accounts of Chemical Research* **1998**, 31 (4), 173–180. <https://doi.org/10.1021/ar960298r>.
- (79) Baldauf, C.; Günther, R.; Hofmann, H.-J. Theoretical Prediction of the Basic Helix Types in α,β -Hybrid Peptides. *Biopolymers* **2006**, 84 (4), 408–413. <https://doi.org/10.1002/bip.20493>.
- (80) Hayen, A.; Schmitt, M. A.; Ngassa, F. N.; Thomasson, K. A.; Gellman, S. H. Two Helical Conformations from a Single Foldamer Backbone: “Split Personality” in Short α/β -Peptides. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43 (4), 505–510. <https://doi.org/10.1002/anie.200352125>.
- (81) Choi, S. H.; Guzei, I. A.; Spencer, L. C.; Gellman, S. H. Crystallographic Characterization of Helical Secondary Structures in α/β -Peptides with 1:1 Residue Alternation. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130 (20), 6544–6550. <https://doi.org/10.1021/ja800355p>.
- (82) Schmitt, M. A.; Choi, S. H.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. New Helical Foldamers: Heterogeneous Backbones with 1:2 and 2:1 $\alpha:\beta$ -Amino Acid Residue Patterns. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128 (14), 4538–4539. <https://doi.org/10.1021/ja060281w>.
- (83) Johnson, L. M.; Gellman, S. H. α -Helix Mimicry with α/β -Peptides. *Methods Enzymology* **2013**, 523, 407–429. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394292-0.00019-9>.
- (84) Horne, W. S.; Price, J. L.; Gellman, S. H. Interplay among Side Chain Sequence, Backbone Composition, and Residue Rigidification in Polypeptide Folding and Assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, 105 (27), 9151–9156. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801135105>.
- (85) Horne, W. S.; Boersma, M. D.; Windsor, M. A.; Gellman, S. H. Sequence-Based Design of α/β -Peptide Foldamers That Mimic BH3 Domains. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47 (15), 2853–2856. <https://doi.org/10.1002/anie.200705315>.
- (86) Lee, E. F.; Smith, B. J.; Horne, W. S.; Mayer, K. N.; Evangelista, M.; Colman, P. M.; Gellman, S. H.; Fairlie, W. D. STRUCTURAL BASIS OF Bcl-XL RECOGNITION BY A BH3-MIMETIC α/β -PEPTIDE GENERATED VIA SEQUENCE-BASED DESIGN. *Chembiochem* **2011**, 12 (13), 2025–2032. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100314>.
- (87) Boersma, M. D.; Haase, H. S.; Peterson-Kaufman, K. J.; Lee, E. F.; Clarke, O. B.; Colman, P. M.; Smith, B. J.; Horne, W. S.; Fairlie, W. D.; Gellman, S. H. Evaluation of Diverse α/β -Backbone Patterns for Functional α -Helix Mimicry: Analogues of the Bim BH3 Domain. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134 (1), 315–323. <https://doi.org/10.1021/ja207148m>.
- (88) Checco, J. W.; Lee, E. F.; Evangelista, M.; Sleebs, N. J.; Rogers, K.; Pettikiriarachchi, A.; Kershaw, N. J.; Eddinger, G. A.; Belair, D. G.; Wilson, J. L.; et al. α/β -Peptide Foldamers Targeting Intracellular Protein-Protein Interactions with Activity in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, 137 (35), 11365–11375. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b05896>.

- (89) Shin, Y.-H.; Mortenson, D. E.; Satyshur, K. A.; Forest, K. T.; Gellman, S. H. Differential Impact of β and γ Residue Preorganization on $\alpha/\beta/\gamma$ -Peptide Helix Stability in Water. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (22), 8149–8152. <https://doi.org/10.1021/ja403319q>.
- (90) Bandyopadhyay, A.; Jadhav, S. V.; Gopi, H. N. α/γ -Hybrid Peptide Helices: Synthesis, Crystal Conformations and Analogy with the α -Helix. *Chemical Communications* **2012**, *48* (57), 7170–7172. <https://doi.org/10.1039/C2CC32911E>.
- (91) Sawada, T.; Gellman, S. H. Structural Mimicry of the α -Helix in Aqueous Solution with an Isoatomic $\alpha/\beta/\gamma$ -Peptide Backbone. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (19), 7336–7339. <https://doi.org/10.1021/ja202175a>.
- (92) Grison, C. M.; Miles, J. A.; Robin, S.; Wilson, A. J.; Aitken, D. J. An α -Helix-Mimicking 12,13-Helix: Designed $\alpha/\beta/\gamma$ -Foldamers as Selective Inhibitors of Protein-Protein Interactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (37), 11096–11100. <https://doi.org/10.1002/anie.201604517>.
- (93) Kemp, D. S.; Curran, T. P.; Boyd, J. G.; Allen, T. J. Studies of N-Terminal Templates for α -Helix Formation. Synthesis and Conformational Analysis of Peptide Conjugates of (2S,5S,8S,11S)-1-Acetyl-1,4-Diaza-3-Keto-5-Carboxy-10-Thiatricyclo[2.8.1.0^{4,8}]Tridecane (Ac-Hel1-OH). *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56* (23), 6683–6697. <https://doi.org/10.1021/jo00023a038>.
- (94) Kemp, D. S.; Oslick, S. L.; Allen, T. J. The Structure and Energetics of Helix Formation by Short Templated Peptides in Aqueous Solution. 3. Calculation of the Helical Propagation Constant s from the Template Stability Constants t/c for Ac-Hel₁-Ala_n-OH, $n = 1-6$. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (18), 4249–4255. <https://doi.org/10.1021/ja952911s>.
- (95) Hoang, H. N.; Driver, R. W.; Beyer, R. L.; Hill, T. A.; D. de Araujo, A.; Plisson, F.; Harrison, R. S.; Goedecke, L.; Shepherd, N. E.; Fairlie, D. P. Helix Nucleation by the Smallest Known α -Helix in Water. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (29), 8275–8279. <https://doi.org/10.1002/anie.201602079>.
- (96) Shepherd, N. E.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. Consecutive Cyclic Pentapeptide Modules Form Short α -Helices That Are Very Stable to Water and Denaturants. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43* (20), 2687–2690. <https://doi.org/10.1002/anie.200352659>.
- (97) Shepherd, N. E.; Hoang, H. N.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. Single Turn Peptide α -Helices with Exceptional Stability in Water. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (9), 2974–2983. <https://doi.org/10.1021/ja0456003>.
- (98) Lee, E. F.; Sadowsky, J. D.; Smith, B. J.; Czabotar, P. E.; Peterson-Kaufman, K. J.; Colman, P. M.; Gellman, S. H.; Fairlie, W. D. High-Resolution Structural Characterization of a Helical α/β -Peptide Foldamer Bound to the Anti-Apoptotic Protein Bcl-XL. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (24), 4318–4322. <https://doi.org/10.1002/anie.200805761>.
- (99) Pendem, N.; Nelli, Y. R.; Douat, C.; Fischer, L.; Laguerre, M.; Ennifar, E.; Kauffmann, B.; Guichard, G. Controlling Helix Formation in the γ -Peptide Superfamily: Heterogeneous Foldamers with Urea/Amide and Urea/Carbamate Backbones. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (15), 4147–4151. <https://doi.org/10.1002/anie.201209838>.
- (100) Cavagnat, D.; Claudon, P.; Fischer, L.; Guichard, G.; Desbat, B. Experimental and Theoretical Study of the Vibrational Spectra of Oligoureas: Helical versus β -Sheet-Type

- Secondary Structures. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115* (15), 4446–4452. <https://doi.org/10.1021/jp1109674>.
- (101) Fischer, L.; Didierjean, C.; Jolibois, F.; Semetey, V.; Manuel Lozano, J.; Briand, J.-P.; Marraud, M.; Poteau, R.; Guichard, G. Propensity for Local Folding Induced by the Urea Fragment in Short-Chain Oligomers. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2008**, *6* (14), 2596. <https://doi.org/10.1039/b801139g>.
- (102) 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. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (12), 4884–4892. <https://doi.org/10.1021/ja401151v>.
- (103) Frémaux, J.; Foldamères peptidomimétiques à base d'urées : vers le développement de structures complexes mimes d'architectures biologiques. Thèse **2013**.
- (104) 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. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59* (18), 8221–8232. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00144>.
- (105) Mauran, L.; Kauffmann, B.; Odaert, B.; Guichard, G. Stabilization of an α -Helix by Short Adjacent Accessory Foldamers. *Comptes Rendus Chimie* **2016**, *19* (1–2), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2015.07.003>.
- (106) Fremaux, J.; Mauran, L.; Pulka-Ziach, K.; Kauffmann, B.; Odaert, B.; Guichard, G. α -Peptide–Oligourea Chimeras: Stabilization of Short α -Helices by Non-Peptide Helical Foldamers. *Angewandte Chemie* **2015**, *127* (34), 9954–9958. <https://doi.org/10.1002/ange.201500901>.
- (107) Wang, D.; Chen, K.; Dimartino, G.; Arora, P. S. Nucleation and Stability of Hydrogen-Bond Surrogate-Based α -Helices. *Organic Biomolecular Chemistry* **2006**, *4* (22), 4074–4081. <https://doi.org/10.1039/B612891B>.
- (108) Chapman, R. N.; Dimartino, G.; Arora, P. S. A Highly Stable Short α -Helix Constrained by a Main-Chain Hydrogen-Bond Surrogate. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (39), 12252–12253. <https://doi.org/10.1021/ja0466659>.
- (109) Cabezas, E.; Satterthwait, A. C. The Hydrogen Bond Mimic Approach: Solid-Phase Synthesis of a Peptide Stabilized as an α -Helix with a Hydrazone Link. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (16), 3862–3875. <https://doi.org/10.1021/ja983212t>.
- (110) Patgiri, A.; Witten, M. R.; Arora, P. S. Solid Phase Synthesis of Hydrogen Bond Surrogate Derived α -Helices: Resolving the Case of a Difficult Amide Coupling. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8* (8), 1773. <https://doi.org/10.1039/c000905a>.
- (111) Wang, D.; Chen, K.; Kulp, J. L.; Arora, P. S. Evaluation of Biologically Relevant Short α -Helices Stabilized by a Main-Chain Hydrogen-Bond Surrogate. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (28), 9248–9256. <https://doi.org/10.1021/ja062710w>.
- (112) Wang, D.; Lu, M.; Arora, P. S. Inhibition of HIV-1 Fusion by Hydrogen-Bond-Surrogate-Based α Helices. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (10), 1879–1882. <https://doi.org/10.1002/anie.200704227>.
- (113) Wang, D.; Liao, W.; Arora, P. S. Enhanced Metabolic Stability and Protein-Binding Properties of Artificial α Helices Derived from a Hydrogen-Bond Surrogate: Application

- to Bcl-XL. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (40), 6525–6529. <https://doi.org/10.1002/anie.200501603>.
- (114) Henchey, L. K.; Kushal, S.; Dubey, R.; Chapman, R. N.; Olenyuk, B. Z.; Arora, P. S. Inhibition of Hypoxia Inducible Factor 1—Transcription Coactivator Interaction by a Hydrogen Bond Surrogate α -Helix. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (3), 941–943. <https://doi.org/10.1021/ja9082864>.
- (115) Mahon, A. B.; Arora, P. S. Design, Synthesis and Protein-Targeting Properties of Thioether-Linked Hydrogen Bond Surrogate Helices. *Chemical Communications* **2012**, *48* (10), 1416–1418. <https://doi.org/10.1039/C1CC14730G>.
- (116) Guarracino, D. A.; Riordan, J. A.; Barreto, G. M.; Oldfield, A. L.; Kouba, C. M.; Agrinoni, D. Macrocyclic Control in Helix Mimetics. *Chemical Reviews* **2019**. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00623>.
- (117) Lau, Y. H.; de Andrade, P.; Wu, Y.; Spring, D. R. Peptide Stapling Techniques Based on Different Macrocyclisation Chemistries. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (1), 91–102. <https://doi.org/10.1039/C4CS00246F>.
- (118) Blackwell, H. E.; Grubbs, R. H. Highly Efficient Synthesis of Covalently Cross-Linked Peptide Helices by Ring-Closing Metathesis. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37* (23), 3281–3284. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19981217\)37:23<3281::AID-ANIE3281>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19981217)37:23<3281::AID-ANIE3281>3.0.CO;2-V).
- (119) Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (24), 5891–5892. <https://doi.org/10.1021/ja000563a>.
- (120) Walensky, L. D. Activation of Apoptosis in Vivo by a Hydrocarbon-Stapled BH3 Helix. *Science* **2004**, *305* (5689), 1466–1470. <https://doi.org/10.1126/science.1099191>.
- (121) Long, Y.-Q.; Huang, S.-X.; Zawahir, Z.; Xu, Z.-L.; Li, H.; Sanchez, T. W.; Zhi, Y.; De Houwer, S.; Christ, F.; Debyser, Z.; et al. Design of Cell-Permeable Stapled Peptides as HIV-1 Integrase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56* (13), 5601–5612. <https://doi.org/10.1021/jm4006516>.
- (122) Baek, S.; Kutchukian, P. S.; Verdine, G. L.; Huber, R.; Holak, T. A.; Lee, K. W.; Popowicz, G. M. Structure of the Stapled P53 Peptide Bound to Mdm2. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (1), 103–106. <https://doi.org/10.1021/ja2090367>.
- (123) Walensky, L. D.; Bird, G. H. Hydrocarbon-Stapled Peptides: Principles, Practice, and Progress: Miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57* (15), 6275–6288. <https://doi.org/10.1021/jm4011675>.
- (124) Glas, A.; Bier, D.; Hahne, G.; Rademacher, C.; Ottmann, C.; Grossmann, T. N. Constrained Peptides with Target-Adapted Cross-Links as Inhibitors of a Pathogenic Protein-Protein Interaction. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53* (9), 2489–2493. <https://doi.org/10.1002/anie.201310082>.
- (125) Bird, G. H.; Mazzola, E.; Opoku-Nsiah, K.; Lammert, M. A.; Godes, M.; Neuberg, D. S.; Walensky, L. D. Biophysical Determinants for Cellular Uptake of Hydrocarbon-Stapled Peptide Helices. *Nature Chemical Biology* **2016**, *12* (10), 845–852. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2153>.
- (126) Taylor, J. W. The Synthesis and Study of Side-Chain Lactam-Bridged Peptides. *Biopolymers* **2002**, *66* (1), 49–75. <https://doi.org/10.1002/bip.10203>.
- (127) Khoo, K. K.; Wilson, M. J.; Smith, B. J.; Zhang, M.-M.; Gulyas, J.; Yoshikami, D.; Rivier, J. E.; Bulaj, G.; Norton, R. S. Lactam-Stabilized Helical Analogues of the Analgesic μ -

- Conotoxin KIIIA. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54* (21), 7558–7566. <https://doi.org/10.1021/jm200839a>.
- (128) Cardoso, R. M. F.; Brunel, F. M.; Ferguson, S.; Zwick, M.; Burton, D. R.; Dawson, P. E.; Wilson, I. A. Structural Basis of Enhanced Binding of Extended and Helically Constrained Peptide Epitopes of the Broadly Neutralizing HIV-1 Antibody 4E10. *Journal of Molecular Biology* **2007**, *365* (5), 1533–1544. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.088>.
- (129) Harrison, R. S.; Shepherd, N. E.; Hoang, H. N.; Ruiz-Gomez, G.; Hill, T. A.; Driver, R. W.; Desai, V. S.; Young, P. R.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. Downsizing Human, Bacterial, and Viral Proteins to Short Water-Stable Alpha Helices That Maintain Biological Potency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107* (26), 11686–11691. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002498107>.
- (130) Klein, M. J.; Schmidt, S.; Wadhvani, P.; Bürck, J.; Reichert, J.; Afonin, S.; Berditsch, M.; Schober, T.; Brock, R.; Kansy, M.; et al. Lactam-Stapled Cell-Penetrating Peptides: Cell Uptake and Membrane Binding Properties. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60* (19), 8071–8082. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00813>.
- (131) Sakagami, K.; Masuda, T.; Kawano, K.; Futaki, S. Importance of Net Hydrophobicity in the Cellular Uptake of All-Hydrocarbon Stapled Peptides. *Molecular Pharmaceutics* **2018**, *15* (3), 1332–1340. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b01130>.
- (132) Cantel, S.; Le Chevalier Isaad, A.; Scrima, M.; Levy, J. J.; DiMarchi, R. D.; Rovero, P.; Halperin, J. A.; D'Ursi, A. M.; Papini, A. M.; Chorev, M. Synthesis and Conformational Analysis of a Cyclic Peptide Obtained via *i* to *i* +4 Intramolecular Side-Chain to Side-Chain Azide–Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73* (15), 5663–5674. <https://doi.org/10.1021/jo800142s>.
- (133) Kawamoto, S. A.; Coleska, A.; Ran, X.; Yi, H.; Yang, C.-Y.; Wang, S. Design of Triazole-Stapled BCL9 α -Helical Peptides to Target the β -Catenin/B-Cell CLL/Lymphoma 9 (BCL9) Protein–Protein Interaction. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55* (3), 1137–1146. <https://doi.org/10.1021/jm201125d>.
- (134) Madden, M. M.; Muppidi, A.; Li, Z.; Li, X.; Chen, J.; Lin, Q. Synthesis of Cell-Permeable Stapled Peptide Dual Inhibitors of the P53-Mdm2/Mdmx Interactions via Photoinduced Cycloaddition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21* (5), 1472–1475. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.01.004>.
- (135) Frankiewicz, L.; Betti, C.; Guillemin, K.; Tourwé, D.; Jacquot, Y.; Ballet, S. Stabilisation of a Short α -Helical VIP Fragment by Side Chain to Side Chain Cyclisation: A Comparison of Common Cyclisation Motifs by Circular Dichroism. *Journal of Peptide Science* **2013**, *19* (7), 423–432. <https://doi.org/10.1002/psc.2515>.
- (136) Jackson, D. Y.; King, D. S.; Chmielewski, J.; Singh, S.; Schultz, P. G. General Approach to the Synthesis of Short α -Helical Peptides. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113* (24), 9391–9392. <https://doi.org/10.1021/ja00024a067>.
- (137) Brunel, F. M.; Dawson, P. E. Synthesis of Constrained Helical Peptides by Thioether Ligation: Application to Analogs of Gp41. *Chemical Communications* **2005**, No. 20, 2552. <https://doi.org/10.1039/b419015g>.
- (138) Brunel, F. M.; Zwick, M. B.; Cardoso, R. M. F.; Nelson, J. D.; Wilson, I. A.; Burton, D. R.; Dawson, P. E. Structure-Function Analysis of the Epitope for 4E10, a Broadly Neutralizing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody. *Journal of Virology* **2006**, *80* (4), 1680–1687. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.4.1680-1687.2006>.

- (139) Zhao, B.; Zhang, Q.; Li, Z. Constructing Thioether-Tethered Cyclic Peptides via on-Resin Intra-Molecular Thiol-Ene Reaction: Intra-Molecular Thiol-Ene Reaction. *Journal of Peptide Science* **2016**, *22* (8), 540–544. <https://doi.org/10.1002/psc.2902>.
- (140) Hu, K.; Geng, H.; Zhang, Q.; Liu, Q.; Xie, M.; Sun, C.; Li, W.; Lin, H.; Jiang, F.; Wang, T.; et al. An In-Tether Chiral Center Modulates the Helicity, Cell Permeability, and Target Binding Affinity of a Peptide. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (28), 8013–8017. <https://doi.org/10.1002/anie.201602806>.
- (141) Phelan, J. C.; Skelton, N. J.; Braisted, A. C.; McDowell, R. S. A General Method for Constraining Short Peptides to an α -Helical Conformation. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (3), 455–460. <https://doi.org/10.1021/ja9611654>.
- (142) Fujimoto, K.; Kajino, M.; Inouye, M. Development of a Series of Cross-Linking Agents That Effectively Stabilize α -Helical Structures in Various Short Peptides. *Chemistry - A European Journal* **2008**, *14* (3), 857–863. <https://doi.org/10.1002/chem.200700843>.
- (143) Jo, H.; Meinhardt, N.; Wu, Y.; Kulkarni, S.; Hu, X.; Low, K. E.; Davies, P. L.; DeGrado, W. F.; Greenbaum, D. C. Development of α -Helical Calpain Probes by Mimicking a Natural Protein–Protein Interaction. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (42), 17704–17713. <https://doi.org/10.1021/ja307599z>.
- (144) Wang, Y.; Chou, D. H.-C. A Thiol-Ene Coupling Approach to Native Peptide Stapling and Macrocyclization. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (37), 10931–10934. <https://doi.org/10.1002/anie.201503975>.
- (145) Spokoiny, A. M.; Zou, Y.; Ling, J. J.; Yu, H.; Lin, Y.-S.; Pentelute, B. L. A Perfluoroaryl-Cysteine S_NAr Chemistry Approach to Unprotected Peptide Stapling. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (16), 5946–5949. <https://doi.org/10.1021/ja400119t>.
- (146) Dantas de Araujo, A.; Perry, S. R.; Fairlie, D. P. Chemically Diverse Helix-Constrained Peptides Using Selenocysteine Crosslinking. *Organic Letters* **2018**, *20* (5), 1453–1456. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b00233>.
- (147) Flint, D. G.; Kumita, J. R.; Smart, O. S.; Woolley, G. A. Using an Azobenzene Cross-Linker to Either Increase or Decrease Peptide Helix Content upon Trans-to-Cis Photoisomerization. *Chemistry & Biology* **2002**, *9* (3), 391–397. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00109-6](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00109-6).
- (148) Kneissl, S.; Loveridge, E. J.; Williams, C.; Crump, M. P.; Allemann, R. K. Photocontrollable Peptide-Based Switches Target the Anti-Apoptotic Protein Bcl-x_L. *ChemBioChem* **2008**, *9* (18), 3046–3054. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800502>.
- (149) Schmid, E. M.; Ford, M. G. J.; Burtey, A.; Praefcke, G. J. K.; Peak-Chew, S.-Y.; Mills, I. G.; Benmerah, A.; McMahon, H. T. Role of the AP2 B-Appendage Hub in Recruiting Partners for Clathrin-Coated Vesicle Assembly. *PLoS Biology* **2006**, *4* (9), 17.
- (150) Nevola, L.; Martín-Quirós, A.; Eckelt, K.; Camarero, N.; Tosi, S.; Llobet, A.; Giralt, E.; Gorostiza, P. Light-Regulated Stapled Peptides to Inhibit Protein-Protein Interactions Involved in Clathrin-Mediated Endocytosis. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (30), 7704–7708. <https://doi.org/10.1002/anie.201303324>.
- (151) Brown, S. P.; Smith, A. B. Peptide/Protein Stapling and Unstapling: Introduction of s-Tetrazine, Photochemical Release, and Regeneration of the Peptide/Protein. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (12), 4034–4037. <https://doi.org/10.1021/ja512880g>.
- (152) Lau, Y. H.; de Andrade, P.; Sköld, N.; McKenzie, G. J.; Venkitaraman, A. R.; Verma, C.; Lane, D. P.; Spring, D. R. Investigating Peptide Sequence Variations for ‘Double-Click’

- Stapled P53 Peptides. *Organic Biomolecular Chemistry* **2014**, *12* (24), 4074–4077. <https://doi.org/10.1039/C4OB00742E>.
- (153) Lau, Y. H.; de Andrade, P.; Quah, S.-T.; Rossmann, M.; Laraia, L.; Sköld, N.; Sum, T. J.; Rowling, P. J. E.; Joseph, T. L.; Verma, C.; et al. Functionalised Staple Linkages for Modulating the Cellular Activity of Stapled Peptides. *Chemical Science* **2014**, *5* (5), 1804–1809. <https://doi.org/10.1039/C4SC00045E>.
- (154) Tran, P. T.; Larsen, C. Ø.; Rønnebjerg, T.; De Foresta, M.; Kunze, M. B. A.; Marek, A.; Løper, J. H.; Boyhus, L.-E.; Knuhtsen, A.; Lindorff-Larsen, K.; et al. Diversity-Oriented Peptide Stapling: A Third Generation Copper-Catalysed Azide-Alkyne Cycloaddition Stapling and Functionalisation Strategy. *Chemistry - A European Journal* **2017**, *23* (14), 3490–3495. <https://doi.org/10.1002/chem.201700128>.
- (155) Dewkar, G. K.; Carneiro, P. B.; Hartman, M. C. T. Synthesis of Novel Peptide Linkers: Simultaneous Cyclization and Labeling. *Organic Letters* **2009**, *11* (20), 4708–4711. <https://doi.org/10.1021/ol901662c>.
- (156) Assem, N.; Ferreira, D. J.; Wolan, D. W.; Dawson, P. E. Acetone-Linked Peptides: A Convergent Approach for Peptide Macrocyclization and Labeling. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (30), 8665–8668. <https://doi.org/10.1002/anie.201502607>.
- (157) 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.” *Chemical Science* **2017**, *8* (7), 5166–5171. <https://doi.org/10.1039/C7SC01342F>.
- (158) Li, Z.; Huang, R.; Xu, H.; Chen, J.; Zhan, Y.; Zhou, X.; Chen, H.; Jiang, B. Divinylsulfonamides as Specific Linkers for Stapling Disulfide Bonds in Peptides. *Organic Letters* **2017**, *19* (18), 4972–4975. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b02464>.
- (159) Wang, Z. A.; Ding, X. Z.; Tian, C.-L.; Zheng, J.-S. Protein/Peptide Secondary Structural Mimics: Design, Characterization, and Modulation of Protein–Protein Interactions. *RSC Advances* **2016**, *6* (66), 61599–61609. <https://doi.org/10.1039/C6RA13976K>.
- (160) Loughlin, W. A.; Tyndall, J. D. A.; Glenn, M. P.; Fairlie, D. P. Beta-Strand Mimetics. *Chemical Reviews* **2004**, *104* (12), 6085–6118. <https://doi.org/10.1021/cr040648k>.
- (161) Watkins, A. M.; Arora, P. S. Anatomy of β -Strands at Protein–Protein Interfaces. *ACS Chemical Biology* **2014**, *9* (8), 1747–1754. <https://doi.org/10.1021/cb500241y>.
- (162) Raghothama, S. R.; Awasthi, S. K.; Balaram, P. β -Hairpin Nucleation by Pro-Gly β -Turns. Comparison of D-Pro-Gly and L-Pro-Gly Sequences in an Apolar Octapeptide. *Journal of the Chemical Society Perkin* **1998**, 137–144. <https://doi.org/10.1039/A703331A>
- (163) Haque, T. S.; Gellman, S. H. Insights on β -Hairpin Stability in Aqueous Solution from Peptides with Enforced Type I' and Type II' β -Turns. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (9), 2303–2304. <https://doi.org/10.1021/ja963653h>.
- (164) Stanger, H. E.; Gellman, S. H. Rules for Antiparallel β -Sheet Design: D-Pro-Gly Is Superior to L-Asn-Gly for β -Hairpin Nucleation. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (17), 4236–4237. <https://doi.org/10.1021/ja973704q>.
- (165) Rai, R.; Vasudev, P. G.; Ananda, K.; Raghothama, S.; Shamala, N.; Karle, I. L.; Balaram, P. Hybrid Peptides: Expanding the β Turn in Peptide Hairpins by the Insertion of β -, γ -, and δ -Residues. *A European Journal of Chemistry* **2007**, *13* (20), 5917–5926. <https://doi.org/10.1002/chem.200601562>.
- (166) Aravinda, S.; Shamala, N.; Rajkishore, R.; Gopi, H. N.; Balaram, P. A Crystalline β -Hairpin Peptide Nucleated by a Type I' Aib-D-Ala β -Turn: Evidence for Cross-Strand Aromatic Interactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41* (20), 3863–3865.

- [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20021018\)41:20<3863::AID-ANIE3863>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20021018)41:20<3863::AID-ANIE3863>3.0.CO;2-A).
- (167) Nowick, J. S.; Brower, J. O. A New Turn Structure for the Formation of β -Hairpins in Peptides. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (4), 876–877. <https://doi.org/10.1021/ja028938a>.
- (168) Liang, G.-B.; Gellman, S. H. β -Turn and β -Hairpin Mimicry with Tetrasubstituted Alkenes. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (9), 1806–1816. <https://doi.org/10.1021/ja9824526>.
- (169) Filigheddu, S. N.; Taddei, M. Small Ring Constrained Peptidomimetics. Synthesis of Aziridine Parallel β -Sheet Mimetics. *Tetrahedron Letters*, **1998**, *39* (22), 3857–3860.
- (170) Feigel, M.; 2,8-Dimethyl-4-(Carboxymethyl)-6-(Aminomethyl)Phenoxathiin S-Dioxide: An Organic Substitute for the β -Turn in Peptides? *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108* (1), 181–182. <https://doi.org/10.1021/ja00261a033>.
- (171) Kaul, R.; Deechongkit, S.; Kelly, J. W. Synthesis of a Negatively Charged Dibenzofuran-Based β -Turn Mimetic and Its Incorporation into the WW Miniprotein-Enhanced Solubility without a Loss of Thermodynamic Stability. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (40), 11900–11907. <https://doi.org/10.1021/ja020675x>.
- (172) Odaert, B.; Jean, F.; Boutillon, C.; Buisine, E.; Melnyk, O.; Tartar, A.; Lippens, G. Synthesis, Folding, and Structure of the β -Turn Mimic Modified B1 Domain of Streptococcal Protein G. *Protein Science* **1999**, *8*(12), 2773–2783. <https://doi.org/10.1110/ps.8.12.2773>.
- (173) Schneider, J. P.; Kelly, J. W. Synthesis and Efficacy of Square Planar Copper Complexes Designed to Nucleate β -Sheet Structure. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117* (9), 2533–2546. <https://doi.org/10.1021/ja00114a016>.
- (174) Nesloney, C. L.; Kelly, J. W. A 2,3'-Substituted Biphenyl-Based Amino Acid Facilitates the Formation of a Monomeric β -Hairpin-like Structure in Aqueous Solution at Elevated Temperature. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (25), 5836–5845. <https://doi.org/10.1021/ja952472x>.
- (175) Lesma, G.; Meschini, E.; Recca, T.; Sacchetti, A.; Silvani, A. Synthesis of Tetrahydroisoquinoline-Based Pseudopeptides and Their Characterization as Suitable Reverse Turn Mimetics. *Tetrahedron* **2007**, *63* (25), 5567–5578. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.04.024>.
- (176) Trabocchi, A.; Occhiato, E. G.; Potenza, D.; Guarna, A. Synthesis and Conformational Analysis of Small Peptides Containing 6-*E* Ndo -BT(t)L Scaffolds as Reverse Turn Mimetics. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67* (21), 7483–7492. <https://doi.org/10.1021/jo0202132>.
- (177) Bittermann, H.; Gmeiner, P. Chiroselective Synthesis of Spirocyclic β -Lactams and Their Characterization as Potent Type II β -Turn Inducing Peptide Mimetics. *The Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71* (1), 97–102. <https://doi.org/10.1021/jo0517287>.
- (178) Oh, K.; Guan, Z. A Convergent Synthesis of New β -Turn Mimics by Click Chemistry. *Chem. Commun.* **2006**, No. 29, 3069–3071. <https://doi.org/10.1039/B606185K>.
- (179) Vahdati, L.; Fanelli, R.; Bernadat, G.; Correia, I.; Lequin, O.; Onger, S.; Piarulli, U. Synthesis and Conformational Studies of a Stable Peptidomimetic β -Hairpin Based on a Bifunctional Diketopiperazine Turn Inducer. *New Journal of Chemistry* **2015**, *39* (5), 3250–3258. <https://doi.org/10.1039/C4NJ01437E>.

- (180) Aemissegger, A.; Kräutler, V.; van Gunsteren, W. F.; Hilvert, D. A Photoinducible β -Hairpin. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (9), 2929–2936. <https://doi.org/10.1021/ja0442567>.
- (181) Robinson, J. A. β -Hairpin Peptidomimetics: Design, Structures and Biological Activities. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41* (10), 1278–1288. <https://doi.org/10.1021/ar700259k>.
- (182) Mizuno, A.; Miura, S.; Watanabe, M.; Ito, Y.; Yamada, S.; Odagami, T.; Kogami, Y.; Arisawa, M.; Shuto, S. Three-Dimensional Structural Diversity-Oriented Peptidomimetics Based on the Cyclopropylic Strain. *Organic Letters* **2013**, *15* (7), 1686–1689. <https://doi.org/10.1021/ol400469w>.
- (183) Hammond, M. C.; Bartlett, P. A. Synthesis of Amino Acid-Derived Cyclic Acyl Amidines for Use in β -Strand Peptidomimetics. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72* (8), 3104–3107. <https://doi.org/10.1021/jo062664i>.
- (184) Nowick, J. S.; Lam, K. S.; Khasanova, T. V.; Kemnitzer, W. E.; Maitra, S.; Mee, H. T.; Liu, R. An Unnatural Amino Acid That Induces β -Sheet Folding and Interaction in Peptides. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (18), 4972–4973. <https://doi.org/10.1021/ja025699i>.
- (185) Kemp, D. S.; Bowen, B. R. Synthesis of Peptide-Functionalized Diacylaminoepindolidiones as Templates for β -Sheet Formation. *Tetrahedron Letters* **1988**, *29* (40), 5077–5080. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)80683-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)80683-8).
- (186) Smith, A. B.; Keenan, T. P.; Holcomb, R. C.; Sprengeler, P. A.; Guzman, M. C.; Wood, J. L.; Carroll, P. J.; Hirschmann, R. Design, Synthesis, and Crystal Structure of a Pyrrolinone-Based Peptidomimetic Possessing the Conformation of a β -Strand: Potential Application to the Design of Novel Inhibitors of Proteolytic Enzymes. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (26), 10672–10674. <https://doi.org/10.1021/ja00052a093>.
- (187) Angelo, N. G.; Arora, P. S. Nonpeptidic Foldamers from Amino Acids: Synthesis and Characterization of 1,3-Substituted Triazole Oligomers. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (49), 17134–17135. <https://doi.org/10.1021/ja056406z>.
- (188) German, E. A.; Ross, J. E.; Knipe, P. C.; Don, M. F.; Thompson, S.; Hamilton, A. D. β -Strand Mimetic Foldamers Rigidified through Dipolar Repulsion. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (9), 2649–2652. <https://doi.org/10.1002/anie.201410290>.
- (189) Sutherell, C. L.; Thompson, S.; Scott, R. T. W.; Hamilton, A. D. Aryl-Linked Imidazolidin-2-Ones as Non-Peptidic β -Strand Mimetics. *Chemical Communications* **2012**, *48* (79), 9834. <https://doi.org/10.1039/c2cc34791a>.
- (190) Wyrembak, P. N.; Hamilton, A. D. Alkyne-Linked 2,2-Disubstituted-Indolin-3-One Oligomers as Extended β -Strand Mimetics. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (13), 4566–4567. <https://doi.org/10.1021/ja809245t>.
- (191) Xin, D.; Raghuraman, A.; Burgess, K. Extended Piperidine–Piperidinone Protein Interface Mimics. *Journal of Organic Chemistry* **2015**, *80* (9), 4450–4458. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b00300>.
- (192) Baruah, P. K.; Sreedevi, N. K.; Majumdar, B.; Pasricha, R.; Poddar, P.; Gonnade, R.; Ravindranathan, S.; Sanjayan, G. J. Sheet-Forming Abiotic Hetero Foldamers. *Chemical Communications* **2008**, No. 6, 712–714. <https://doi.org/10.1039/B713229H>.
- (193) Fisk, J. D.; Gellman, S. H. A Parallel β -Sheet Model System That Folds in Water. *Journal of the American Chemistry Society* **2001**, *123* (2), 343–344. <https://doi.org/10.1021/ja002493d>.

- (194) Freire, F.; Fisk, J. D.; Peoples, A. J.; Ivancic, M.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. Diacid Linkers That Promote Parallel β -Sheet Secondary Structure in Water. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (25), 7839–7841. <https://doi.org/10.1021/ja802042c>.
- (195) Vahdati, L.; Kaffy, J.; Brinet, D.; Bernadat, G.; Correia, I.; Panzeri, S.; Fanelli, R.; Lequin, O.; Taverna, M.; Ongeri, S.; et al. Synthesis and Characterization of Hairpin Mimics That Modulate the Early Oligomerization and Fibrillization of Amyloid β -Peptide: Synthesis and Characterization of Hairpin Mimics That Modulate the Early Oligomerization and Fibrillization of Amyloid β -Peptide. *European Journal of Organic Chemistry* **2017**, *2017* (20), 2971–2980. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700010>.
- (196) Tonali, N.; Kaffy, J.; Soulier, J.-L.; Gelmi, M. L.; Erba, E.; Taverna, M.; van Heijenoort, C.; Ha-Duong, T.; Ongeri, S. Structure-Activity Relationships of β -Hairpin Mimics as Modulators of Amyloid β -Peptide Aggregation. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *154*, 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.018>.
- (197) Holmes, D. L.; Smith, E. M.; Nowick, J. S. Solid-Phase Synthesis of Artificial β -Sheets. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (33), 7665–7669. <https://doi.org/10.1021/ja9710971>.
- (198) Zheng, J.; Liu, C.; Sawaya, M. R.; Vadla, B.; Khan, S.; Woods, R. J.; Eisenberg, D.; Goux, W. J.; Nowick, J. S. Macrocyclic β -Sheet Peptides That Inhibit the Aggregation of a Tau-Protein-Derived Hexapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (9), 3144–3157. <https://doi.org/10.1021/ja110545h>.
- (199) Cashman, T. J.; Linton, B. R. β -Sheet Hydrogen Bonding Patterns in Cystine Peptides. *Organic Letters* **2007**, *9* (26), 5457–5460. <https://doi.org/10.1021/ol7023696>.
- (200) Kier, B. L.; Anderson, J. M.; Andersen, N. H. Disulfide-Mediated β -Strand Dimers: Hyperstable β -Sheets Lacking Tertiary Interactions and Turns. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (16), 5363–5371. <https://doi.org/10.1021/ja5117809>.
- (201) Gori, A.; Wang, C.-I. A.; Harvey, P. J.; Rosengren, K. J.; Bholra, R. F.; Gelmi, M. L.; Longhi, R.; Christie, M. J.; Lewis, R. J.; Alewood, P. F.; et al. Stabilization of the Cysteine-Rich Conotoxin MrlA by Using a 1,2,3-Triazole as a Disulfide Bond Mimetic. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (4), 1361–1364. <https://doi.org/10.1002/anie.201409678>.
- (202) Ross, N. T.; Katt, W. P.; Hamilton, A. D. Synthetic Mimetics of Protein Secondary Structure Domains. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2010**, *368* (1914), 989–1008. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0210>.
- (203) Laungani, A. C.; Slattery, J. M.; Krossing, I.; Breit, B. Supramolecular Bidentate Ligands by Metal-Directed in Situ Formation of Antiparallel β -Sheet Structures and Application in Asymmetric Catalysis. *Chemistry - A European Journal* **2008**, *14* (15), 4488–4502. <https://doi.org/10.1002/chem.200800359>.
- (204) Chowdhury, S.; Mahmoud, K. A.; Schatte, G.; Kraatz, H.-B. Amino Acid Conjugates of 1,1'-Diaminoferrocene. Synthesis and Chiral Organization. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (16), 3018–3023. <https://doi.org/10.1039/B506178D>.
- (205) Chowdhury, S.; Schatte, G.; Kraatz, H.-B. How Useful Is Ferrocene as a Scaffold for the Design of β -Sheet Foldamers? *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (37), 7056–7059. <https://doi.org/10.1002/anie.200801460>.
- (206) Gellman, S. H. Minimal Model Systems for β -Sheet Secondary Structure in Proteins. *Current Opinion in Chemical Biology* **1998**, *2* (6), 717–725. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(98\)80109-9](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(98)80109-9).

- (207) Schenck, H. L.; Gellman, S. H. Use of a Designed Triple-Stranded Antiparallel β -Sheet To Probe β -Sheet Cooperativity in Aqueous Solution; *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*(19), 4869-4870. <https://doi.org/10.1021/ja973984+>.
- (208) Sharman, G. J.; Searle, M. S. Cooperative Interaction between the Three Strands of a Designed Antiparallel β -Sheet. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (21), 5291–5300. <https://doi.org/10.1021/ja9705405>.
- (209) Kortemme, T.; Ramírez-Alvarado, M.; Serrano, L. Design of a 20-Amino Acid, Three-Stranded Beta-Sheet Protein. *Science* **1998**, *281* (5374), 253–256. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.253>.
- (210) Kemp, D. S. Peptidomimetics and the Template Approach to Nucleation of β -Sheets and α -helix in peptides. *Trends in Biotechnologies* **1990**, *8*, 249-255.
- (211) Sonti, R.; Gopi, H. N.; Muddegowda, U.; Ragothama, S.; Balam, P. A Designed Three-Stranded β -Sheet in an α/β Hybrid Peptide. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (19), 5955–5965. <https://doi.org/10.1002/chem.201204327>.
- (212) Ross, J. E.; Knipe, P. C.; Thompson, S.; Hamilton, A. D. Hybrid Diphenylalkyne-Dipeptide Oligomers Induce Multistrand β -Sheet Formation. *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21* (39), 13518–13521. <https://doi.org/10.1002/chem.201502690>.
- (213) Bandyopadhyay, A.; Misra, R.; Gopi, H. N. Structural Features and Molecular Aggregations of Designed Triple-Stranded β -Sheets in Single Crystals. *Chemical Communications* **2016**, *52* (27), 4938–4941. <https://doi.org/10.1039/C6CC00127K>.
- (214) Sebaoun, L.; Maurizot, V.; Granier, T.; Kauffmann, B.; Huc, I. Aromatic Oligoamide β -Sheet Foldamers. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (5), 2168–2174. <https://doi.org/10.1021/ja412729s>.
- (215) Sebaoun, L.; Kauffmann, B.; Delclos, T.; Maurizot, V.; Huc, I. Assessing Stabilization through π - π Interactions in Aromatic Oligoamide β -Sheet Foldamers. *Organic Letters* **2014**, *16* (9), 2326–2329. <https://doi.org/10.1021/ol500512f>.
- (216) Lamouroux, A.; Sebaoun, L.; Wicher, B.; Kauffmann, B.; Ferrand, Y.; Maurizot, V.; Huc, I. Controlling Dipole Orientation through Curvature: Aromatic Foldamer Bent β -Sheets and Helix-Sheet-Helix Architectures. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139* (41), 14668–14675. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07961>.
- (217) Gopalakrishnan, R.; Frolov, A. I.; Knerr, L.; Drury, W. J.; Valeur, E. Therapeutic Potential of Foldamers: From Chemical Biology Tools To Drug Candidates? *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59* (21), 9599–9621. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00376>.
- (218) Fahs, S.; Patil-Sen, Y.; Snape, T. J. Foldamers as Anticancer Therapeutics: Targeting Protein-Protein Interactions and the Cell Membrane. *ChemBioChem* **2015**, *16* (13), 1840–1853. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500188>.

Chapitre 2. Développement d'agrafes peptidiques polaires de type guanidine

La cyclisation entre les chaînes latérales de deux résidus d'un même peptide est une technique répandue pour stabiliser la structuration en hélice α d'un peptide court.¹ Au cours du chapitre 1, nous avons vu qu'il existe différents types de macrocycles pour former des agrafes peptidiques, généralement apolaires.^{2,3} Pour compléter le répertoire de modèles macrocycliques disponibles pour stabiliser une hélice α peptidique nous avons considéré l'introduction d'une fonction originale polaire : le motif guanidine. La fonction guanidine est fréquemment rencontrée au sein des biomolécules notamment parmi les protéines porteuses du résidu arginine. Elle présente un fort caractère basique ($pK_a = 13,7$) et se trouve à l'état cationique à pH physiologique ce qui peut aider à moduler la solubilité dans l'eau d'un peptide. De plus, la charge positive de la fonction guanidine peut conférer des propriétés de pénétration cellulaire intéressantes aux peptides qu'elle compose. En effet, l'équipe de P. A. Wender a mis en évidence l'importance des résidus arginine du peptide polaire Tat₄₉₋₅₇ connu pour sa capacité à traverser les membranes des cellules et souvent utilisé comme transporteur moléculaire.⁴ Ce peptide constitue le domaine de transduction de la protéine d'activation de transcription nucléaire (Tat) codée par le VIH-1 et il est composé de neuf résidus : RKKRRQRRR. Cette équipe a démontré que lorsque ce peptide conjugué à une fluorescéine est tronqué à l'extrémité C-terminale ou à l'extrémité N-terminale (Tat₄₉₋₅₆, Tat₄₉₋₅₅ et Tat₅₀₋₅₇, Tat₅₁₋₅₇ respectivement), sa capacité à pénétrer les cellules Jurkat est diminuée.⁵ Le marquage des peptides modifiés a servi à analyser la pénétration cellulaire par cytométrie en flux et microscopie confocale. Ces expériences ont montré que la présence de résidus chargés positivement (Lys, Arg) peut donc influencer sur la capacité d'un peptide à traverser les membranes et que l'impact des résidus arginine est plus fort que celui des lysines. Une autre étude menée par S. H. Gellman a prouvé que de courts peptides- β enrichis en arginines pouvaient pénétrer les cellules HeLa.⁶ Dans ce cas, une pénétration cellulaire rapide (15 min) a été observée pour un peptide structuré en hélice 14 (*i.e.* les liaisons hydrogène forment des cycles à quatorze chaînons) en milieu aqueux et dont les motifs guanidinium sont disposés sur la même face de l'hélice. Ces travaux ont ainsi montré que l'arrangement spatial des groupements guanidinium et la stabilité structurale du peptide ont un impact direct sur l'entrée d'un oligopeptide au sein des cellules.

Un autre aspect intéressant du motif guanidine est son implication dans certains processus biologiques grâce à sa capacité à former des liaisons hydrogène ou à établir des interactions électrostatiques. Ce fait laisse envisager qu'une agrafe peptidique type guanidine, positionnée à proximité de la surface d'interaction d'une protéine partenaire, permettrait de renforcer cette interaction grâce à des contacts polaires additionnels. Par ailleurs, selon la longueur et la flexibilité des chaînes alkyles impliquées dans le macrocycle, elle permettrait également de conserver un certain caractère hydrophobe.

Lors d'un projet d'ingénierie de protéines nous nous sommes intéressés à la Ribonucléase S, un complexe enzymatique formé par un petit peptide hélicoïdal (peptide S) en interaction avec une protéine (protéine S).⁷ L'importance d'un pont salin entre les résidus Glu2 et Arg10 du peptide mettant en jeu la fonction guanidine présente sur l'arginine (**Figure 1**) a été mise en évidence.⁸ Cette fonction est essentielle à la fois pour la stabilisation de l'hélice α mais aussi dans l'interaction entre le peptide S et la protéine S et donc dans la cohésion du complexe. C'est pourquoi, nous avons choisi le peptide S comme modèle d'étude pour développer une

stratégie de stabilisation d'hélice α par un lien covalent de type guanidine N,N' -disubstituée. Par la suite, le but sera d'appliquer ce concept d'agrafes peptidiques sur différentes séquences peptidiques d'intérêt biologique.

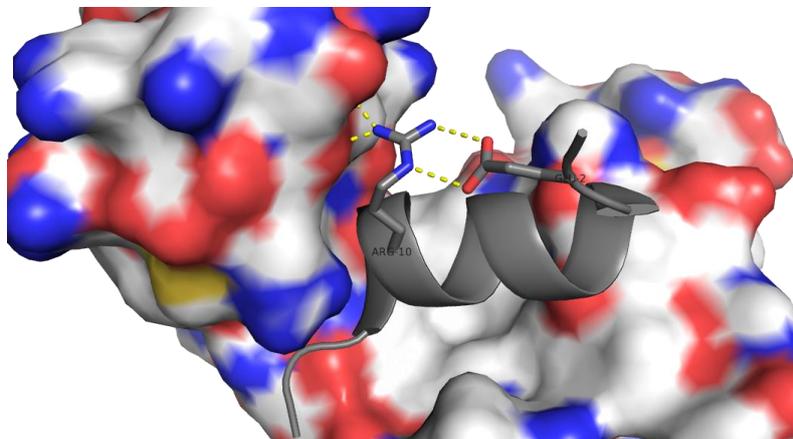


Figure 1 : Pont salin du peptide S entre les résidus Glu2 et Arg10 en interaction avec la protéine S. Les pointillés jaunes représentent les liaisons hydrogène (PDB 2NRS).

I. Stratégie de synthèse : introduction du motif guanidine lors de l'étape de macrocyclisation

Afin d'établir une stratégie de synthèse de ponts guanidine robuste, différents paramètres ont dû être pris en compte. Il était nécessaire de concevoir une voie de synthèse compatible avec l'ensemble des résidus acides aminés fonctionnels pour permettre une application sur un large choix de séquences peptidiques. Le développement de ces agrafes peptidiques devait également être compatible avec une synthèse sur support solide en utilisant des conditions de réactions douces n'altérant pas la résine utilisée comme support (*e.g.* éviter de trop hautes températures ou l'emploi de métaux). Au cours de cette partie, il sera question de détailler la mise au point de l'ensemble des étapes de synthèse d'agrafes peptidiques type guanidine.

1) Stratégie de guanidinylation sur support solide

Dans la littérature, de nombreuses réactions ont été décrites pour synthétiser des guanidines.^{9,10} Parmi les différents précurseurs permettant de former ce motif, nous avons choisi de travailler avec un groupement thiourée, compatible avec la synthèse sur support solide. Il existe différents types d'activation de ces thiourées pour générer la fonction guanidine (**Figure 2**). Les thiourées activées par un carbamate peuvent être converties en guanidine en présence de chlorure de mercure^{11,12} ou de carbodiimides comme l'EDC¹³ et le DIC¹⁴ (**Figure 2A**). Deux autres réactifs sont également utilisés pour activer une thiourée en carbodiimide : le réactif de Mukaiyama (iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium)¹⁵ et le diiode (**Figure 2B**).^{16,17} La conversion d'une thiourée en guanidine peut également être effectuée *via* une arylation en présence du réactif de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobenzène)¹⁸ ou une alkylation en présence de iodométhane^{19,20} menant ainsi à des intermédiaires isothiourées (**Figure 2C**).

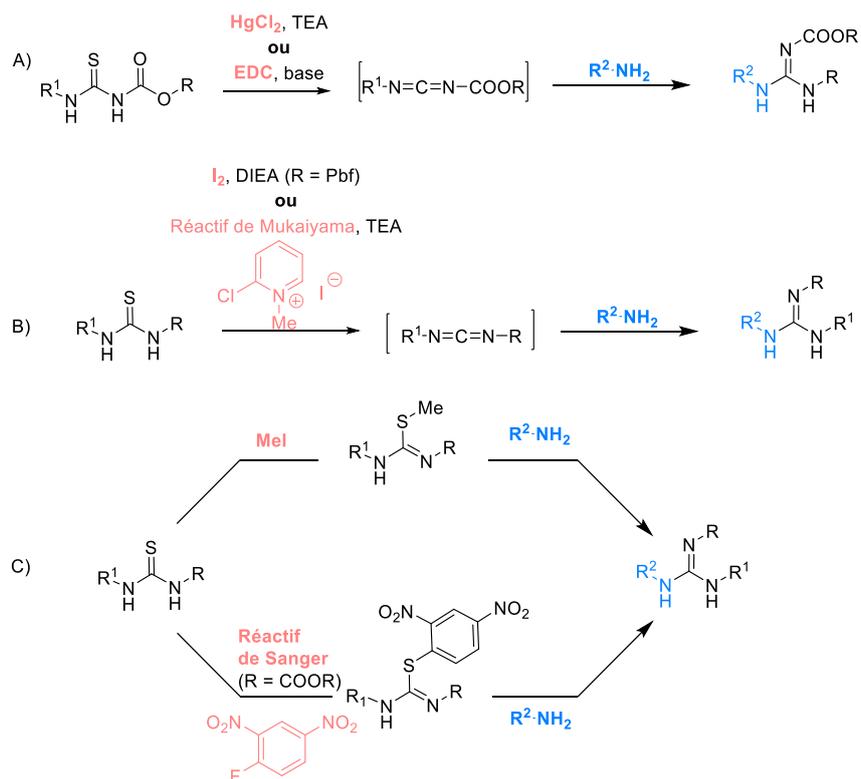


Figure 2 : Agents d'activation de thiourées vers la formation d'une fonction guanidine.

En 2005, E. Fan a rapporté la synthèse d'oligomères de guanidines à partir de monomères **1** portant un groupement azoture d'un côté et de l'autre une fonction thiourée activée par un groupement 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyle (Pbf) (Schéma 1).²¹ Le lien guanidine est formé par réaction avec l'amine primaire à coupler en présence d'EDC, *via* le passage par un intermédiaire carbodiimide. Les monomères étant protégés à l'extrémité N-terminale par un azoture, celui-ci a ensuite été réduit en présence de SnCl₂ et PhSH. Ces deux étapes ont été répétées jusqu'à atteindre l'oligomère désiré qui a finalement été clivé de la résine dans des conditions acides.

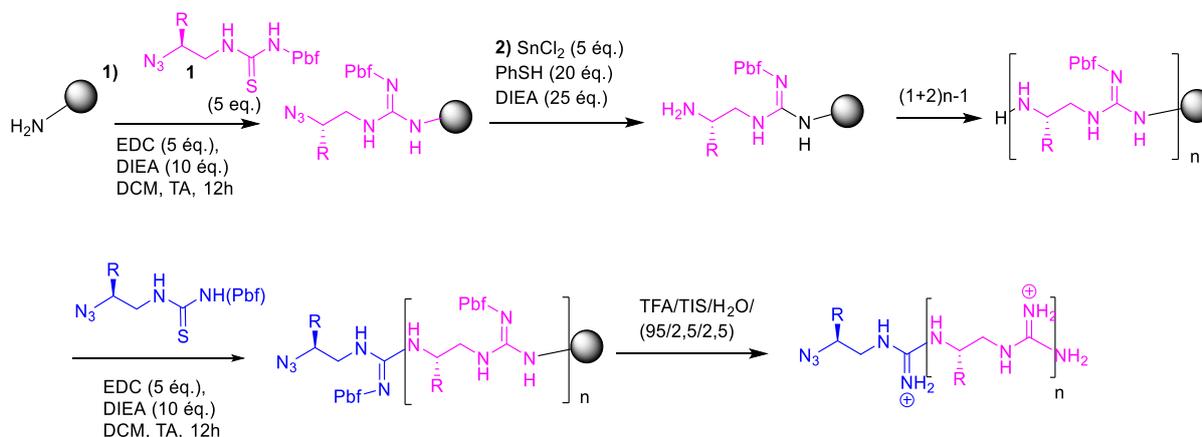


Schéma 1 : Synthèse d'oligoguanidines selon E. Fan

J. F. Hernandez a quant à lui développé une stratégie de synthèse de peptides macrocycliques *via* la formation d'une guanidine (Schéma 2).²² Le macrocycle a été synthétisé sur support

solide après l'assemblage d'un pentapeptide **2** sur la résine. Deux acides α -aminés présentant des amines primaires protégées sur leurs chaînes latérales ont été placés de part et d'autre d'une séquence constituée de trois résidus. Les groupements protecteurs de ces deux chaînes latérales, Alloc et Mtt, sont orthogonaux entre eux mais aussi aux protections des autres résidus de la séquence et sont donc compatibles avec les conditions de synthèse du peptide. Dans un premier temps, l'amine située en C-terminale portant le groupement Alloc a été sélectivement déprotégée en présence de palladium tétrakis puis, convertie en isothiocyanate **3** à l'aide de DPT (di-2-pyridylthionocarbonate). Ensuite, le deuxième groupement protecteur (Mtt) fut ôté dans des conditions acides douces et l'amine primaire générée a réagi avec l'isothiocyanate afin de fermer le macrocycle **4** en formant une fonction thiourée. Après alkylation de la thiourée avec du iodométhane, la réaction avec des amines primaires ou secondaires a conduit aux guanidines **5** désirées diversement substituées. Cette même équipe a adapté cette méthode de macrocyclisation pour préparer différents analogues d'enképhalines et moduler leur activité vis-à-vis de récepteurs opioïdes.²³

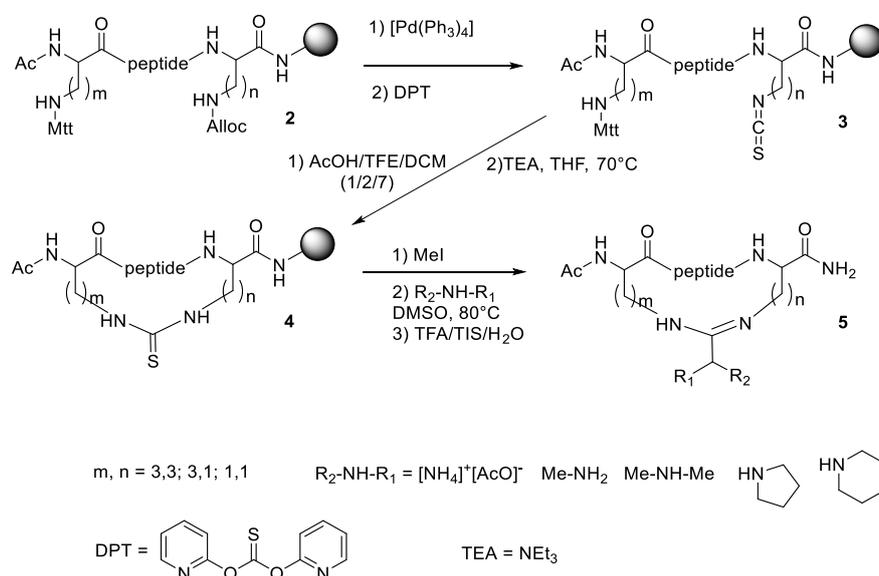


Schéma 2 : Stratégie de synthèse de peptides macrocycliques entre deux chaînes latérales de deux résidus distancés de trois résidus et portant un motif guanidine développée par J. F. Hernandez.²³

En s'appuyant sur les précédents travaux de J. F. Hernandez nous avons choisi de concevoir une stratégie de synthèse où le motif guanidine serait formé directement lors de l'étape de macrocyclisation. Le développement des agrafes peptidiques de type guanidine nécessite la présence d'amines primaires sur les chaînes latérales des deux résidus à cycliser. La séquence peptidique de départ devait donc être modifiée en remplaçant deux résidus par des lysines dotées de groupements protecteurs orthogonaux (GP₁ et GP₂) (**Schéma 3**). L'avantage d'utiliser la lysine est que l'amine primaire de la chaîne latérale est rattachée au C α par un segment hydrocarboné assez flexible pour favoriser la macrocyclisation. Ainsi, une fois que la séquence peptidique est assemblée sur support solide selon une stratégie Fmoc, la synthèse du macrocycle nécessite un jeu de déprotections sélectives des chaînes latérales impliquées dans le macrocycle. La formation du macrocycle commence par la déprotection sélective de GP₁ sur **6** pour que l'amine libre réagisse avec un dérivé isothiocyanate. Ceci mène à la formation de l'intermédiaire thiourée **7** activé par GP₃. La deuxième amine (lysine) portant le groupement

GP₂ est déprotégée afin de réagir avec la thiourée activée **7** pour former la guanidine lors de l'étape de macrocyclisation. Le groupement GP₃ est quant à lui ôté en fin de synthèse, avant de cliver le peptide de la résine.

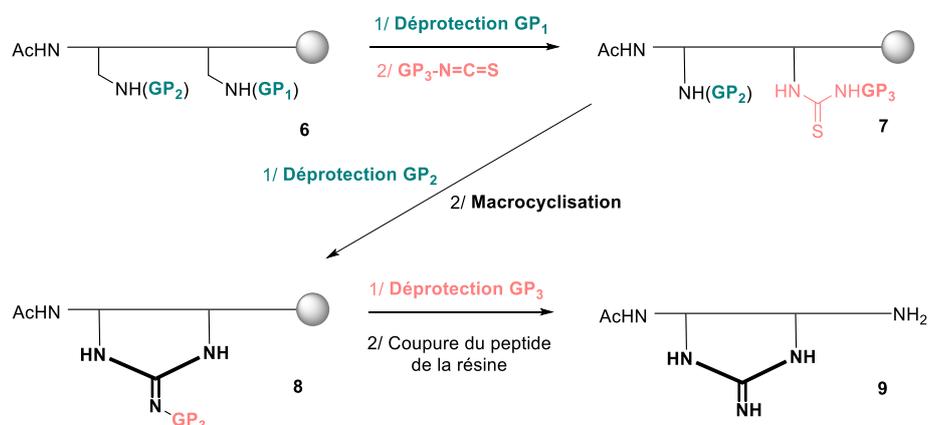


Schéma 3 : Stratégie de synthèse envisagée pour concevoir des agrafes peptidiques type guanidine.

2) Choix du groupement activateur GP₃

Une fois que cette stratégie fut établie, il a fallu statuer sur la nature du groupement à utiliser en GP₃ avant de déterminer les groupements protecteurs GP₁ et GP₂ des deux résidus lysine. Ce point était crucial car les isothiocyanates acylés sont des composés plutôt instables et difficilement isolables. Deux composés ont été synthétisés pour introduire le motif thiourée : le Pbf-isothiocyanate et le Fmoc-isothiocyanate.

Les conditions de synthèse du Pbf-NCS en présence de thioisocyanate de tétrabutylammonium ont été décrites par E. Fan.²⁴ La synthèse du dérivé Pbf-NCS **11** s'est avérée délicate car le produit se dégrade rapidement lors de sa purification sur colonne de silice ce qui a mené à un rendement de seulement 3 % (**Schéma 4A**). La synthèse a été effectuée à trois reprises en modifiant les systèmes d'éluants lors de la purification mais le composé désiré n'a pas pu être séparé du composé de départ. L'équipe d'E. Fan a également rapporté la difficulté d'isoler le Pbf-NCS puisqu'ils l'ont systématiquement obtenu avec 5 % du produit initial, le Pbf-Cl **10**, après purification. Ils ont rapporté que le composé **11** était très instable à température ambiante ce pourquoi l'étape de purification devait être rapide. En revanche, le dérivé Fmoc-isothiocyanate **13** a été synthétisé à partir du thiocyanate de potassium et de chlorure de fluorénylméthoxycarbonyle **12** avec un rendement de 54 % (**Schéma 4B**) comme décrit par J. A. Flygare.²⁵ Le produit ainsi obtenu a pu être conservé à -4 °C pendant plus de dix-huit mois sans se dégrader. D'après ces résultats, le groupement Fmoc a été retenu pour être positionné en GP₃ sur l'intermédiaire thiourée de la synthèse du pont guanidine.

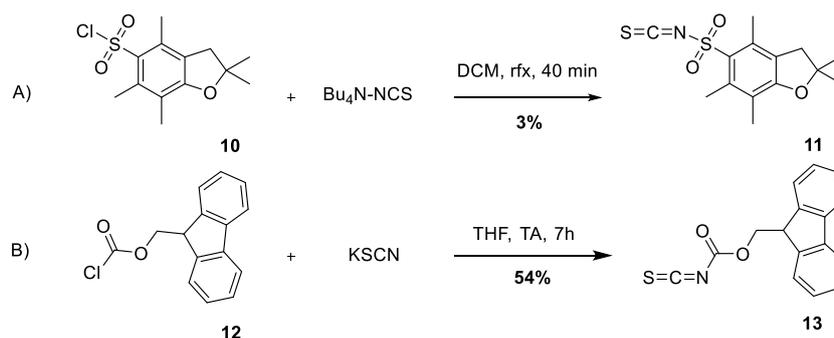


Schéma 4 : Synthèses de dérivés isothiocyanates. A) Synthèse du Pbf-NCS. B) Synthèse du Fmoc-NCS.

3) Choix des groupements protecteurs sur les chaînes latérales des lysines

Le premier enjeu synthétique pour former un macrocycle type guanidine fut de choisir judicieusement les groupes protecteurs à apporter sur les chaînes latérales des lysines. Ces groupements devaient être orthogonaux entre eux mais aussi à ceux présents sur tous les autres résidus peptidiques de la séquence. La synthèse du peptide étant réalisée selon une stratégie Fmoc, l'ensemble des groupements protégeant les chaînes latérales non impliquées dans le macrocycle sont acido-labiles comme le *tert*-butoxycarbone (Boc) ou le *tert*-butyle (*t*Bu). Par conséquent, les conditions de déprotection des groupements GP₁ et GP₂ ne devaient pas solliciter de conditions acides fortes, ni de conditions basiques, pour être compatibles avec la synthèse peptidique et la déprotection du Fmoc. Alors, deux couples de groupements protecteurs, disponibles commercialement, présentaient les caractéristiques requises : Alloc/Mtt et Alloc/*iv*Dde (**Figure 3**). Effectivement, l'allyloxycarbone dit Alloc est enlevé *via* une catalyse au Palladium tétrakis et pour ôter le groupement Mtt (méthyltrityle) des conditions acides douces sont nécessaires mais restent tout à fait compatibles avec les protections des autres résidus de la séquence peptidique.^{26,27} Le composé *iv*Dde (1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidène)-3-méthylbutyle) quant à lui, requiert généralement une réaction d'hydrazinolyse.²⁸

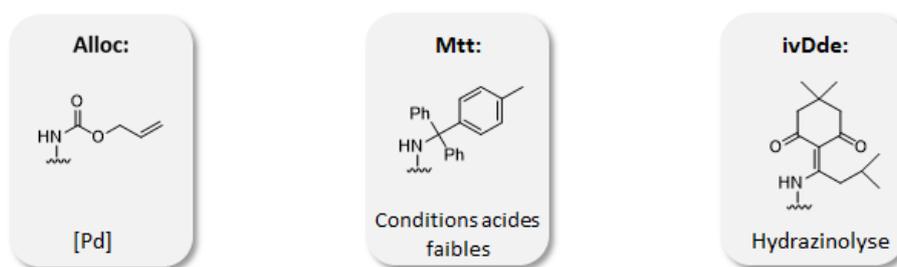


Figure 3 : Groupements protecteurs compatibles avec la stratégie de synthèse d'un pont guanidine. Les conditions de déprotection sont écrites en dessous de chaque groupement.

La synthèse de séquences peptidiques dérivées du peptide S a été envisagée comportant soit le couple Alloc/*iv*Dde ou Alloc/Mtt comme groupements protecteurs : KK(GP₂)TAAAKFEK(GP₁)QHMDS. La première finalité était de déterminer si ces groupements interfèrent dans l'efficacité de synthèse du peptide et de mettre en place des conditions optimales de déprotection. En fonction de ces critères, l'un de ces jeux de groupements protecteurs a dû être choisi pour intervenir dans la conception de nos agrafes peptidiques.

Les séquences peptidiques décrites au cours de ce chapitre ont été synthétisées sur un synthétiseur automatique (CEM Liberty Blue) à partir d'une résine de polystyrène TFA labile (MBHA Rink amide) chargée à 0,52 mmol/g et d'acides α -aminés commerciaux de type : Fmoc-aa-OH. Les réactions de couplage ont été effectuées en présence de DIC et de l'additif Oxyma qui est une alternative à l'HOBt et qui a pour rôle d'éviter des réactions secondaires et de supprimer l'épimérisation.²⁹ Pour la déprotection des groupements Fmoc, une solution à 20 % de pipéridine dans le DMF a été utilisée (**Schéma 5**). Enfin, l'extrémité N-terminale a été acétylée en présence d'anhydride acétique pour ajouter un accepteur de liaisons hydrogène supplémentaire. Différentes transformations ont ensuite été effectuées sur support solide suivies d'un clivage en conditions acides à l'aide du mélange TFA/H₂O/TIS/EDT (94/2.5/0.1/2.5). L'éthylène dithiol (EDT) sert à limiter l'oxydation de la méthionine en sulfoxyde et le triisopropylsilane (TIS) est utilisé pour capter les cations libérés.

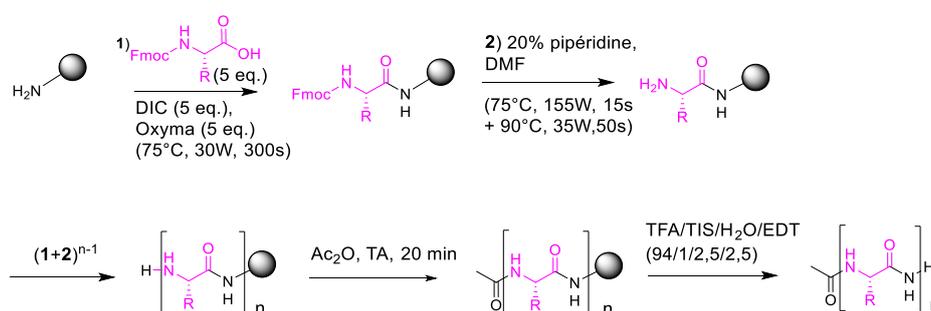


Schéma 5 : Synthèse de peptides sur support solide assistée par micro-ondes.

Le suivi des différentes étapes de synthèse a été assuré par des micro-clivages dans les conditions précédemment mentionnées pour procéder à des analyses HPLC et LC/MS et caractériser ainsi chaque intermédiaire formé. Le système RP-HPLC utilisé présente un gradient linéaire 10 à 100 % de B (0.1 % TFA dans CH₃CN) dans A (0.1 % TFA dans H₂O) en 10 minutes avec détection UV à 200 nm.

a) Couple Alloc/ivDde

i. Synthèse du peptide

Une première séquence peptidique (**P1**) issue du peptide S a été synthétisée en remplaçant les résidus 2 et 10 par des lysines dont les chaînes latérales sont protégées respectivement par les groupements ivDde et Alloc : Ac-KK(**ivDde**)TAAAKFEK(**Alloc**)QHMDS. Il a semblé plus prudent d'introduire le résidu portant le groupement protecteur le plus encombré (ivDde) en fin de synthèse, (*i.e.* vers l'extrémité N-terminale), afin d'éviter au maximum de possibles délétions dues à l'encombrement stérique. L'étape de couplage de chaque acide α -aminé a été optimisée en faisant varier la température de chauffage aux micro-ondes. En réalisant des couplages à 90 °C/35 W, le composé souhaité n'a été obtenu qu'avec une pureté de 52 %. Effectivement, les analyses HPLC et LC/MS ont révélé la formation d'un produit secondaire majoritaire provenant de la délétion d'une lysine protégée par un groupement Boc. A priori celle-ci correspondait à celle située en fin de séquence suivant la Lys(ivDde). Alors, cette synthèse fut optimisée en doublant le nombre de couplages pour ce dernier résidu et le peptide désiré **P1** a été obtenu avec une très bonne pureté de 90 %. La synthèse a également été envisagée en utilisant des

conditions de couplages plus douces à 75 °C/30 W mais la pureté du peptide a drastiquement diminué à 43%.

ii. Déprotection du groupement Alloc

Le groupement Alloc a été enlevé par le biais d'une catalyse au palladium tétrakis en présence de phényle silane dans le dichlorométhane à température ambiante et sous atmosphère inerte (**Schéma 6**). La réaction a été réalisée une première fois durant trois heures mais l'analyse HPLC a montré que la conversion en produit **P2** n'était que de 61 %. La réaction fut relancée dans les mêmes conditions que précédemment pendant une heure pour arriver à une conversion complète et une pureté de 73 %.

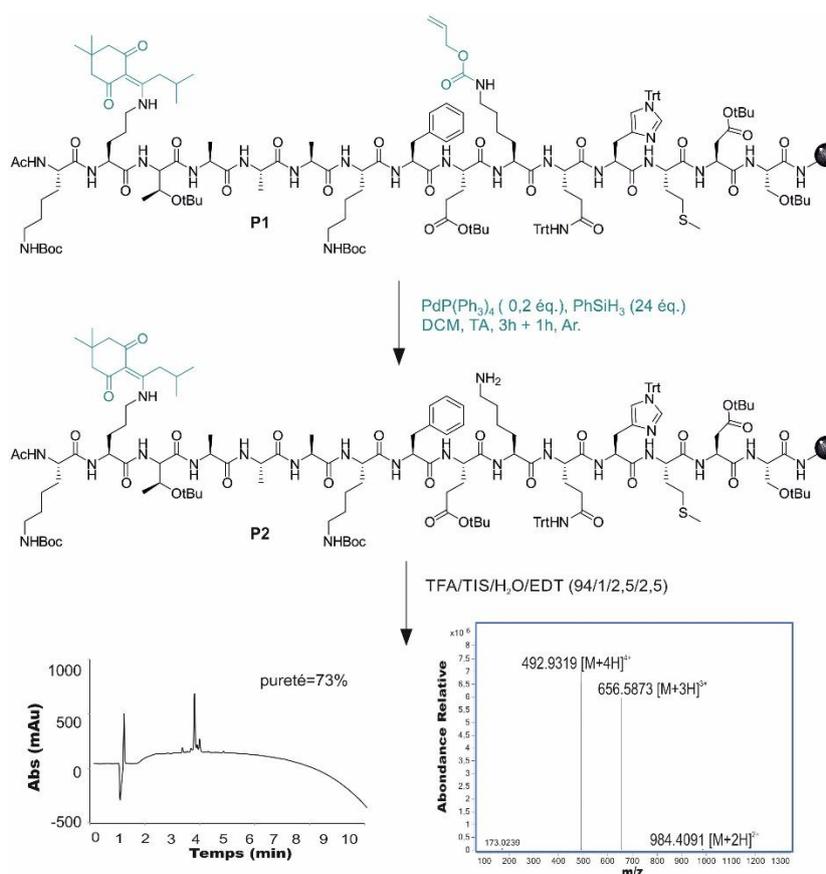


Schéma 6 : Déprotection du groupement Alloc sur le peptide **P1**. Le chromatogramme HPLC et le spectre de masse du composé brut résultant **P2** ont été obtenus à l'issue d'un microclivage. HPLC : gradient 10 à 100 % de B (0.1 % TFA dans CH_3CN) dans A (0.1 % TFA dans H_2O), 10 min.

iii. Optimisation de l'introduction du motif thiourée

Après avoir vérifié l'efficacité des conditions de déprotection de l'Alloc, nous avons cherché à optimiser la formation de la thiourée **P3** (**Schéma 7**). Pour ce faire, l'amine libre du peptide issue de la déprotection du groupement Alloc, a été mise à réagir avec le Fmoc-isothiocyanate en excès (5 équ.) dans le dichlorométhane, pendant 30 min. La conversion totale en thiourée **P3** a bien eu lieu. La réaction fut retentée en diminuant le nombre d'équivalents (1 équ.) du dérivé isothiocyanate. Dans ce cas, la conversion a été complète en 1h ce qui a permis de diminuer la quantité nécessaire d'isothiocyanate pour une durée de réaction totale correcte.

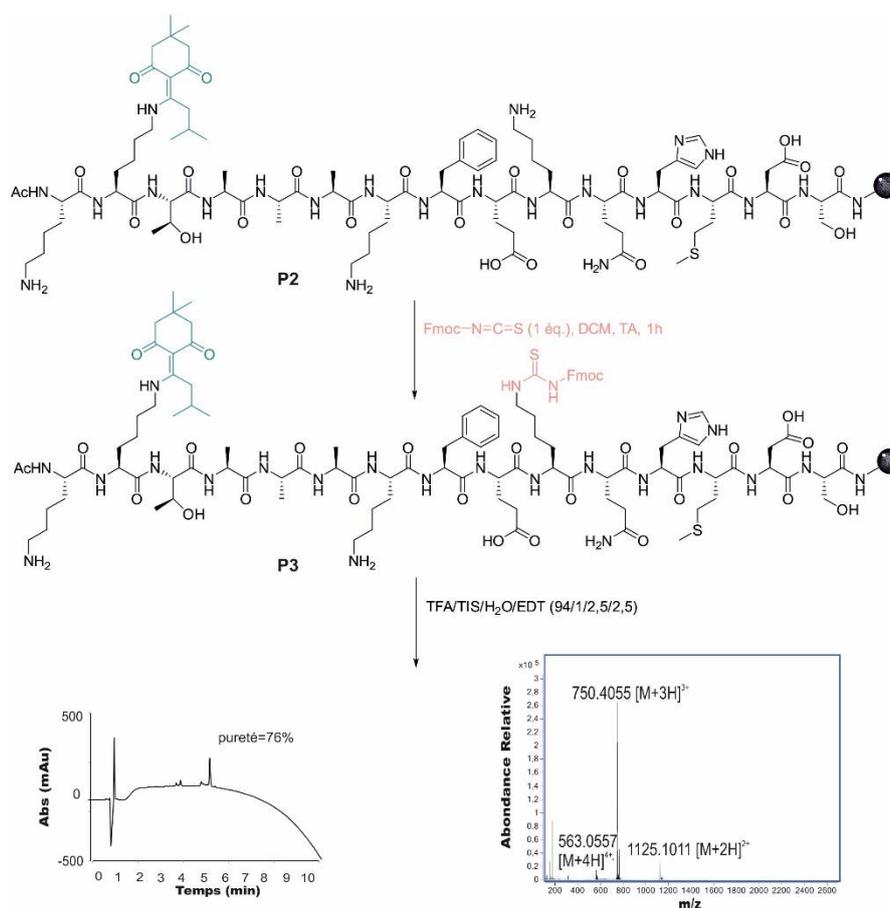


Schéma 7 : Introduction du motif thiourée sur le composé **P2**. Le chromatogramme HPLC et le spectre de masse du composé brut résultant **P3** ont été obtenus à l'issue d'un microclivage. HPLC : gradient 10 à 100 % de B (0.1 % TFA dans CH₃CN) dans A (0.1 % TFA dans H₂O), 10 min.

iv. Déprotection ivDde

Des essais quant à la déprotection de l'ivDde ont été effectués en parallèle de ceux réalisés sur l'Alloc. Le groupement ivDde est généralement déprotégé par le biais d'une hydrazinolyse en présence d'hydrazine hydratée.²⁸ Cependant, il a été décrit que le Fmoc peut être rapidement déprotégé en présence d'hydrazine. Ce fait nécessiterait donc de déprotéger l'ivDde en première étape de synthèse (GP₁) avant l'introduction du motif Fmoc-thiourée. Il n'est pas impossible que l'hydrazine puisse réduire également le motif allylique ce pourquoi, nous nous sommes également intéressés à d'autres conditions de déprotection de l'ivDde.³⁰ M. Bradley a notamment utilisé de l'hydroxylamine en présence d'imidazole solubilisés dans un mélange NMP/DCM, en se basant sur le fait que le Fmoc est sensible aux conditions basiques et que la déprotection du Dde nécessite un nucléophile effectuant une *trans* enamination.³¹ Cette équipe a observé que la déprotection de l'éthyle de 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxacyclohexylidène) (Dde) a eu lieu en présence d'hydroxylamine/imidazole sans altérer les groupements Alloc et Fmoc d'une même séquence. Des premiers essais ont été effectués avec ces deux réactifs pour déprotéger l'ivDde à partir du peptide **P1** (Tableau 1). Plusieurs conditions ont été testées en faisant varier le nombre d'équivalents, le temps de réaction ou le solvant mais ceux-ci ne se sont pas avérés fructueux puisqu'au mieux une déprotection partielle a été observée comme le retranscrivent les résultats résumés dans le tableau. En effet, la conversion en produit désiré

P4 est restée très faible (11 %) même en très larges excès d'hydroxylamine et les essais réalisés en présence d'hydrazine ont manqué de réplicabilité. Plus récemment, S. Lokey *et al.* ont rapporté que le groupement Dde peut être également orthogonal au groupement Fmoc lorsque la réaction de déprotection est effectuée en présence de borohydrure de sodium à partir du peptide **P3**.³² Alors, ce troisième réactif a été envisagé pour parvenir à déprotéger le groupement ivDde mais a mené systématiquement à la déprotection du Fmoc du fait du temps de réaction long. L'augmentation du nombre d'équivalents de NaBH₄ a effectivement permis d'ôter le groupement ivDde mais non sans déprotéger le Fmoc également.

Tableau 1 : Conditions testées pour déprotéger le groupement ivDde à partir du peptide ^a **P1** et ^b **P3**.

Réactif	Equivalents	Solvants	Temps	Conversion
Hydroxylamine^a NH₂OH.HCl/imidazole	10 éq./10 éq.	NMP/DMF	2h	0 %
	51 éq./38 éq.	NMP/DCM	1h30	0 %
	514 éq./385 éq.	NMP/DCM	1h30	11 % (P4)
Hydrazine^a N₂H₄.H₂O	21 éq.	DMF DMF	3h	30 % (P4)
			16h	0 % Traces de produit désiré
Borohydrure de sodium^b NaBH₄	1 éq.	Ethanol/THF	6h	0 % Déprotection Fmoc
	10 éq.	Ethanol/THF	15h	0 % Déprotection ivDde et Fmoc

Au regard des résultats obtenus pour la déprotection de l'ivDde qui était incomplète quelles que soient les conditions utilisées, l'emploi de ce groupement protecteur était fortement compromis. Alors, la poursuite du projet s'est dirigée sur le couple Alloc/Mtt.

b) Couple Alloc/Mtt

i. Synthèse du peptide

Un premier fait à considérer quant à l'utilisation du couple Alloc/Mtt est que le groupement Mtt est sensible aux conditions acides. Par conséquent, les analyses assurant le suivi réactionnel et résultantes d'un clivage au TFA montrent systématiquement la déprotection du groupement Mtt. La séquence peptidique envisagée **P5** a été synthétisée, comprenant une lysine protégée par le Mtt en position 2 tandis que la lysine portant le groupement Alloc a été placée en position 10. Le peptide **P5** a été obtenu avec une excellente pureté (> 90 %) à la fois dans des conditions douces de couplages à 75 °C et aussi à 90 °C.

Ce peptide a également été synthétisé en inversant les positions des lysines comportant les groupements protecteurs Alloc et Mtt. Lors d'une première synthèse, le peptide **P6** fut obtenu avec une faible pureté de 6 % car le produit majoritaire formé résultait de la délétion des deux résidus d'intérêt Lys(Alloc) et Lys(Mtt). La synthèse fut retentée en doublant le nombre de couplages pour ces deux résidus critiques. Cette fois-ci, le peptide attendu n'a pas été formé

puisque'un peptide résultant de la délétion des résidus 3 à 9 a été principalement récupéré. L'insertion de la lysine(Mtt) en position 10 compliquait trop la synthèse du peptide pour continuer le développement de ponts guanidine avec cette séquence.

Le choix de la séquence de départ s'est donc porté sur le peptide **P5** pour s'intéresser aux conditions de déprotection des groupements Alloc et Mtt qui le composent.

ii. Déprotection du groupement Alloc

Le groupement Alloc fut déprotégé dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le couple Alloc/ivDde selon une catalyse au palladium. Après 2h de réaction, la conversion en **P6** n'était que de 71 % et la réaction fut relancée pendant 1h. Cette fois-ci, une conversion à 84 % a été observée. Pour atteindre une conversion complète, la déprotection de l'Alloc fut renouvelée une seconde fois pendant 1h (**Schéma 8**). Par la suite, il a été déterminé que la conversion totale pouvait être obtenue en faisant réagir à deux reprises le peptide avec les agents de déprotection pendant 2h.

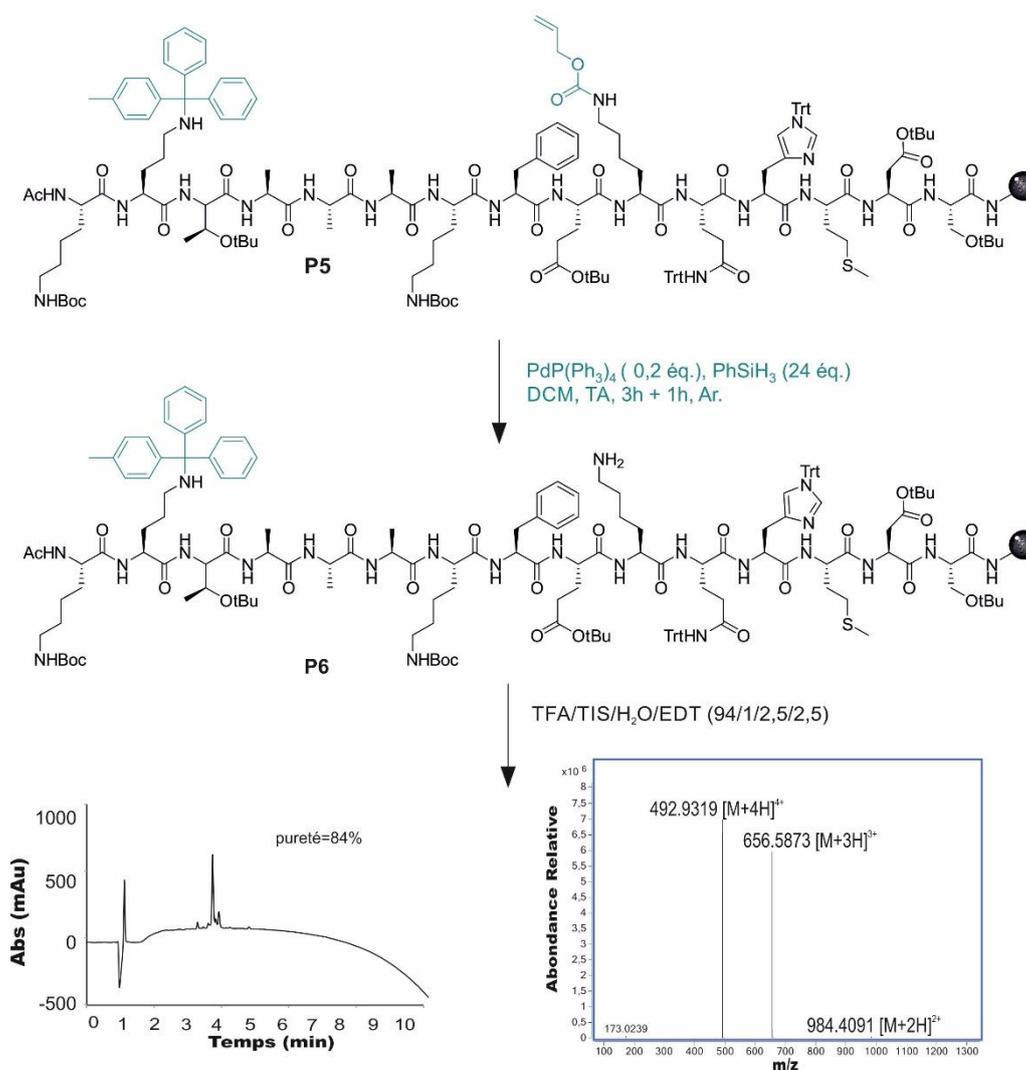


Schéma 8 : Déprotection du groupement Alloc sur le peptide **P5**. Le chromatogramme HPLC et le spectre de masse du composé brut résultant **P6** ont été obtenus à l'issue d'un microclivage. HPLC : gradient 10 à 100 % de B (0.1 % TFA dans CH_3CN) dans A (0.1 % TFA dans H_2O), 10 min.

iii. Formation de la thiourée

Dans l'optique de générer le macrocycle, la deuxième étape de synthèse requiert l'insertion du motif thiourée. Les résultats précédemment obtenus sur le peptide comportant l'ivDde ont montré la possibilité d'optimiser la réaction en utilisant un seul équivalent de Fmoc-NCS. Cette même condition a été appliquée sur l'intermédiaire **P6** et le suivi de la réaction a également montré une conversion totale en **P7** après 1h de réaction (**Schéma 9**). Le chromatogramme HPLC réalisé suite à cette étape a révélé un seul produit majoritaire avec une très bonne pureté de 85 %.

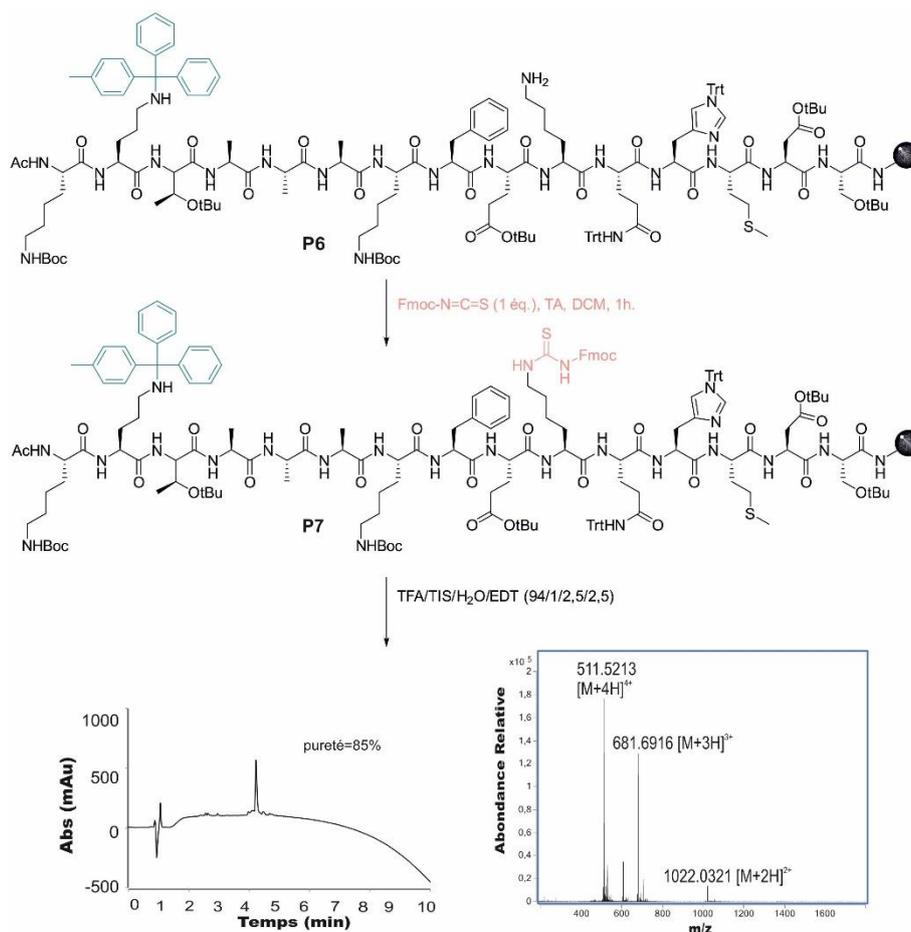


Schéma 9 : Introduction du motif thiourée sur **P6**. Le chromatogramme HPLC et le spectre de masse du composé brut résultant **P7** ont été obtenus à l'issue d'un microclivage HPLC : gradient 10 à 100 % de B (0.1 % TFA dans CH₃CN) dans A (0.1 % TFA dans H₂O), 10 min.

iv. Déprotection du groupement Mtt

Il a été mentionné auparavant que le Mtt s'enlève dans des conditions acides douces ce qui rend délicat le suivi de sa réaction. En effet, il est automatiquement déprotégé lors du « microclivage » en présence d'acide trifluoroacétique (TFA), ce qui empêche d'observer directement sa conversion sur un chromatogramme HPLC. Or, trois conditions menant à la déprotection de ce groupement ont été envisagées: DCM/TFE/AcOH (7/2/1), DCM/TFE/HFIP/TES (6,5/2/1/0,5), DCM/TFA/TIS (7/1/2).^{27,22} Pour optimiser cette étape, il a donc été nécessaire de choisir le mélange le plus efficace pour déprotéger le Mtt. Les tests

colorimétriques de Kaiser ou celui au TNBS sont généralement utilisés pour révéler des amines primaires présentes sur le peptide accroché à la résine, en bleu et orange respectivement. Ceux-ci permettent donc de vérifier si la réaction de déprotection a effectivement lieu mais il est difficile d'avoir une information quantitative concernant la conversion en amine déprotégée. Pour pallier ce problème, une acétylation suivant la réaction de déprotection a été envisagée pour les trois conditions mentionnées précédemment afin de quantifier la proportion de lysine qui a été déprotégée après microclivage. Les résultats quant aux essais de déprotection du Mtt à partir du composé **P7** sont retranscrits dans le **Tableau 2**. Il est apparu qu'une conversion complète est possible en utilisant le mélange contenant l'HFIP lorsqu'il est mis à réagir à trois reprises sur le peptide **P7** durant 30 min. En revanche, pour les deux autres conditions, une conversion partielle en **P8** a été observée sachant que la déprotection en présence d'acide acétique a été réitérée jusqu'à cinq reprises pour atteindre une conversion de seulement 35 %.

Tableau 2 : Résultats relatifs à la déprotection du groupement Mtt sur **P7** selon différentes conditions à température ambiante. Les taux de conversion ont été déterminés à partir des chromatogrammes HPLC des composés acétylés issus de chaque condition.

Conditions de déprotection du Mtt	Temps	Conversion en P8
DCM/TFE/AcOH (7/2/1)	3x30 min	29 %
	5x30 min	35 %
DCM/TFE/HFIP/TES (6,5/2/1/0,5)	3x30 min	100 %
DCM/TFA/TIS (7/1/2)	3x30 min	52 %

Le mélange DCM/TFE/HFIP/TES a donc été sélectionné pour déprotéger le groupement Mtt sur l'ensemble des synthèses entreprises dans ce projet.

4) Etape de macrocyclisation

La réaction de macrocyclisation générant le motif guanidine a d'abord été tentée à partir du peptide **P8**, soit une cyclisation en $(i, i+8)$ correspondant à l'analogue covalent du pont salin Glu2/Arg10 du peptide S natif. La guanidinylation a été testée avec différents réactifs : les carbodiimides EDC et DIC ou le réactif de Mukaiyama. Aucune conversion en produit désiré n'a été observée par contre ces essais ont révélé l'instabilité du groupement Fmoc situé sur la thiourée en présence de DMF. En effet, la déprotection du Fmoc a régulièrement eu lieu à l'issue de ces tentatives de macrocyclisation lorsque la résine restait en contact prolongé avec le DMF. Nous avons donc veillé par la suite à privilégier le DCM que ce soit comme solvant de réaction ou lors des rinçages. De plus, il semblerait que la taille du macrocycle ne soit pas suffisante pour permettre une cyclisation en $(i, i+8)$ dans ces conditions. Une nouvelle séquence simplifiée (**P9**) a donc été considérée pour revenir à un macrocycle plus court en $(i, i+4)$ avec les groupements Mtt et Alloc en position 2 et 6, respectivement. Les résidus His12 et Met13 de cette séquence ont été mutés par des résidus Ala pour limiter les réactions secondaires.

La synthèse de la première agrafe peptidique a donc été réalisée sur la séquence modèle **P9** en $(i, i+4)$ (**Schéma 10**). Pour commencer, le groupement Alloc a été déprotégé selon les conditions

précédemment établies pour que l'amine primaire **P10** ainsi libérée puisse réagir avec le dérivé isothiocyanate. Le produit **P11** résultant comportait une thiourée activée par un groupement Fmoc et la pureté du produit s'est élevée à 81 %. Le deuxième groupement protecteur (Mtt) a été enlevé dans des conditions acides en présence du mélange HFIP/TFE/TES/DCM. Ensuite, l'agent de couplage qui a été envisagé pour l'étape de macrocyclisation est le carbodiimide EDC en présence d'une base, la DIEA, dans le DCM. La réaction a été réalisée une première fois en ajoutant un seul équivalent d'EDC et de DIEA sur la thiourée **P12**. Suite à 4h d'agitation à température ambiante, une conversion de 29 % en produit cyclisé **P13** a été constatée. La conversion totale fut observée après répétition de la réaction sur une durée de 22h. Pour tenter d'accélérer la réaction et limiter la déprotection du Fmoc, la réaction fut de nouveau tentée en apportant cette fois-ci 1,2 équivalent d'EDC et DIEA. Dans ce cas, une conversion de 48 % en produit macrocyclisé a été constatée après 12h de réaction. Cette dernière a donc été renouvelée dans les mêmes conditions pour atteindre une conversion totale et former le produit **P13** désiré avec une pureté de 60 %. Finalement, l'agrafe peptidique **AP1** fut obtenue après la déprotection du Fmoc de la guanidine portée par **P13** dans des conditions basiques (20 % de pipéridine dans le DMF). Le peptide a été clivé de la résine en présence du mélange TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5 ; v/v/v). Le chromatogramme HPLC final montre que la conversion du composé **P13** en produit **AP1** a été complète et la pureté du produit brut était de 58 %. Après purification par HPLC préparative en phase inverse, le peptide **AP1** a été récupéré avec un rendement de 19 % (34 mg).

Ainsi, les différentes étapes de synthèse ont été mises au point pour développer des ponts guanidine entre deux résidus d'une séquence peptidique séparés par trois résidus. Ces résultats prometteurs ont ouvert la voie pour étudier ensuite l'impact de variations, telles que la taille et la position du macrocycle, sur le déroulement de la synthèse de ces macrocycles.

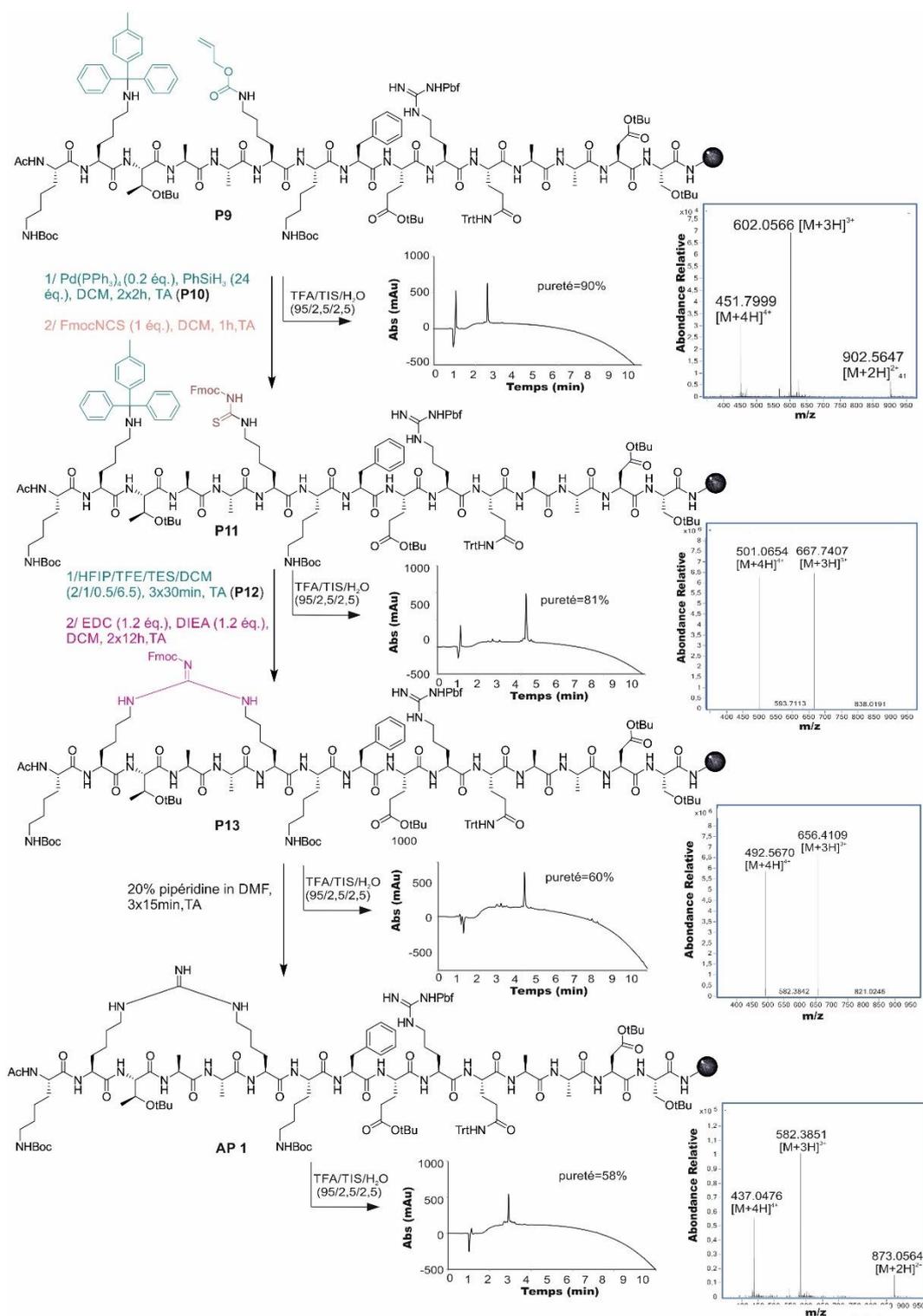


Schéma 10 : Schéma de synthèse du pont guanidine **AP1**. Le chromatogramme HPLC et le spectre de masse des composés bruts **P9**, **P11**, **P13** et **AP1** ont été obtenus à l'issue d'un microclivage HPLC : gradient 10 à 100 % de B (0.1 % TFA dans CH₃CN) dans A (0.1 % TFA dans H₂O), 10 min.

II. Champs d'application de l'agrafe peptidique guanidine

1) Macrocyclisation en (i, i+4) : influence de la position et de la taille du macrocycle

a) Synthèse des ponts guanidine entre les résidus [K6-K10] et [O2-O6]

Pour faire valoir cette stratégie pour la synthèse de nouvelles agrafes peptidiques de type guanidine, il semblait intéressant de montrer que celle-ci peut être effectuée à différentes positions de la séquence. Alors, le pont guanidine a été construit entre les positions 6 et 10 du même peptide modèle en utilisant les conditions de réaction qui ont été précédemment optimisées (**Tableau 3**, ligne [K6-K10]). La synthèse du peptide ainsi que les étapes de déprotection des groupements Alloc et Mtt et la formation de la thiourée se sont déroulées de manière similaire à la séquence modèle [K2-K6]. Cependant, il semble que la macrocyclisation se soit effectuée plus rapidement entre les positions 6 et 10 qu'entre les résidus 2 et 6. En effet, après 12h de réaction, la macrocyclisation en (2, 6) présentait un taux de conversion inférieur de moitié à celui en (6, 10). L'intermédiaire **P18** obtenu présentait donc une excellente pureté de 76 % et aucun produit secondaire n'a été formé. Une fois que le groupement Fmoc a été ôté, en conditions basiques, le peptide **AP2** a été clivé de la résine et la pureté du composé brut s'élevait à 67 %. Après purification, le peptide **AP2** a finalement été obtenu avec un rendement de 10 %, soit 18 mg. Le rendement plus faible dans ce cas s'explique par une perte de produit lors de la purification en raison d'un dysfonctionnement de la RP-HPLC préparative.

Tableau 3 : Comparaison des résultats de synthèse des peptides **AP1**, **AP2** et **AP3**. A = synthèse du précurseur peptidique ; B = formation de la thiourée acylée ; C = produit de macrocyclisation ; D = produit final (brut après clivage de la résine). Les puretés des différentes étapes sont indiquées entre parenthèse et les rendements après purification finale sont également rapportés.

Mutations (i, i+4)	Séquences	A	B	C	D	Rende- ments
[K2-K6]	Ac-KK(Mtt)TAAK(Alloc)KFERQAADS	P9 (90 %)	P11 (81 %)	P13 (60 %)	AP1 (58 %)	19 %
[K6-K10]	Ac-KETAAK(Mtt)KFEK(Alloc)QAADS	P14 (85 %)	P16 (79 %)	P18 (76 %)	AP2 (67 %)	10 %
[O2-O6] *O=ornithine	Ac-KO(Mtt)TAAO(Alloc)KFERQAADS	P19 (88 %)	P21 (80 %)	P23 (80 %)	AP3 (59 %)	16 %

Pour étendre les possibilités d'accès aux agrafes peptidiques type guanidine, une variation de la taille du macrocycle en (i, i+4) a également été effectuée en envisageant des chaînes latérales plus courtes. Ceci permettrait à terme de vérifier l'impact de l'apport de contraintes plus ou moins flexibles sur l'hélicité d'un peptide avec ce type de macrocycle. Pour ce faire, des résidus ornithines ont été incorporés aux positions 2 et 6 du peptide modèle étudié (**Tableau 3**, ligne [O2-O6]). Ces acides α -aminés non naturels comportent un carbone de moins que les lysines sur leur chaînes latérales ce qui réduit la taille du macrocycle de deux atomes. Par ailleurs, les

dérivés Fmoc-Orn-OH protégées par un groupement Alloc ou Mtt sont également disponibles commercialement. La synthèse de ce pont guanidine a également été réalisée à partir de la séquence modèle précédemment utilisée et en suivant le même procédé optimisé. L'ornithine comportant l'Alloc a été placée en position 6 et celle avec le Mtt en position 2 pour mener au peptide **P19** avec une pureté de 88 %. La déprotection du groupement Alloc a été réalisée en 2x2h de réaction (peptide **P20**) puis le motif thiourée a été introduit sur l'ornithine en position 6 (**P21**) avec une pureté de 80 % comparable à celles des synthèses évoquées précédemment. La macrocyclisation a également été réalisée avec succès puisque la pureté du peptide **P23**, à l'issue de cette étape, était toujours de l'ordre de 80 %. Elle s'est avérée toutefois plus lente, puisqu'au bout de 12h de réaction, une conversion de seulement 34 % a été observée contre 48 % pour la séquence équivalente avec les résidus lysines. La formation du macrocycle a pu être complètement accomplie en réitérant la réaction 12h de plus. Ainsi, réduire la longueur des chaînes latérales impliquées dans le macrocycle semble altérer la vitesse de réaction ce qui est certainement dû au fait que le macrocycle résultant est plus contraint dans ce cas. La synthèse du peptide **AP3** a été menée à bien et le chromatogramme HPLC du composé brut a montré une pureté finale de 59 %. Le peptide **AP3** a été purifié et 27mg de produit ont été récupérés soit un rendement de 16 %.

b) Etudes conformationnelles en solution

Pour les peptides, il est possible d'observer la signature de l'hélice α par dichroïsme circulaire avec deux minima caractéristiques à 208 nm et 222 nm. Le pourcentage de structuration en hélice dans chacune des séquences peptidiques hélicoïdales a été déterminé en supposant une relation linéaire de l'ellipticité à 222 nm, utilisant l'équation suivante :

$$fh = ([\theta]_{222} \text{ obs} - [\theta]c) \div ([\theta]_{222\infty} - [\theta]c).$$

Pour laquelle $[\theta]c$ et $[\theta]_{222\infty}$ correspondent respectivement à l'ellipticité molaire d'un peptide non structuré et à l'ellipticité molaire d'une séquence peptidique totalement structurée en hélice α .^{33,34} Ces deux paramètres peuvent être exprimés de la façon suivante :

$$[\theta]c = (2220 - 53T) \text{ et } [\theta]_{222\infty} = (-44000 + 250T) \times (1 - k \div N).$$

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

Les peptides possédant le pont guanidine **AP1**, **AP2** et **AP3** ont fait l'objet d'études par dichroïsme circulaire afin d'évaluer l'impact de la position et la taille du macrocycle sur une séquence peptidique donnée. Le peptide **P24** a également été synthétisé pour comparer l'influence de l'introduction d'un pont guanidine sur une séquence peptidique par rapport à son analogue linéaire. Le peptide **P24** comporte donc deux lysines en position 2 et 6 : Ac-KKTAAKKFERQAADS. Les expériences ont été réalisées dans l'eau à 3 °C et les résultats ont été retranscrits sous la forme de graphiques retraçant l'ellipticité molaire par résidu en fonction de la longueur d'onde pour chaque séquence (**Figure 4**). Il est apparu que le peptide linéaire **P24**

adopte une structure aléatoire avec un maximum à 218 nm et un minimum à 208 nm en solution. Ceci était prévisible puisque les résidus stabilisant l'hélice α du peptide *S* via des interactions entre les chaînes latérales, notamment le Glu2 impliqué dans le pont salin avec Arg10, ont été remplacés par une alanine ou une lysine. La présence du macrocycle guanidine en (*i, i+4*) entre les positions 2 et 6 a peu d'influence sur la structuration du peptide quelle que soit la longueur des chaînes latérales (**Figure 4, Tableau 4**, peptides **AP1** et **AP3**). En revanche, pour l'agrafe peptidique **AP2** entre les positions 6 et 10, un signal caractéristique d'une structure hélicoïdale a été observé (**Figure 4**). La courbe obtenue pour **AP2** a atteint une valeur d'ellipticité molaire par résidu de -8792 soit une hélicité calculée de 30 % (**Tableau 4**). Le placement du pont guanidine entre les positions 6 et 10, c'est-à-dire au centre du peptide, a permis de stabiliser l'hélice. Ceci peut aussi s'expliquer par la présence en position 2 de l'acide aminé Glu qui a sûrement été en mesure de rétablir un pont salin avec la guanidine ainsi apportée.

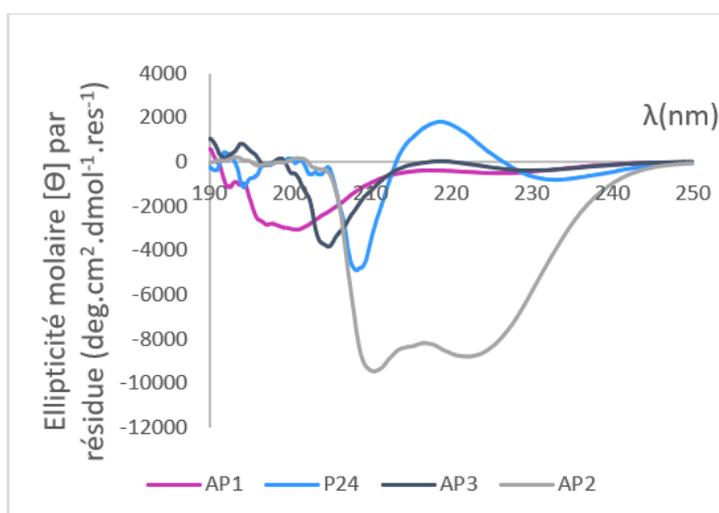


Figure 4 : Spectres CD des peptides **P24** (151 μ M), **AP1** (240 μ M), **AP2** (186 μ M), **AP3** (297 μ M) dans l'eau enregistrés à 3 °C dans une cuve de 5 mm.

Composés	$[\Theta]_{222\text{obs}}$	% hélicité
P24	1218	2%
AP1 [K2-K6]	-437	7%
AP2 [K6-K10]	-8792	30%
AP3 [O2-O6]	-109	6%

Tableau 4 : Valeurs mesurées d'ellipticité molaire à 222 nm et des pourcentages d'hélicité dans l'eau pour **AP1**, **AP2**, **AP3** et **P24**.

Ces résultats ont donc démontré que l'incorporation d'un pont guanidine en (*i, i+4*) peut promouvoir une structure en hélice α sur un peptide initialement non structuré. La capacité de ce pont guanidine à stabiliser une structure hélicoïdale diffère selon la position du macrocycle.

2) Macrocyclisation en (*i, i+4*) : séquences peptidiques biologiquement actives

Dans le but de prouver que le système d'agrafes peptidiques développé ici ne s'applique pas uniquement à des séquences modèles, la voie de synthèse a été étendue à des peptides impliqués dans des interactions avec une protéine d'intérêt.

a) Séquence native du peptide S

i. Synthèse des peptides [K2-K6] et [K6-K10]

Tout d'abord, les ponts guanidine furent appliqués à la séquence native du peptide S

(KETAAAKFERQHMS) comprenant les résidus His12 et Met13 importants pour l'interaction avec la protéine S et l'activité du complexe enzymatique, RNase S, résultant.

Plusieurs structures cristallographiques du complexe de la Ribonucléase S ont été décrites sachant que la première fut rapportée par F. M. Richards en 1992.³⁵ Le peptide S de ce complexe est constitué de vingt acides α -aminés dont trois impliqués dans l'activité catalytique (His12, Glu11, Lys7) et deux autres (Phe8 et Met13) interviennent dans l'interaction hydrophobe avec la protéine S (**Figure 5**).³⁶ La structure hélicoïdale est quant à elle formée par les résidus 3 à 13. Au regard des résultats retranscrits dans la littérature, il apparaît que ce peptide peut être tronqué en gardant uniquement les quinze premiers acides aminés (S-15) puisque les cinq derniers ne sont ni impliqués dans l'activité enzymatique ni dans l'interaction avec la protéine, ni dans la structure hélicoïdale. Seuls les quinze premiers acides aminés ont donc été pris en compte pour la synthèse de nos agrafes peptidiques. Les résidus responsables de l'activité catalytique ainsi que ceux impliqués dans l'effet hydrophobe devaient aussi être impérativement gardés pour espérer préserver l'activité et de l'interaction avec la protéine S.

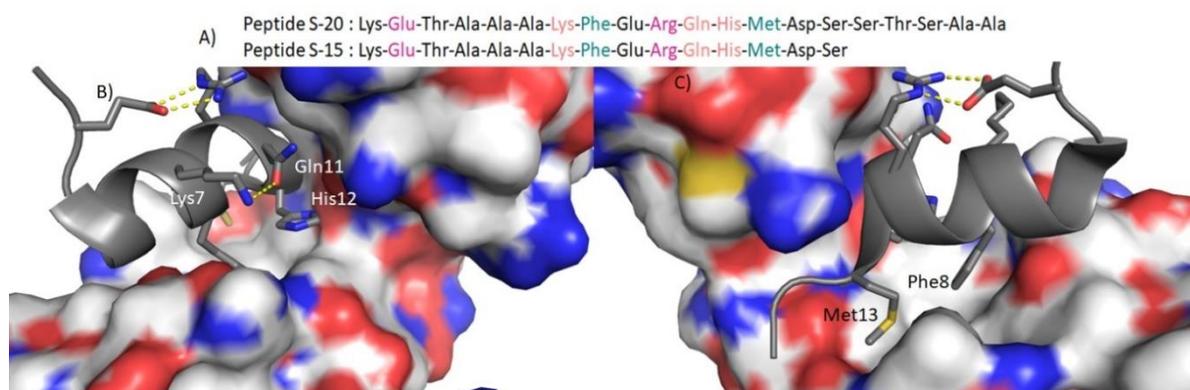


Figure 5 : Séquence primaire et structure cristallographique du peptide S en interaction avec la protéine S. A) Séquences primaires des peptides S-15 et S-20. Les résidus notés en rose sont ceux formant le pont salin responsable d'une interaction avec la protéine partenaire. Les résidus écrits en vert et orange sont ceux impliqués dans l'interface hydrophobe et le site catalytique, respectivement. B) Structure cristallographique illustrant les trois résidus localisés au sein du site catalytique de la RNase. C) Résidus du peptide S situés dans la poche hydrophobe de la protéine S. (PDB : 2RNS).

Le pont guanidine devait être placé préférentiellement sur la même face que le pont salin naturel, situé entre Arg 10 et Glu2, dans l'optique de garder la liaison hydrogène avec la protéine S. Les deux macrocyclisations en [K2-K6] et [K6-K10] effectuées sur la séquence modèle ont donc été également réalisées sur la séquence native du peptide S.

Deux peptides, **P25** et **P30** comportant deux résidus Lys aux positions (2,6) et (6,10) respectivement, ont été synthétisés avec une pureté d'environ 80 % (**Tableau 5**, colonne A). Le groupement Alloc a été enlevé en présence de PdP(Ph₃)₄. La poursuite de la synthèse a notamment mené aux composés thiourée **P27** et **P32** dont les puretés n'ont pas pu être déterminées car leurs signaux correspondant en RP-HPLC présentaient un épaulement ne permettant pas de mesurer précisément la proportion de l'intermédiaire thiourée dans ces deux cas (**Tableau 5**, colonne B). Suite à la déprotection du groupement Mtt, la réaction de macrocyclisation a été réalisée pour les deux peptides en question (**Tableau 5**, colonne C). Après 12h de réaction une conversion à 74 % fut constatée pour le peptide **P34** contre 38 %

pour le peptide **P29**. La réaction fut renouvelée dans les mêmes conditions sur les deux peptides afin d'atteindre une conversion complète. Le composé **P29** a présenté une pureté de 83 % alors que le peptide **P34** une pureté de seulement de 54 %. Finalement, le groupement Fmoc a été déprotégé dans des conditions basiques usuelles pour récupérer les agrafes peptides **AP4** et **AP5** présentant, respectivement, une pureté de 58 % et 43 % (**Tableau 5**, colonne D). Les puretés ont été déterminées suite au clivage du peptide de la résine par un traitement au TFA. Les peptides macrocyclisés avec le motif guanidine ont ensuite été purifiés par RP-HPLC et s'accompagnent d'un rendement de 17 % pour **AP4** (31 mg) et 10 % pour **AP5** (19 mg).

Tableau 5 : Comparaison des résultats de synthèse des peptides **AP4** et **AP5**. A = synthèse du précurseur peptidique ; B = formation de la thiourée acylée ; C = produit de macrocyclisation ; D = produit final (brut après clivage de la résine). Les puretés des différentes étapes sont indiquées entre parenthèse et les rendements après purification finale sont également rapportés.

Mutations (<i>i, i+4</i>)	Séquences	A	B	C	D	Rendements
[K2-K6]	Ac-KK(Mtt)TAAK(Alloc)KFERQHMS	P25 (80 %)	P27 (ND)	P29 (83 %)	AP4 (58 %)	17 %
[K6-K10]	Ac-KETAAK(Mtt)KFEK(Alloc)QHMS	P30 (78 %)	P32 (ND)	P34 (54 %)	AP5 (43 %)	10 %

ii. Etudes conformationnelles

Les études en solution par dichroïsme circulaire ont également été effectuées pour les agrafes peptidiques **AP4** et **AP5** issues du peptide S dans les mêmes conditions que précédemment. Ces dernières ont été comparées au peptide S, **P35** (KETAAKYEYRQHMS), possédant l'ensemble des résidus assurant la stabilisation de l'hélice α dont le pont salin Glu2-Arg10 (**Figure 6**). Le peptide linéaire **P35** a démontré une hélicité de 26 % ce qui correspondait bien aux valeurs décrites par R.L. Baldwin à basse température dans l'eau (**Figure 6, Tableau 6**).³⁷ Il a été observé que l'insertion d'un macrocycle guanidine à l'extrémité N-terminale (**AP4**) entre les positions 2 et 6 déstabilise légèrement l'hélice du peptide dont le pourcentage de structuration a été déterminé à 22 % (**Tableau 6**). A l'inverse, la structure hélicoïdale du peptide **AP5** portant le macrocycle guanidine en (*i, i+4*) entre les positions 6 et 10 est davantage stabilisée (**Figure 6**). Dans ce cas, un gain de 9 % d'hélicité a été obtenu comparativement au peptide linéaire **P35** (**Tableau 6**). Cette dernière observation s'est avérée en accord avec les résultats obtenus pour le peptide **AP2** car dans ces deux cas une augmentation de l'hélicité par rapport au peptide linéaire a été observée. Ceci est donc venu confirmer que l'insertion d'un pont covalent avec la fonction guanidine entre les positions 6 et 10 peut permettre de conserver le pont salin avec le résidu Glu2. Cette interaction clé a pour effet de mieux stabiliser la structure hélicoïdale comparativement aux agrafes peptidiques comprenant le macrocycle à l'extrémité N-terminale.

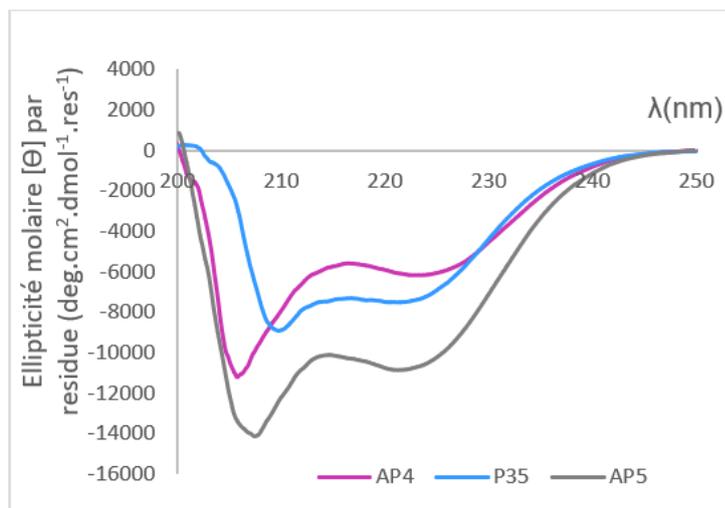


Figure 6 : Spectres CD des peptides **P35** (177 μM), **AP4** (107 μM), **AP5** (108 μM) dans l'eau enregistrés à 3 °C dans une cuve de 5 mm.

Composés	$[\Theta]_{222\text{obs}}$	% hélicité
P35	-7514	26%
AP4 [K2-K6]	-6161	22%
AP5 [K6-K10]	-10857	35%

Tableau 6 : Valeurs mesurées d'ellipticité molaire à 222 nm et des pourcentages d'hélicité dans l'eau pour **AP4**, **AP5** et **P35**.

Finalement, l'ensemble de ces résultats a suggéré que l'introduction d'un pont type guanidine en (*i, i+4*) peut permettre de stabiliser la structure hélicoïdale s'il est placé au centre du peptide S. En revanche, il n'a pas été observé qu'une stabilisation de l'hélice α pouvait avoir lieu lorsque le macrocycle est situé vers l'extrémité N-terminale ce qui empêche la formation du pont salin impliquant le résidu Glu2.

Des études à l'état solide ont également été amorcées en co-cristallisant **AP4** et **AP5** avec la protéine S. La technique de cristallogénèse qui a été utilisée est la diffusion de vapeur par goutte suspendue. Plusieurs conditions ont été criblées (96 pour les dérivés du peptide S) en utilisant notamment les lots de conditions de cristallisation JBS Classic 2, 3 et 6. Une plaque de vingt-quatre puits rassemblant des conditions décrites dans la littérature favorisant la cristallisation du complexe RNase S, a également été réalisée. Chaque goutte contient 0,7 μL du complexe L/Protéine S avec un ratio 5/1 et où chaque ligand L correspond soit à **AP4** soit à **AP5**. Cela permettrait à termes de corroborer les résultats avec ceux obtenus en solution. Un aspect intéressant concernant les analogues macrocyclisés du peptide S serait d'observer si l'interaction avec la protéine *via* le motif guanidine a été conservée ou non.

b) Peptide PMI : inhibiteur de l'interaction p53/MDM2

A ce jour, le peptide PMI qui est initialement obtenu selon un processus de *phage display*, est reconnu comme l'un des meilleurs inhibiteurs de l'interaction p53/MDM2, et adopte une structure hélicoïdale.³⁸ Sa séquence primaire comporte douze acides α -aminés dont l'enchaînement est le suivant : TSFAEYWNLSP. En 2010, l'équipe de W. Lu a réussi à identifier les résidus clés pour l'interaction de PMI avec la protéine MDM2 par le biais d'un AlaScan.³⁹ Ce protocole consiste à remplacer, tour à tour, chaque résidu du peptide par une alanine dans le but de dévoiler les chaînes latérales responsables de l'affinité avec le partenaire MDM2. Il est advenu que la triade hydrophobe composée des résidus Phe3, Trp7 et Leu10 contribue fortement à l'interaction avec la surface de la protéine MDM2 (**Figure 7**). De plus, les résidus

Ser2 et Glu5 permettent la nucléation de l'hélice α du peptide PMI étant donné leurs implications dans un motif nommé *capping box* à l'extrémité N-terminale.

En 2018 W. Lu a développé des agrafes peptidiques de type dithiocarbamate appliquées au peptide PMI.⁴⁰ Ils ont notamment obtenu, *via* des mesures par SPR, une valeur de constante de dissociation vis-à-vis de la protéine MDM2 de 0,87 nM pour un peptide macrocyclisé entre les positions 4 et 8 contre $K_i = 47$ nM pour son équivalent linéaire. Ce peptide décoré d'un pont dithiocarbamate a également montré une aptitude à traverser les membranes cellulaires en assurant, *in vitro*, une activité inhibitrice de l'interaction p53/MDM2. En se basant sur ces travaux, une agrafe peptidique type guanidine a été imaginée sur le peptide PMI en (*i, i+4*). Le macrocycle a été introduit entre les résidus en positions 4 et 8 pour éviter de perturber l'interaction avec MDM2. Les résidus caractéristiques permettant cette interaction peptide-protéine et la nucléation de l'hélice α sont ainsi préservés.

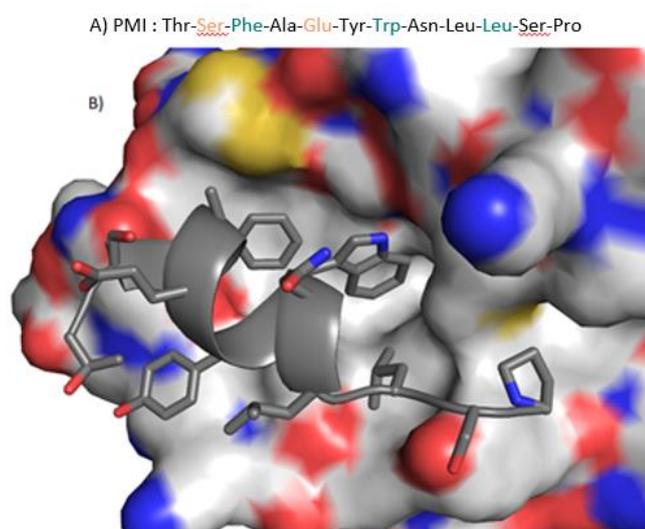


Figure 7 : Séquence primaire et structure cristallographique de PMI en interaction avec MDM2. A) Séquence primaire de PMI où les résidus notés en vert correspondent à la triade hydrophobe intervenant dans l'interaction PMI/MDM2. Les résidus notés en orange désignent ceux impliqués dans le motif *capping box*. B) Structure cristallographique de PMI illustrant l'emplacement des chaînes latérales de ce peptide responsables de l'interaction avec la protéine partenaire (PDB : 3EQY).

La stratégie de synthèse de pont guanidine entre deux chaînes latérales a donc été reproduite sur le peptide PMI où le résidu Ala4 a été remplacé par la lysine avec le groupement protecteur Mtt tandis que l'asparagine 8 a été substituée par la lysine portant le groupement Alloc (**Schéma 11**). La séquence peptidique **P36** ainsi conçue a été synthétisée sur support solide et les analyses HPLC ont indiqué que celle-ci présentait une pureté de 93 %. Tout comme les peptides précédents, le composé Fmoc-isothiocyanate a réagi avec succès sur **P37** pour mener au dérivé **P38** pur à 66 %. Le groupement Mtt a ensuite été déprotégé en amont de l'étape de macrocyclisation. Concernant la guanidinylation, une conversion en produit cyclisé **P40** a été évaluée à 62 % après 12h et la conversion complète fut atteinte en réitérant la réaction 12h de plus. Enfin, le groupement Fmoc a été déprotégé pour donner le composé final **AP6** qui présentait une pureté de 57 %. Malheureusement, le peptide **AP6** fut isolé avec un faible rendement de 2 % (3 mg) en partie dû à la faible solubilité de ce composé dans un mélange eau/acétonitrile et des conditions de séparation non optimisées sur HPLC préparative.

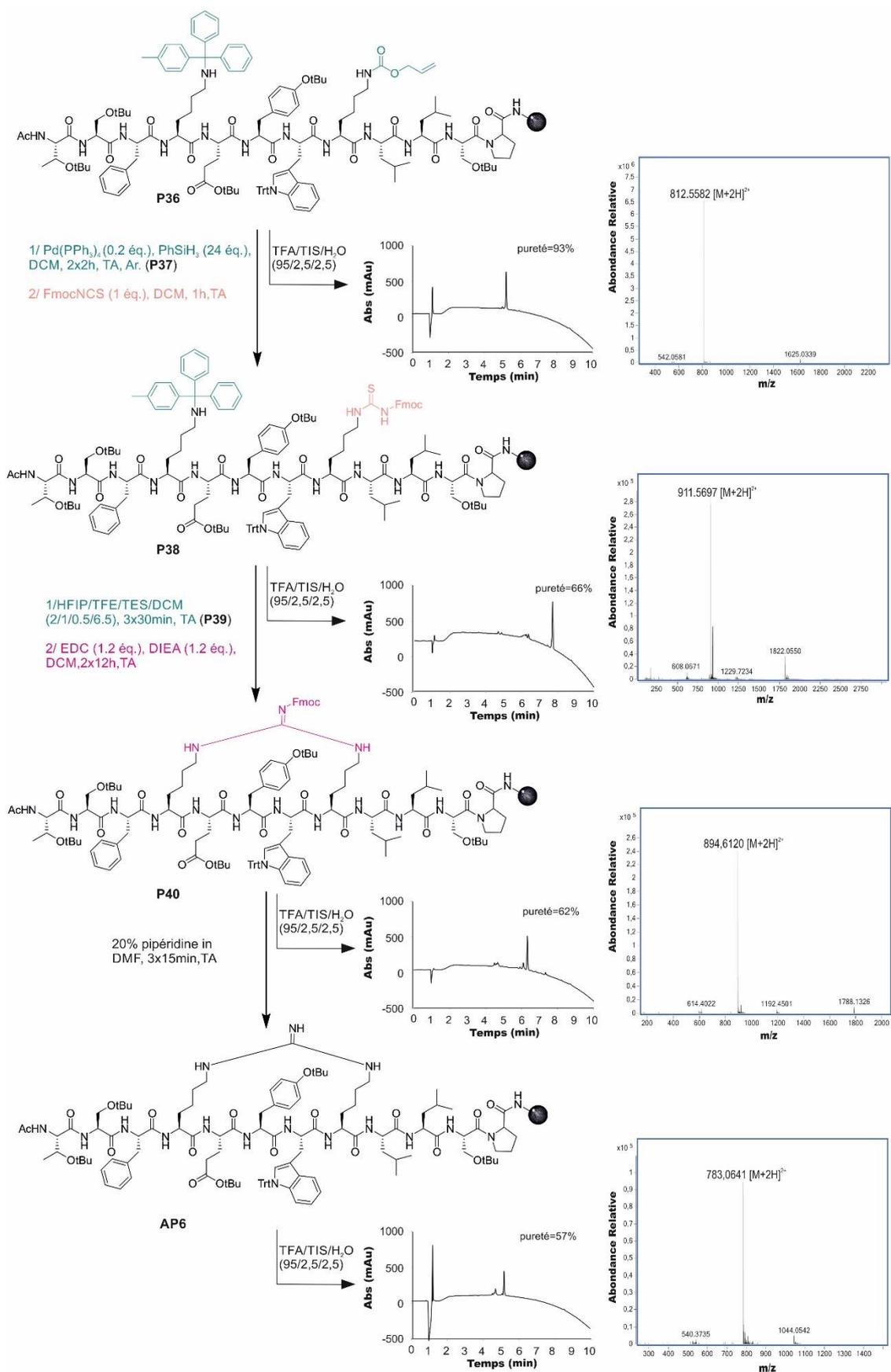


Schéma 11 : Synthèse d'un pont guanidine AP6 sur PMI en (*i, i+4*) entre les positions 4 et 8. Chaque intermédiaire P36, P38, P40 et AP6 est accompagné de son chromatogramme HPLC et de son spectre de

masse obtenus à l'issue d'un microclivage HPLC : gradient 10 à 100 % de B (0.1 % TFA dans CH₃CN) dans A (0.1 % TFA dans H₂O), 10 min.

Concernant l'étude conformationnelle de ce composé, des essais de co-cristallisation avec la protéine MDM2 ont été effectués au sein de notre laboratoire.

La capacité de ce peptide à inhiber l'interaction entre les protéines MDM2 et p53 sera prochainement évaluée dans un test HTRF (Homogenous Time Resolved Fluorescence) qui combine la technologie FRET (fluorescence resonance energy transfer) avec une mesure résolue dans le temps.⁴¹ Sur ce point, l'influence du pont guanidine pourra être directement comparée avec d'autres peptides macrocycliques décrits dans la littérature.⁴⁰

c) Peptide SRC1-2 : interaction avec le récepteur nucléaire VDR

Le récepteur de la vitamine D (VDR) est un récepteur nucléaire impliqué dans l'activation du processus de transcription de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire et le métabolisme calcique, en partenariat avec le calcitriol (forme active de la vitamine D₃).^{42,43,44} La formation d'un complexe comprenant, entre autres, le récepteur nucléaire VDR lié à la fois au calcitriol et à une protéine coactivatrice permet d'amorcer la transcription de l'ADN. La famille de coactivateurs de récepteurs stéroïdiens (SRC) constitue la plus grande famille de protéines régulatrices sachant que l'isoforme SRC1 est commun à une quantité importante de récepteurs nucléaires dont VDR.^{45,46} Il est à noter qu'un motif nommé NR box pour *nuclear receptor box* commun à tous les récepteurs SRC est nécessaire pour l'interaction avec le récepteur ciblé. Ce motif contient systématiquement une triade de leucines qui opèrent dans une poche hydrophobe agencées comme suit : LXXLL.^{47,48} Les résidus notés XX correspondent à l'histidine suivie d'une arginine pour SRC1-2 : RHKILHRLQLQEGS-NH₂. Les trois résidus Leu se projetant dans un sillon hydrophobe, à la surface du récepteur il était préférable de placer le pont guanidine sur la face opposée de l'hélice α du peptide qui est exposée au solvant (**Figure 8**). Par ailleurs, l'analyse de la structure cristallographique montre que des interactions entre des résidus chargés du récepteur et ceux placés aux extrémités de SRC1-2 stabilisent également la formation de ce complexe. En effet, les carboxylates du résidu E446 de VDR sont impliqués dans des liaisons hydrogène avec les liaisons amides à l'extrémité N-terminale du peptide SRC1-2 tandis que ses résidus C-terminaux établissent des liaisons hydrogène avec le résidu K274 de VDR.

Des études ont été menées par l'équipe de S. L. Irving et celle de T. W. Moore sur des peptides agrafés par des pont hydrocarbonés dérivant du peptide SRC2-2.^{49,50} Ils ont obtenu des résultats similaires en termes d'interaction avec les récepteurs d'estrogène ER α lorsque le peptide SRC2-2 est cyclisé entre les positions 3 et 7. Par exemple, une nette amélioration de l'affinité vis-à-vis du récepteur ER α a été observée, *via* des mesures par SPR, par rapport à leur séquence peptidique linéaire respective. Les structures cristallographiques obtenues par T.W. Moore ont notamment montré que le macrocycle hydrocarboné a conservé l'interaction avec la surface hydrophobe du récepteur.

Par conséquent, l'agrafe peptide **AP7** portant le motif guanidine a donc été envisagée entre les résidus 3 et 7 du peptide SRC1-2.

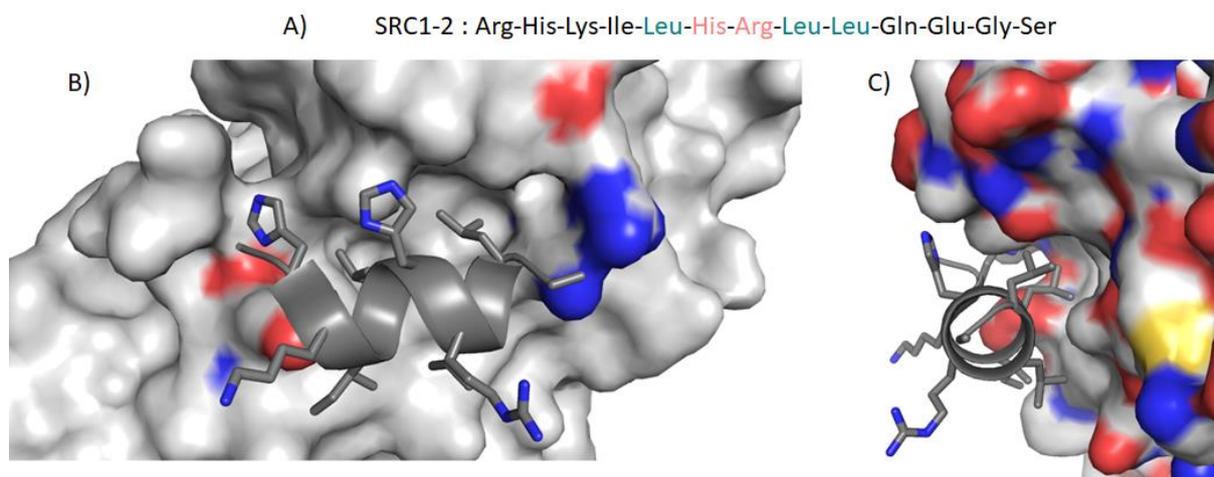


Figure 8 : Séquence primaire et structure cristallographique de SRC1-2. A) Séquence primaire avec le motif LXXLL impliqué dans l'interaction hydrophobe. B) Structure cristallographique du peptide SRC1-2 en interaction avec VDR. C) Mise en évidence du motif LXXLL avec la projection des leucines localisées dans la poche hydrophobe. (PDB : 2HC4).

La synthèse du peptide **P41** dérivant de SRC1-2 où le résidu Lys3 contient le groupement Mtt sur sa chaîne latérale et où l'Arg7 est remplacée par une lysine arborant le groupement Alloc a été réalisée (**Schéma 12**). Ce peptide initial **P41** a été obtenu avec une pureté de 87 %. L'amine primaire résultante de la déprotection de l'Alloc a réagi avec le Fmoc-isothiocyanate pour donner l'intermédiaire thiourée **P43**. Le groupement Mtt a ensuite été enlevé dans les mêmes conditions acides que les synthèses précédentes. L'amine de la lysine déprotégée est donc devenue à même de former le pont guanidine avec la thiourée en présence d'EDC et DIEA menant au produit **P45** qui a présenté une pureté à hauteur de 72 %. Ensuite, le groupement protecteur Fmoc restant a été éliminé pour donner le produit attendu **AP7** avec une pureté élevée de 70 %. Finalement, le peptide macrocyclisé a été et 21 mg de produit ont été obtenus soit un rendement de 13 %.

A l'heure actuelle, des études d'interaction avec VDR sont effectuées pour le composé **AP7** par le Dr. Natacha Rochel-Guiberteau (IGBMC, Strasbourg). Des mesures d'affinité seront réalisées par thermophorèse à micro-échelle (*microscale thermophoresis MST*) afin de déterminer la constante de dissociation K_D du complexe **AP7/VDR**. Des expériences de nano-fluorimétrie différentielle à balayage (nanoDSF) sont également envisagées pour évaluer la stabilité de la protéine en présence de ce ligand. Afin de procéder à des études à l'état solide, des expériences de cristallogénèse en présence de VDR sont aussi en cours.

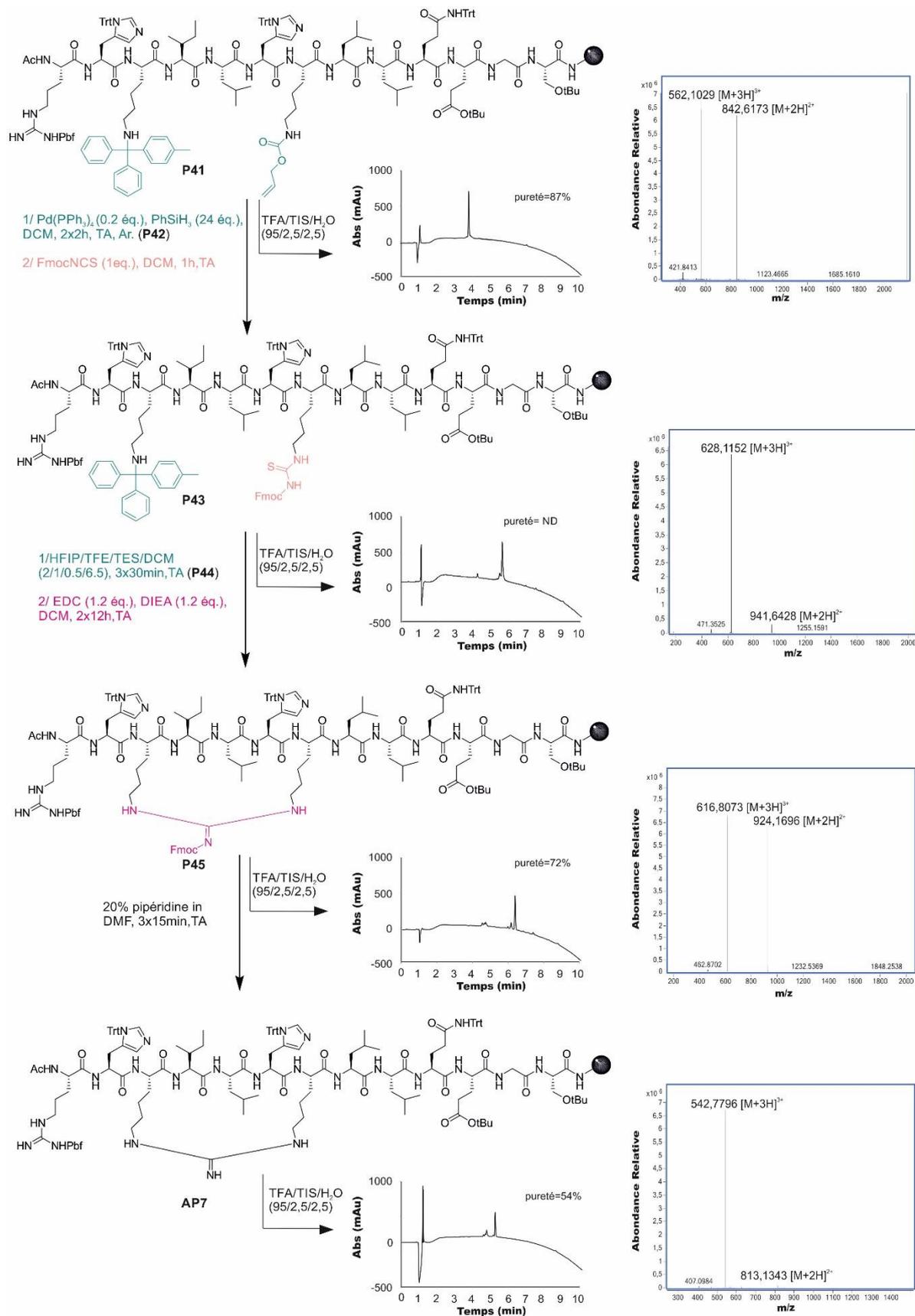


Schéma 12 : Synthèse d'un pont guanidine sur le peptide SRC1-2 en (*i, i+4*) entre les positions 3 et 7. Chaque intermédiaire P41, P43, P45 et AP7 est accompagné de son chromatogramme HPLC et de son

spectre de masse obtenus à l'issue d'un microclivage. HPLC : gradient 10 à 100 % de B (0.1 % TFA dans CH₃CN) dans A (0.1 % TFA dans H₂O), 10 min.

3) Macrocyclisation en (*i, i+7*)

Les résultats rapportés sur la synthèse de ponts guanidine en (*i, i+4*) se sont avérés très encourageants ce pourquoi il a été proposé d'étendre cette chimie à la conception de macrocycles en (*i, i+7*) sur le peptide S modèle.

L'insertion de lysines protégées par des groupements protecteurs orthogonaux a été effectuée aux positions 3 et 10 dans le but de mimer le résidu Arg par la fonction guanidine du macrocycle. Une première séquence peptidique **P46** a été synthétisée sur support solide et la pureté du peptide s'est élevée à 95 % (**Schéma 13**). Cette synthèse a été suivie par la déprotection du groupement Alloc dans les conditions habituelles donnant le produit **P47**. Ensuite, l'insertion du motif thiourée a été effectuée à partir du Fmoc-isothiocyanate. L'intermédiaire **P48** ainsi obtenu présentait une pureté de 66 % et son groupement Mtt a été ôté dans des conditions acides. La macrocyclisation a été tentée en présence d'EDC et DIEA. Après 12h de réaction, un premier microclivage a été réalisé et un nouveau produit a été formé. Cependant, la masse de ce dernier ne correspondait pas à celui escompté **P50**. Alors, la réaction fut renouvelée 12h de plus pour arriver à une conversion complète mais avec une faible pureté. Après une analyse plus approfondie, il est apparu que le produit majoritaire formé était un mélange du monomère cyclisé **AP8** et de son dimère. Il n'a pas été possible de séparer correctement les pics correspondant au dimère et au produit **P50** sur RP-HPLC afin de déterminer précisément la proportion de chacun dans le mélange. L'étape de déprotection finale du Fmoc a été réalisée en présence de pipéridine diluée dans le DMF. Après clivage final de la résine, une purification du produit brut a été effectuée par RP-HPLC préparative. Une faible quantité de monomère **AP8** a été obtenue, légèrement contaminé par le dimère comme le montre le spectre de masse de la **Figure 9A**. Le dimère **AP8a** a, quant à lui, pu être isolé et caractérisé par LC-MS (**Figure 9B**).

Il semblerait donc la macrocyclisation intermoléculaire se soit avérée compétitive. La longueur des chaînes latérales des lysines n'était peut-être pas adaptée à la distance entre les deux résidus à lier pour favoriser la macrocyclisation intermoléculaire. En effet, les macrocycles hydrocarbonés réalisés en (*i, i+7*) sur des peptides comportent généralement 11 à 13 atomes donc le macrocycle guanidine proposé, moins flexible avec 11 atomes consécutifs, devait être trop court pour relier deux résidus de cette manière.

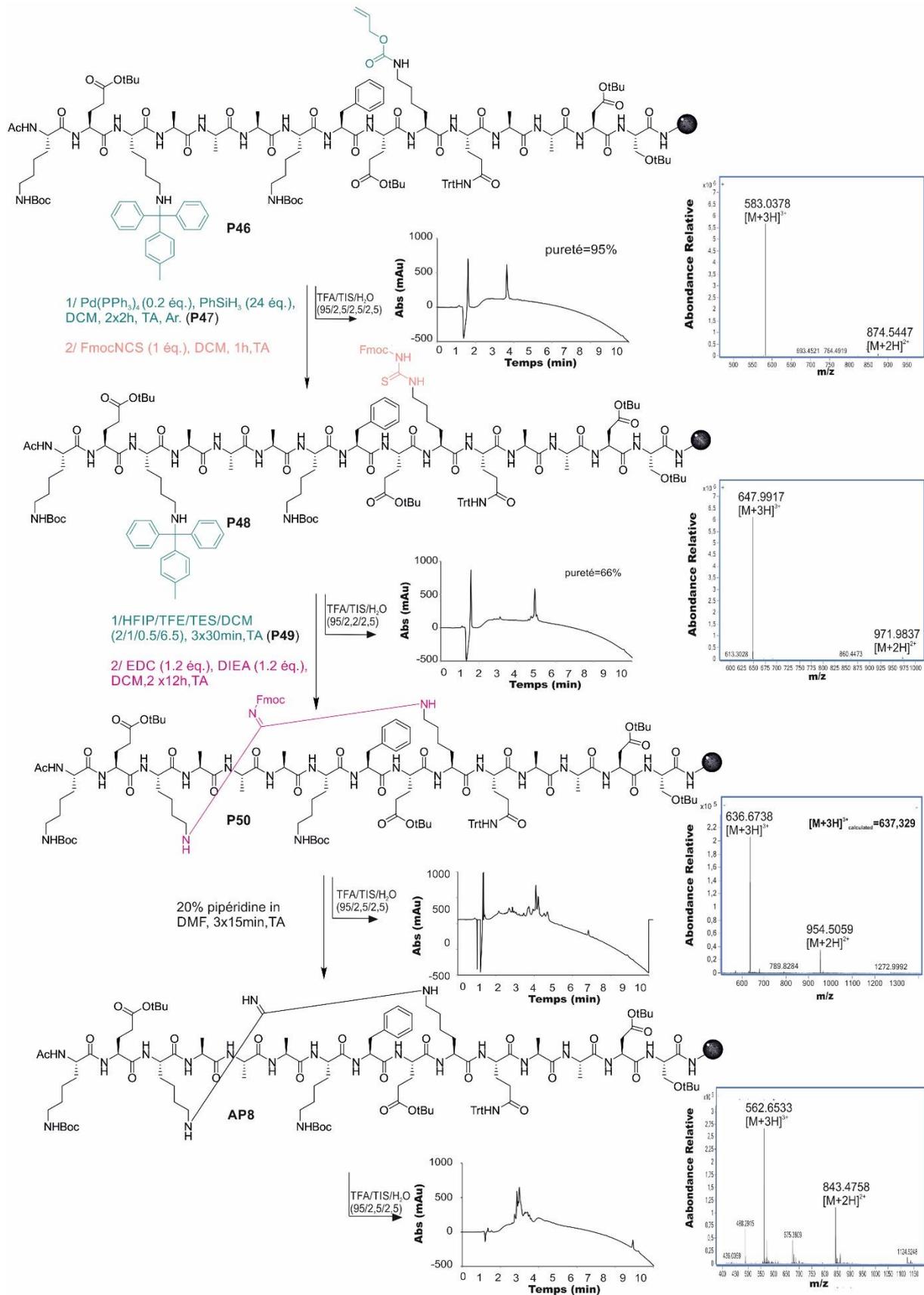


Schéma 13 : Synthèse d'un pont guanidine AP8 sur une séquence modèle en (*i, i+7*) entre les positions 3 et 7. Chaque intermédiaire P46, P48, P50 et AP8 est accompagné de son chromatogramme HPLC et de son spectre de masse obtenus à l'issue d'un microclivage. HPLC : gradient 10 à 100 % de B (0.1 % TFA dans

CH₃CN) dans A (0.1 % TFA dans H₂O), 10 min et 10 à 50 % de B (0.1 % TFA dans CH₃CN) dans A (0.1 % TFA dans H₂O), 10 min pour **AP8**.

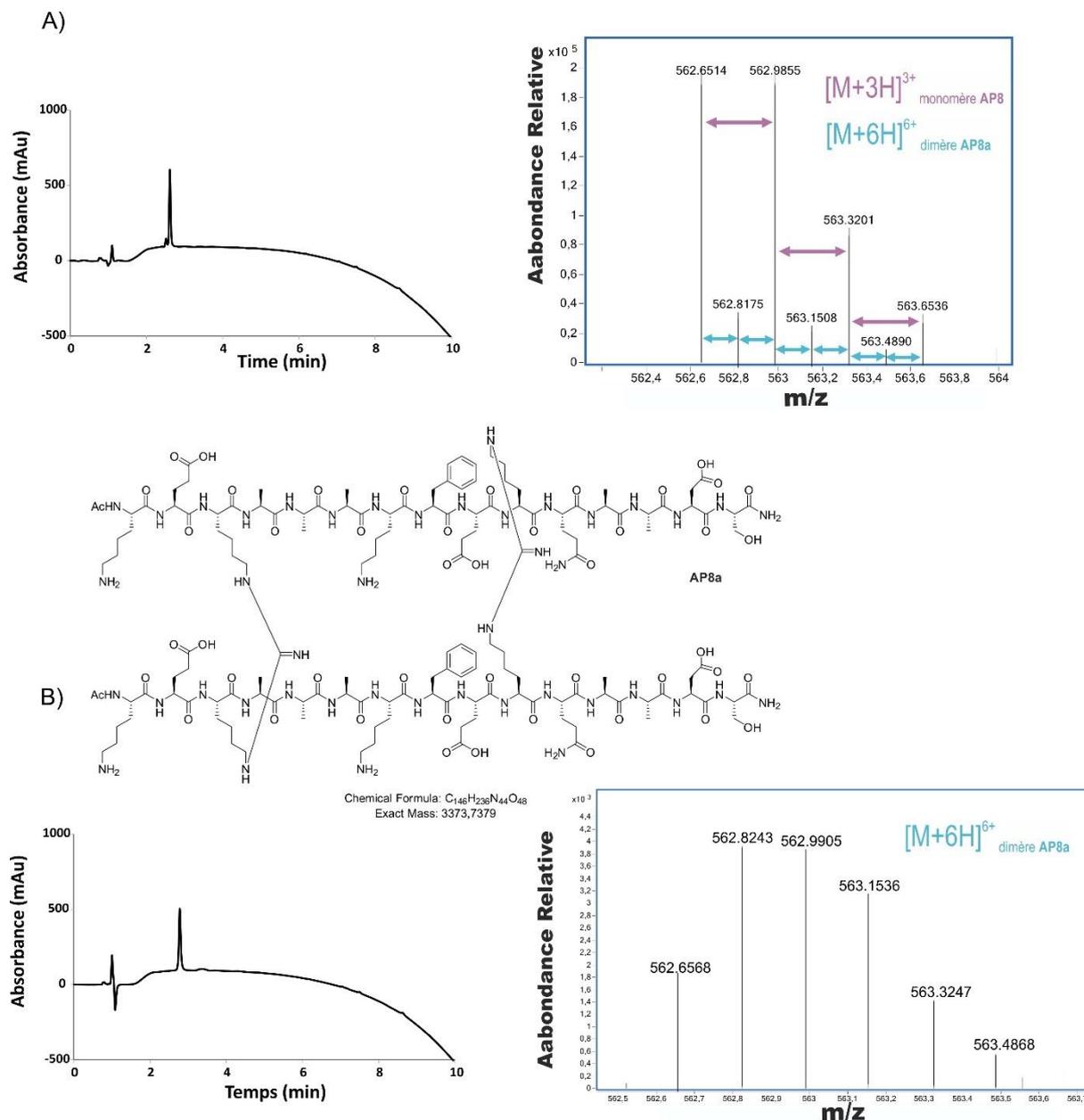


Figure 9 : A) Chromatogramme HPLC et spectre de masse du composé **AP8** ($t_r = 2, 61$ min) après purification. B) Structure du dimère **AP8a** accompagnée de son chromatogramme HPLC ($t_r = 2, 78$ min) et de son spectre de masse après purification. Les valeurs correspondant aux $m/z = 3$ pour **AP8** et $m/z = 6$ pour **AP8a** sont indiquées en violet et bleu respectivement. HPLC : gradient 10 à 100 % de B (0.1 % TFA dans CH₃CN) dans A (0.1 % TFA dans H₂O), 10 min.

Une autre stratégie permettant d'allonger les chaînes latérales a été développée afin d'accéder à un macrocycle guanidine en $(i, i+7)$ à treize atomes. Il a été envisagé de coupler l'acide aminé Fmoc-Gly-OH avec l'amine primaire d'une des deux chaînes latérales apportant ainsi trois atomes supplémentaires dans le macrocycle. La chaîne latérale liée au résidu Gly a été réduite d'un atome en utilisant un résidu ornithine pour que l'ensemble constitue un macrocycle à treize atomes.

Une lysine comportant le groupement Mtt sur sa chaîne latérale a été insérée en position 3 du peptide S tandis qu'à la position 10 c'est donc une ornithine portant le groupement Alloc qui a été introduite (**Schéma 14**). Le peptide **P51** ainsi assemblé a présenté une pureté de 73 % due à deux sous-produits résultant de délétions d'alanine et d'une sérine. Le groupement Alloc de l'ornithine a ensuite été enlevé dans les conditions habituelles formant le dérivé **P52** qui a ensuite été couplé à l'acide aminé Fmoc-Gly-OH. La réaction de couplage a été effectuée en présence de DIC et Oxyma sous assistance micro-ondes. Le groupement Fmoc de la glycine a ensuite été ôté pour libérer une amine primaire **P53** qui a ensuite été converti en thiourée **P55** via l'ajout du Fmoc-isothiocyanate. Après la déprotection du groupement Mtt de ce dernier, la macrocyclisation a été réalisée toujours en présence d'EDC et DIEA, ce qui a mené à la formation du produit souhaité **P57** avec une pureté de 58%. Le groupement Fmoc de la guanidine a finalement été enlevé générant ainsi le peptide macrocyclisé **AP9**. La pureté du produit brut a été déterminée à 49%. Le composé **AP9** été isolé mais des traces du composé dimérisé ont été observées sur le spectre de masse résultant de la purification (**Figure 10**). Le dimère dans ce cas a été formé en très faible quantité puisque sa présence n'avait pas été remarquée à l'étape précédente, ni sur le chromatogramme HPLC ni sur le spectre LC/MS.

Finalement, la synthèse du peptide **AP8** comportant un pont guanidine en $(i, i+7)$ à 11 atomes s'est avérée compliquée principalement en raison de la formation compétitive du dimère **AP8a**. Toutefois, la possibilité d'insérer efficacement un pont guanidine en $(i, i+7)$ sur un peptide a été prouvée en ajustant la longueur des chaînes impliquées dans la macrocyclisation. Il a ainsi été possible d'obtenir le produit brut cyclisé **AP9** avec une pureté proche de 50 % après clivage final de la résine. Le composé a été isolé par RP-HPLC, mais cette étape doit encore être optimisée afin d'éliminer les traces résiduelles du dimère. Il est également possible d'envisager de reproduire la synthèse sur une résine présentant une charge (*loading*) plus faible.

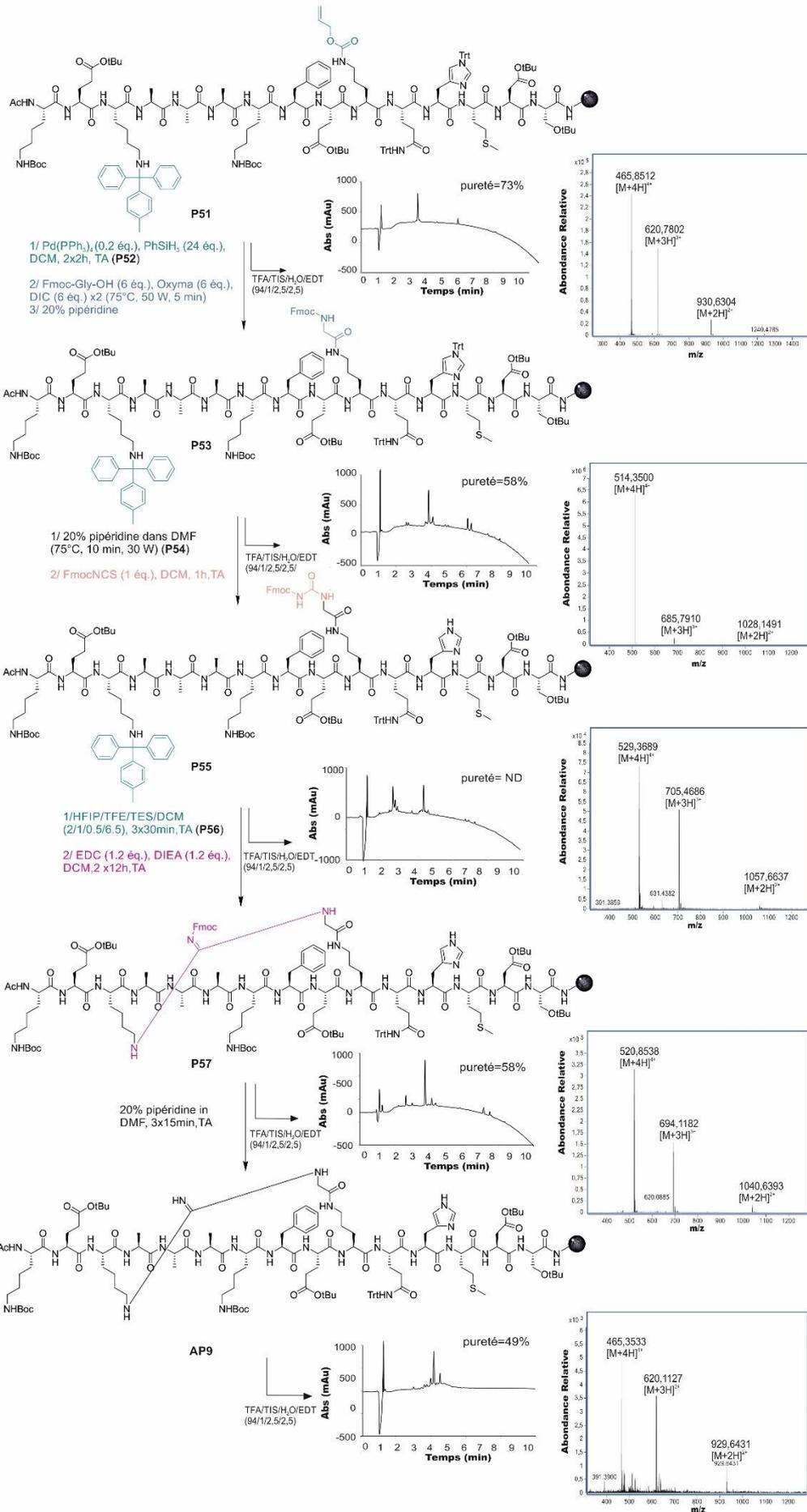


Schéma 14 : Synthèse d'un pont guanidine en (*i, i+7*) sur le peptide S entre les positions 3 et 7. Chaque intermédiaire **P51**, **P53**, **P55**, **P57** et **AP9** est accompagné de son chromatogramme HPLC et de son spectre de masse obtenus à l'issue d'un microclivage (HPLC : gradient 10 à 100 % de B (0.1 % TFA dans CH₃CN) dans A (0.1 % TFA dans H₂O), 10 min).

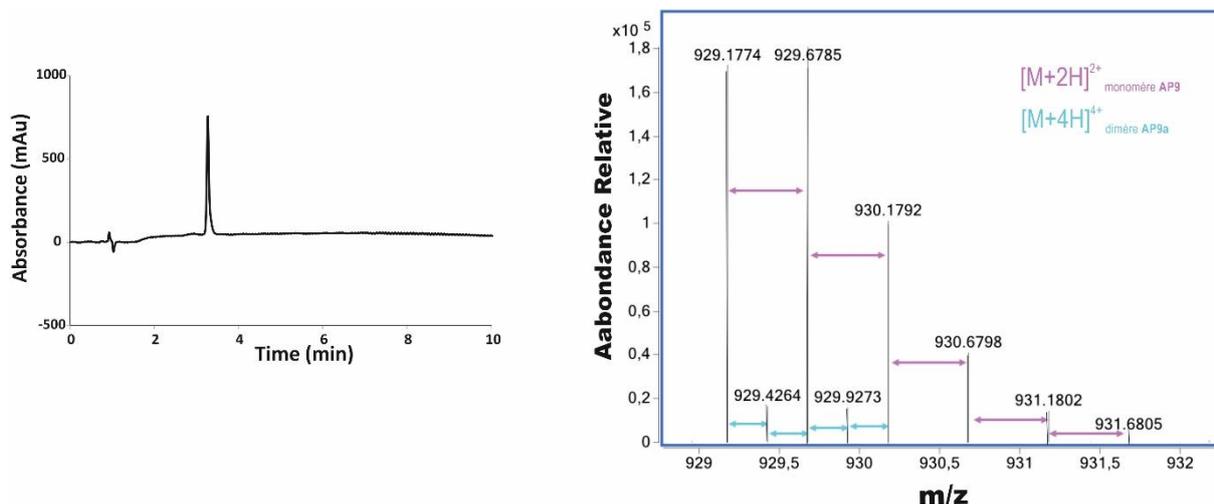


Figure 10 : Chromatogramme HPLC et spectre de masse de **AP9** après purification. Les valeurs correspondant aux $m/z = 2$ pour **AP9** et $m/z = 4$ pour **AP9a** sont indiquées en violet et bleu respectivement. HPLC : gradient 10 à 100 % de B (0.1 % TFA dans CH₃CN) dans A (0.1 % TFA dans H₂O), 10 min.

III. Conclusion et perspectives

Ce projet porte sur la conception d'une nouvelle méthode de macrocyclisation effectuée entre deux chaînes latérales d'un peptide pour stabiliser une structure en hélice α au sein de peptides courts. Il vise à introduire une fonction polaire, la guanidine, au sein du macrocycle menant à des agrafes peptidiques originales pour potentiellement améliorer les propriétés de pénétration cellulaire de peptides.

La stratégie utilisée pour former ces macrocycles repose sur une cyclisation intramoléculaire où l'une des chaînes latérales porte un groupement thiourée activé par un Fmoc comme précurseur de la fonction guanidine. Dans un premier temps, la mise au point des méthodes de déprotection des groupements Mtt et Alloc situés sur les chaînes latérales impliquées dans le macrocycle a été effectuée. Il s'en est suivi la synthèse de trois peptides macrocyclisés en (*i, i+4*) à partir d'une séquence peptidique modèle. Ces trois peptides, qui diffèrent par la taille ou la position du macrocycle, ont été obtenus avec de bonnes puretés finales. Les analyses en solution par dichroïsme circulaire ont révélé que seule l'agrafe peptidique située entre les positions 6 et 10 (**AP2**) stabilise une structure hélicoïdale comparativement au peptide linéaire et aux peptides macrocyclisés à l'extrémité N-terminale (**AP1** et **AP3**).

Par la suite, la même voie de synthèse a été utilisée pour étendre les ponts guanidine en (*i, i+4*) à des peptides impliqués dans des interactions avec une protéine d'intérêt : peptide S/ protéine S, PMI/ MDM2, SRC1-2/ VDR. Le peptide S a été macrocyclisé entre les positions 2 et 6 (**AP4**) puis 6 et 10 (**AP5**). Le peptide PMI a été cyclisé entre en position 4, 8 (**AP6**) et le peptide SRC1-

2 a quant à lui été cyclisé entre les positions 3 et 7 (**AP7**). Des résultats similaires en termes de pureté ont été observés et les quatre peptides macrocyclisés ont pu être isolés.

Les deux agrafes peptides issues du peptide S ont donné lieu à des études en solution par dichroïsme circulaire dans l'eau à 3 °C. Dans ce cas, il est apparu que le peptide **AP5** présente un taux d'hélicité plus élevé (35 %) que le peptide S natif (26 %). Pour le peptide **AP4**, le pourcentage d'hélicité était légèrement plus faible (22 %) que le peptide S. Ces résultats ont donc confirmé que l'introduction du pont guanidine au centre du peptide peut stabiliser la structure hélicoïdale et probablement permettre de conserver le pont salin naturel. Ces données demandent à être complétées par des études à l'état solide du peptide en interaction avec la protéine partenaire (protéine S) afin d'observer si l'interaction avec la protéine *via* le motif guanidine a également été conservée ou non. Des essais de cristallogénèse ont également été réalisés sur les agrafes peptidiques dérivant des peptides bioactifs PMI et SRC1-2 en présence des protéines d'intérêt : **AP6**/MDM2 et **AP7**/VDR. L'étude des propriétés d'interaction des peptides **AP6** et **AP7** est actuellement en cours de réalisation. Cela permettrait à terme d'obtenir des informations à la fois sur la structure et sur l'interaction avec leur protéine partenaire.

Pour étendre les champs d'application des macrocycles type guanidine, leur insertion a également été envisagée en (*i, i+7*) sur le peptide S. La synthèse de ce pont guanidine a été tentée selon deux stratégies différentes pour mener soit à un macrocycle à onze atomes (**AP8**) soit à un pont guanidine à treize atomes (**AP9**). La formation du produit désiré a été observée dans les deux cas mais dans le premier cas, l'étape de macrocyclisation a conduit à la formation de produits secondaires, et notamment celle du composé dimérisé. L'allongement de la taille du macrocycle a permis d'obtenir, en revanche, le peptide macrocyclisé en (*i, i+7*) avec une bonne pureté.

Les informations qui seront obtenues à partir des différentes expériences concernant les interactions peptide-protéine seront déterminantes pour la suite projet. En parallèle, des études quant à la résistance à la protéolyse ou aux propriétés de pénétration cellulaire pourraient être menées pour les agrafes peptidiques issues de peptides biologiquement actifs. L'idée ici sera de valider si la fonction guanidine peut effectivement permettre d'améliorer certaines propriétés pharmacologiques de peptides.

D'autres stratégies de synthèses permettant d'introduire plusieurs motifs guanidine au sein de l'agrafe peptidique sont également en cours de développement au laboratoire.

Bibliographie

- (1) Guarracino, D. A.; Riordan, J. A.; Barreto, G. M.; Oldfield, A. L.; Kouba, C. M.; Agrinoni, D. Macrocyclic Control in Helix Mimetics. *Chemical Reviews* **2019**. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00623>.
- (2) Lau, Y. H.; de Andrade, P.; Wu, Y.; Spring, D. R. Peptide Stapling Techniques Based on Different Macrocyclisation Chemistries. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (1), 91–102. <https://doi.org/10.1039/C4CS00246F>.
- (3) Iegre, J.; Gaynord, J. S.; Robertson, N. S.; Sore, H. F.; Hyvönen, M.; Spring, D. R. Two-Component Stapling of Biologically Active and Conformationally Constrained Peptides: Past, Present, and Future. *Advanced Therapeutics* **2018**, *1* (7), 1800052. <https://doi.org/10.1002/adtp.201800052>.
- (4) Wender, P. A.; Galliher, W. C.; Goun, E. A.; Jones, L. R.; Pillow, T. H. The Design of Guanidinium-Rich Transporters and Their Internalization Mechanisms. *Advanced Drug Delivery. Reviews* **2008**, *60* (4–5), 452–472. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.016>.
- (5) Goun, E. A.; Pillow, T. H.; Jones, L. R.; Rothbard, J. B.; Wender, P. A. Molecular Transporters: Synthesis of Oligoguanidinium Transporters and Their Application to Drug Delivery and Real-Time Imaging. *Chembiochem* **2006**, *7* (10), 1497–1515. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600171>.
- (6) Potocky, T. B.; Menon, A. K.; Gellman, S. H. Effects of Conformational Stability and Geometry of Guanidinium Display on Cell Entry by β -Peptides. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (11), 3686–3687. <https://doi.org/10.1021/ja042566j>.
- (7) Richards, F. M.; Vithayathil, P. J. The Preparation of Subtilisin-Modified Ribonuclease and the Separation of the Peptide and Protein Components. *Journal of Biological Chemistry* **1959**, *234* (6), 1459–1465.
- (8) Bierzynski, A.; Kim, P. S.; Baldwin, R. L. A Salt Bridge Stabilizes the Helix Formed by Isolated C-Peptide of RNase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1982**, *79* (8), 2470–2474. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.8.2470>.
- (9) Katritzky, A. R.; Rogovoy, B. V. Recent Developments in Guanidylating Agents. **2005**, 39.
- (10) Shaw, J. W.; Grayson, D. H.; Rozas, I. Synthesis of Guanidines and Some of Their Biological Applications. In *Guanidines as Reagents and Catalysts I*; Selig, P., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2015; Vol. 50, pp 1–51. https://doi.org/10.1007/7081_2015_174.
- (11) Kim, K. S.; Qian, L. Improved Method for the Preparation of Guanidines. *Tetrahedron Letters* **1993**, *34* (48), 7677–7680. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)61537-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)61537-X).
- (12) Linkletter, B. A.; Szabo, I. E.; Bruice, T. C. Solid-Phase Synthesis of Deoxynucleic Guanidine (DNG) Oligomers and Melting Point and Circular Dichroism Analysis of Binding Fidelity of Octameric Thymidyl Oligomers with DNA Oligomers. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 3888–3896. <https://doi.org/10.1021/ja984212w>.
- (13) Manimala, J. C.; Anslyn, E. V. A Highly Efficient Method for the Synthesis of Guanidinium Derivatives. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43* (4), 565–567. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)02165-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)02165-7).
- (14) Li, M.; Wilson, L. J.; Portlock, D. E. A Simple Solid-Phase Synthesis of Disubstituted Guanidines Using Rink Amide Resin as an Amine Component. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42* (12), 2273–2275. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)00162-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)00162-9).

- (15) Yong, Y. F.; Kowalski, J. A.; Lipton, M. A. Facile and Efficient Guanylation of Amines Using Thioureas and Mukaiyama's Reagent. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62* (5), 1540–1542. <https://doi.org/10.1021/jo962196k>.
- (16) Rong, H.-J.; Yang, C.-F.; Chen, T.; Wang, Y.-Q.; Ning, B.-K. Synthesis of Guanidines via the I₂ Mediated Desulfurization of N,N'-Di-Boc-Thiourea. *Tetrahedron Letters* **2019**, *60* (34), 150970. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.150970>.
- (17) Qin, C.; Li, J.; Fan, E. Iodine-Mediated Guanidine Formation through Arylsulfonyl-Activated Thioureas. *Synlett* **2009**, *2009* (15), 2465–2468. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1217825>.
- (18) Schneider, S. E.; Bishop, P. A.; Salazar, M. A.; Bishop, O. A.; Anslyn, E. V. Solid Phase Synthesis of Oligomeric Guanidiniums. *Tetrahedron* **1998**, *54* (50), 15063–15086. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00900-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00900-4).
- (19) Rasmussen, C. R.; Jr, F. J. V.; Reynolds, B. E.; Plampin, J. N.; Hood, A. R.; Hecker, L. R.; Nortey, S. O.; Hanslin, A.; Costanzo, M. J.; Jr, R. M. H.; et al. A Versatile Synthesis of Novel N,N,N"-Trisubstituted Guanidines. *Synthesis* **1988**, *1988* (6), 460–466. <https://doi.org/10.1055/s-1988-27606>.
- (20) Pulka-Ziach, K.; Antunes, S.; Perdriau, C.; Kauffmann, B.; Pasco, M.; Douat, C.; Guichard, G. Postelongation Strategy for the Introduction of Guanidinium Units in the Main Chain of Helical Oligourea Foldamers. *The Journal of Organic Chemistry* **2018**, *83* (5), 2530–2541. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01895>.
- (21) Zhang, Z.; Fan, E. Solid-Phase and Solution-Phase Syntheses of Oligomeric Guanidines Bearing Peptide Side Chains. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70* (22), 8801–8810. <https://doi.org/10.1021/jo051226t>.
- (22) Touati-Jallabe, Y.; Chiche, L.; Hamzé, A.; Aumelas, A.; Lisowski, V.; Berthomieu, D.; Martinez, J.; Hernandez, J.-F. Cyclic Peptides with a Diversely Substituted Guanidine Bridge: Solid-Phase Synthesis and Structural Analysis. *Chemistry - A European Journal* **2011**, *17* (9), 2566–2570. <https://doi.org/10.1002/chem.201003299>.
- (23) Touati-Jallabe, Y.; Bojnik, E.; Legrand, B.; Mauchauffée, E.; Chung, N. N.; Schiller, P. W.; Benyhe, S.; Averlant-Petit, M.-C.; Martinez, J.; Hernandez, J.-F. Cyclic Enkephalins with a Diversely Substituted Guanidine Bridge or a Thiourea Bridge: Synthesis, Biological and Structural Evaluations. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56* (14), 5964–5973. <https://doi.org/10.1021/jm4008592>.
- (24) Zhang, Z.; Pickens, J. C.; Hol, W. G. J.; Fan, E. Solution- and Solid-Phase Syntheses of Guanidine-Bridged, Water-Soluble Linkers for Multivalent Ligand Design. *Organic Letters* **2004**, *6* (9), 1377–1380. <https://doi.org/10.1021/ol049835v>.
- (25) Kearney, P. C.; Fernandez, M.; Flygare, J. A. Solid-Phase Synthesis of 2-Aminothiazoles. 5.
- (26) Grieco, P.; Gitu, P. M.; Hruby, V. J. Preparation of "side-Chain-to-Side-Chain" Cyclic Peptides by Allyl and Alloc Strategy: Potential for Library Synthesis. *The Journal of Peptide Research* **2001**, *57* (3), 250–256.
- (27) Li, D.; Elbert, D. L. The Kinetics of the Removal of the N-Methyltrityl (Mtt) Group during the Synthesis of Branched Peptides. *The Journal of Peptide Research* **2002**, *60* (5), 300–303.
- (28) Bloomberg, G. B.; Askin, D.; Gargaro, A. R.; Tanner, M. J. A. Synthesis of a Branched Cyclic Peptide Using a Strategy Employing Fmoc Chemistry and Two Additional Orthogonal Protecting Groups. *Tetrahedron Letters* **1993**, *34* (29), 4709–4712. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)60663-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)60663-9).

- (29) Albericio, F.; El-Faham, A. Choosing the Right Coupling Reagent for Peptides: A Twenty-Five-Year Journey. *Organic Process Research & Development* **2018**, *22* (7), 760–772. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00159>.
- (30) Rohwedder, B.; Mutti, Y.; Dumy, P.; Mutter, M. Hydrazinolysis of Dde: Complete Orthogonality with Alloc Protecting Groups. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (10), 1175–1178. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)10810-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)10810-3).
- (31) Díaz-Mochón, J. J.; Bialy, L.; Bradley, M. Full Orthogonality between Dde and Fmoc: The Direct Synthesis of PNA–Peptide Conjugates. *Organic Letters* **2004**, *6* (7), 1127–1129. <https://doi.org/10.1021/ol049905y>.
- (32) Turner, R. A.; Hauksson, N. E.; Gipe, J. H.; Lokey, R. S. Selective, On-Resin *N*-Methylation of Peptide *N*-Trifluoroacetamides. *Organic Letters* **2013**, *15* (19), 5012–5015. <https://doi.org/10.1021/ol402341u>.
- (33) Chakrabartty, A.; Baldwin, R. L. Stability of α -helices. *Advances in Protein Chemistry* **1995**, *46*, 141-176.
- (34) Grison, C. M.; Burslem, G. M.; Miles, J. A.; Pils, L. K. A.; Yeo, D. J.; Imani, Z.; Warriner, S. L.; Webb, M. E.; Wilson, A. J. Double Quick, Double Click Reversible Peptide “Stapling.” *Chemical Science* **2017**, *8* (7), 5166–5171. <https://doi.org/10.1039/C7SC01342F>.
- (35) Kim, E. E.; Varadarajan, R.; Wyckoff, H. W.; Richards, F. M. Refinement of the Crystal Structure of Ribonuclease S. Comparison with and between the Various Ribonuclease A Structures. *Biochemistry* **1992**, *31* (49), 12304–12314. <https://doi.org/10.1021/bi00164a004>.
- (36) Walter, B.; Wold, F. The Role of Lysine in the Action of Bovine Pancreatic Ribonuclease A. *Biochemistry* **1976**, *15* (2), 304–310. <https://doi.org/10.1021/bi00647a010>.
- (37) Baldwin, R. L. α -Helix Formation by Peptides of Defined Sequence. *Biophysical Chemistry* **1995**, *55* (1), 127–135. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(94\)00146-B](https://doi.org/10.1016/0301-4622(94)00146-B).
- (38) Pazgier, M.; Liu, M.; Zou, G.; Yuan, W.; Li, C.; Li, C.; Li, J.; Monbo, J.; Zella, D.; Tarasov, S. G.; et al. Structural Basis for High-Affinity Peptide Inhibition of P53 Interactions with MDM2 and MDMX. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106* (12), 4665–4670. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900947106>.
- (39) Li, C.; Pazgier, M.; Li, C.; Yuan, W.; Liu, M.; Wei, G.; Lu, W.-Y.; Lu, W. Systematic Mutational Analysis of Peptide Inhibition of the P53-MDM2/MDMX Interactions. *Journal of Molecular Biology* **2010**, *398* (2), 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.03.005>.
- (40) Li, X.; Tolbert, W. D.; Hu, H.-G.; Gohain, N.; Zou, Y.; Niu, F.; He, W.-X.; Yuan, W.; Su, J.-C.; Pazgier, M.; et al. Dithiocarbamate-Inspired Side Chain Stapling Chemistry for Peptide Drug Design. *Chemical Science* **2019**. <https://doi.org/10.1039/C8SC03275K>.
- (41) Kane, S. A.; Fleener, C. A.; Zhang, Y. S.; Davis, L. J.; Musselman, A. L.; Huang, P. S. Development of a Binding Assay for P53/HDM2 by Using Homogeneous Time-Resolved Fluorescence. *Analytical Biochemistry* **2000**, *278* (1), 29–38. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4413>.
- (42) Haussler, M. R.; Myrtle, J. F.; Norman, A. W. The Association of a Metabolite of Vitamin D3 with Intestinal Mucosa Chromatin in Vivo. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243* (15), 4055–4064.
- (43) Blunt, J. W.; DeLuca, H. F.; Schnoes, H. K. 25-Hydroxycholecalciferol. A Biologically Active Metabolite of Vitamin D3. *Biochemistry* **1968**, *7* (10), 3317–3322. <https://doi.org/10.1021/bi00850a001>.
- (44) Zhang, J.; Chalmers, M. J.; Stayrook, K. R.; Burris, L. L.; Wang, Y.; Busby, S. A.; Pascal, B. D.; Garcia-Ordóñez, R. D.; Bruning, J. B.; Istrate, M. A.; et al. DNA Binding Alters

- Coactivator Interaction Surfaces of the Intact VDR–RXR Complex. *Natural Structural and Molecular Biology* **2011**, *18* (5), 556–563. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2046>.
- (45) McKenna, N. J.; Lanz, R. B.; O'Malley, B. W. Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology. *Endocrine Reviews* **1999**, *20* (3), 321–344. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.3.0366>.
- (46) Oñate, S. A.; Tsai, S. Y.; Tsai, M.-J.; O'Malley, B. W. Sequence and Characterization of a Coactivator for the Steroid Hormone Receptor Superfamily. *Science* **1995**, *270* (5240), 1354–1357. <https://doi.org/10.1126/science.270.5240.1354>.
- (47) Heery, D. M.; Kalkhoven, E.; Hoare, S.; Parker, M. G. A Signature Motif in Transcriptional Co-Activators Mediates Binding to Nuclear Receptors. *Nature* **1997**, *387* (6634), 733–736. <https://doi.org/10.1038/42750>.
- (48) Housley, P. R.; Sanchez, E. R.; Danielsen, M.; Ringold, G. M.; Pratt, W. B. Evidence That the Conserved Region in the Steroid Binding Domain of the Glucocorticoid Receptor Is Required for Both Optimal Binding of Hsp90 and Protection from Proteolytic Cleavage. A Two-Site Model for Hsp90 Binding to the Steroid Binding Domain. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265* (22), 12778–12781.
- (49) Phillips, C.; Roberts, L. R.; Schade, M.; Bazin, R.; Bent, A.; Davies, N. L.; Moore, R.; Pannifer, A. D.; Pickford, A. R.; Prior, S. H.; et al. Design and Structure of Stapled Peptides Binding to Estrogen Receptors. *The Journal of American Chemical Society* **2011**, *133* (25), 9696–9699. <https://doi.org/10.1021/ja202946k>.
- (50) Speltz, T. E.; Fanning, S. W.; Mayne, C. G.; Fowler, C.; Tajkhorshid, E.; Greene, G. L.; Moore, T. W. Stapled Peptides with γ -Methylated Hydrocarbon Chains for the Estrogen Receptor/Coactivator Interaction. *Angewandte Chemie International Edition England* **2016**, *55* (13), 4252–4255. <https://doi.org/10.1002/anie.201510557>.

Chapitre 3. Conception et synthèse de feuillets β multi-brins artificiels de type diamine-diacide

I. Conception de nouveaux feuillets β multi-brins

1) Historique du projet

L'objectif du projet dans lequel ce travail thèse s'est inscrit est la conception d'une nouvelle classe de molécules programmées pour se replier de façon rationnelle en feuillets β par formation de liaisons hydrogène intramoléculaires. Cette nouvelle bibliothèque moléculaire viendra enrichir la diversité des structures accessibles aux foldamères, et à plus long terme, permettra le développement de molécules protéomimétiques capables de mimer des structures tertiaires de protéines.

Parmi les différentes classes de foldamères existantes, les oligomères comportant des liaisons urées entre les résidus ont reçu une attention croissante au cours des dernières années. Un domaine de recherche au sein de notre équipe est axé sur le développement de foldamères de type oligourée comme peptidomimes. Des études ont démontré l'aptitude de ces oligomères à adopter un repliement similaire aux hélices α .¹ Les monomères constituant ces oligourées sont des analogues aza des γ -peptides dont l'unité de répétition comprend un dérivé d'éthylène diamine et un espaceur de type carbonyle reliant chaque unité diamine (**Figure 1A**). Les substituants portés par l'unité diamine correspondent aux chaînes latérales d'acides α -aminés. Ainsi, le squelette principal d'une oligourée possède un site donneur de liaison hydrogène supplémentaire par rapport à leurs homologues oligoamides. Des études structurales à haute résolution en solution et à l'état solide ont permis de montrer que ces oligourées adoptent des structures en hélice droite 2,5 bien définies, stabilisées par un réseau de liaisons hydrogène à trois centres. Par la suite, ces observations ont conduit à se questionner sur l'impact de la longueur de l'espaceur entre deux unités diamine sur la structuration des oligomères résultants. L'idée a donc été d'insérer un connecteur plus long, de type diacide, entre chaque unité diamine afin de déterminer si la structure hélicoïdale est conservée ou bien si le nouvel espaceur peut induire une structure étendue (**Figure 1B**). Le connecteur étant un dérivé de diacide, les liaisons formées entre chaque unité ne sont plus des urées mais des amides.

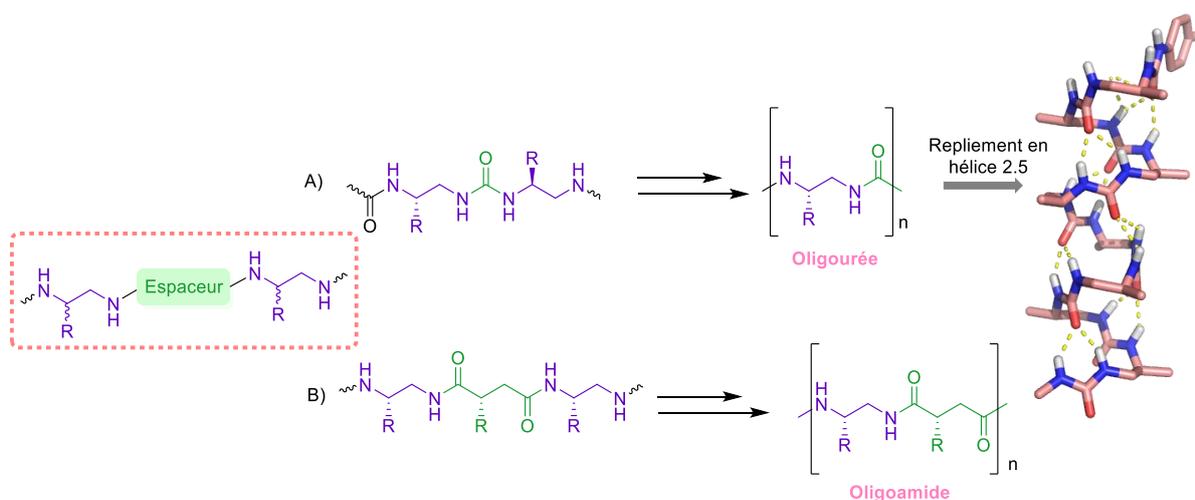


Figure 1 : Oligomères conçus à partir de motifs diamine. A) Oligourées repliées en hélice 2.5 (rés/tour). B) Oligoamides alternant des motifs diamines et diacides.

Le dimère **III.1** contenant une unité diamine et une unité diacide a été synthétisé (**Figure 2A**). Les études structurales à l'état solide ont montré la formation d'une structure étendue mimant un brin β (**Figure 2B**). En effet, la structure cristallographique du composé **III.1** a notamment révélé que celui-ci se stabilisait *via* des liaisons hydrogène formées avec des brins adjacents typiques d'une structure en feuillet β . A partir de ces études, un projet visant à concevoir des molécules artificielles, dérivées de diacides et de diamines, conçues pour se replier en feuillet β a été initié par le Dr. Christel Dolain. L'approche envisagée propose de coupler des brins constitués alternativement d'unités diamines et diacides sur le motif diamine D-Pro-DADME (prolyl-(1,1-diméthyl)-1,2-diaminoéthyle), qui est également stabilisé par une liaison hydrogène (**Figure 2B**). Ce dernier a été décrit par S.H. Gellman qui a démontré que ce pseudo-coude β possède la capacité intrinsèque d'induire un repliement en feuillet β .² D'après les données cristallographiques, la distance entre ces deux mimes de brins β est compatible avec l'insertion du coude D-Pro-DADME.

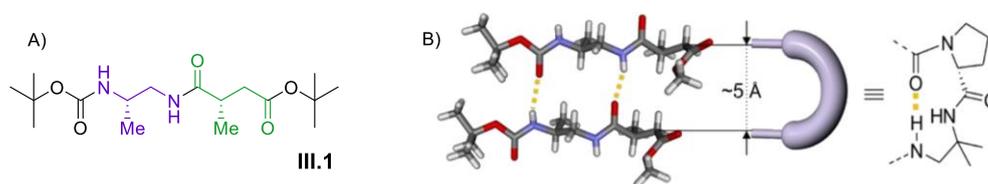


Figure 2 : A) Structure étendue d'un dimère de diamine (violet) et diacide (vert). B) Structure cristallographique de ces mêmes brins stabilisés par des liaisons hydrogène interbrins et structure du coude D-Pro-DADME.

Une première génération de mimes de feuillets β a donc été développée en couplant l'extrémité de ces brins au motif D-Pro-DADME *via* la formation de liaisons amide (**Figure 3A**). Des études effectuées en solution par des expériences de RMN ont démontré que ce modèle adoptait un repliement en feuillet β type « épingle à cheveux » stabilisé par un réseau de liaisons hydrogène. Par la suite, les tentatives d'élongation des brins ont mené à des problèmes de solubilité. L'hypothèse émise à ce sujet est la formation possible d'agrégats à cause des NH et des carbonyles non engagés dans des interactions intramoléculaires qui sont donc susceptibles d'interagir entre eux, en intermoléculaire. Ce système a donc été réadapté en modulant des paramètres structuraux tels que la rigidité et la longueur des brins. Alors, une seconde génération des foldamères d'oligoamides a été synthétisée comportant jusqu'à trois brins diacides et deux coudes artificiels (**Figure 3B**). Les études menées en solution par RMN sur ces premières molécules ont montré qu'un réseau de liaisons hydrogène, entre les oxygènes des groupements carbonyle d'un brin et les protons amide du brin adjacent, stabilise le repliement en feuillet β . Plusieurs architectures capables de se replier en feuillet β ont alors été synthétisées, mais ce dernier concept était limité à des molécules à trois brins. En effet, l'enchaînement des brins diacides et de coudes D-Pro-DADME engendre une rupture du réseau de liaisons hydrogène responsable de la structuration. Comme montré sur la **Figure 3C**, la stratégie de synthèse suivie jusqu'alors pour accéder à des foldamères multi-brins ne permet pas d'accéder à des squelettes de plus de deux coudes et 3 brins.

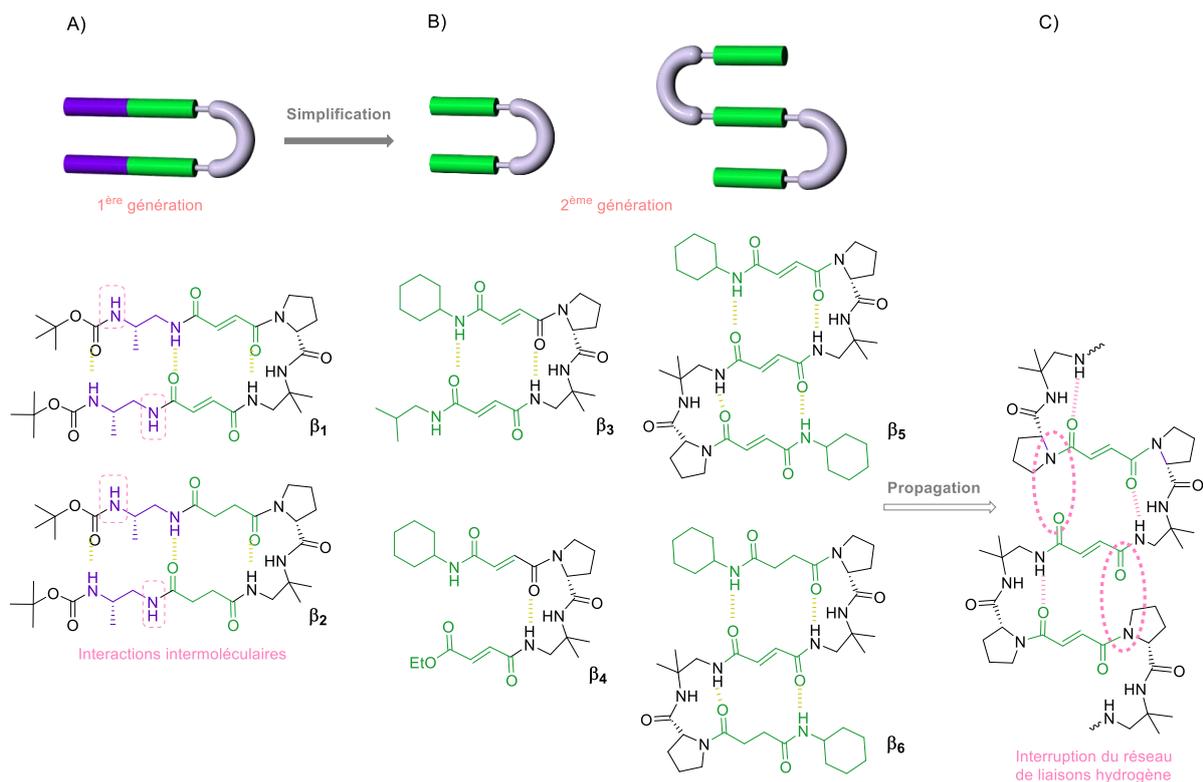


Figure 3 : Evolution du développement des foldamères mimant des feuillets β multi-brins à partir de motifs diacides (vert) et diamines (violet). A) Première génération. B) Deuxième génération. C) Propagation des liaisons hydrogène vers des architectures à cinq brins. Les liaisons hydrogène intramoléculeaires sont représentées en pointillés.

A partir de ces résultats, il a fallu concevoir de nouveaux mimes de feuillets β compatibles avec des structures de plus de trois brins artificiels.

2) Vers des architectures multi-brins

a) Conception de foldamères diamine/diacide repliés en feuillet β

Dans l'optique de parvenir à des molécules multi-brins, une troisième génération de foldamères a été envisagée. En raison de ce nouvel objectif, une voie de synthèse adéquate a été établie afin de concevoir des structures complexes possédant davantage de brins. L'introduction de fonctions urées trisubstituées formées à partir d'un brin possédant le motif diamine a été considérée (**Figure 4**). Ces dernières aideraient à maintenir des liaisons hydrogène intramoléculeaires nécessaires pour accéder à des architectures de plus de trois brins. Alors, les molécules cibles de ce projet de thèse sont les foldamères diamine/diacide β_7 et β_8 . Pour établir un chemin synthétique robuste vers le foldamère à cinq brins β_8 et évaluer l'impact de l'introduction des fonctions urées sur le repliement, une première molécule cible β_7 comprenant trois brins et deux coudes β artificiels a d'abord été considérée (**Figure 4**).

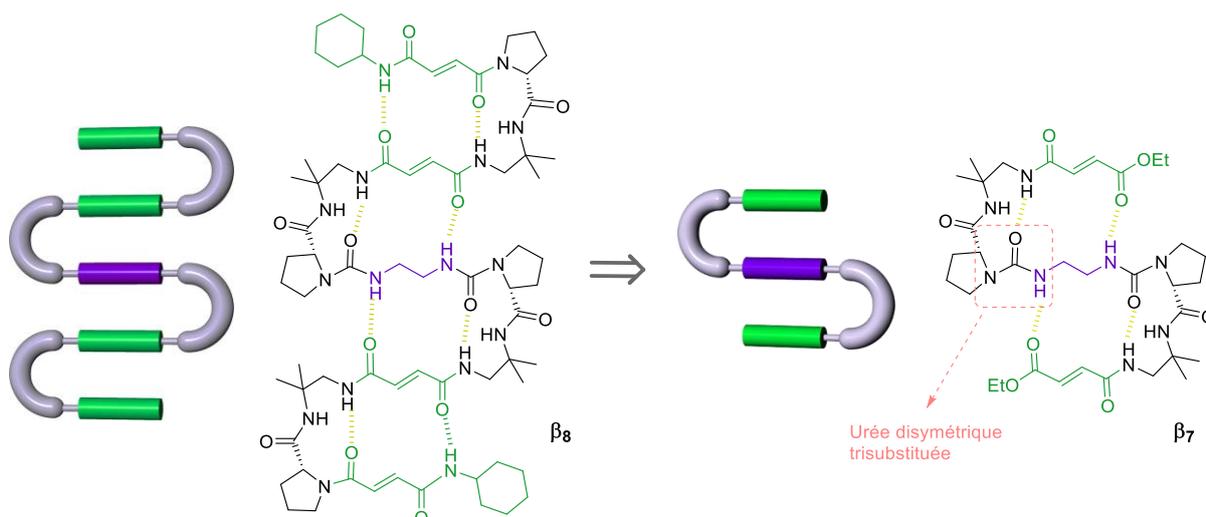


Figure 4 : Troisième génération de foldamères repliés en feuillets β multi-brins. Molécule cible à cinq brins (gauche) et le modèle d'étude à trois brins (droite).

Par conséquent, c'est sur ce modèle d'étude à trois brins que les synthèses évoquées dans ce chapitre seront testées, dans l'optique de parvenir à synthétiser une architecture à cinq brins.

b) Analyse rétrosynthétique du foldamère à trois brins

Les molécules conçues pour ce projet ont la particularité de présenter chacune un axe de symétrie qui permet une synthèse convergente en couplant deux fragments semblables de part et d'autre d'un brin central. Ainsi, une première stratégie fut envisagée pour suivre une route convergente vers le foldamère à trois brins β_7 . Une analyse rétrosynthétique propose de coupler un motif brin-coude **III.2** de part et d'autre de l'éthylène diamine **III.3** en une seule étape (**Figure 5**). L'avantage, ici, est d'obtenir la molécule β_7 selon un couplage convergent final sachant que le motif brin-coude **III.2** est facilement accessible par le biais de couplages peptidiques entre unités disponibles commercialement. Le défi synthétique pour obtenir cette structure à trois brins réside dans la synthèse des urées disymétriques trisubstituées assurant la jonction entre le brin diamine et les prolines.

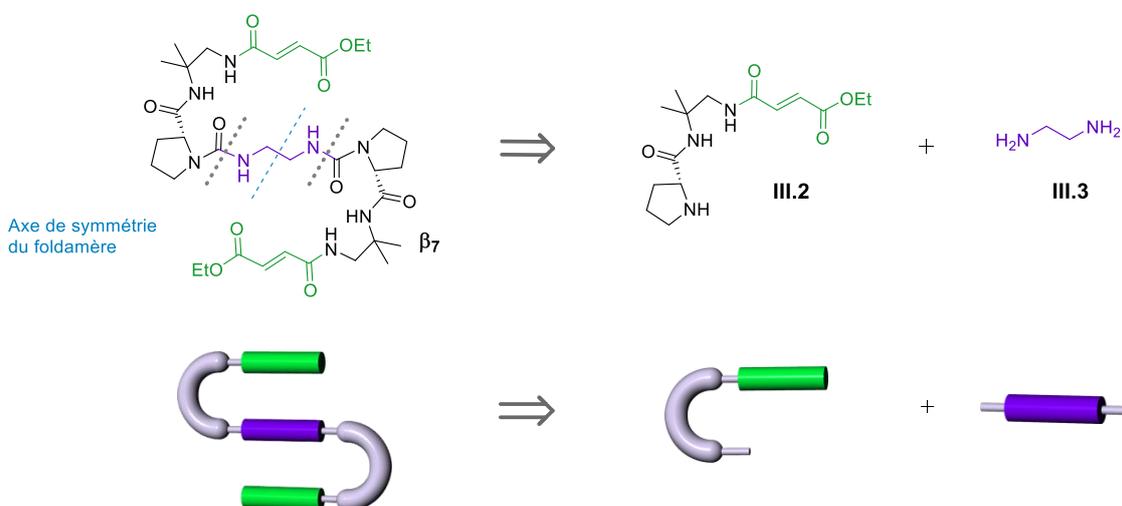


Figure 5 : Analyse rétrosynthétique pour mener au foldamère diacide/diamine à trois brins β_7 . Les coupures caractéristiques sont représentées en pointillés gris qui délimitent le motif brin-coude (noir et

vert) à coupler avec la diamine (violet). En bas, représentation schématique de la décomposition du foldamère à trois brins.

c) Synthèse du motif brin-coude III.2

Le premier point fut consacré à la synthèse du motif brin-coude et ce, en partant d'un dérivé d'éthylène diamine, 1,2-diamino-2-méthylpropane. Ce composé **1** est sélectivement mono-protégé par un groupement benzyle introduit avec un excès du carbonate de benzylphényle.³ Cette sélectivité est permise car l'amine primaire dont le carbone en α est dialkylé présente un encombrement stérique trop important pour se lier à un groupement protecteur benzyle. Le composé **2** a permis d'accéder au mime de coude β **3** protégé par deux groupements orthogonaux : Boc et Cbz. Le produit **3** a été obtenu avec un bon rendement de 91 % par le biais d'un couplage peptidique entre la Boc-D-Pro-OH et le dérivé **2** en présence du carodiimide EDC et de l'additif HOBt (**Schéma 1**).

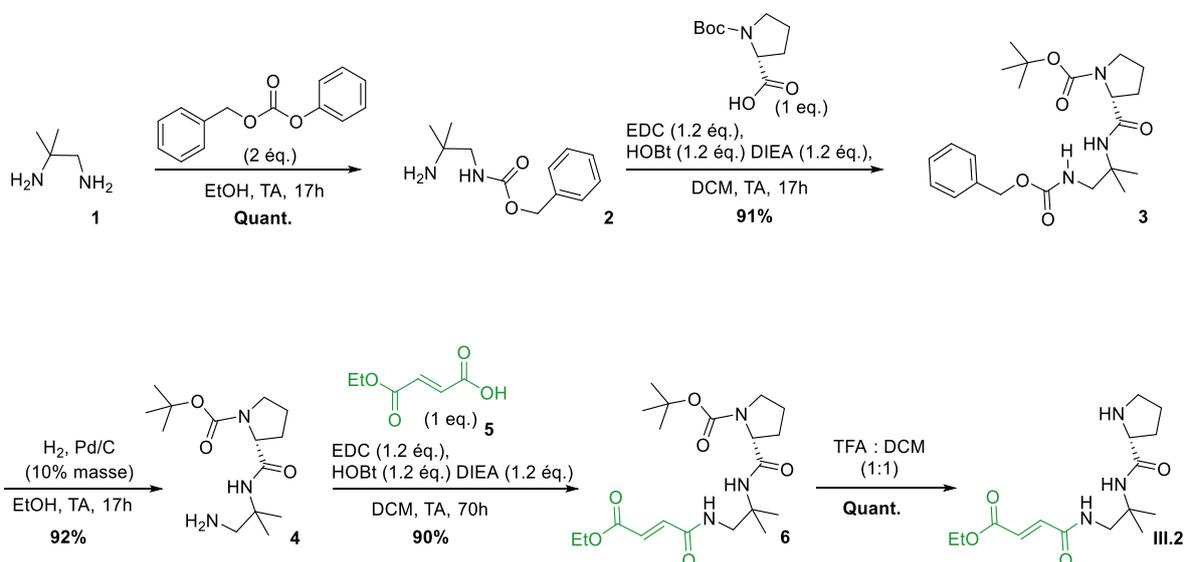


Schéma 1 : Synthèse du motif brin-coude III.2.

Il s'en est suivi la déprotection du groupement benzyle *via* une hydrogénation catalysée au palladium pour former l'unité Boc-D-Pro-DADME **4**, dont la proline est protégée par le groupement Boc. Le composé **4** ainsi obtenu a été couplé au monoéthylfumarate **5** composant le mime de brin β . Cette réaction a été réalisée en présence des agents de couplage EDCI/HOBt pour former un lien amide menant à la molécule **6**. Le groupement Boc a été déprotégé dans des conditions acides à l'aide d'un mélange TFA/DCM pendant trente minutes pour mener au fragment brin-coude désiré III.2. Finalement, le motif brin-coude III.2 a été obtenu aisément avec un rendement global de 75 %. La poursuite de la synthèse vers la molécule cible impliquait un couplage convergent entre deux équivalents du motif brin-coude III.2 pour un équivalent d'éthylène diamine afin de former les urées trisubstituées désirées en une seule étape. Il a donc été question de trouver une activation adaptée à la fonction amine pour former les urées trisubstituées. Pour ce faire, il y avait deux stratégies possibles : (1) l'activation du brin diamine III.3 à coupler ensuite avec le motif brin-coude III.2 synthétisé ou (2) l'activation de la proline (amine secondaire) de ce dernier qui réagirait ensuite avec la diamine III.3.

d) Activation des amines primaires de l'éthylène diamine

Différentes méthodes de synthèse des urées mono-, di-, tri- et tétra-substituées ont été décrites dans la littérature. Ces méthodes sont généralement basées sur la réaction d'une amine avec un agent de carbonylation comme le phosgène et ses dérivés^{4,5}, différents carbonates^{6,7,8}, *N,N'*-carbonyldiimidazole^{9,10,11} ou 1,1'-bisbenzotriazole¹², des isocyanates^{13,14} ou des carbamates.^{15,16,17,18}

Parmi ces méthodes, l'une d'entre elle est couramment utilisée au sein de notre laboratoire pour activer des amines primaires afin de former des oligourées. Cette stratégie est basée sur la réaction d'une amine avec un carbonate de *N,N'*-disuccinimidyle et les monomères de carbamate de succinimide résultants sont obtenus avec de bons rendements.^{19,20} En vue d'un couplage convergent, l'activation de l'éthylène diamine **III.3** par un groupement type carbamate de succinimide sur chacune des amines a été testée (**Schéma 2**). L'éthylène diamine a été mise en présence du carbonate de disuccinimidyle (en excès) pour former le composé activé **7**.

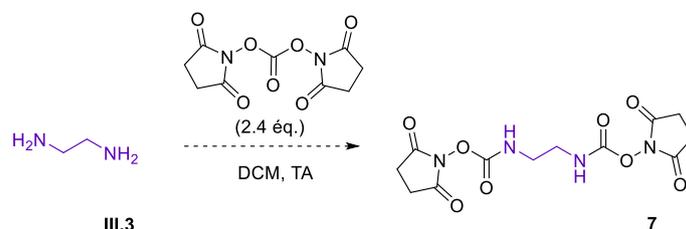


Schéma 2 : Première stratégie d'activation de l'éthylène diamine **III.3**.

Malheureusement, cette stratégie n'a pas porté ses fruits car la diamine **III.3**, une fois activée, réagit systématiquement sur elle-même pour cycliser et mener à la formation de la 2-imidazolidinone **8** (**Schéma 3**). Cette réaction avait déjà été mise en évidence par H. Ogura *et al.* lors d'une étude sur des imidocarbamates où plusieurs dérivés de diamine ont cyclisé en présence de DSC.²¹

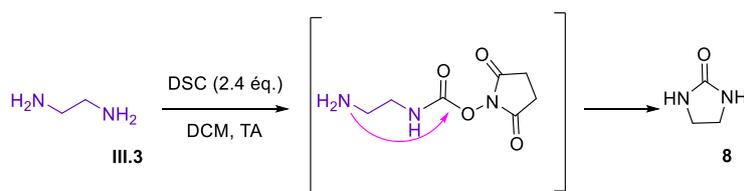


Schéma 3 : Cyclisation de l'éthylène diamine **III.3** menant au composé 2-imidazolidinone **8**.

Dans l'espoir de contrecarrer cette cyclisation, le concept d'un couplage convergent a été mis de côté pour suivre un chemin réactionnel itératif en enchaînant des étapes de protection/déprotection, d'activation et de couplages peptidiques. Alors, l'éthylène diamine **III.3** a été mono-protégée par un groupement Boc en amont de son activation par le DSC pour former l'intermédiaire **9** (**Schéma 4**). L'activation de l'amine primaire restante a été effectuée en présence du carbonate de *N,N'*-disuccinimidyle pour mener au produit **10**. L'amine activée a réagi avec le motif brin-coude **III.2** selon un couplage peptidique formant alors le composé à deux brins **11**. Ensuite, l'autre extrémité de la diamine a été déprotégée en conditions acides donnant le composé **12** qui a été, à son tour, activé en carbamate de succinimide **13** en

présence de DSC. Pour terminer, l'idée était de procéder à un couplage entre le dérivé **13** activé avec le deuxième fragment périphérique **III.2** pour générer la deuxième urée trisubstituée et de surcroît former la molécule cible à trois brins β_7 . Cependant, la formation du composé **13** résultant de l'activation du produit **12** par le DSC n'a pas été observée.

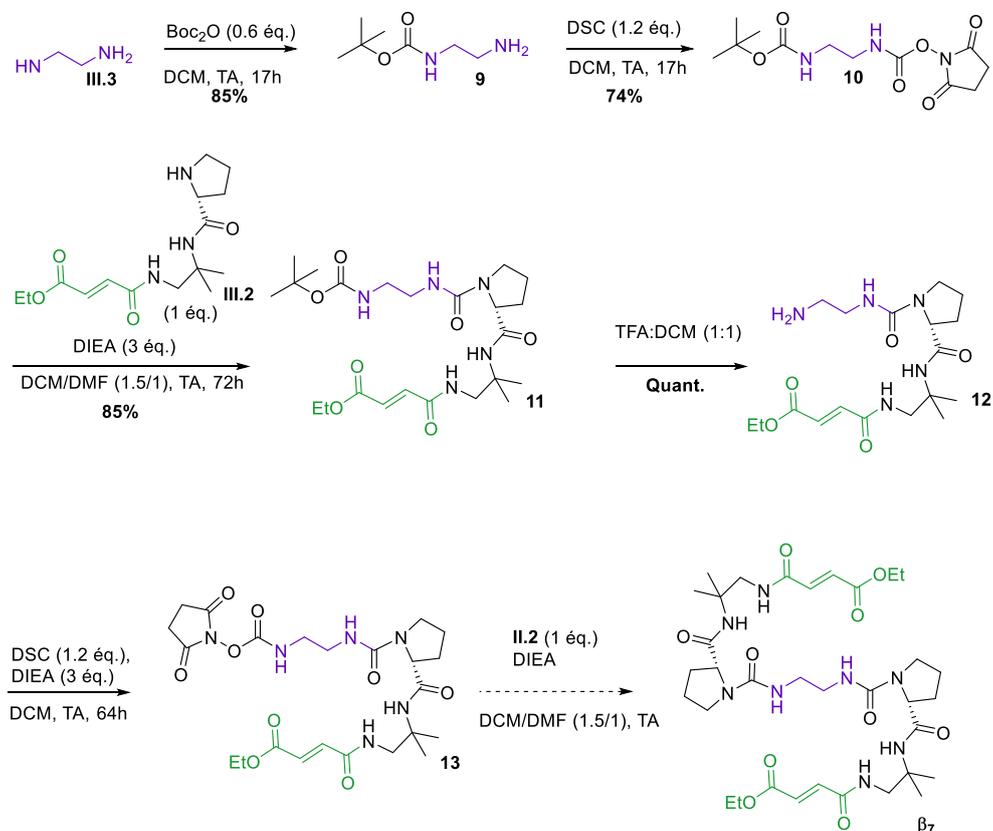


Schéma 4 : Deuxième stratégie d'activation de l'éthylène diamine **III.3**.

Des analyses par RMN ainsi que par spectrométrie de masse ont permis d'identifier le produit formé suite à l'activation du dérivé **12** par le DSC. Le produit résultant de cette étape de synthèse **14** résulte en fait de la cyclisation de l'éthylène diamine (Schéma 5). Par conséquent, le dérivé **13** demeure un intermédiaire non isolable menant directement à la cyclisation intramoléculaire.

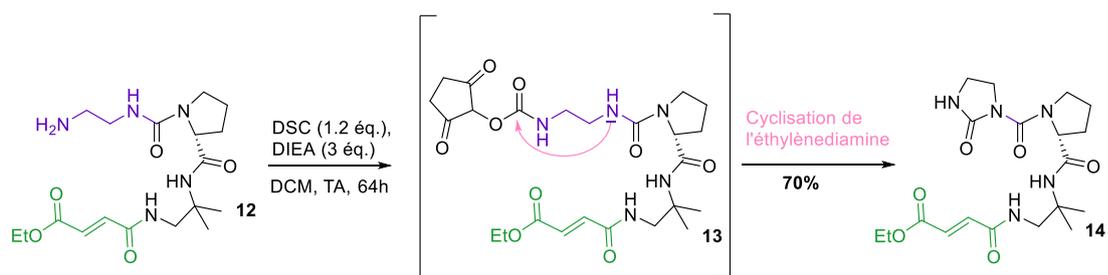


Schéma 5 : Formation du composé **14**.

Le spectre HMBC du composé **14** ci-dessous montre effectivement que la molécule possède cinq signaux caractéristiques de carbonyle (Figure 6). Cette analyse a notamment permis de démontrer que le carbone C_{16} est uniquement corrélé au $CH\alpha$ de la proline et d'identifier les CH_2 (C_{18}/C_{19}), le carbonyle et le NH formant l'urée cyclique. Il a également été possible

d'attribuer les signaux relatifs aux CH_2 éthyléniques ($\text{C}_{4/5}$) ainsi que les protons amides du brin et du coude artificiel.

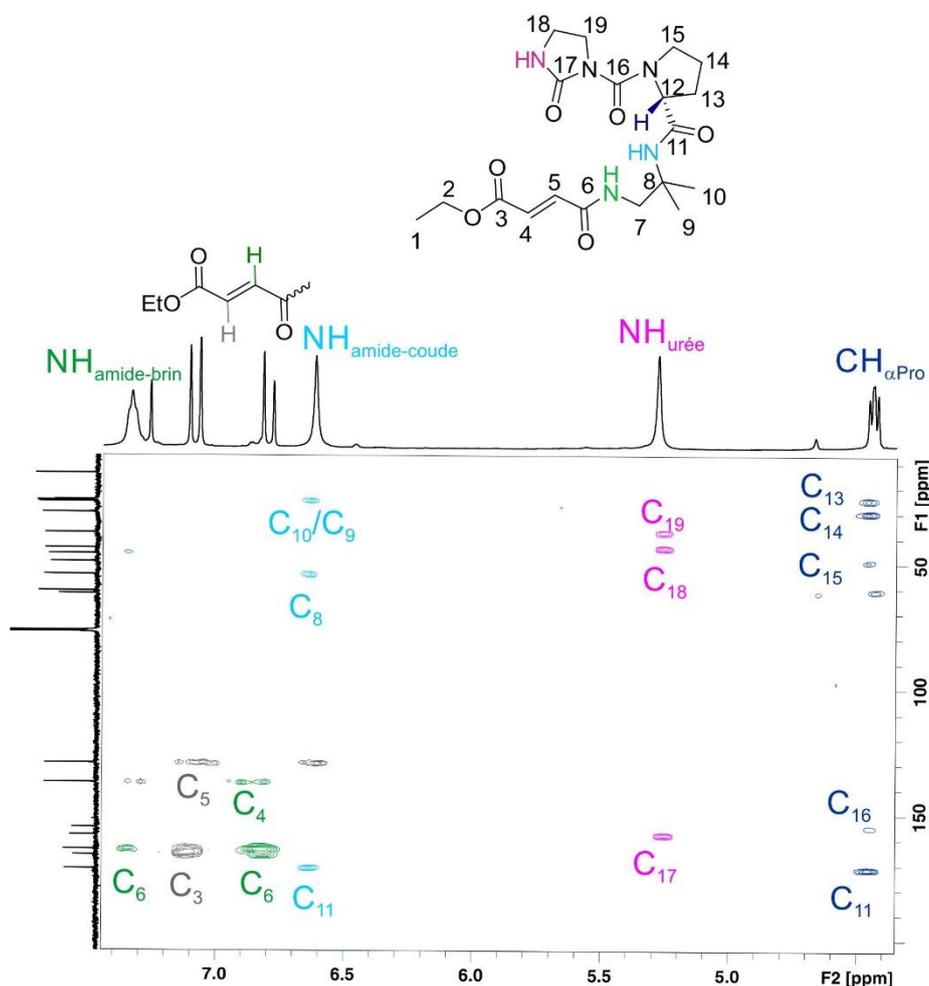


Figure 6 : Spectre HMBC ^1H - ^{13}C de la molécule **14** (400MHz, CDCl_3). Zoom sur la région des NH.

Pour pallier aux problèmes relatifs à la cyclisation récurrente de l'éthylène diamine, une seconde stratégie a été mise au point pour effectuer ce couplage de manière convergente. Cette nouvelle stratégie s'appuie sur l'activation de la proline du motif brin-coude précédemment décrit.

e) Activation de l'amine secondaire de la proline

Pour commencer, l'activation de l'amine secondaire de la proline a été exécutée sur un système modèle **15** dérivant du motif D-Pro-DADME en présence de carbonate de *N,N'*-disuccinimide (**Schéma 6**). Le carbamate de succinimide **16** résultant a pu être isolé pour ensuite procéder à la synthèse d'une urée trisubstituée par l'introduction de la propylamine. L'idée était de s'affranchir du problème de cyclisation intramoléculaire des dérivés diamines en utilisant cette fois une amine primaire simple. Le composé désiré **17** avec l'urée trisubstituée a été obtenu avec un faible rendement de 15 %. Des caractérisations par spectroscopie RMN et spectrométrie de masse ont permis d'identifier la structure du produit majoritairement formé à l'issue de cette réaction. Ce produit **18** est le résultat de l'ouverture du cycle du succinimide

décrite par N.I. Vasilevich et D.H. Coy dont le mécanisme est montré ci-dessous.²² Cette équipe a également travaillé avec le DSC pour former un carbamate activant une amine et a mis en évidence le fait que dans le cas d'une amine secondaire activée, la réaction avec une autre amine conduit à un mélange de deux produits : l'urée désirée et le dérivé correspondant à l'ouverture du cycle succinimide.

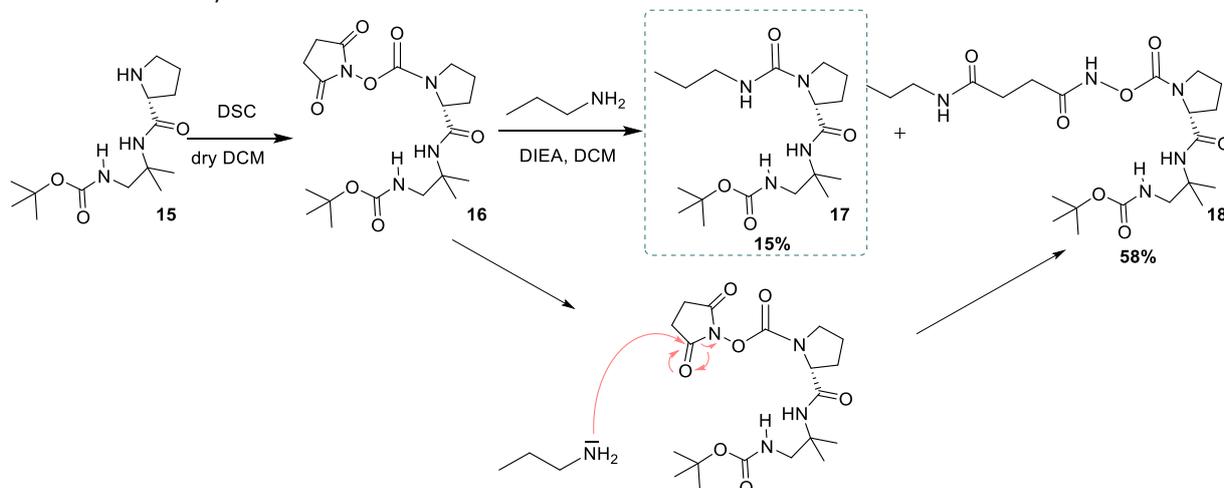


Schéma 6 : Synthèse de l'urée dissymétrique trisubstituée **17** par activation de l'amine secondaire de la proline.

D'après ces observations l'activation par le DSC de l'amine secondaire de la proline a semblé incompatible avec la stratégie de synthèse des foldamères diacides/diamines multi-brins.

Comme mentionné auparavant, la synthèse d'urées tri-substituées peut également être effectuée par une activation préalable d'une amine par un agent type carbamate. Alors, la proline du motif brin-coude **III.2** précédemment synthétisé a été activée par un nouveau motif : le carbamate de 4-nitrophényle (**Schéma 7**). Le composé **19** a été préparé *via* une substitution nucléophile de l'amine secondaire de la proline sur le chloroformate de 4-nitrophényle selon la voie de synthèse décrite par N.C.O Tomkinson.¹⁸ A partir du composé **19**, la réaction de formation d'une urée trisubstituée **20** a été testée avec une amine primaire simple : l'octylamine. A l'issue de cette réaction, un nouveau produit a été formé mais ne correspondait pas à celui souhaité.

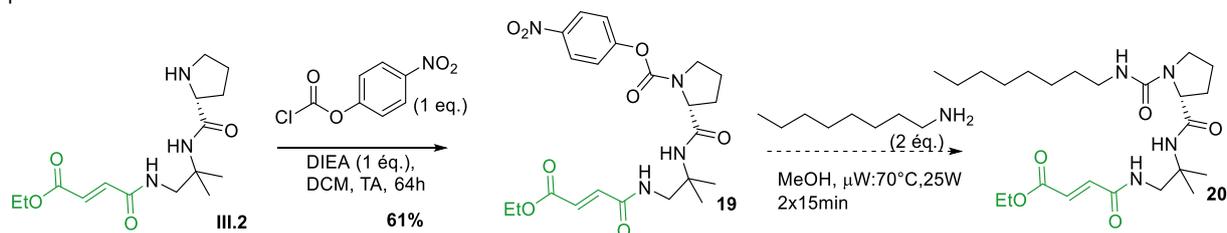


Schéma 7 : Activation de la proline sous forme de carbamate de *para*-nitrophényle.

A la suite d'analyses par RMN et spectrométrie de masse il s'est avéré qu'une cyclisation intramoléculaire avait eu lieu (**Schéma 8**). En effet, un proton amide sur le motif du coude vient réagir sur le carbonyle de la fonction activatrice pour former le dérivé d'hydantoïne **21**.²³

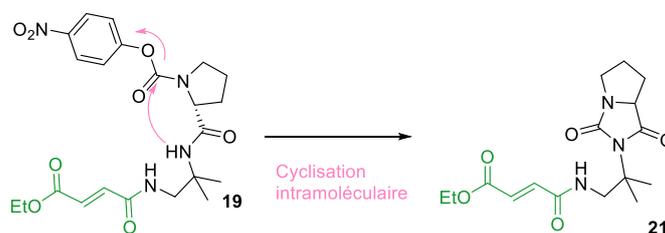


Schéma 8 : Cyclisation intramoléculaire menant au dérivé hydantoïne **21**.

Les études précédentes n'ont pas permis d'aboutir à la construction de la molécule à trois brins β_7 désirée. En effet, il semble impossible d'activer l'éthylène diamine **III.3** pour qu'elle soit attaquée par l'amine de la proline, selon une substitution nucléophile. En parallèle, une méthode a permis d'activer la proline. Cependant, la formation des urées trisubstituées correspondantes n'a pas pu aboutir en raison de la présence de protons amide au niveau du motif coude générant une cyclisation intramoléculaire. Par conséquent, il a été nécessaire de repenser l'analyse rétrosynthétique en découpant différemment la molécule afin de former l'urée trisubstituée en amont du couplage avec le brin périphérique.

3) Seconde approche rétrosynthétique

a) Couplage convergent avec formation des coudes β en fin de synthèse

L'idée d'obtenir des mimes de feuilletts β multi-brins selon une voie convergente restait une stratégie attractive car elle permettrait notamment d'alléger le nombre d'étapes de synthèse. C'est la raison pour laquelle un deuxième chemin de synthèse fut élaboré où le foldamère β_7 à trois brins est issu de deux synthons : le brin périphérique **III.4** et le brin central **III.5** (**Figure 7**). Ce dernier contient le dérivé diamine **III.3** lié de part et d'autre de chaque proline **III.6**, formant ainsi les urées trisubstituées. Cette stratégie permet de se concentrer d'abord sur la synthèse d'urées trisubstituées en s'affranchissant de potentielles cyclisations résultant de l'activation de l'amine secondaire de la proline. Dans un deuxième temps, le couplage convergent consistera à former les liaisons amide de chaque coude D-Pro-DADME pour obtenir la molécule cible à trois brins β_7 .

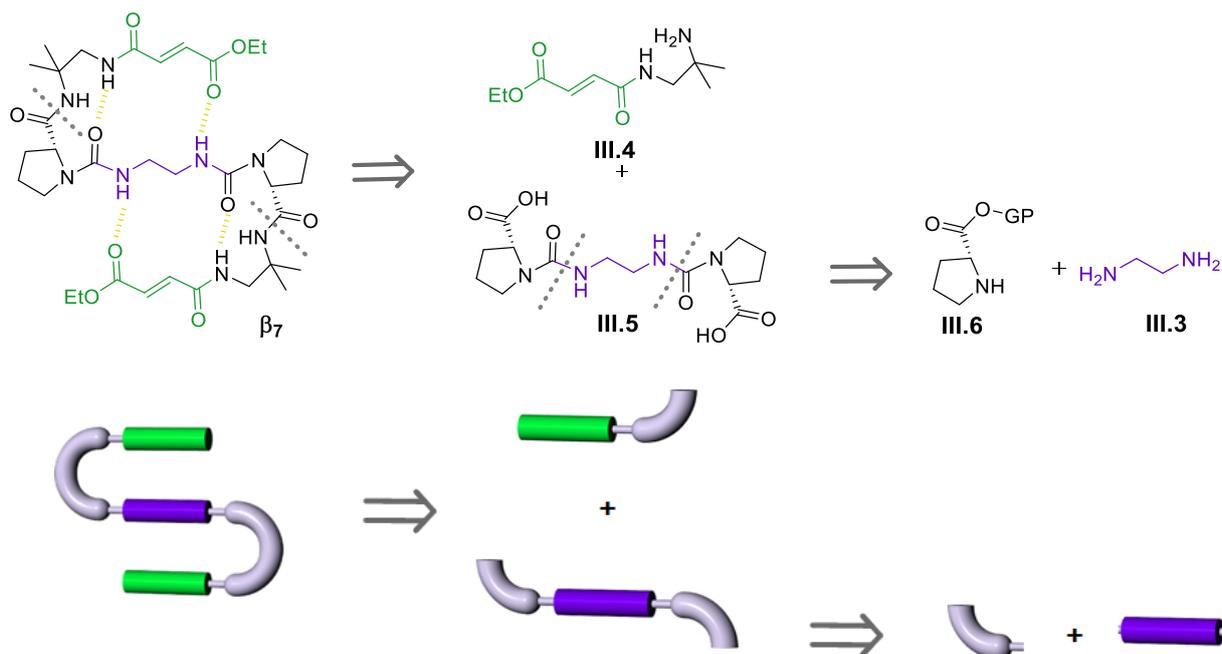


Figure 7 : Nouvelle approche rétrosynthétique du foldamère à trois brins.

Alors, dans le but d'assembler ce feuillet artificiel à trois brins il a été question de concevoir d'une part, un brin central comportant les urées trisubstituées **III.5** entre la proline et l'éthylène diamine et d'autre part, le brin périphérique **III.4** dérivant d'un motif diacide.

b) Synthèse des fragments de la molécule cible à trois brins β_7

La deuxième voie de synthèse élaborée pour parvenir à la molécule finale propose de préparer, simultanément, les brins diacide et diamine qui seront ensuite reliés par des mimés de coudes β , le motif D-Pro-DADME, formé lors du couplage convergent final.

i. Synthèse du fragment central **III.5**

L'obtention du brin **III.5** composé du motif diamine requiert la formation d'urées disymétriques trisubstituées *via* l'activation de l'amine secondaire de la proline. Or, l'activation des amines secondaire pour synthétiser des urées tri ou tétrasubstituées est connue pour être difficile ce pourquoi, des méthodes spécifiques ont été développées dont l'activation de l'amine secondaire en carbamate d'imidazole. Une première stratégie proposée par R. A. Batey consiste à activer la proline en sel de carbamoylimidazolium avant le couplage avec l'amine primaire²⁴ (**Figure 8**, Voie B). K. K. Balasubramanian a, quant à lui, développé une voie de synthèse où le couplage est effectué en présence de triméthyle d'aluminium²⁵ (**Figure 8**, Voie A) et D.H. Thompson a utilisé le chlorure de zirconium²⁶ (**Figure 8**, Voie C) pour obtenir des urées disymétriques trisubstituées.

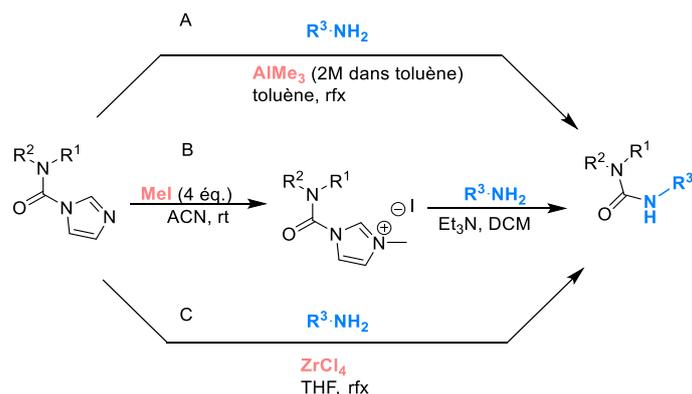


Figure 8 : Méthodes de synthèse d'urées trisubstituées dissymétriques *via* l'activation d'amines secondaires en carbamate d'imidazole.

Dans notre cas, la méthode développée par R.A Batey a été retenue car elle présentait de meilleurs rendements.²⁴ Cette voie consiste donc à activer une amine secondaire en carbamate d'imidazole qui est ensuite alkylé en présence d'iodométhane pour former un intermédiaire plus réactif type sel de carbamoylimidazolium. Le couplage entre ce dernier et la deuxième amine donne lieu à la formation de l'urée trisubstituée désirée. De plus, la voie de synthèse du fragment **III.5** fut d'abord mise en place sur la L-proline benzylester puis appliquée à son énantiomère, plus coûteux, en configuration D (**Schéma 9**) et les rendements à chaque étape sont similaires pour ces deux énantiomères.

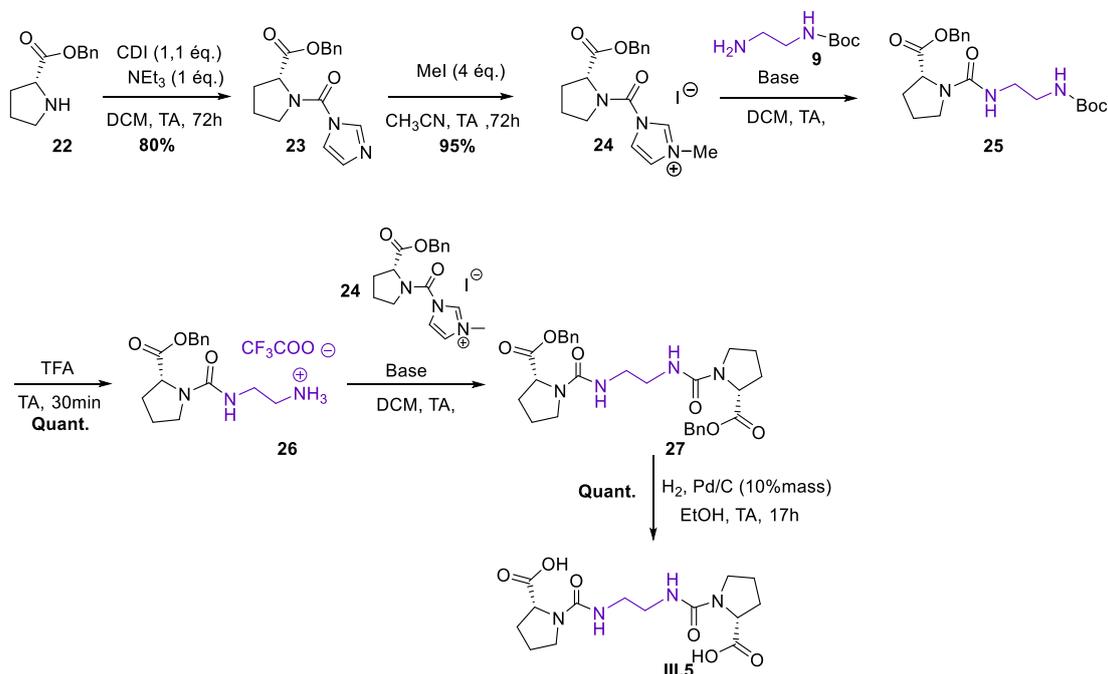


Schéma 9 : Synthèse du brin central **III.5** comprenant deux urées dissymétriques trisubstituées.

Comme mentionné précédemment, la proline **22** D-Pro-OBn a été activée par un carbamate d'imidazole **23** en présence de N,N' -carbonyldiimidazole (CDI) qui a été converti en sel de carbamoylimidazolium **24** avec d'excellents rendements. Pour poursuivre la synthèse du fragment **III.5**, l'optimisation des conditions de couplage menant aux urées trisubstituées a été nécessaire et les résultats de ces réactions ont été retranscrits dans les **tableaux 1 et 2**. Le

premier couplage pour former une urée trisubstituée menant au dérivé **25** a alors été effectué avec l'éthylène diamine **9** mono-protégée par Boc. Cette réaction a d'abord été exécutée en présence de triéthylamine (TEA) comme dans les résultats rapportés par R.A. Batey.²⁴ Lorsque la réaction a été effectuée en présence d'un équivalent de TEA pour un équivalent d'amine **9**, un meilleur rendement a été obtenu en augmentant le temps de réaction comme le montrent les conditions 1 et 2 du **Tableau 1**. L'ajout de TEA en large excès pour la condition 3 n'a pas permis de dépasser les 39 % de rendement. Cet inconvénient limite le rendement global de la synthèse puisque c'est seulement la troisième étape sur les six menant au brin central. Récemment, Cyril Mallet, étudiant en master 2, a étudié par RMN ¹H la stabilité du sel de carbamoylimidazolium **24** en présence de différentes bases. Il est apparu que la triéthylamine dégrade ce composé tandis que la 2,4,6-triméthylpyridine (collidine) le détériore moins. En effet, en comparant les spectres RMN ¹H du composé **24** solubilisé dans le chloroforme seul, en présence de TEA ou de 2,4,6-triméthylpyridine la disparition des signaux caractéristiques de **24** a été constatée en présence de TEA (**Figure 9B**). Sur le spectre RMN de **24** mesuré en présence de collidine, de nouveaux signaux sont apparus mais ceux du composé en question ont été conservés (**Figure 9C**). Le couplage a donc été reproduit à l'aide de la 2,4,6-triméthylpyridine qui semble moins dégrader le sel de carbamoylimidazole. Le produit a certes été formé avec un meilleur rendement qu'auparavant mais le rendement restait inférieur à 50 % (**Tableau 1** condition 4).

Tableau 1 : Optimisation des conditions de formation de la 1^{ère} urée trisubstituée **25**.

Conditions	Amine 9	Base	Temps	Rendement 25
1	1 éq.	TEA 1 éq.	15h	19 %
2	1 éq.	TEA 1éq.	5 jours	28 %
3	1 éq.	TEA 4 éq.	5 jours	39 %
4	1 éq.	2,4,6-triméthylpyridine 1 éq.	2h30	47 %
5	1 éq.	-	1h30	39 %
6	2 éq.	-	17h	63 %
7	3 éq.	-	17h	67 %

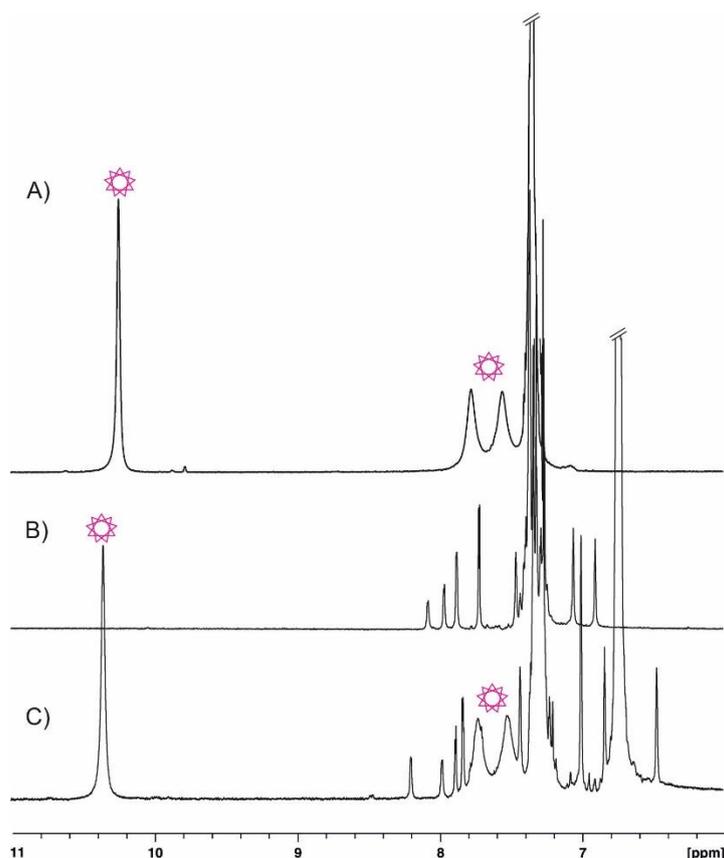


Figure 9 : Spectres RMN ^1H (300MHz) du sel activé **24**. A) en l'absence de base. B) En présence de TEA. C) en présence de 2,4,6-triméthylpyridine.

Lorsque cette même réaction a été effectuée sans base pour éviter toute dégradation du produit **24**, il a été possible d'accéder à des rendements plus élevés que pour les couplages en présence de base (**Tableau 1**, condition 5). De ce fait, une hypothèse a été émise selon laquelle la diamine jouerait elle-même le rôle de base ce pourquoi, en présence d'un seul équivalent de ce réactif la conversion en urée est limitée. Effectivement, si la protonation de la diamine a lieu, celle-ci n'est plus en mesure d'assurer la substitution nucléophile. Alors, le premier couplage a pu être optimisé en augmentant le nombre d'équivalents d'amine **9** et mène à l'urée trisubstituée correspondante **25** à hauteur de 67 % de rendement en 17h ce qui confirme l'hypothèse en question (**Tableau 1**). Une fois que cette urée a été formée, le groupement a été déprotégé dans des conditions acides menant au composé **26**.

La formation de la deuxième urée **27** n'a pas pu être optimisée de la même façon puisque l'ajout d'une base est nécessaire afin de rendre l'amine primaire **26** nucléophile celle-ci étant introduite sous la forme d'un sel de TFA (**Schéma 9**). Le sel de carbamoylimidazole **24** a semblé plus stable en présence de la 2,4,6-triméthylpyridine plutôt que la triéthylamine mais finalement, le rendement de ce deuxième couplage est resté aux alentours de 20 % quelle que soit la base utilisée (**Tableau 2**).

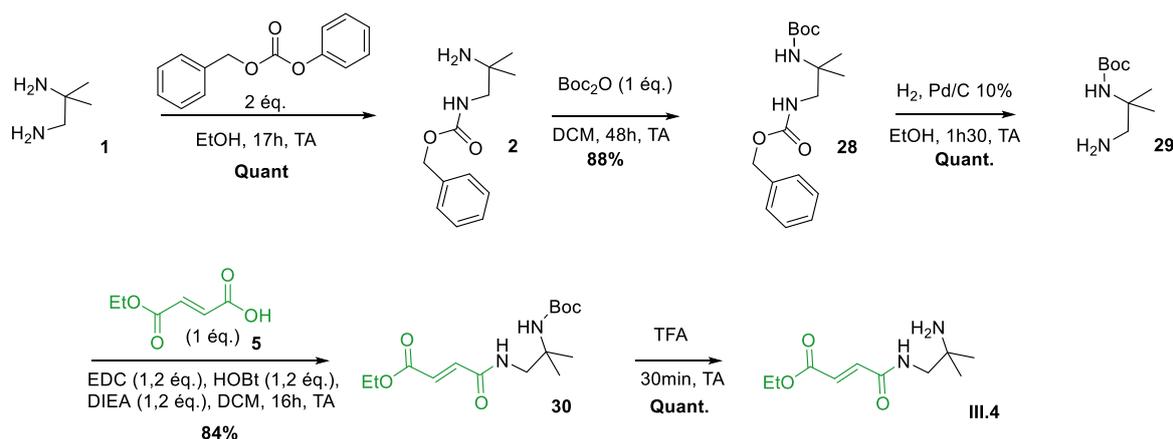
Tableau 2 : Optimisation des conditions de formation de la 2^{ème} urée trisubstituée menant au composé 27.

Conditions	Amine 26	Base	Temps	Rendement 27
1	1 éq.	TEA 2 éq.	5 jours	20 %
2	1 éq.	2,4,6-triméthylpyridine 1 éq.	2h30	20 %
3	2 éq.	TEA 2 éq.	17h	23 %

Une fois que le couplage avec la dernière proline activée a été accompli, la déprotection des esters de benzyle de la proline 27 a été effectuée *via* une réaction d'hydrogénation. Le fragment III.5 ainsi obtenu était apte à former un lien amide en réagissant avec la fonction amine du brin périphérique.

ii. Synthèse du fragment III.4

En parallèle de la synthèse précédemment évoquée, le brin périphérique a été préparé grâce à un jeu de groupements protecteurs orthogonaux (Schéma 10). La 1,2-diamino-2-méthylpropane 1 est protégée par un carbamate benzyle (Cbz) pour former le composé 2 de manière sélective.

**Schéma 10** : Synthèse du brin périphérique III.4 dérivant d'un motif diacide.

La deuxième amine primaire a été à son tour protégée par un Boc qui est orthogonal à la protection Cbz. L'introduction du groupement Boc a été effectuée en présence du dicarbonate de di-tert-butyle pour mener à l'intermédiaire 28. Le groupement benzyle a été ôté selon une hydrogénation catalysée au Pd/C, pour obtenir l'amine primaire 29. Cette dernière a ensuite été impliquée dans un couplage peptidique avec le mono-éthylfumarate 5 en présence d'EDC/HOBt. Un lien amide a alors été formé reliant le brin externe à une partie du pseudo-coude qui est encore protégé par un Boc générant le produit 30. Ce groupement Boc a été enlevé pour libérer la fonction amine du produit III.4 qui interviendra lors du couplage entre ce

brin et le brin central **III.5**, dont la synthèse a été précédemment décrite. L'ensemble des étapes s'est accompagné d'un bon rendement global de 74 %.

c) Synthèse de la molécule cible à trois brins β_7

La confection des brins précédents a permis de progresser vers la synthèse d'un mème de feuillet β à trois brins. Pour joindre de manière covalente les brins périphériques **III.4** sur l'unité centrale **III.5** il a été question de former deux mêmes liaisons amide (**Schéma 11**). Plus précisément, il s'agit de réaliser un couplage peptidique convergent engendrant la formation du pseudo-coude et donc du foldamère à trois brins β_7 . Les conditions testées pour optimiser ce couplage peptidique sont retranscrites dans le **Tableau 3**.

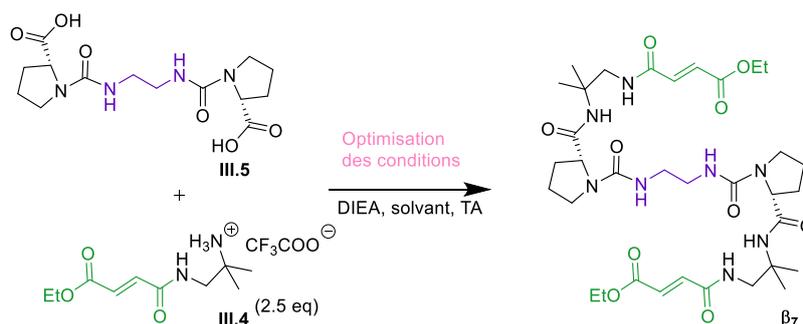


Schéma 11 : Couplage peptidique menant au foldamère à trois brins β_7 .

Tableau 3 : Optimisation des conditions du couplage convergent menant à β_7 .

Conditions	Agents de couplage	DIEA	Temps/solvant	Rendement
1	EDC (2.5 éq.) HOBt (2.5 éq.)	3.6 éq.	68h/DCM	18 %
2	PyBOP (2.5 éq.)	6.5 éq.	112h/DMF	46 %

Pour réaliser ce couplage, il a été nécessaire d'utiliser 2,5 équivalents d'agent de couplage et du brin **III.4** pour maximiser les chances d'obtenir le composé à trois brins β_7 en une seule étape. Une première tentative fut effectuée en alliant le couple EDC/HOBt avec la base DIEA en excès qui sert essentiellement à basifier l'amine du brin externe **III.4** pour accentuer son caractère nucléophile (**Tableau 3**). De cette manière le composé souhaité a été obtenu avec un rendement de 18 %. Ce faible rendement s'explique par la formation d'un produit secondaire **31** résultant d'une cyclisation entre l'acide libre de la proline et l'amine impliquée dans la liaison urée (**Schéma 12**). En effet, le composé **31** a pu être identifié par spectrométrie de masse et RMN ^1H et possède un dérivé cyclique type hydantoïne sur une extrémité du brin central. La deuxième extrémité du brin central a quant à elle été couplée au brin périphérique. Alors, pour optimiser cette réaction, l'idée fut d'utiliser un autre agent de couplage peptidique plus réactif afin de minimiser la formation du produit secondaire. La même réaction a donc été réalisée en utilisant cette fois le PyBOP à la place de l'EDC avec un large excès de base pour ajuster le pH à 9 (**Tableau 3**). La molécule cible β_7 a ainsi été obtenue avec un rendement plus élevé de 46 %.

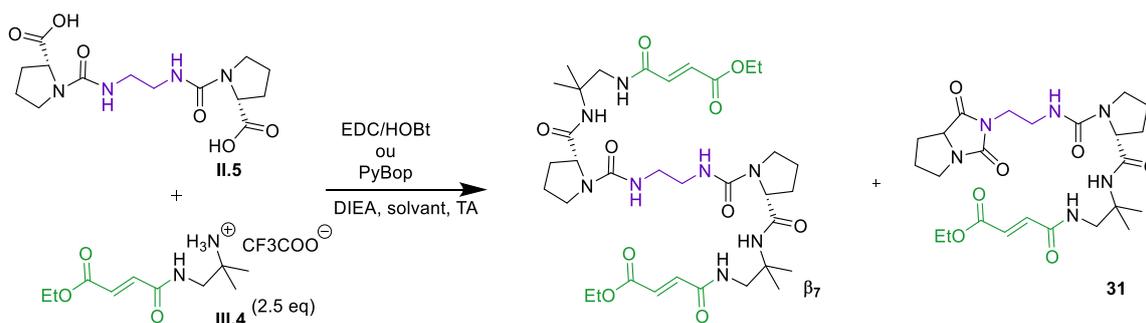


Schéma 12 : Couplage peptidique menant au foldamère β_7 et au produit secondaire 31.

D'après l'analyse du spectre RMN ^1H du produit brut, il a été possible de déterminer dans quelles proportions ces deux produits ont été formés (Figure 10). Il en est ressorti que le produit majoritaire formé est 31 suite à la réaction en présence d'EDC dans un ratio 34/66 (β_7 /31) (Tableau 4). Ce ratio a ensuite été inversé lorsque le couplage a été effectué avec le PyBop.

Tableau 4 : Ratios entre les produits 31 et β_7 selon les conditions de couplage.

Conditions	Agents de couplage	Ratio β_7 /31
1	EDC (2,5 équ.) HOBt (2,5 équ.)	34/66
2	PyBop (2,5 équ.)	66/34

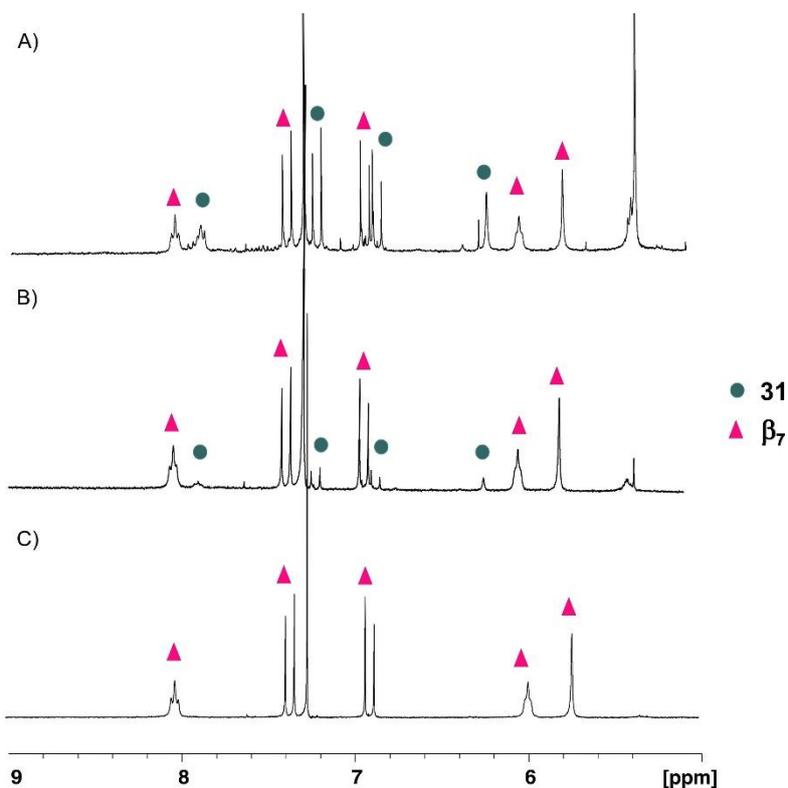


Figure 10 : Spectres RMN ^1H (300Mz, CDCl_3) montrant les ratios β_7 /31. A) Mélange obtenu après le couplage en présence d'EDC. B) Après le couplage en présence de PyBOP. C) β_7 pur.

4) Synthèse de la molécule cible à cinq brins β_8

Toujours dans l'optique d'accéder à des mimes de feuillets β multi-brins, la conception d'un foldamère diacide/diamine β_8 à cinq brins a été amorcée. D'après l'analyse rétrosynthétique fournie **Figure 11**, l'obtention de cette deuxième molécule cible s'effectuerait à partir du composé à trois brins précédemment synthétisé, sur lequel deux nouveaux brins périphériques seraient introduits de manière convergente. Les nouvelles liaisons à former sont de type amide et cette synthèse implique donc une saponification de la molécule β_7 au préalable pour synthétiser le précurseur **III.7**.

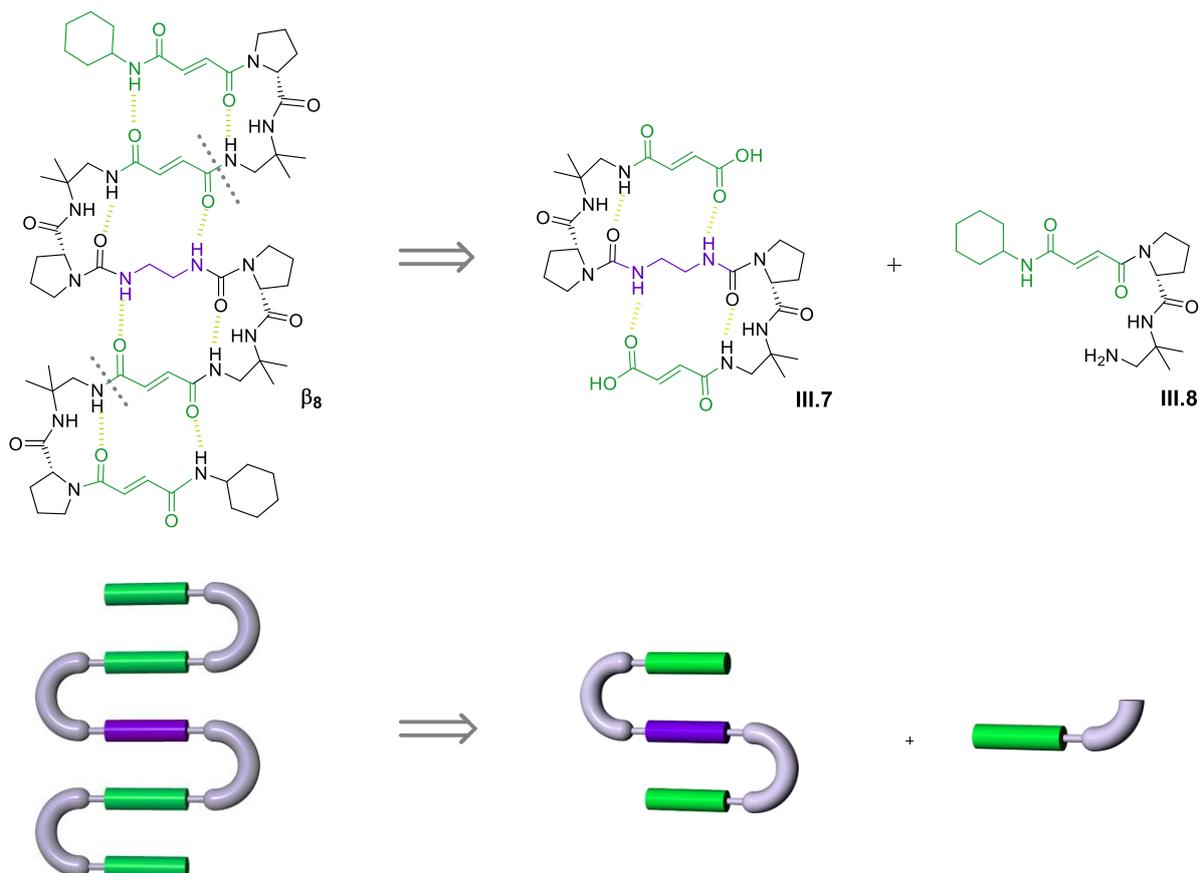


Figure 11 : Analyse rétrosynthétique du foldamère à 5 brins β_8 .

a) Synthèse du motif coude-brin externe **III.8**

La synthèse du motif brin-coude externe **III.8** a débuté par un couplage peptidique entre la cyclohexylamine et le mono-éthylfumarate **5**, dont l'une des fonctions acide est masquée par un ester d'éthyle (**Schéma 13**). Le produit **32** a été obtenu qui a ensuite subi une saponification pour mener à l'acide **33** qui sera apte à former une liaison amide avec la proline du pseudo-coude **36**.

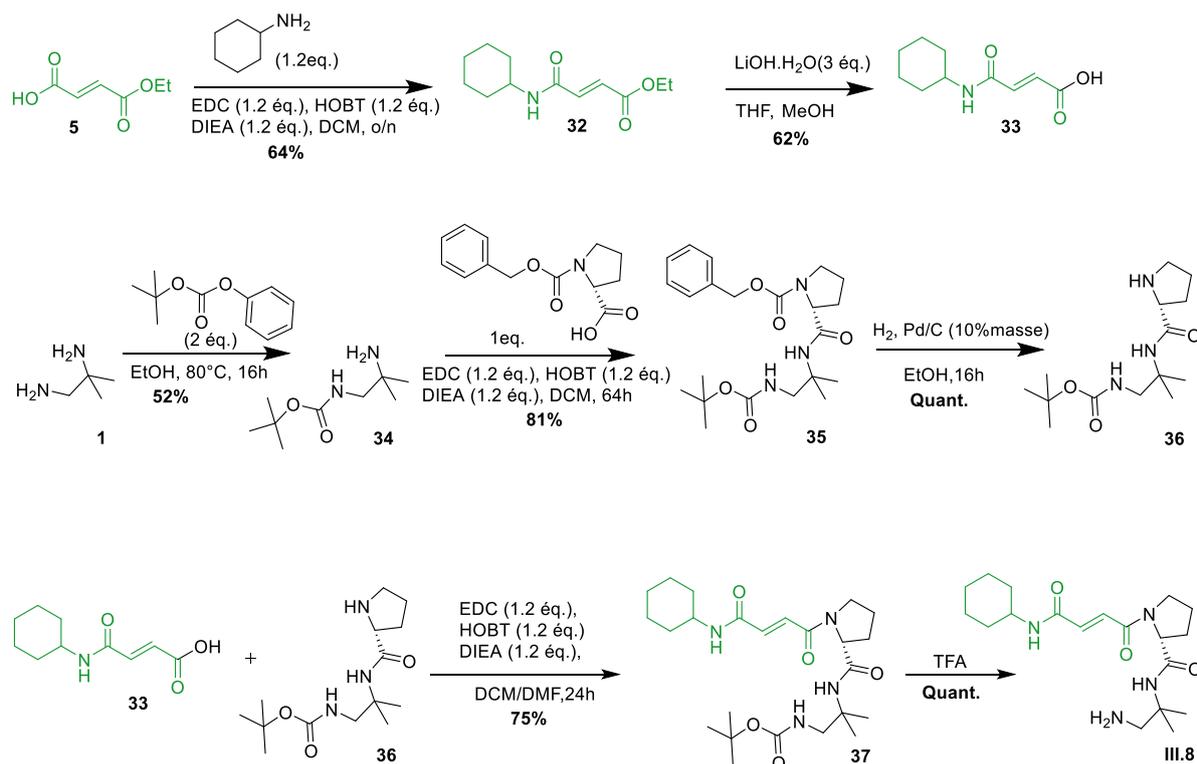


Schéma 13 : Synthèse du brin périphérique de l'architecture à cinq brins.

En parallèle, le coude artificiel a donc été synthétisé à partir de la 1,2-diamino-2-méthylpropane **1** qui a été sélectivement protégée sur la diamine la moins encombrée avec un groupement Boc (Schéma 13). Cette étape de protection a été effectuée en présence du carbonate de *tert*-butylphényle. Ensuite, cette diamine **34** a permis d'accéder au produit **35** lors d'un couplage peptidique avec la proline dont l'amine est protégée par un groupement benzyle (D-Pro-Cbz). Le motif coude D-Pro-DADME **35** protégé par les groupements Boc et Cbz a donc été obtenu. Le groupement Cbz a été ôté *via* une hydrogénation ce qui a libéré l'amine secondaire de la proline et a mené au mimo de coude mono-protégé **36**. Un couplage peptidique a été exécuté, en présence du couple d'agents de couplage EDC/HOBT, entre ce dernier et le brin périphérique **33** pour obtenir le fragment brin-coude **37**. Finalement, la déprotection du groupement Boc a été réalisée dans des conditions acides usuelles pour aboutir au fragment III.8.

En vue d'un couplage convergent faisant intervenir deux brins périphériques III.8, la molécule à trois brins réactive dérivant de β_7 devait être préparée.

b) Saponification des fonctions esters terminales du feuillet β à trois brins β_7

Pour obtenir le foldamère à cinq brins, l'objectif a été d'utiliser son équivalent à trois brins β_7 qui a été saponifié pour libérer les fonctions acide aux extrémités de cette molécule et former le produit III.7 (Schéma 14). La saponification a été effectuée en présence d'hydroxyde de lithium ajouté en larges excès pour mener au diacide III.7 avec un rendement de 73 %.

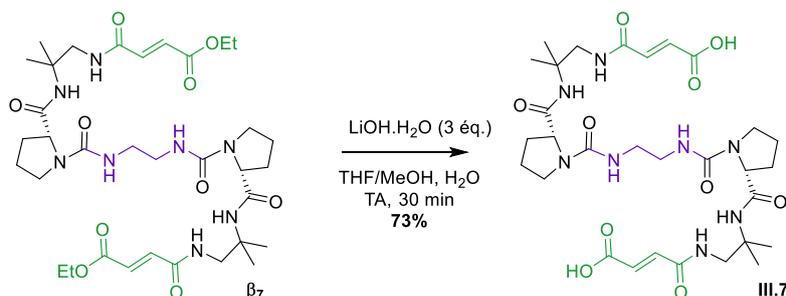


Schéma 14 : Saponification sur le foldamère à trois brins pour obtenir le substrat diacide III.7.

c) Synthèse de la molécule cible à cinq brins β_8

Une fois que le motif coude-brin III.8 a été préparé et le feuillet à trois brins saponifié, le couplage peptidique convergent pour assembler ces deux moitiés a pu être réalisé. Pour ce faire, la réaction a été testée en utilisant le PyBop qui semblait plus approprié au regard des résultats précédents pour la molécule à trois brins. Malheureusement, le composé souhaité n'a pas été formé puisque seule la présence des réactifs de départ a été observée après 67h de réaction. Toutefois, l'architecture envisagée β_8 a été obtenue en utilisant l'EDC comme agent de couplage (Schéma 15) et son additif HOBt. Le foldamère à cinq brins β_8 a finalement été synthétisé mais s'accompagne d'un rendement de 32 %. La réaction finale nécessiterait une optimisation des conditions de couplage et de purification.

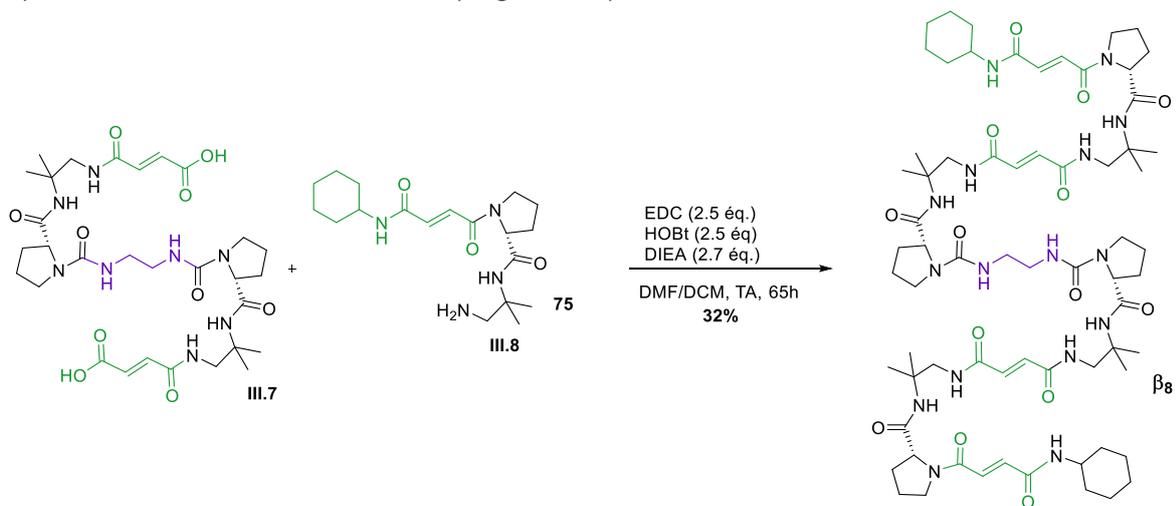


Schéma 15 : Synthèse du foldamère diacide/diamine à 5 brins β_8 .

Les objectifs de synthèse de ce projet ont été atteints puisque le feuillet à trois brins et sa version extensible à cinq brins furent obtenus et prouvent ainsi la possibilité d'utiliser des séquences diacide/diamine pour accéder à des architectures multi-brins. Le maniement de motifs diacides et diamines a permis de former des liens amides et urées et mettaient à profit des liaisons hydrogène pour un potentiel repliement en feuillet β .

II. Etudes structurales des molécules cibles à trois (β_7) et cinq brins (β_8)

Des études plus approfondies ont été nécessaires pour évaluer l'aptitude des structures comprenant plusieurs brins synthétisés à adopter un repliement en feuillet β . Deux aspects

différents peuvent donner des informations complémentaires : la structuration en solution et la structure dans le solide. Dans un premier temps, les données obtenues au gré d'études en solution de différents foldamères multi-brins seront détaillées. Dans un deuxième temps, il sera question de discuter la structure de certains de ces foldamères à l'état solide.

1) Etude en solution

a) Analyse comparative par RMN ^1H de différents composés

i. Remarques générales

Les spectres RMN ^1H des molécules cibles β_7 et β_8 ont fait l'objet de comparaison avec ceux des composés à deux brins β_4 et **11**, du coude protégé D-Pro-DADME **3** et du motif brin-coude **6** (Figure 12). Il est apparu que le coude artificiel D-Pro-DADME seul présente généralement des signaux larges mais ceux-ci s'affinent lorsqu'il est lié à un ou plusieurs brins. En effet, le composé **5** présente des signaux moins larges que le coude **3** tout comme le produit β_4 à deux brins. Un affinement significatif des signaux dont celui du proton amide du coude (point bleu) a été observé lorsque le motif diamine et, par conséquent, les fonctions urées sont introduites sur l'un des brins comme le montrent les spectres D à F. Concernant les autres protons amides ou urées caractéristiques des molécules décrites, il a été constaté que leurs signaux ont tendance à se déblinder au fur et à mesure de l'augmentation du nombre de brins et de coudes. Ceci fut particulièrement observé pour le proton urée (point mauve) sur les spectres D à F qui présente un déplacement chimique de 5,2 ppm pour le composé **11** puis à 5,98 ppm pour le foldamère à trois brins β_7 pour terminer à 6,76 ppm pour la molécule à cinq brins β_8 . Les protons amide désignés par les points verts ont également été affectés par l'allongement des structures puisque leurs déplacements chimiques fluctuent entre 7,63 ppm (β_4) et 8,38 ppm (β_8). Le proton amide du coude (point bleu) a vu son déplacement chimique augmenter par l'ajout de brins excepté lors du passage des architectures multi-brins β_7 vers β_8 où son signal est resté fixe. Enfin, la proline possède un signal caractéristique pour le proton situé sur le carbone en α de l'azote ($\text{CH}\alpha$) situé aux alentours de 3,9 ppm. Le déplacement chimique de ce dernier a été très peu affecté par l'introduction d'éléments supplémentaires. Le foldamère β_8 présente un axe de symétrie, qui comprend deux prolines avec un environnement différent ce qui correspond bien aux deux signaux observés (triangles noirs). La symétrie des molécules multi-brins β_7 et β_8 a donc facilité l'interprétation de leurs spectres RMN ^1H et l'augmentation du nombre de brins et de coudes a permis d'obtenir des signaux caractéristiques de plus en plus fins. Finalement, l'effet de déblindage observé pour les protons amide et urée par le biais de cette analyse comparative est en accord avec la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires.

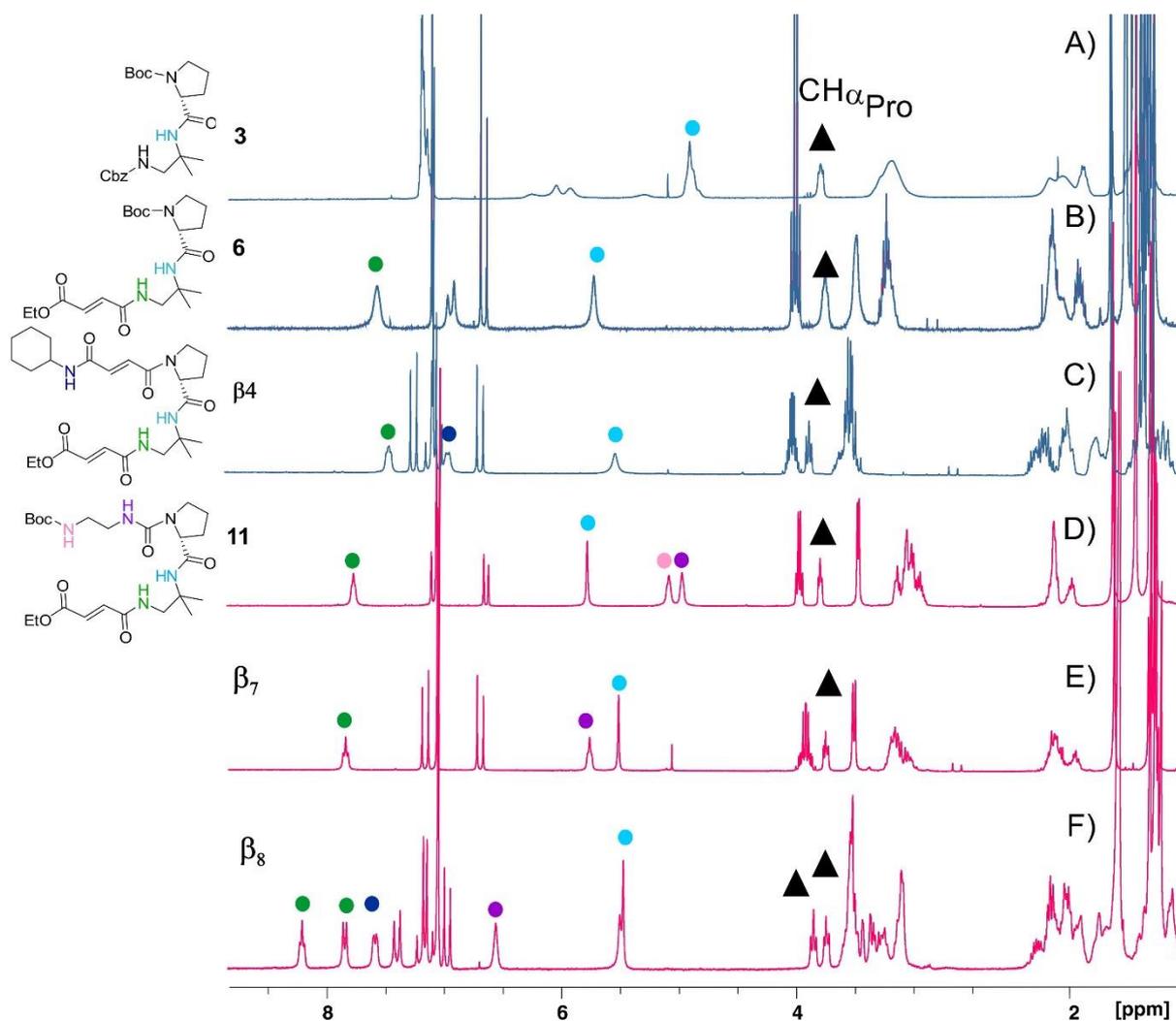


Figure 12 : Superposition de spectres RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de plusieurs composés synthétisés dont le nombre de brins augmente du haut vers le bas.

ii. Etude de la stabilité conformationnelle des foldamères : isomérisation *cis/trans* de la proline

Un autre aspect qui a été mis en évidence au cours de ce projet concerne la stabilité conformationnelle induite par la proline qui peut adopter une conformation *cis* ou *trans*. L'isomérisation entre ces deux conformations est souvent observée en solution sur les spectres RMN ^1H des foldamères étudiés jusqu'alors où le signal correspondant au CH_α est dupliqué. Or, la présence de ces deux jeux de signaux indique qu'un équilibre a lieu en solution entre deux conformations pour une molécule donnée. Cet équilibre a pu être observé en effectuant des analyses RMN ^1H dans différents solvants et/ou en réalisant des séquences d'acquisition à plusieurs températures (**Figure 13**). Par exemple, le foldamère β_2 présentait des signaux larges dans le chloroforme-deutéié à température ambiante (24 °C) qui se sont vus affinés lors du passage dans un solvant polaire : le diméthylsulfoxyde-deutéié ($\text{DMSO-}d_6$). L'analyse dans le $\text{DMSO-}d_6$ a bien révélé la présence de deux espèces en solution avec deux jeux de signaux intégrant chacun pour un CH_α de la proline. Il a également été possible d'observer le dédoublement des signaux dans le chloroforme à l'aide d'études à différentes températures montrant donc la présence de deux espèces liées à l'isomérisation *cis/trans* de la proline. En

effet, à basse température (0°C et 5°C) les signaux sont devenus plus fins car la vitesse d'échange entre chaque espèce est ralentie ce pourquoi l'apparition de jeux de signaux a été observée. Par la suite, l'augmentation de la température a entraîné une accélération de ces échanges jusqu'à coalescence des signaux menant à des pics larges qui résultent de la moyenne des déplacements chimiques de chaque forme.

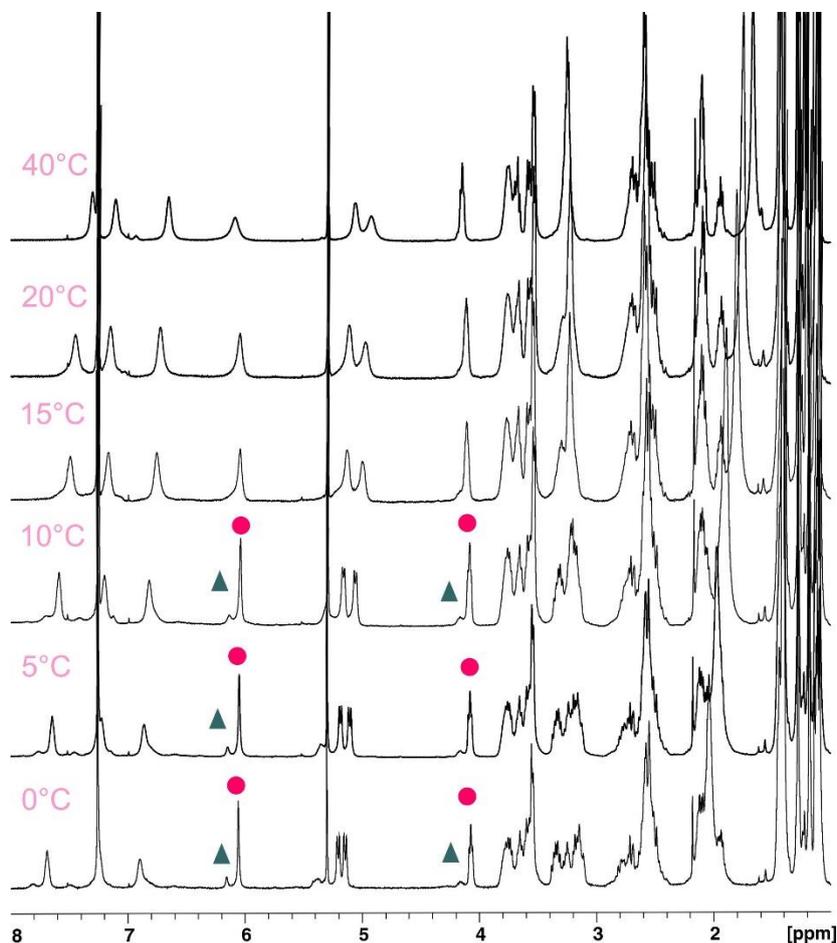


Figure 13 : Spectres RMN ^1H de β_2 à différentes températures dans CDCl_3 avec l'apparition de deux jeux de signaux.

De plus, pour l'ensemble des mimes de feuillets β synthétisés, l'apparition de la forme *cis* est synonyme d'une déstabilisation du système. Dans ce cas, le carbonyle rattaché à l'atome d'azote n'est plus idéalement orienté pour établir la liaison hydrogène intramoléculaire avec le brin adjacent, ce qui altère la structuration en feuillet β . Alors, examiner la stabilité conformationnelle de la proline pour ces molécules peut également renseigner sur la robustesse de leur repliement (**Figure 14**). Une analyse comparative entre les trois foldamères à trois brins synthétisés a donc été réalisée. Il est apparu que pour les foldamères β_5 , β_6 et β_7 , la proline est présente sous une seule conformation dans le chloroforme. Celle-ci est supposée être en *trans* sinon les liaisons hydrogène qui stabilisent la structuration ne pourraient pas être formées. Cependant, lorsque les composés ont été placés dans un environnement polaire comme le $\text{DMSO-}d_6$, la deuxième conformation (*cis*) est apparue traduisant ainsi une déstabilisation de la structure. Cette observation s'explique par le fait que les architectures étudiées sont sujettes à interagir avec le solvant polaire *via* des liaisons hydrogène en compétition avec les liaisons intramoléculaires.

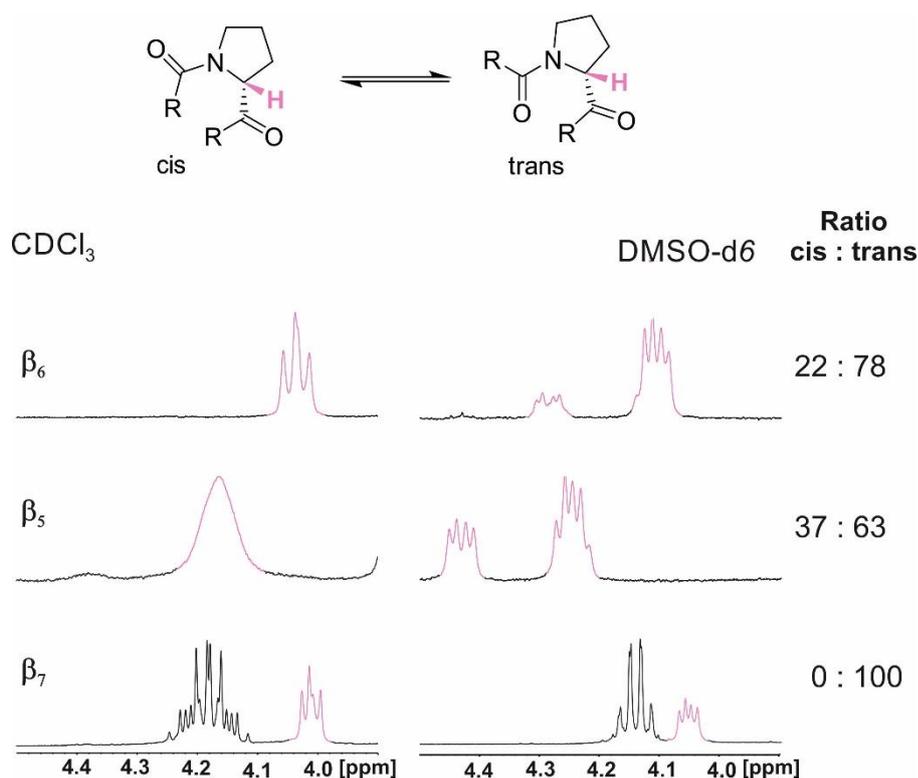


Figure 14 : Stabilité structurale liée à la conformation *cis/trans* de la proline de foldamères à trois brins β_5 , β_6 et β_7 ; zoom sur les CH α des prolines.

Il a été possible de déterminer le ratio entre ces deux configurations pour chaque composé qui sont rapportés sur la **Figure 14**. D'après ces résultats, la forme *trans* est toujours restée majoritaire et le feuillet artificiel β_6 était moins déstabilisé que son homologue β_5 avec les doubles liaisons. D'ailleurs pour ce dernier, il a été observé que dans le chloroforme une deuxième espèce se profile déjà en quantité moindre. Ainsi, l'apport de brins rigides s'est accompagné de la diminution de la stabilité conformationnelle de la proline. Par ailleurs, l'absence d'isomérisation pour le dernier mime de feuillet β_7 a été constatée ce qui signifie que l'introduction des urées et donc du brin diamine contraint davantage la proline en configuration *trans*. Le repliement adopté par le foldamère β_7 a semblé aussi stable en milieu apolaire que polaire ce qui sera un atout à prendre en compte lors du passage de ce type de ce foldamères multi-brins en milieu aqueux.

b) Etude en solution du repliement du foldamère à trois brins β_7

i. Dosage par ajout croissant de DMSO-*d*₆

Pour obtenir des informations quant à la structuration du foldamère β_7 mixant des jonctions amides et urées, il est possible d'effectuer des études en solution en s'appuyant sur les signaux RMN ^1H des protons de ces fonctions. Les données obtenues permettent de s'assurer que les liaisons hydrogène intramoléculaires requises pour le repliement type feuillet β serpenté soient bien formées.

L'étude en solution du foldamère à trois brins s'est appuyée sur un dosage suivi par RMN ^1H de la molécule initialement solubilisée dans un solvant apolaire, le chloroforme (CDCl₃), par l'ajout

d'un solvant polaire, le diméthylsulfoxyde- d_6 (DMSO- d_6) (**Figure 15**). Cette expérience est basée sur le principe que si un proton amide ou urée est impliqué dans une forte interaction intramoléculaire (*i.e* liaison hydrogène avec un carbonyle), il ne sera que peu affecté par l'introduction d'un environnement polaire. Alors, les signaux observés en RMN ^1H de ces protons ne devraient pas ou peu se déplacer lors de l'ajout du DMSO- d_6 . A l'inverse, les protons non impliqués dans des liaisons hydrogène intramoléculaires sont plus susceptibles d'interagir avec un milieu polaire et leurs déplacements chimiques auront tendance à se déblindier.

Le composé **$\beta 7$** a donc été solubilisé dans du chloroforme à une concentration de 5 mM et des ajouts successifs de DMSO- d_6 ont été effectués allant de 1 % à 40 %. Un dernier spectre RMN ^1H a également été enregistré dans le DMSO- d_6 pur, à une concentration de 5 mM, pour avoir une idée sur la structuration de la molécule dans un milieu à priori déstabilisateur. La **Figure 15**, montre que les signaux en vert et rose, correspondant respectivement au proton amide du brin externe et au proton urée du brin central, ont été très peu impactés par l'introduction croissante du DMSO- d_6 . En effet, leurs déplacements chimiques se sont légèrement déblindés à partir de 20 % de DMSO- d_6 ce qui suggère que ces protons sont bien impliqués dans des liaisons hydrogène. Au contraire, le proton amide du coude en bleu a, quant à lui, été davantage affecté par l'ajout du solvant polaire puisque son signal s'est continuellement déblindé plus la proportion de DMSO- d_6 augmentait. Ceci signifie qu'il n'est pas engagé dans une interaction intramoléculaire. Ces résultats concordent donc avec la structure envisagée pour ce foldamère à trois brins car les protons amide et urée présents sur les brins ont adopté un comportement caractéristique d'une implication dans une interaction intramoléculaire. Comme cela fut envisagé lors de la conception de ce foldamère, le dernier proton amide sur le mime de coude a semblé libre d'interagir avec son environnement et ne participe donc pas à la stabilisation structurale de ce peptidomime. Ainsi, cette expérience a rendu compte d'une preuve indirecte du repliement en feuillet β stabilisé par des liaisons hydrogène intramoléculaires.

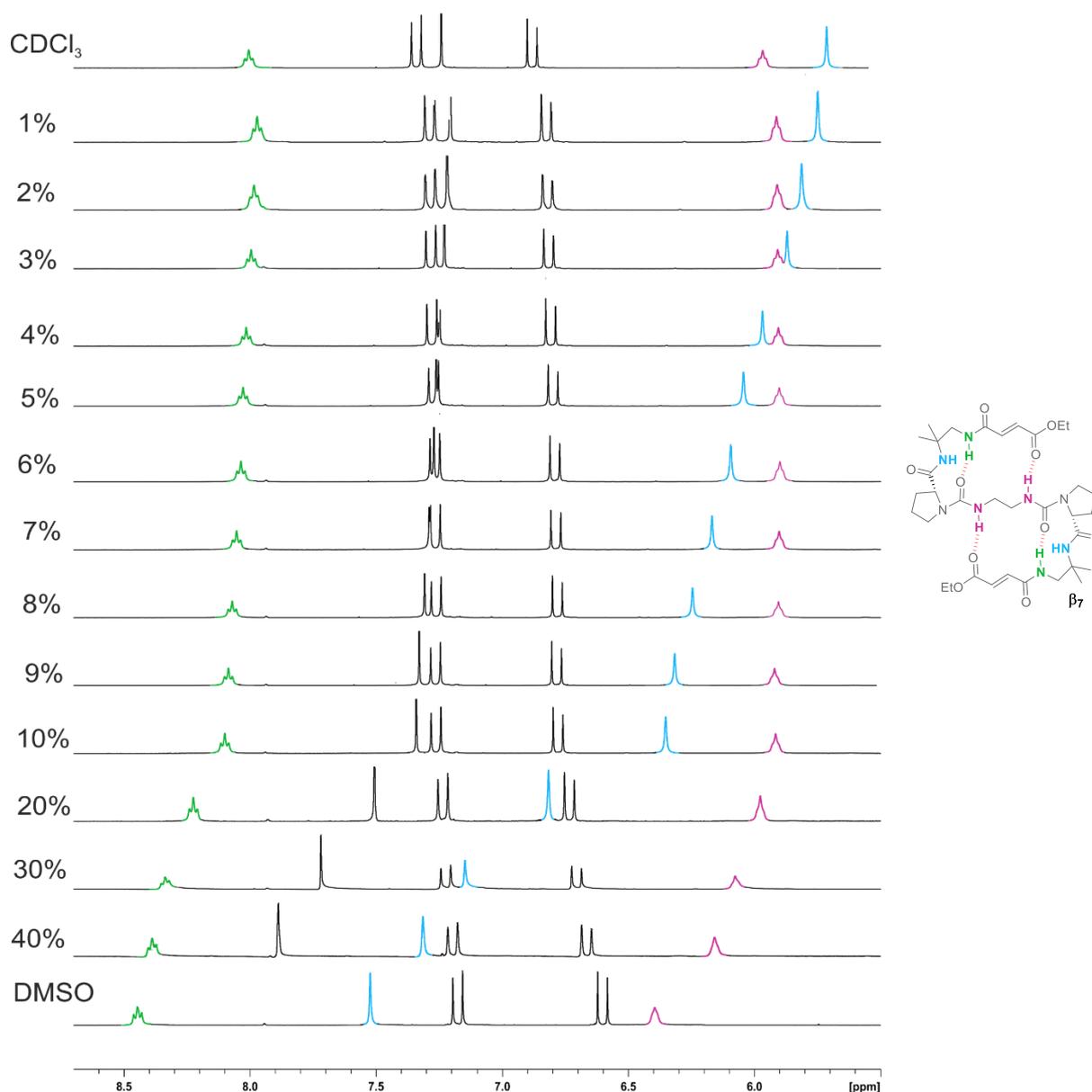


Figure 15 : Etude en solution du repliement du feuillet β_7 via un dosage induit par l'ajout de $\text{DMSO}-d_6$ dans le CDCl_3 observé par RMN ^1H (400 MHz).

ii. Détermination de la structure en solution du foldamère à trois brins β_7

Des expériences de RMN en deux dimensions ont été réalisées afin d'obtenir de plus amples informations sur la structure adoptée par le foldamère β_7 en solution à 24°C pour une concentration à 20 mM. Les expériences de corrélation COSY et HSQC ^1H - ^{13}C ont notamment permis d'identifier les signaux correspondant aux protons amide et urée étudiés précédemment (**Figure 16**). Tout d'abord, le spectre RMN ^1H a démontré que le signal situé à 5,80 ppm correspond au proton amide du coude D-Pro-DADME qui est sous la forme d'un singulet contrairement aux deux autres signaux des protons NH qui sont présents sous la forme de triplets. Les expériences COSY et HSQC ^1H - ^{13}C ont servi à attribuer le signal du proton amide (en vert) qui est corrélé au CH_2 de la fonction ester caractérisé par un doublet de doublet et donc au carbone C7. Ces expériences ont également permis de déterminer le déplacement

chimique correspond au proton urée (en rose) qui est relié au méthylène portant le carbone C_{17} . Le carbone tertiaire de la proline, $CH\alpha$, a également pu être identifié.

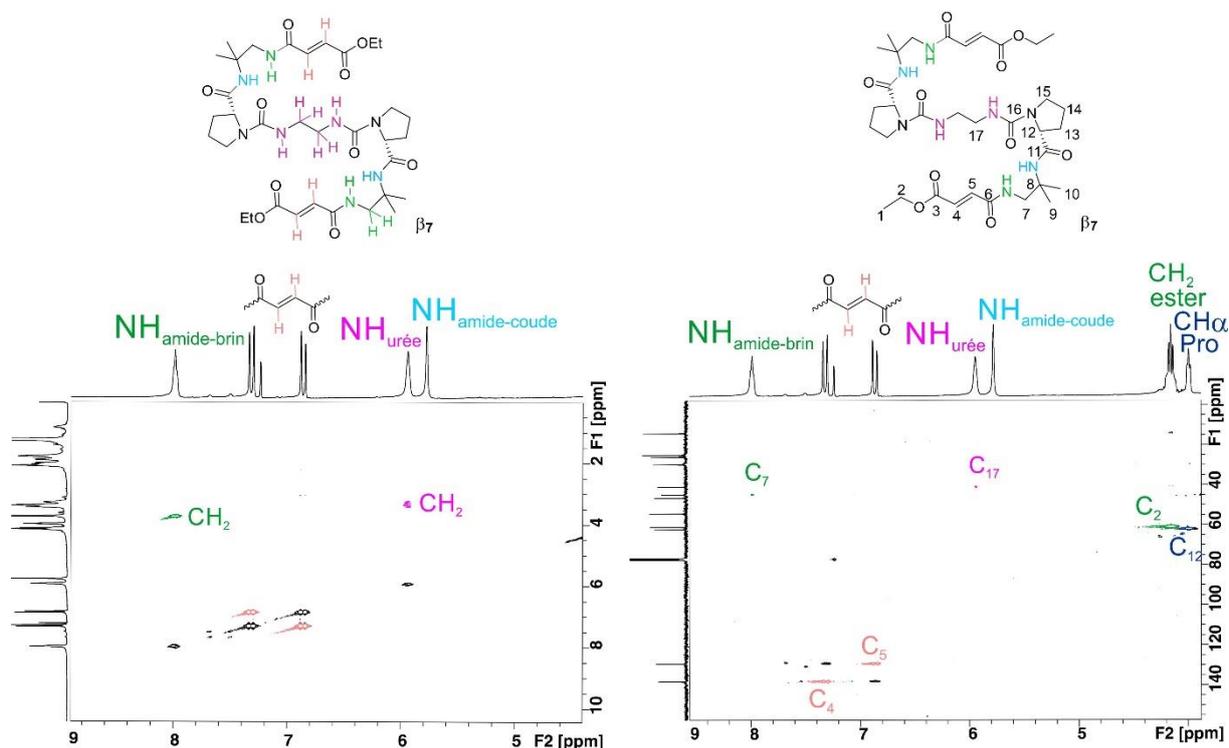


Figure 16 : Spectres RMN COSY 1H - 1H (gauche) et HSQC 1H - ^{13}C (droite) du foldamère β_7 (20 mM, 400 MHz).

L'expérience de corrélation HMBC 1H - ^{13}C a pu compléter ces informations en permettant notamment d'identifier le déplacement correspondant à chacun des deux protons éthyléniques (Figure 17). En effet, l'un de ces protons (orange) est corrélé au même carbonyle que le proton amide du brin en vert en J^2 tandis que le deuxième CH éthylénique a présenté une corrélation avec le carbonyle appartenant au groupement ester. L'environnement local des signaux caractéristiques du motif D-Pro-DADME a pu être établi notamment en remontant jusqu'aux carbones C_6 et C_{11} qui en constituent les fonctions amides mais aussi en distinguant les trois méthylènes (C_{13} , C_{14} , C_{15}) présents sur le cycle de la proline. Les signaux relatifs au motif urée n'ont pas montré de corrélation en 2J ni 3J c'est donc en procédant par élimination qu'il a été déduit que le NH de la fonction urée est lié au carbonyle (C_{16}) situé à 158,07 ppm.

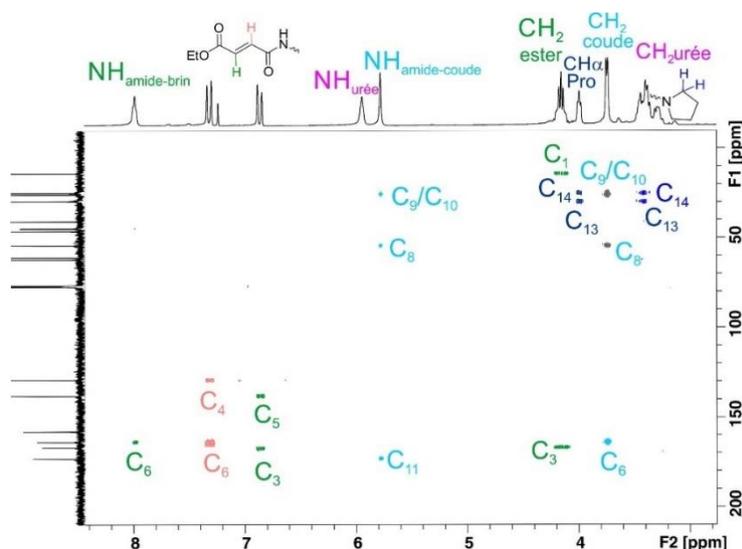


Figure 17 : Spectres RMN HMBC ^1H - ^{13}C du foldamère β_7 (20 mM, 400MHz).

Finalement, une expérience NOESY a été réalisée afin d’observer les corrélations dans l’espace entre les différents protons de la molécule ce qui a permis de conclure quant à la structure adoptée par la molécule β_7 en solution. L’ensemble des corrélations dans l’espace caractéristiques du foldamère β_7 qui ont été déterminées sont retranscrites sur la **Figure 18**. Par mesure de clarté, les corrélations résultant de couplages en ^2J et ^3J ont été omises sur la structure représentée sur la figure. Concernant le motif coude D-Pro-DADME, les corrélations attendues entre les protons amide ont bien été obtenues ainsi que celle entre le proton amide central (en bleu) et le proton du $\text{CH}\alpha$ de la proline. Ensuite, le CH éthylénique en orange a montré une corrélation avec l’un des méthylènes situés sur le brin central ainsi qu’au proton amide en vert et le second CH éthylénique. Enfin, les signaux de corrélation dans l’espace relatifs au proton urée ont nécessité un zoom sur le spectre RMN NOESY entre 5 et 8 ppm permettant de constater que celui-ci est bien corrélé au CH éthylénique en orange ainsi qu’au méthylène du groupement ester (**Figure 19**). Ce dernier a également montré une corrélation avec le méthylène en α de l’azote de la proline.

Ainsi, suite à l’élucidation de la structure à l’aide des expériences RMN COSY, HSQC et HMBC, l’interprétation du spectre RMN NOESY a prouvé que le foldamère β_7 adopte bien un repliement en feuillet β , en solution, d’après les différentes corrélations spatiales établies.

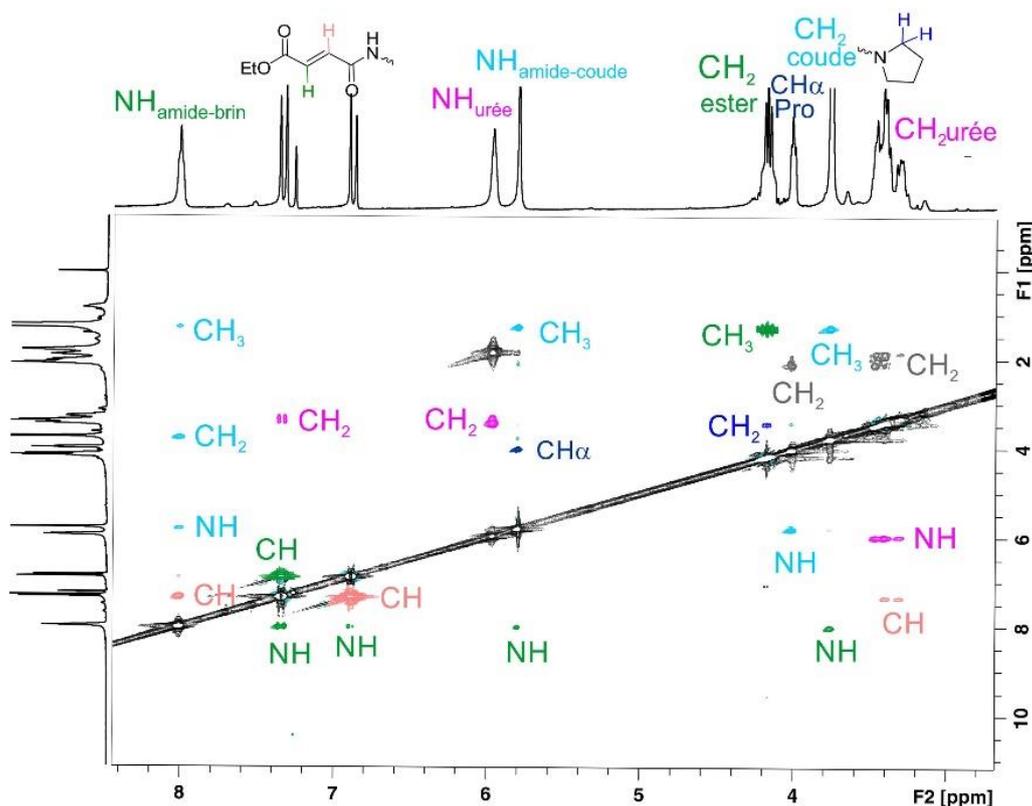


Figure 18 : Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY du foldamère β_7 (20 mM, 400 MHz).

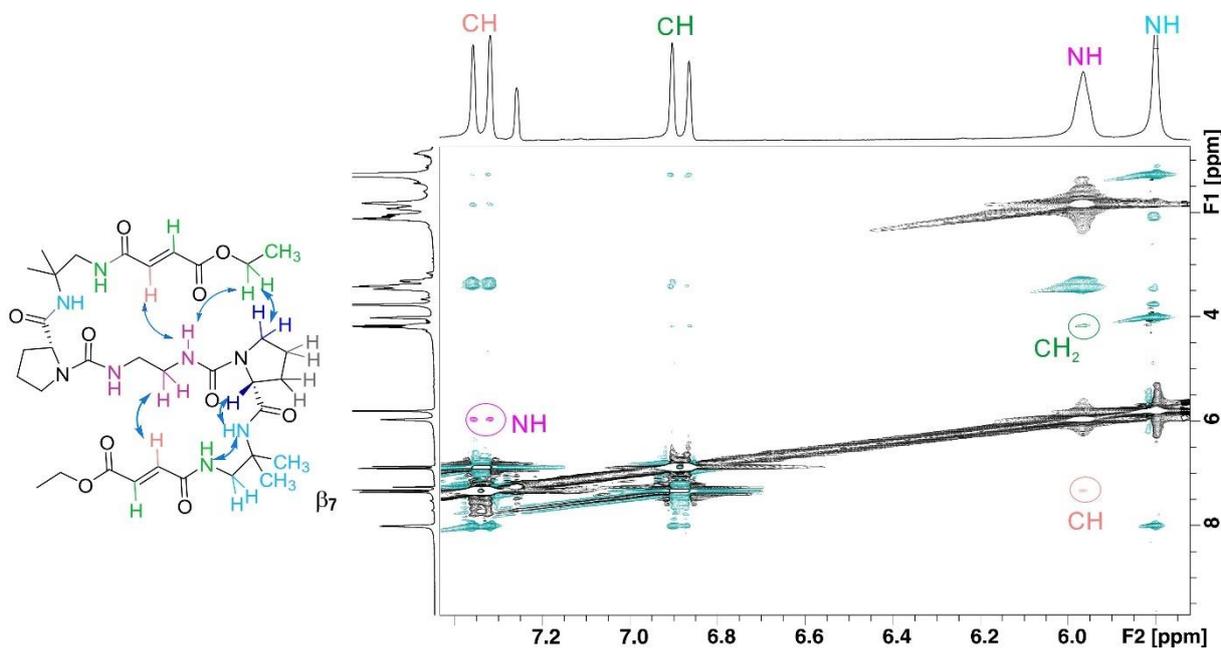


Figure 19 : Zoom sur la région des NH du spectre RMN ^1H - ^1H NOESY du foldamère β_7 (20 mM, 400 MHz) et structure de β_7 dont les corrélations spatiales établies correspondent aux flèches bleues.

Pour conclure, l'ensemble des expériences RMN 2D et plus particulièrement la séquence d'acquisition type NOESY ont démontré que le foldamère β_7 adopte bien le repliement attendu en feuillet β . Ceci est donc en accord avec la preuve indirecte de repliement fournie par l'expérience de dosage qui a servi à identifier les protons impliqués dans les liaisons hydrogène intramoléculaires stabilisant le repliement en feuillet β .

c) Etude en solution du repliement du foldamère à cinq brins β_8

Plus récemment, l'expérience du dosage a aussi été réalisée sur le foldamère à cinq brins β_8 pour obtenir des informations quant à son repliement en solution. Cette étude n'a pas été concluante car de nouveaux signaux n'appartenant pas à la molécule d'intérêt ont été observés (**Figure 20**). En effet, l'analyse effectuée sur le spectromètre RMN 400MHz a révélé l'apparition de signaux de faible intensité dans la région des protons amide pour une concentration à 5 mM comme le montre la **Figure 20**. Concernant, les spectres qui ont été obtenus pour une concentration à 3 mM sur les spectromètres 300 MHz et 400 MHz, les signaux sont davantage dissimulés en raison d'une ligne de base trop large.

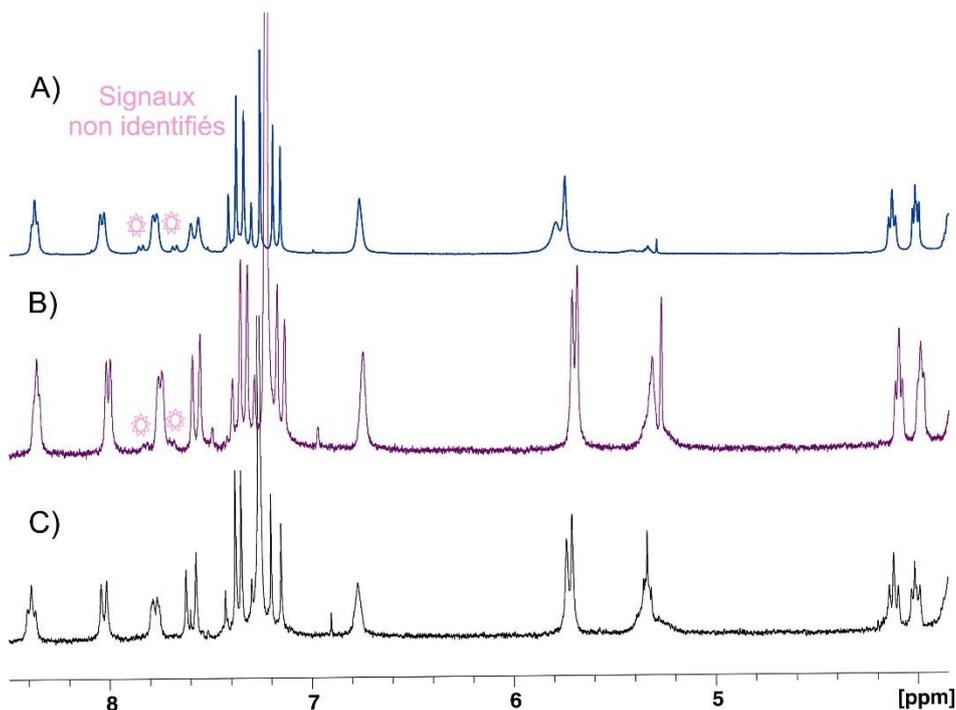


Figure 20 : Spectres RMN ^1H du foldamère à cinq brins β_8 dans le CDCl_3 à : A) 5 mM (400 MHz). B) 3 mM (400 MHz) et C) 3 mM (300 MHz).

L'hypothèse d'un équilibre en solution entre deux conformations a alors été supposée. Il a été observé que dans le $\text{DMSO}-d_6$ un nouveau signal est également apparu au sein de la région des $\text{CH}\alpha$ de la proline ce qui aurait pu correspondre avec la formation de l'isomère *cis* de la proline (**Figure 21A**). Alors, pour comprendre si ce phénomène était dû à la présence d'une impureté, ou plutôt à l'existence d'un équilibre lent en solution entre plusieurs conformations de la proline, des spectres RMN ont été réalisés à différentes températures : de 5°C à 70°C . L'étude en température permet généralement de démontrer la présence d'un équilibre en solution et de déterminer le ratio entre plusieurs espèces quand les signaux sont distincts et fins. Des spectres RMN ^1H ont donc été enregistrés à différentes températures dans le chloroforme et dans le $\text{DMSO}-d_6$ pour le composé β_8 . Au regard des résultats retranscrits sur la **Figure 21** (B et C) aucun de ces effets de ces variations de température ne fut observé pour le composé à cinq brins. Effectivement, les proportions entre les supposées conformations *cis/trans* de la proline sont restées intactes puisque aucune variation des signaux propres aux $\text{CH}\alpha$ de la proline n'a été observée. En l'absence d'évolution relative aux changements de température il est difficile

de conclure à un équilibre entre deux ou plusieurs espèces dans ce cas. Il est donc fort probable que ce soient des impuretés présentes en faibles quantités ce pourquoi, la molécule β_8 doit être à nouveau synthétisée et purifiée différemment pour éclaircir ces résultats.

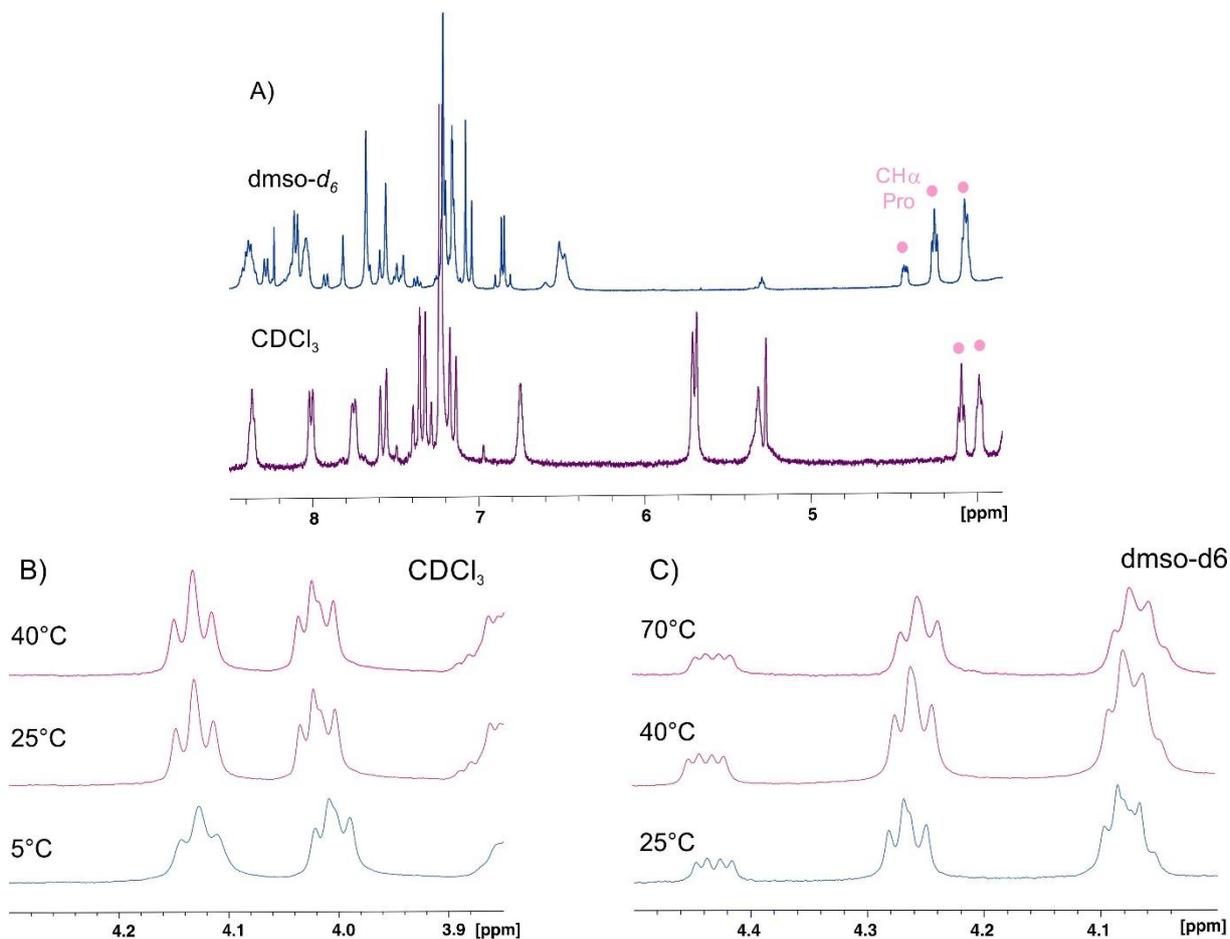


Figure 21 : Spectres RMN ^1H (400 MHz) du foldamère β_8 . A) Analyses dans le DMSO- d_6 et dans le CDCl_3 . Influence de changements de température sur les signaux CH_α B) dans le CDCl_3 et C) dans le DMSO- d_6 .

d) Comparaison du repliement en solution des foldamères à trois brins β_5 , β_6 et β_7 stabilisés par liaisons hydrogène

Les expériences de dosage par l'ajout croissant de DMSO- d_6 ont également été réalisées à partir des foldamères synthétisés par le Dr. Christel Dolain pour comparer les résultats au repliement adopté par le foldamère β_7 . Tout d'abord, sur les spectres RMN ^1H il a été constaté que le déplacement chimique du proton amide du coude (en bleu ciel) reste fixe (5,73 ppm) sur les trois spectres (**Figure 22**). Sur le spectre du foldamère β_6 , il a été possible d'attribuer les signaux correspondant aux deux autres protons amide de la molécule de par la multiplicité des pics. Ainsi, le signal distingué par un point bleu marine correspond au proton amide lié au cyclohexyle et celui en vert au proton amide reliant le motif coude au brin central. Le spectre RMN ^1H du composé β_5 présentait des signaux trop larges pour attribuer les protons amide autres que celui du coude. L'attribution des protons du foldamère β_7 a quant à elle été décrite précédemment. Ces trois spectres ont montré que les signaux des protons urée se situent vers 6 ppm tandis que les protons amide, hormis celui du coude en bleu, sont plus déblindés et se retrouvent entre 7,6 ppm et 8 ppm. Pour les expériences de dosage en présence du DMSO- d_6 ,

le même protocole d'ajouts successifs de DMSO- d_6 que le produit β_7 a été suivi sur les composés à trois brins β_5 et β_6 . Les résultats ont été retranscrits sous la forme de graphiques suivant le déplacement chimique de chaque proton amide ou urée en fonction du pourcentage de DMSO- d_6 (Figure 23).

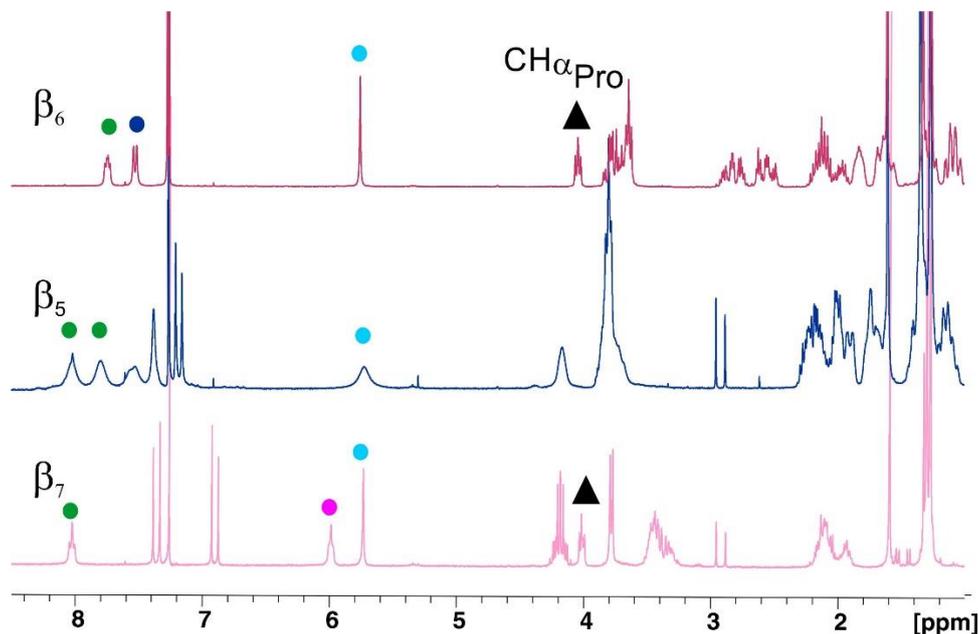


Figure 22 : Spectres RMN ^1H des foldamères à trois brins β_5 , β_6 et β_7 (CDCl_3 , 400 MHz).

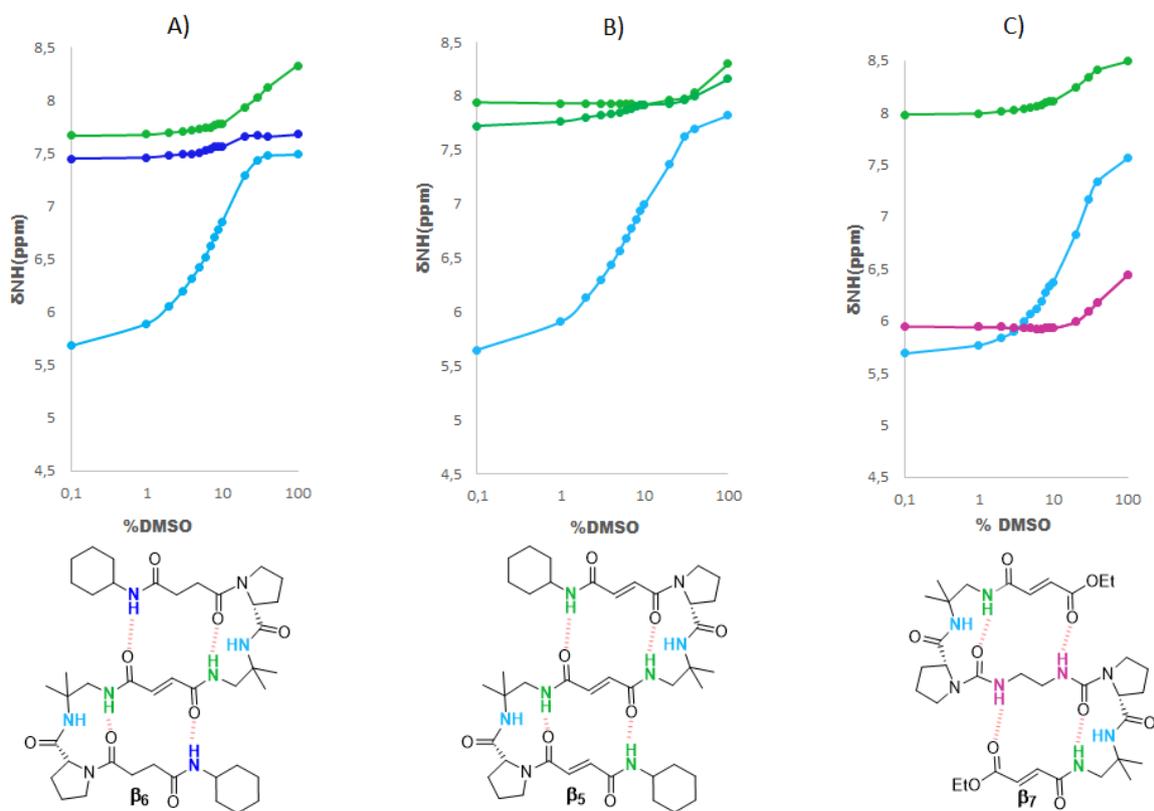


Figure 23 : Etude comparative du repliement en feuillet β de plusieurs foldamères à trois brins stabilisés par des liaisons hydrogène.

Au regard du graphique A, il est apparu que les protons amide des brins (en vert et bleu marine) du foldamère β_6 ont été affectés par l'ajout du solvant polaire à hauteur de 20 % surtout le proton lié au cyclohexyle (**Figure 23**). Tout comme pour le foldamère β_7 , ces observations ont prouvé que ces signaux sont impliqués dans des liaisons hydrogène intramoléculaires assez stables car ils ont été peu perturbés par l'addition du solvant polaire. Le proton amide du coude a été plus largement affecté par l'ajout du DMSO- d_6 ce qui suggère qu'il n'est effectivement pas impliqué dans des liaisons hydrogène intramoléculaires. Pour la molécule β_5 , un constat similaire a été effectué pour le proton amide du coude D-Pro-DADME dont le déplacement chimique a évolué de 5,73 ppm (0 % DMSO- d_6) vers 7,82 ppm pour une teneur à 100 % de DMSO- d_6 (**Figure 23**). Les deux autres protons amide de cette même molécule ont quant à eux été moins affectés par l'ajout du DMSO- d_6 car c'est à partir d'une teneur à 30 % de DMSO dans le chloroforme que les déplacements chimiques de ces derniers ont commencé à se déblinder. Ces résultats ont donc été en accord avec un repliement en feuillet β via des liaisons hydrogène intramoléculaires n'impliquant pas le NH du coude en bleu. Enfin, le repliement en feuillet β en solution du foldamère β_7 a été prouvé de manière directe et indirecte comme discuté auparavant. Sur le graphique C, il est possible d'observer que pour le proton urée en rose, son déplacement chimique a également commencé à se déblinder pour une valeur de 20 % de DMSO- d_6 .

Pour conclure, l'ensemble de ces observations concordent avec le repliement en feuillet β pour les trois foldamères comportant trois brins. Ces expériences ont été réalisées à titre d'une preuve indirecte de repliement en s'appuyant sur la présence ou l'absence de liaisons hydrogène intramoléculaires. Réaliser des expériences de type RMN 2D permettrait de confirmer le repliement en feuillet β pour les structures β_5 et β_6 .

2) Etude structurale à l'état solide des foldamères multi-brins

Pour confirmer les interprétations des repliements observés en solution il était important d'obtenir des informations complémentaires grâce à des études à l'état solide. Des cristaux ont été obtenus pour deux molécules de ce projet *via* la méthode d'évaporation du solvant dans lequel elles ont été solubilisées au préalable. Une structure cristallographique du motif brin-coude **5** a pu être déterminée par diffraction des rayons X (**Figure 24**). Les cristaux en question ont été obtenus par évaporation du chloroforme. Alors, il a été possible d'identifier la liaison hydrogène intramoléculaire induite par le coude D-Pro-DADME mesurée à 2,1 Å entre le carbonyle du Boc et le proton amide assurant la jonction entre le coude et le brin. Le brin est un dérivé du monoéthyle fumarate et il a été remarqué sur cette structure que le carbonyle de l'ester pointe vers le bas en l'absence de liaison hydrogène possible avec un brin adjacent relié à la proline. Concernant le motif coude, le NH et le carbonyle pointent dans deux directions opposées perpendiculaires au plan du brin et sont donc libres d'intervenir dans l'empilement du réseau cristallin.

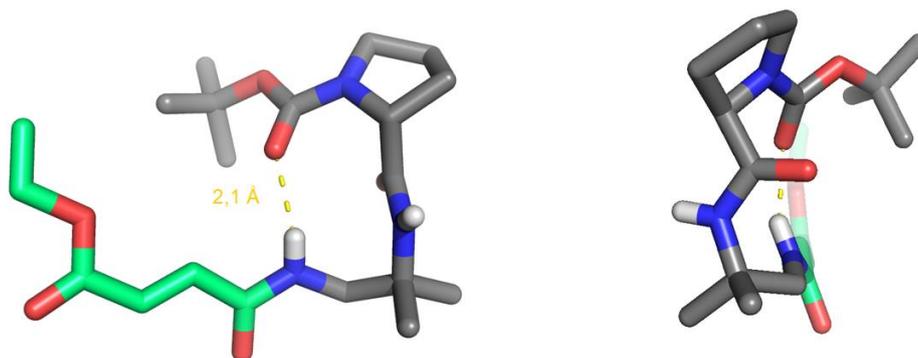


Figure 24 : Structure cristallographique du motif brin-coude **6** protégé par un Boc. Vue de face (à gauche) et vue de côté (à droite).

Récemment, de plus amples informations ont été rapportées par la cristallisation monomérique du foldamère β_7 à trois brins. La cristallisation de ce composé a été réalisée par évaporation du chloroforme dans lequel le foldamère a été solubilisé à une concentration de 41 mM. Une structure cristallographique a été obtenue par diffraction des rayons X sur l'un de ces cristaux avec une bonne résolution de 0,80 Å (**Figure 25**). Quatre liaisons hydrogène intramoléculaires ont été observées sur cette structure imitant celles d'un feuillet β antiparallèle car ces liaisons délimitent, alternativement, des cycles à 10 et à 14 chaînons (**Figure 25A & B**). La formation de ces liaisons hydrogène caractéristiques est permise par la conformation de l'espaceur éthylène diamine où chaque proton urée est orienté vers le carbonyle d'un des deux brins adjacents. De plus, les liaisons hydrogène formées par le motif coude ont été mesurées à 2,1 Å et 2,2 Å et à 2,6 Å et 2,8 Å pour les liaisons impliquant les protons urée. Ceci traduit donc une légère ouverture de la structure au niveau des extrémités. De plus, les liaisons amide des pseudo-coudes β sont bien perpendiculaires au plan comme dans les coudes β naturels et la structure du composé **5** précédemment mentionnée. Ainsi, l'analyse à l'état solide du foldamère à 3 brins β_7 concorde avec la structure établie en solution maintenue grâce quatre liaisons hydrogène intramoléculaires.

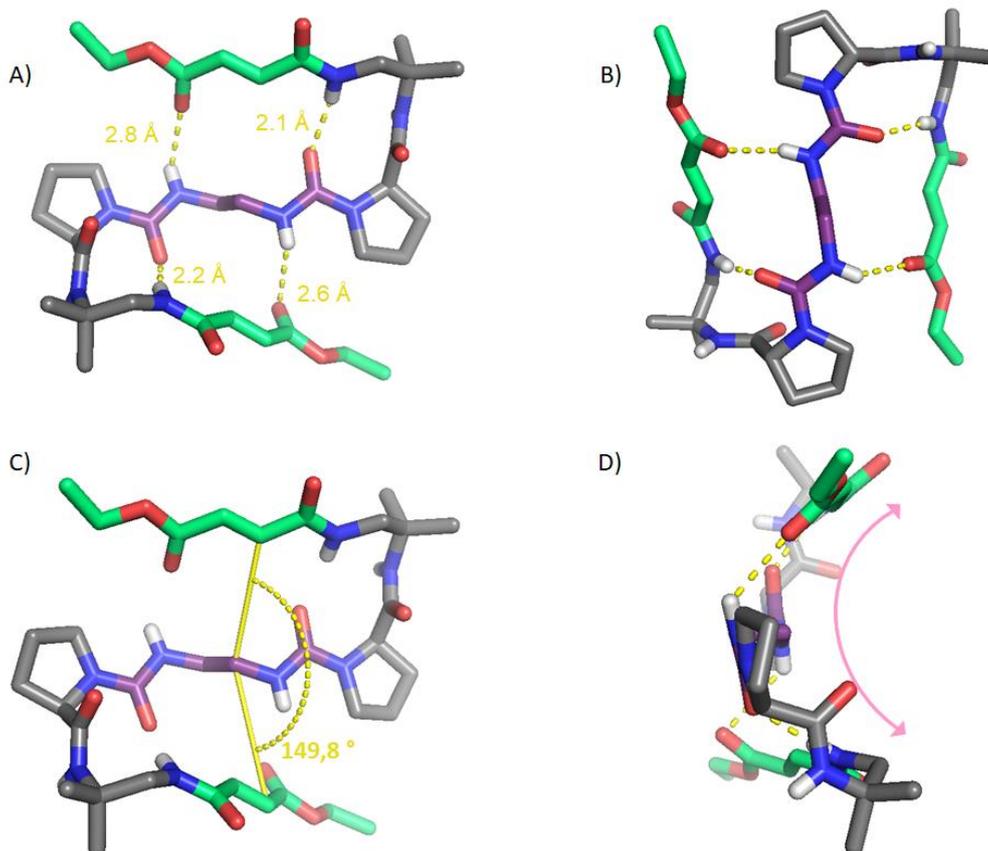


Figure 25 : Structure cristallographique du foldamère à trois brins β_7 . A) Représentation de la structure et longueur des liaisons hydrogène (pointillés jaune). B) Vue arrière de la structure incurvée. C) Angle entre les deux brins externes. D) Vue de profil de la structure et sa courbure.

Un aspect intéressant à évoquer est la courbe qu'épouse cette structure visible sur la **Figure 25** (C & D) et résultante de l'angle formé entre les deux brins périphériques mesuré à $149,8^\circ$. Cette spécificité laisse penser qu'augmenter le nombre de brins permettrait d'obtenir une architecture cylindrique avec une cavité à l'image des tonneaux β naturels.

Pour aller plus loin, il serait bénéfique d'obtenir une structure cristallographique du foldamère à cinq brins pour confirmer et étoffer les informations structurales déjà obtenues.

III. Conclusion et perspectives

Ce projet porte sur le développement de mimes de feuillets β avec des foldamères stabilisés par des liaisons hydrogène intramoléculaires menant à des structures multi-brins alternant des coudes et brins artificiels. Ce type de repliement a été indirectement prouvé en solution pour les structures dérivant exclusivement de brins diacides. Cependant, il n'était pas possible d'accéder à des architectures plus longues avec ce type de composés qui restreignent le réseau de liaisons hydrogène. Ce pourquoi, le principal objectif de ce projet fut de mettre en place une stratégie de synthèse viable pour obtenir des architectures multi-brins alliant des brins diamine et de diacides pour maintenir les liaisons hydrogène indispensables pour l'allongement de ces foldamères. La préparation de ces structures a fait intervenir la synthèse d'urées tri-substituées qui se sont avérées difficiles à obtenir. Une première stratégie de synthèse d'architectures

multi-brins a été mise de côté car elle n'a pas permis de former ces fonctions. Une deuxième stratégie de synthèse a donc été mise en place et a mené à la molécule cible β_7 comprenant trois brins. Cette voie de synthèse a nécessité l'optimisation des conditions de couplage menant aux urées trisubstituées selon la méthode de R. A. Batey.²⁴ Finalement, un couplage peptidique convergent a pu conduire au foldamère désiré. L'utilisation d'une voie convergente a permis un gain d'étapes de synthèse et de matière et a requis une maîtrise parfaite dans la sélectivité des réactions.

Une fois cette première molécule cible synthétisée, différentes études ont été réalisées pour caractériser le repliement en solution en se focalisant sur la présence de liaisons hydrogène intramoléculaires puis par des analyses de spectroscopie RMN 2D qui ont confirmé le repliement en feuillet β attendu. Des études à l'état solide ont également été effectuées sur le foldamère β_7 par diffraction des rayons X. Une structure cristallographique du foldamère à trois brins a donc été obtenue ce qui demeure une réelle avancée puisque les informations concordent parfaitement avec les données issues des études en solution. A présent, l'idée est d'évaluer si les règles régissant le repliement des structures à trois brins se perpétuent en allongeant les structures. Il est également question de vérifier si la notion de courbure observée sur la structure cristallographique du foldamère à trois brins est accentuée lorsque le nombre de brins augmente. Pour apporter des réponses à ces questions, un foldamère à cinq brins β_8 a été synthétisé toujours selon une stratégie convergente. A ce jour, les méthodes de couplage final et de purification de ce composé n'ont pas été optimisées afin d'obtenir suffisamment de matière pour procéder aux études en solution ainsi qu'à des essais de cristallisation. A court terme, d'autres cibles comprenant trois à cinq brins pourront être envisagées en jouant sur la longueur des brins et l'apport de chaînes latérales afin de passer ces architectures en milieu aqueux. L'idée serait d'apporter des groupements polaires au sein des brins pour favoriser la solubilité de ces structures dans l'eau. Le point crucial ici sera de ne pas provoquer d'importantes interactions intermoléculaires par l'ajout de chaînes latérales polaires qui engendreraient l'agrégation des composés.

En perspective, un nouvel objectif a pu être soumis grâce à l'acquisition de la structure cristallographique du foldamère à trois brins β_7 et consiste à développer des mimes de tonneaux β . La **Figure 26** illustre les différentes avancées pour parvenir à des structures de plus en plus complexes en partant d'un feuillet à trois brins puis à cinq brins pour viser ensuite une macromolécule qui rappelle la structure des tonneaux β naturels.

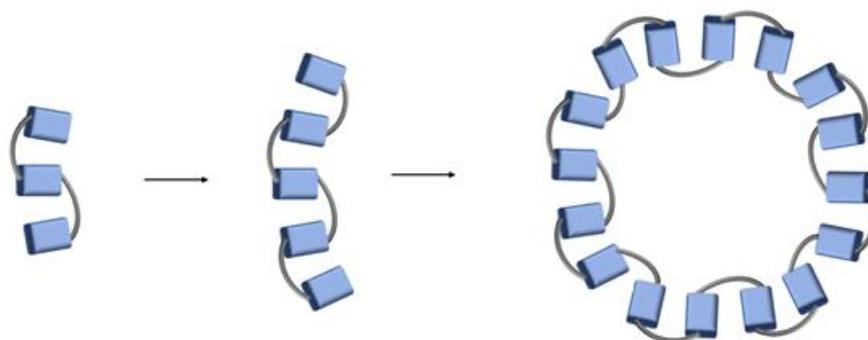


Figure 26 : Evolution du foldamère à trois brins au cinq brins puis vers un mime de tonneau β .

Pour revenir à l'utilisation d'unités diamine générant la formation de structures étendues, un nouveau projet a également été initié au sein du laboratoire. Dans ce cas, l'espaceur entre les motifs diamines serait de type carbonyle pour former des oligourées. Nous avons sélectionné des oligomères constitués de deux types de monomères dérivés de diamine. L'alternance de ces monomères pourrait favoriser la formation de brins β étendus au détriment d'une structure hélicoïdale. En effet, il a été démontré que les deux catégories de monomères M_1 et M_2 différant par la position de la chaîne latérale sur le squelette et sa stéréochimie sont compatibles avec la structure en hélice (**Figure 27A**). En revanche, l'inversion de chiralité sur le monomère M_2 conduisant donc à M_3 rend la séquence correspondante hybride incompatible avec la structuration en hélice (**Figure 27B**).²⁷ Il s'agira d'établir si les oligomères ainsi conçus adoptent ou non un repliement en structures étendues.

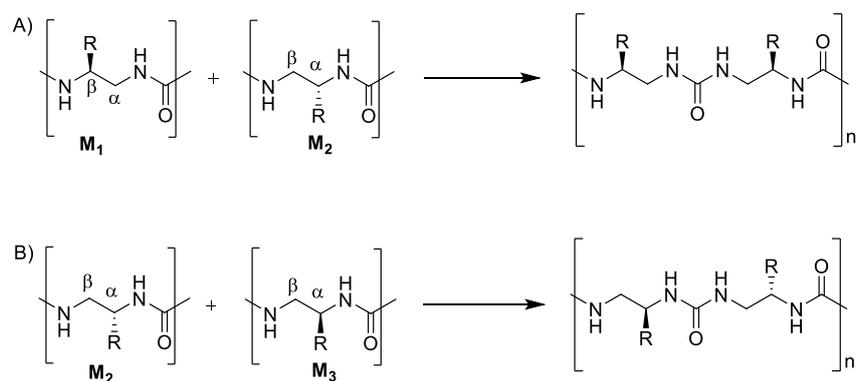


Figure 27 : Compatibilité de monomères d'oligourées avec des structures secondaires. A) Monomères favorisant la formation d'hélices. B) Monomères supposés compatibles pour la formation de brins étendus.

Finalement, le potentiel de ce projet réside dans la pluralité de ses objectifs afin d'obtenir des structures toujours plus complexes les unes que les autres à l'effigie des structures peptidiques naturelles. Les difficultés synthétiques majeures ont pu être maîtrisées au cours de ce doctorat et nous avons vu que la structure cristallographique d'un foldamère à trois brins a permis d'ouvrir des voies quant à la poursuite de ce projet.

Bibliographie

- (1) Fremaux, J.; Mauran, L.; Pulka-Ziach, K.; Kauffmann, B.; Odaert, B.; Guichard, G. α -Peptide–Oligourea Chimeras: Stabilization of Short α -Helices by Non-Peptide Helical Foldamers. *Angewandte Chemie* **2015**, *127* (34), 9954–9958. <https://doi.org/10.1002/ange.201500901>.
- (2) Fisk, J. D.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. Control of Hairpin Formation via Proline Configuration in Parallel β -Sheet Model Systems. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (23), 5443–5447. <https://doi.org/10.1021/ja9929483>.
- (3) Pittelkow, M.; Lewinsky, R.; Christensen, J. B. Selective Synthesis of Carbamate Protected Polyamines Using Alkyl Phenyl Carbonates. *Synthesis* **2002**, *2002* (15), 2195–2202. <https://doi.org/10.1055/s-2002-34859>.
- (4) Majer, P.; Randad, R. S. A Safe and Efficient Method for Preparation of N,N'-Unsymmetrically Disubstituted Ureas Utilizing Triphosgene. *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59* (7), 1937–1938. <https://doi.org/10.1021/jo00086a061>.
- (5) Scialdone, M. A.; Shuey, S. W.; Soper, P.; Hamuro, Y.; Burns, D. M. Phosgenated P-Nitrophenyl(Polystyrene)Ketoxime or Phoxime Resin. A New Resin for the Solid-Phase Synthesis of Ureas via Thermolytic Cleavage of Oxime-Carbamates. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63* (14), 4802–4807. <https://doi.org/10.1021/jo9716542>.
- (6) Takeda, K.; Akagi, Y.; Saiki, A.; Tsukahara, T.; Ogura, H. Convenient Methods for Syntheses of Active Carbamates, Ureas and Nitrosoureas Using N,N'-Disuccinimido Carbonate (DSC). *Tetrahedron Letters* **1983**, *24* (42), 4569–4572. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)85958-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)85958-4).
- (7) FujitaShin-ichiro; M, B.; AraiMasahiko. Synthesis of N,N'-Disubstituted Urea from Ethylene Carbonate and Amine Using CaO. *Chemistry Letters* **2004**. <https://doi.org/10.1246/cl.2004.742>.
- (8) Turoczi, M.-C.; Simon, M.; Badea, V.; Csunderlik, C. Synthesis of Bis-Ureas from Bis(o-Nitrophenyl) Carbonate. *Molecules* **2008**, *13* (12), 3192–3197. <https://doi.org/10.3390/molecules13123192>.
- (9) Zhang, X.; Rodrigues, J.; Evans, L.; Hinkle, B.; Ballantyne, L.; Peña, M. Formation of Urea Dipeptides from Carbonyldiimidazole: Application toward the Protease Inhibitors GE 20372 and MAPI. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62* (18), 6420–6423. <https://doi.org/10.1021/jo970514p>.
- (10) Zheng, C.; Combs, A. P. A General Method for the Solid-Phase Synthesis of Unsymmetrical Tri- and Tetrasubstituted Ureas. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2002**, *4* (1), 38–43. <https://doi.org/10.1021/cc010034i>.
- (11) Grzyb, J. A.; Shen, M.; Yoshina-Ishii, C.; Chi, W.; Brown, R. S.; Batey, R. A. Carbamoylimidazolium and Thiocarbamoylimidazolium Salts: Novel Reagents for the Synthesis of Ureas, Thioureas, Carbamates, Thiocarbamates and Amides. *Tetrahedron* **2005**, *61* (30), 7153–7175. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.05.056>.
- (12) Katritzky, A. R.; Pleyne, D. P. M.; Yang, B. A General Synthesis of Unsymmetrical Tetrasubstituted Ureas. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62* (12), 4155–4158. <https://doi.org/10.1021/jo962245t>.
- (13) Nowick, J. S.; Powell, N. A.; Nguyen, T. M.; Noronha, G. An Improved Method for the Synthesis of Enantiomerically Pure Amino Acid Ester Isocyanates. *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57* (26), 7364–7366. <https://doi.org/10.1021/jo00052a069>.

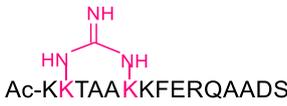
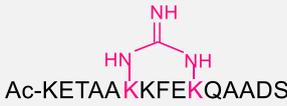
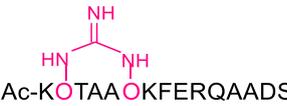
- (14) Burgess, K.; Ibarzo, J.; Linthicum, D. S.; Russell, D. H.; Shin, H.; Shitangkoon, A.; Totani, R.; Zhang, A. J. Solid Phase Syntheses of Oligoureas. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (7), 1556–1564. <https://doi.org/10.1021/ja9631256>.
- (15) Martinez, J.; Oiry, J.; Imbach, J. L.; Winternitz, F. Activated N-Nitrosocarbamates for Regioselective Synthesis of N-Nitrosoureas. *Journal of Medicinal Chemistry* **1982**, *25* (2), 178–182. <https://doi.org/10.1021/jm00344a017>.
- (16) Hutchins, S. M.; Chapman, K. T. A General Method for the Solid Phase Synthesis of Ureas. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35* (24), 4055–4058. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)73110-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)73110-8).
- (17) Thavonekham, B. A Practical Synthesis of Ureas from Phenyl Carbamates. *Synthesis* **1997**, *1997* (10), 1189–1194. <https://doi.org/10.1055/s-1997-1335>.
- (18) Bridgeman, Eu.; Tomkinson, N. C. O. A Simple Method for the Preparation of Di-, Tri- and Tetrasubstituted Non-Symmetrical Ureas. *Synlett* **2006**, No. 2, 4.
- (19) Douat-Casassus, C.; Pulka, K.; Claudon, P.; Guichard, G. Microwave-Enhanced Solid-Phase Synthesis of N,N'-Linked Aliphatic Oligoureas and Related Hybrids. *Organic Letters* **2012**, *14* (12), 3130–3133. <https://doi.org/10.1021/ol3012106>.
- (20) Fremaux, J.; Dolain, C.; Kauffmann, B.; Clayden, J.; Guichard, G. Influence of Achiral Units with Gem-Dimethyl Substituents on the Helical Character of Aliphatic Oligourea Foldamers. *Chemical Communications* **2013**, *49* (67), 7415–7417. <https://doi.org/10.1039/C3CC40961A>.
- (21) Ogura, H.; Takeda, K. Imido Carbonate Compound, Production Thereof and Uses Thereof as Reagent for Forming Active Ester of Amino Acids. US4341707A, July 27, 1982.
- (22) Vasilevich, N. I.; Coy, D. H. Conversion of O-Succinimidyl Carbamates to N-(O-Carbamoyl)-Succinmonoamides and Ureas: Effects of N-Substituents and Reaction Conditions on the Reaction Pathway. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43* (37), 6649–6652. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)01451-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)01451-X).
- (23) Konnert, L.; Lamaty, F.; Martinez, J.; Colacino, E. Recent Advances in the Synthesis of Hydantoins: The State of the Art of a Valuable Scaffold. *Chemical Reviews* **2017**, *117* (23), 13757–13809. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00067>.
- (24) Batey, R. A.; Santhakumar, V.; Yoshina-Ishii, C.; Taylor, S. D. An Efficient New Protocol for the Formation of Unsymmetrical Tri- and Tetrasubstituted Ureas. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (35), 6267–6270. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)01330-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)01330-6).
- (25) Velavan, A.; Sumathi, S.; Balasubramanian, K. K. Unsymmetrical Tetrasubstituted Ureas from Tertiary Carbamoylimidazole: Activation by AlMe₃. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, *10* (31), 6420. <https://doi.org/10.1039/c2ob25412c>.
- (26) Lee, A.; Kim, H.-K.; Thompson, D. H. A Facile Method for the Preparation of Unsymmetrical Ureas Utilizing Zirconium(IV) Chloride: Facile Synthesis of Unsymmetrical Urea. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2016**, *37* (2), 154–160. <https://doi.org/10.1002/bkcs.10646>.
- (27) 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. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (12), 4884–4892. <https://doi.org/10.1021/ja401151v>.

Conclusion générale et perspectives

Ces dernières années, des avancées en biologie moléculaire ont permis de voir émerger des molécules biologiques comme agents thérapeutiques. Or, bien souvent seuls quelques éléments de structures secondaires de ces molécules (comme les hélices α ou les feuilletts β) sont impliqués dans leur interaction avec la protéine partenaire et sont donc nécessaires pour leur activité biologique. Les peptides aptes à adopter les repliements propres aux structures secondaires rencontrées dans les protéines et qui possèdent des caractéristiques intermédiaires entre les petites molécules et les protéines, représentent un enjeu thérapeutique intéressant. Ces derniers présentent toutefois des inconvénients qui résident dans leur faible stabilité plasmatique et leur faible pénétration cellulaire notamment à cause de leur flexibilité conformationnelle ce qui limite pour l'instant leur développement thérapeutique. C'est dans ce contexte que des méthodologies ont été développées afin d'améliorer les propriétés pharmacologiques de courts fragments peptidiques. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à deux stratégies : stabiliser la structure secondaire des peptides dans leur conformation hélicoïdale (chapitre 2) et développer des squelettes non naturels comme mimes de feuillet β multi-brins (chapitre 3).

Parmi les différentes techniques conçues pour stabiliser le repliement en hélice α , nous avons choisi de travailler sur la macrocyclisation entre deux chaînes latérales *via* l'introduction d'une fonction polaire qui est fréquemment rencontrée au sein des biomolécules : le motif guanidine. Une stratégie de synthèse consistant à former la guanidine lors de l'étape finale de macrocyclisation par réaction entre un précurseur thiourée activé et une fonction amine a ainsi été développée sur support solide. Les différentes étapes de cette stratégie ont tout d'abord été validées sur une séquence peptidique modèle pour former une agrafe peptidique en ($i, i+4$), et ont notamment nécessité un choix judicieux des groupements protecteurs portés par les deux résidus lysine impliqués dans le macrocycle. Plusieurs séquences ont été synthétisées pour évaluer l'influence de la position (**AP1**, [K6-K10] vs **AP2**, [K6-K10]) et de la taille (**AP3**, [O2-O6]) du macrocycle formé en ($i, i+4$) sur la structuration du peptide modèle (**Tableau 1**). Des études de dichroïsme circulaire ont démontré que l'incorporation d'un pont guanidine en ($i, i+4$) permet de stabiliser fortement la structure hélicoïdale lorsqu'il est placé au centre du peptide et que la possibilité d'établir un pont salin avec le résidu Glu2 est maintenue.

Tableau 1 : Valeurs des rendements de synthèse et des pourcentages d'hélicité calculés à 222 nm pour les peptides issus d'une séquence modèle macrocyclisés en ($i, i+4$) par un motif guanidine.

Composés	Séquences	Rendements	Taux d'hélicité
P25	KKTAACKFERQAADS	23 %	2 %
AP1 [K2-K6]	 Ac-KKTAAKKFERQAADS	19 %	7 %
AP2 [K6-K10]	 Ac-KETAAKKFEKQAADS	10 %	30 %
AP3 [O2-O6]	 Ac-KOTAAOKFERQAADS	16 %	6 %

Le concept d'agrafes peptidiques type guanidine a ensuite été appliqué à des peptides biologiquement actifs impliqués dans des interactions protéine-protéine. Les peptides qui ont été étudiés et leur protéine d'intérêt sont : le peptide S/protéine S, PMI/MDM2, SRC1-2/VDR. La synthèse de macrocycles en $(i, i+4)$ s'est avérée compatible avec l'ensemble de ces séquences peptidiques. De très bonnes puretés HPLC ont en effet été observées pour les différents composés bruts et des rendements de 2 % à 17 % ont été obtenus après purification (Tableau 2).

Tableau 2 : Résultats de synthèse des peptides **AP4** à **AP7**. A = synthèse du peptide ; B = formation de la thiourée ; C = macrocyclisation ; D = produits bruts. Les puretés des différentes étapes sont indiquées entre parenthèse.

Mutations ($i, i+4$)	Séquences	A	B	C	D	Rende- ments
Peptide S [K2-K6]	Ac-KK(Mtt)TAAK(Alloc)KFERQHMDS	P25 (80 %)	P27 (ND)	P29 (83 %)	AP4 (58 %)	17 %
Peptide S [K6-K10]	Ac-KETAAK(Mtt)KFEK(Alloc)QHMDS	P30 (78 %)	P32 (ND)	P34 (54 %)	AP5 (43 %)	10 %
PMI [K4-K8]	Ac-TSFK(Mtt)EYWK(Alloc)LLSP	P36 (93 %)	P38 (66%)	P40 (62 %)	AP6 (57 %)	2 %
SRC1-2 [K3-K7]	Ac-RHK(Mtt)ILHK(Alloc)LLQEGS	P41 (87 %)	P43 (ND)	P45 (72 %)	AP 7 (54 %)	13 %

Des études structurales en solution et à l'état solide pour les différentes séquences macrocyclisées sont en cours pour déterminer l'apport de l'agrafe peptidique guanidine sur la stabilisation de l'hélice et son impact sur l'interaction avec leur protéine partenaire respective.

Afin d'étendre les champs d'application de ces agrafes, des tentatives de macrocyclisation en $(i, i+7)$ ont également été faites sur le peptide S permettant d'accéder à un macrocycle à onze atomes (**AP8**) ou treize atomes (**AP9**), issu du couplage avec le résidu Fmoc-Gly-OH sur l'une des chaînes latérales. Dans le premier cas, la formation importante du dimère a été observée tandis que la dimérisation a été fortement diminuée en augmentant la taille du macrocycle.

Ainsi, une stratégie de synthèse efficace a été mise au point permettant d'accéder à des agrafes peptidiques originales comportant un motif guanidine. Celle-ci est compatible avec différentes séquences peptidiques d'intérêt biologique et il a été montré que la taille du macrocycle peut être modulée pour permettre une cyclisation à la fois en $(i, i+4)$ et en $(i, i+7)$. Cette étude a ouvert des perspectives intéressantes pour appliquer notre méthodologie sur une plus large gamme de peptides impliquées dans des interactions protéine-protéine et étudier l'influence de cette agrafe peptidique portant une fonction guanidine sur leurs propriétés de pénétration cellulaire. Une autre stratégie qui permettrait de former plusieurs motifs guanidine *via* une macrocyclisation intermoléculaire est également en cours de développement au laboratoire.

Parallèlement au travail sur la stabilisation d'hélices α , nous nous sommes intéressés à la conception de mimes de feuillet β multi-brins. L'idée est d'accéder à des structures complexes alternant des coudes et brins artificiels, composés de motifs diamine et diacide, stabilisés par des liaisons hydrogène intramoléculaires. La synthèse de ces structures a fait intervenir la préparation d'urées trisubstituées dissymétriques ce qui a constitué un premier défi

synthétique. L'optimisation d'une voie de synthèse de ces urées trisubstituées a permis d'accéder à une première molécule cible β_7 comprenant trois brins (**Figure 1**). Cette dernière a été assemblée selon une stratégie convergente en synthétisant deux fragments distincts qui ont été reliés *via* un couplage peptidique. Plusieurs études ont été réalisées pour caractériser le repliement en solution de cette molécule. Une première expérience de dosage suivi par RMN ^1H de la molécule initialement solubilisée dans le chloroforme, par l'ajout d'un solvant polaire (le DMSO- d_6) a été réalisée. Les informations obtenues ont apporté une preuve indirecte de repliement en feuillet β pour ce foldamère à trois brins en s'appuyant sur le faible déplacement chimique des signaux des protons amide et urée impliqués dans des liaisons hydrogène intramoléculaires. L'étude des corrélations NOE obtenues en RMN 2D a confirmé le repliement en feuillet β pour le foldamère β_7 . Une structure cristallographique de ce même foldamère a également été obtenue par diffraction des rayons X et concorde parfaitement avec un repliement en feuillet β sachant que cette structure est incurvée.

Nous avons ensuite cherché à évaluer si les règles régissant le repliement des structures à trois brins pouvaient permettre d'accéder à des structures plus longues et si la courbure observée sur la structure cristallographique du foldamère β_7 serait accentuée lorsque le nombre de brins augmente. Alors, un foldamère à cinq brins constitué également de motifs diamine et diacide, β_8 , a été synthétisé selon une stratégie convergente (**Figure 1**). Le couplage final et la méthode de purification doivent encore être optimisés afin d'obtenir suffisamment de composé β_8 pour procéder aux études en solution ainsi qu'à des essais de cristallisation pour comparer les données structurales avec le feuillet à trois brins β_7 .

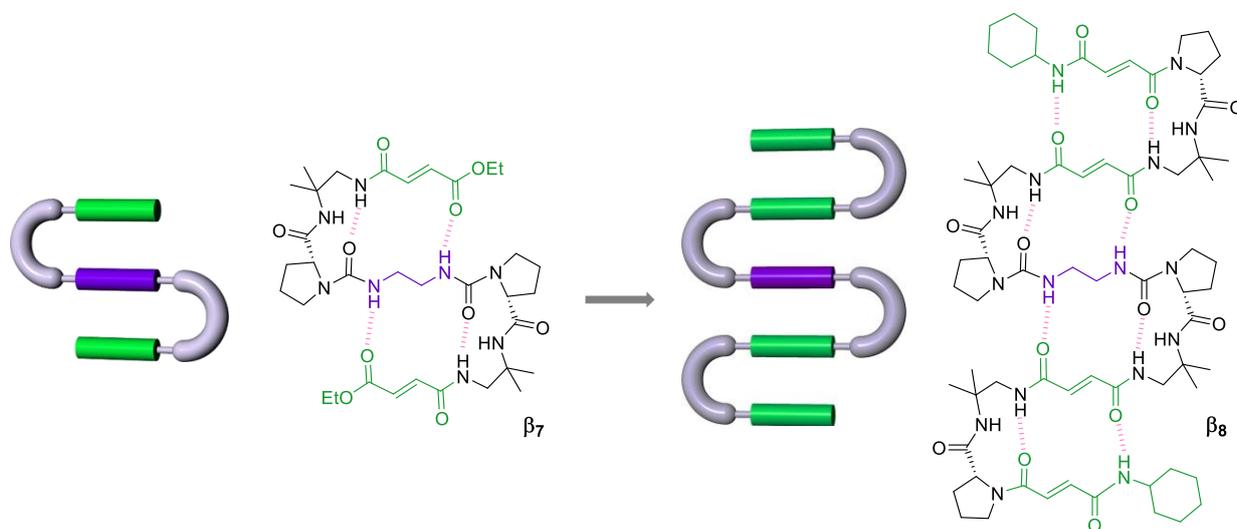


Figure 1 : Molécules cibles à trois brins β_7 et cinq brins β_8 synthétisées et conçues pour se replier en feuillets β multibrins.

A court terme, d'autres cibles comprenant trois à cinq brins pourront être envisagées en jouant sur la longueur des brins et la présence de chaînes latérales polaires afin d'envisager le passage de ces structures en milieu aqueux. Le point crucial ici sera de ne pas provoquer d'importantes interactions intermoléculaires par l'ajout de chaînes latérales polaires qui engendreraient l'agrégation des composés. La structure courbée qu'adopte le foldamère à trois brins β_7 permet également d'envisager la possibilité de développer des architectures multi-brins cylindriques avec une cavité, à l'image des tonneaux β naturels (**Figure 2**).

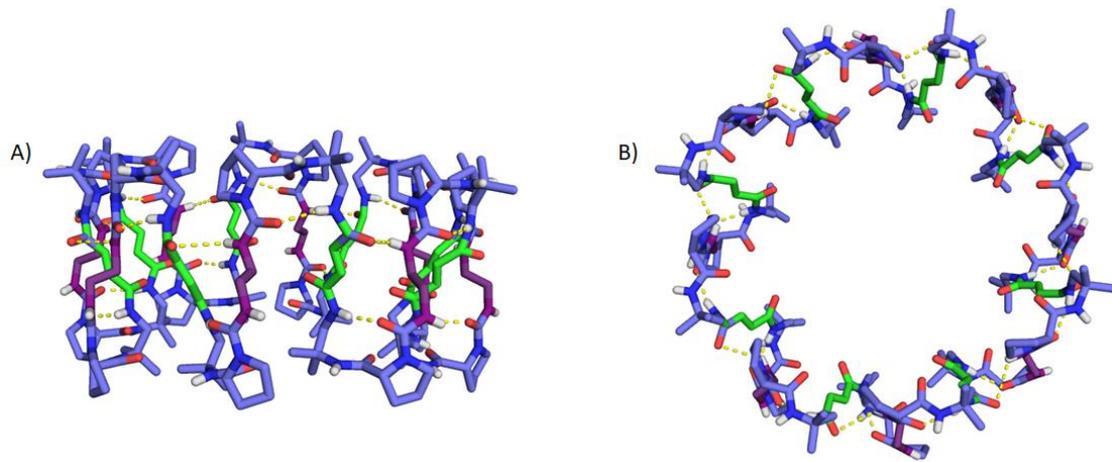


Figure 2 : Schématisation de la conception de tonneaux β artificiels à partir de la structure cristallographique du foldamère β_7 à trois brins.

Partie expérimentale

I. General methods

Commercially available reagents were used throughout without purification. Solvents were purchased from Sigma-Aldrich. THF, DCM and Toluene were preliminary dried by passing through solvent drying system (SPS 800 Manual from MBraun). TFA was purchased from SigmaAldrich. DMF and DCM for solid phase synthesis were purchased from Carlo ERBA. RP-HPLC-quality acetonitrile (ACN) and MilliQ water were used for RP-HPLC analyses and purification. N-protected amino acids were purchased from Iris Biotech. Rink amide resins were purchased from Novabiochem laboratories. All reactions were carried out under a dry nitrogen atmosphere and triethylamine (TEA)/diisopropylethylamine (DIEA) were distilled over phosphorus pentoxide (P_2O_5) prior to use. Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) on Merck silica gel 60-F254 plates (Merck) and observed under UV light and charring with 1 % w/w ninhydrin in ethanol followed by heating or by RP-HPLC analysis. Column chromatography purifications were carried out on Merck GEDURAN Si60 (40-63 μ m). Reaction needing microwave irradiation were carried out on Discover system or LibertyBlue from CEM (CEM μ Waves S.A.S., Orsay, France).

Analytical RP-HPLC analyses were performed on a Dionex Ultimate U3000 using Macherey-Nagel Nucleodur columns (4.6 x 100 mm, 3 μ m, λ = 200 nm) at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. Semi-preparative purifications were performed on a Dionex Ultimate U3000 using a Macherey-Nagel Nucleodur VP250/10 100-16 C18ec column (10 x 250 mm, 16 μ m) at a flow rate of 4 mL.min⁻¹. Preparative purifications of stapled peptides were performed on a Gilson GX-281 using a Macherey-Nagel Nucleodur VP250/21 100-5 C18ec column (21 x 250 mm, 5 μ m) at a flow rate of 20 mL.min⁻¹. The mobile phase was composed of 0.1% (v/v) TFA-H₂O (Solvent A) and 0.1% (v/v) TFA-ACN (Solvent B).

Nuclear Magnetic Resonance. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded on two different NMR spectrometers: (1) an Advance II NMR spectrometer (Bruker Biospin) with a vertical 7.05T narrowbore/ultrashield magnet operating at 300 MHz for ¹H observation and 75 MHz for ¹³C observation by means of a 5-mm direct BBO 1H/19F_XBB_H probe with Z gradient capabilities; (2) a DPX-400 NMR spectrometer (Bruken Biospin) with a vertical 9.4T narrowbore/ultrashield magnet operating at 400 MHz for ¹H observation by means of 5-mm direct QNP 1H/13C/31P/19F probe with gradient capabilities. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm, δ) relative to the ¹H or ¹³C residual signal of the deuterated solvent used. ¹H NMR splitting patterns with observed first-order coupling are designated as singlet (s), broad singlet (brs), doublet (d), triplet (t), or quartet (q). Not defined ¹H NMR splitting patterns are designated as multiplet (m). Coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz). Samples were not degassed and data processing was performed with Topspin 3.6 software.

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

Circular Dichroism. All circular dichroism (CD) spectra were recorded on a J-815 Jasco discographe (Jasco France, Nantes, France) using a quartz cell with a path length of 1 mm or 5 mm (Hellma, Paris, France). Samples temperature was regulated at 3°C or 20°C. Data were collected in continuous scan mode with a data pitch of 0.1 nm, a scanning speed of 50 nm.min⁻¹, 2 nm bandwidth and three accumulations per sample. Samples data were collected as raw ellipticity (Ψ in mdeg) and converted to per residue mean ellipticity (PRME with $[\Theta]$ = ellipticity) in deg.cm².dmol⁻¹.residue⁻¹ using the following equation:

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

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

Crystallography. For X-Ray diffractions studies collections were performed at the IECB X-ray facility (UMS 3033) on two different high flux microfocus Rigaku rotating anodes at the copper α wavelength. Data were collected on a micromax MM07 (800W) equipped with osmic Varimax mirrors and semi-cylindrical R-Axis spider IP detector or on a FRX (2.7 kW) equipped with osmic Varimax mirrors and a Dectris Pilatus 200 K hybrid detector. The crystals were mounted on cryo-loops after quick soaking on Paratone-N oil from Hampton research and flash-frozen. Both diffractometers have partial chi geometry goniometer allowing omegascan data collections. The data were processed with the CrystalClear suite version 1.36 and 2.1b25 (CrystalClear (Rigaku/MSC), 2006). All crystal structures were solved using direct methods implemented in SHELXD and were refined using SHELXL 2013 version. Fullmatrix least-squares refinement were performed on F² for all unique reflections, minimizing $w(F_o^2 - F_c^2)^2$, 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 CH3). The positions and isotropic displacement parameters of the remaining hydrogen atoms were refined freely. SIMU and DELU commands were used to restrain some side chains as rigid groups and restrain their displacement parameters.

II. Experimental data of chapter 2

1) General procedure for peptides synthesis using N-Fmoc strategy

Oligomers were prepared on a 100 μ mol scale. Polystyrene rink amide resin MBHA (loading 0.52 mmol/g) was placed in a polypropylene SPE tube (CEM), and preswelled with DMF. All steps were performed under inert atmosphere on the Liberty Blue system (CEM). The temperature was maintained by modulation of power and controlled with a fiber optic sensor. The vessel was then placed inside the microwave reactor (CEM Liberty Blue). Fmoc- α -XaaOH (5 eq. relative to the resin loading), DIC (5 eq. relative to the resin loading), oxyma (5 eq., relative to the resin loading) were dissolved in DMF. The mixture was added into the reaction vessel (CEM Liberty Blue). Fmoc was deprotected with 20 % of piperidine in DMF, under microwave irradiation (155 W, 75 °C, 15 sec) + (35W, 90 °C, 50 sec). Then double couplings were performed systematically using DIC and oxyma (40 W, 75 °C, 300 sec). The final Fmoc was deprotected with 20 % of piperidine in DMF, under microwave irradiation (155W, 75 °C, 15sec) + (35W, 90

°C, 50 sec). Resin was filtered off, washed with DMF (2 × 2 mL) and DCM (2 × 2 mL). Acetylation of the N-terminal was performed by adding 2 mL of acetic anhydride for on the resin for 20 min. Resin was filtered off, washed with DMF (2 × 2 mL) and DCM (2 × 2 mL) and dried. A small amount of resin was finally swelled in a mixture TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v) or TFA/TIS/H₂O/EDT (94:2.5:2.5:1, v/v/v/v) when appropriate and left to react for 120 min. 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 and lyophilized.

Intermediate **P1** was synthesized on a 100 μmol scale according to general method, except for peptidic couplings performed at (170 W, 75 °C, 15 sec + 35 W, 90 °C, 110 sec). ESI-MS: (Mw 2051.37) m/z 1026.41 [M+2H]²⁺, 684.59 [M+3H]³⁺, 513.68 [M+4H]⁴⁺. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 4.31 min.

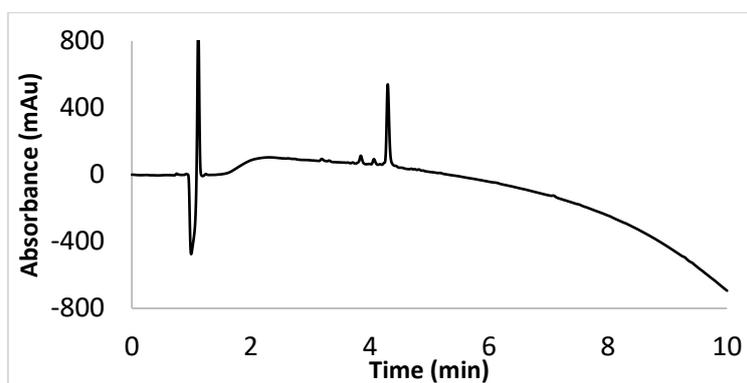


Figure 1: RP-HPLC chromatogram of **P1** (λ = 200 nm).

Intermediate **P5** was synthesized on a 100 μmol scale according to previous general method. ESI-MS: (Mw 1845.10) m/z 922.85 [M+2H]²⁺, 615.88 [M+3H]³⁺, 461,90[M+4H]⁴⁺. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 3.17 min.

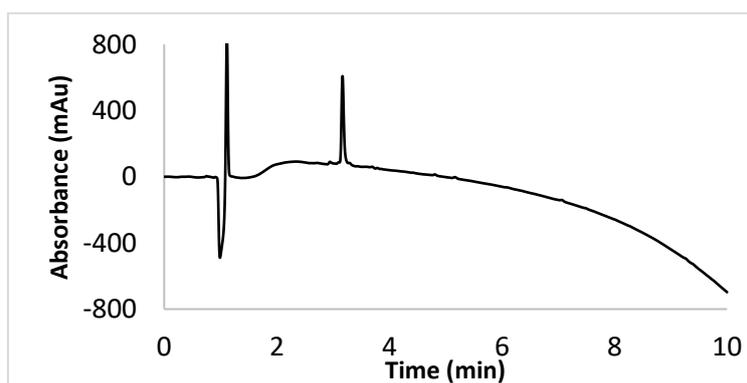


Figure 2: RP-HPLC chromatogram of **P5** (λ = 200 nm).

Intermediate **P9** was synthesized on a 100 μmol scale according to previous method. ESI-MS: (Mw 1804.04) m/z 902.56 [M+2H]²⁺, 602.05 [M+3H]³⁺. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 2.96 min.

Experimental part

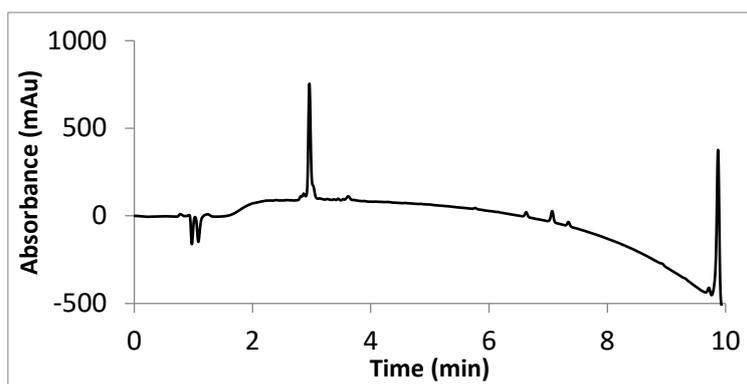


Figure 3: RP-HPLC chromatogram of **P9** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P14** was synthesized on a 100 μmol scale according to previous method. ESI-MS: (Mw 1776.96) m/z 593.04 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$. HPLC: $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA (solvent A), $\text{ACN} + 0.1\%$ TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 3.17$ min.

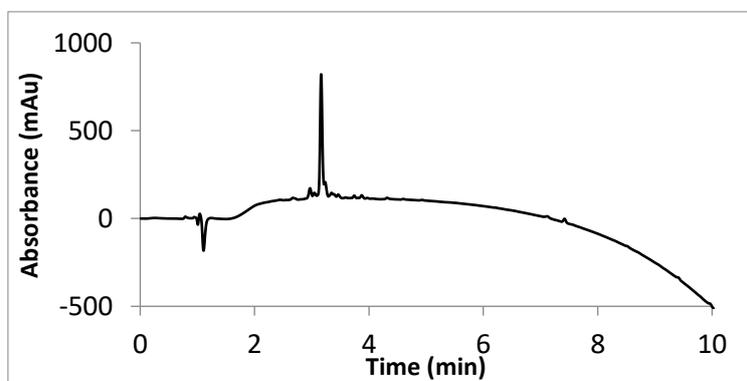


Figure 4: RP-HPLC chromatogram of **P14** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P19** was synthesized on a 100 μmol scale according to previous method. ESI-MS: (Mw 1775.98) m/z 592.72 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$. HPLC: $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA (solvent A), $\text{ACN} + 0.1\%$ TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 2.86$ min.

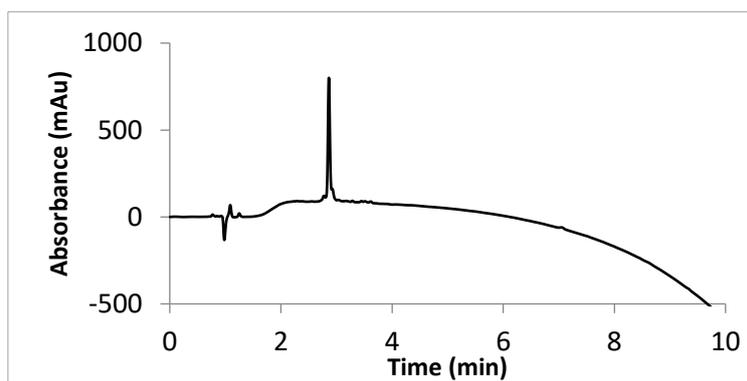


Figure 5: RP-HPLC chromatogram of **P19** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P25** was synthesized on a 100 μmol scale according to previous method. ESI-MS: (Mw 1930.21) m/z 955.52 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 644.01 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 483.51 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$. HPLC: $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA (solvent A), $\text{ACN} + 0.1\%$ TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 3.02$ min.

Experimental part

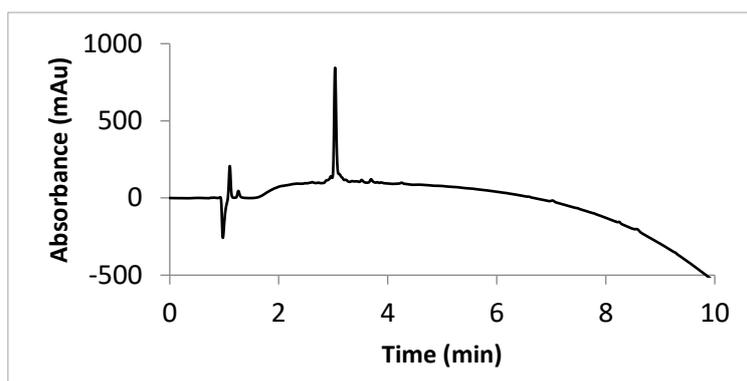


Figure 6: RP-HPLC chromatogram of **P25** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P30** was synthesized on a 100 μ mol scale according to previous method. ESI-MS: (Mw 1903.14) m/z 635.50 $[M+3H]^{3+}$, 476.64 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 3.16$ min.

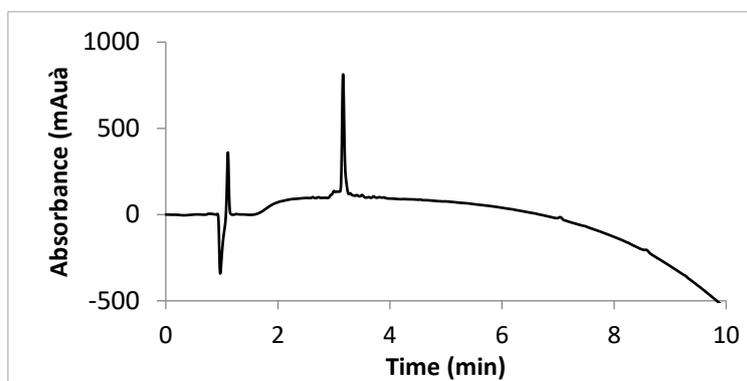


Figure 7: RP-HPLC chromatogram of **P30** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P35** was obtained as a white solid after purification in a yield of 23 % (39 mg). The product was purified by preparative HPLC: H₂O (0.1 % TFA), (ACN 0.1 % TFA); gradient 10-40 %, 20 min, flow = 20 mL/min. ESI-MS: (Mw 1719.96) m/z 860.63 $[M+2H]^{2+}$, 574.11 $[M+3H]^{3+}$, 431.34 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 2.32$ min.

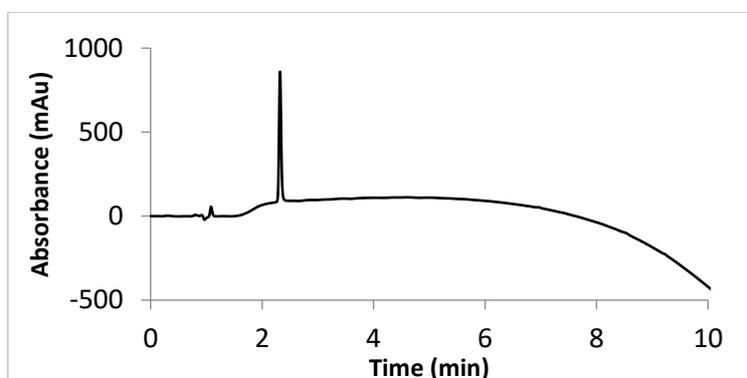


Figure 8: RP-HPLC chromatogram of **P35** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P36** was synthesized on a 100 μmol scale according to previous method. ESI-MS: (Mw 1623.87) m/z 1625.00 $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$, 812.52 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 542.05 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$. HPLC: H_2O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_{\text{R}} = 4.79$ min.

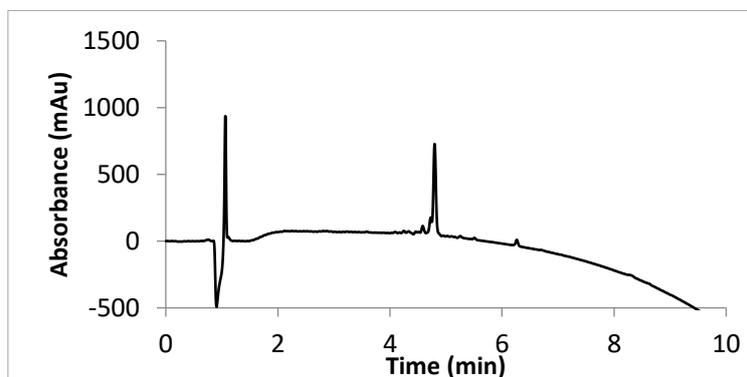


Figure 9: RP-HPLC chromatogram of **P36** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P41** was synthesized on a 100 μmol scale according to previous method. ESI-MS: (Mw 1683.98) m/z 1685.16 $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$, 842.61 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 562.10 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$. HPLC: H_2O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_{\text{R}} = 3.65$ min.

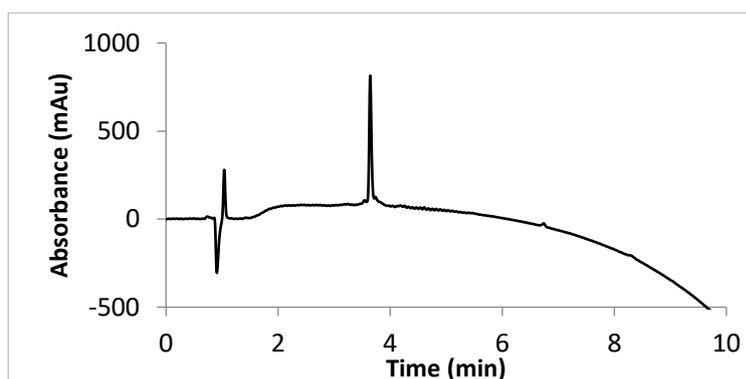


Figure 10: RP-HPLC chromatogram of **P41** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P46** was synthesized on a 100 μmol scale according to previous method. ESI-MS: (Mw 1718.93) m/z 874.54 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 583.03 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$. HPLC: H_2O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_{\text{R}} = 3.64$ min.

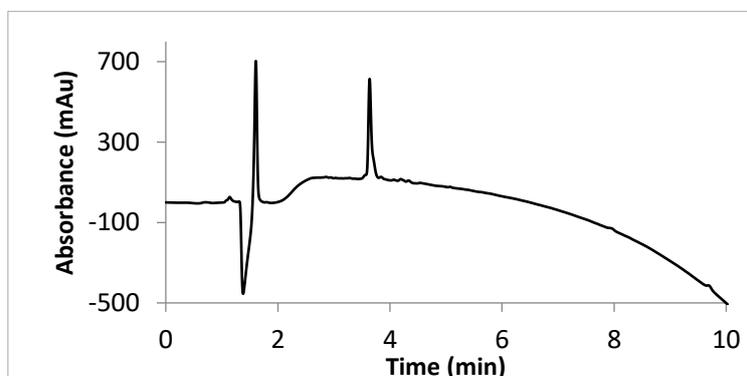


Figure 11: RP-HPLC chromatogram of **P46** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P51** was synthesized on a 100 μmol scale according to previous method. ESI-MS: (Mw 1859.09) m/z 930.63 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 620.78 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 465.85 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$. HPLC: $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA (solvent A), $\text{ACN} + 0.1\%$ TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 3.13$ min.

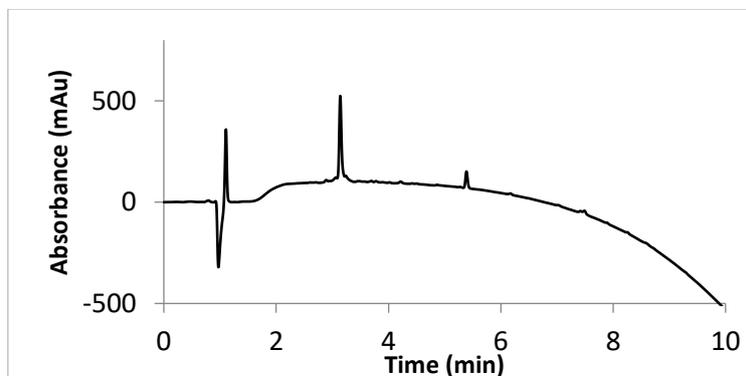


Figure 12: RP-HPLC chromatogram of **P51** ($\lambda = 200$ nm).

2) Deprotection of orthogonal protective groups

a) General procedure for Alloc deprotection

The alloc group was removed by treatment of the resin (100 μmol) with $\text{Pd}[\text{PPh}_3]_4$ (0.2 eq., 20 μmol , 23 mg) and phenylsilane (24 eq., 2.4 mmol, 0.3 mL) in anhydrous DCM (9 mL). After 2h stirring at room temperature, the resin was filtered and washed twice with DCM/DMF/DCM. The reaction was repeated once followed by the same treatment. Resin was filtered off, washed twice with DMF (2×2 mL) and DCM (2×2 mL) and dried. A small amount of resin was finally swelled in a mixture TFA/TIS/ H_2O (95:2.5:2.5, v/v/v) or TFA/TIS/ H_2O /EDT (94:2.5:2.5:1, v/v/v/v) when appropriate and left to react for 120 min. After that time, the resin was filtered off, washed with TFA (2×2 mL), DCM (2×2 mL) and the filtrate was evaporated under reduced pressure and lyophilized.

Intermediate **P2** was synthesized using previous method. ESI-MS: (Mw 1966.81) m/z 984.40 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 492.68 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$. HPLC: $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA (solvent A), $\text{ACN} + 0.1\%$ TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 3.78$ min.

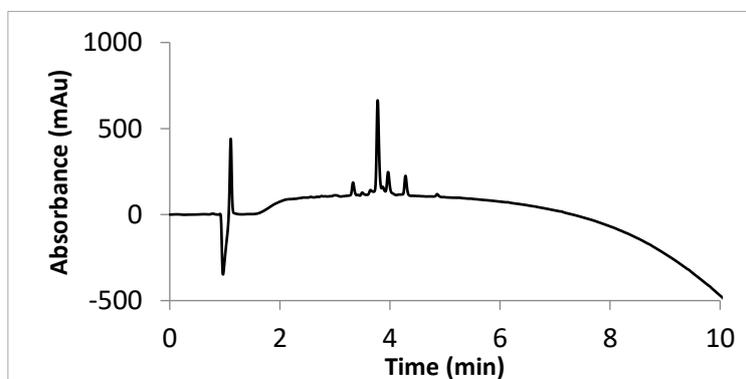


Figure 13: RP-HPLC chromatogram of **P2** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P6** was synthesized using previous method. ESI-MS: (Mw 1759.90) m/z 881.00

$[M+2H]^{2+}$, 587.67 $[M+3H]^{3+}$, 441.00 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 2.55$ min.

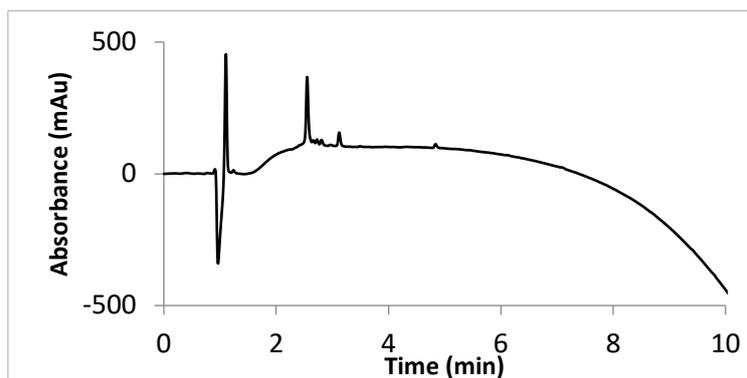


Figure 14: RP-HPLC chromatogram of **P6** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P10** was synthesized using previous method. ESI-MS: (Mw 1719.96) m/z 860.55 $[M+2H]^{2+}$, 574.05 $[M+3H]^{3+}$, 430.79 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 3.94$ min.

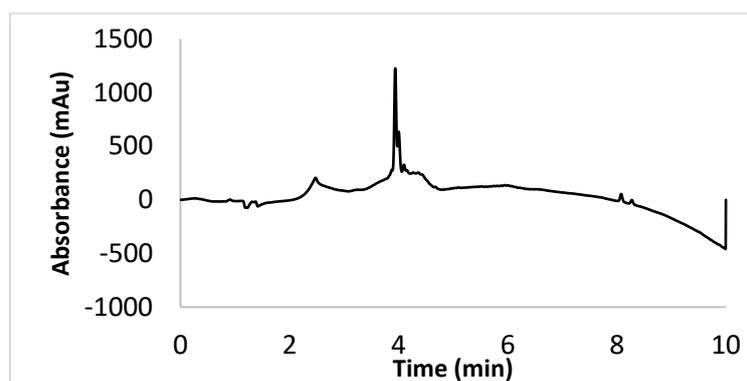


Figure 15: RP-HPLC chromatogram of **P10** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P15** was synthesized using previous method. ESI-MS: (Mw 1692.89) m/z 565.02 $[M+3H]^{3+}$, 424.03 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B) gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 2.68$ min.

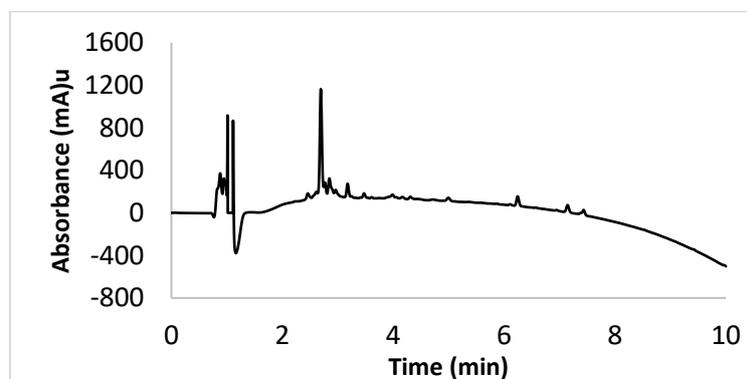


Figure 16: RP-HPLC chromatogram of **P15** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P20** was synthesized using previous method. ESI-MS: (Mw 1691.91) m/z 846.54

$[M+2H]^{2+}$, 564.70 $[M+3H]^{3+}$, 423.79 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 4.15 min.

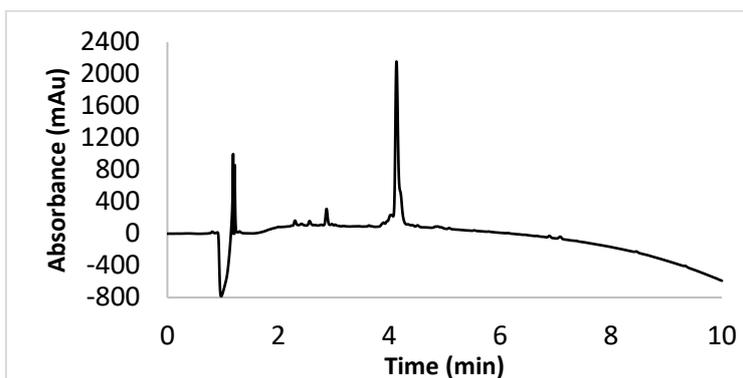


Figure 17: RP-HPLC chromatogram of **P20** (λ = 200 nm).

Intermediate **P26** was synthesized using previous method. ESI-MS: (Mw 1846.14) m/z 923.69 $[M+2H]^{2+}$, 616.16 $[M+3H]^{3+}$, 462.64 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 2.55 min.

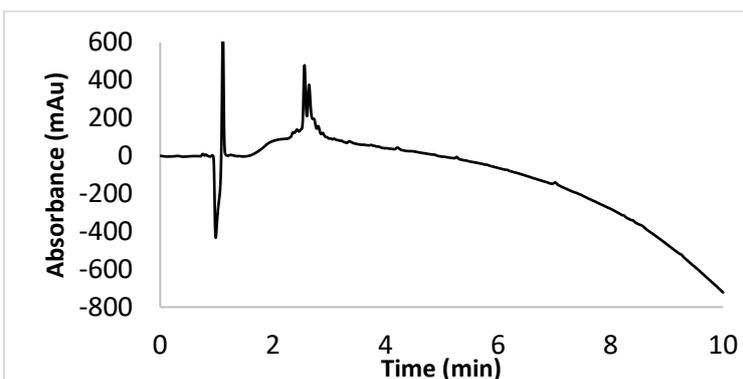


Figure 18: RP-HPLC chromatogram of **P26** (λ = 200 nm).

Intermediate **P31** was synthesized using previous method. ESI-MS: (Mw 1819.07) m/z 910.17 $[M+2H]^{2+}$, 607.14 $[M+3H]^{3+}$, 455.63 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 2.72 min.

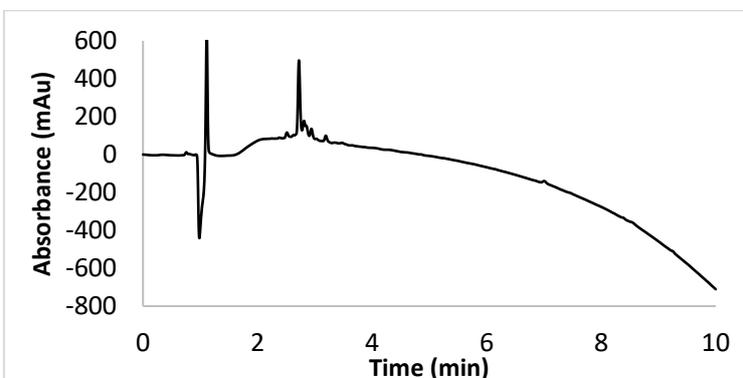


Figure 19: RP-HPLC chromatogram of **P31** (λ = 200 nm).

Intermediate **P37** was synthesized using previous method. ESI-MS: (Mw 1539.79) m/z 1541.00

$[M+1H]^+$, 771.04 $[M+2H]^2+$. HPLC: $H_2O + 0.1\%$ TFA (solvent A), $ACN + 0.1\%$ TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 4.6$ min.

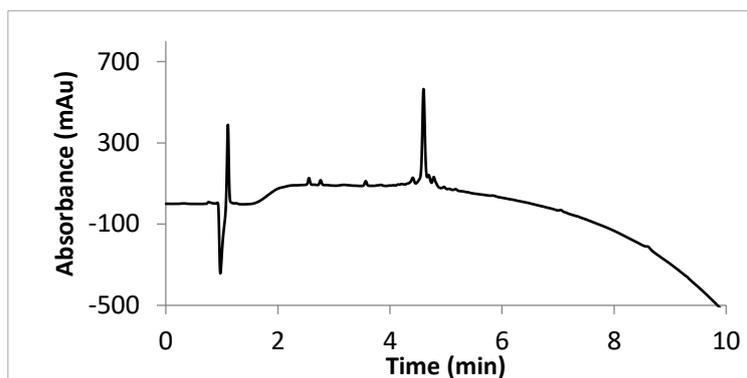


Figure 20: RP-HPLC chromatogram of **P37** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P42** was synthesized using previous method. ESI-MS: (Mw 1599.90) m/z 800.45 $[M+2H]^2+$, 533.97 $[M+3H]^3+$. HPLC: $H_2O + 0.1\%$ TFA (solvent A), $ACN + 0.1\%$ TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 3.39$ min.

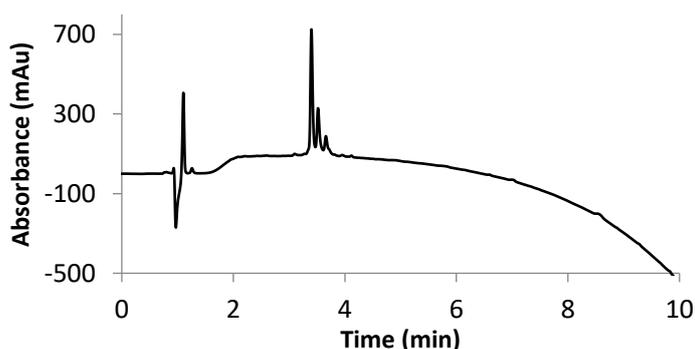


Figure 21: RP-HPLC chromatogram of **P42** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P47** was synthesized using previous method. ESI-MS: (Mw 1662.86) m/z 830.95 $[M+2H]^2+$, 554.30 $[M+3H]^3+$, 415.98 $[M+3H]^3+$. HPLC: $H_2O + 0.1\%$ TFA (solvent A), $ACN + 0.1\%$ TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 2.79$ min.

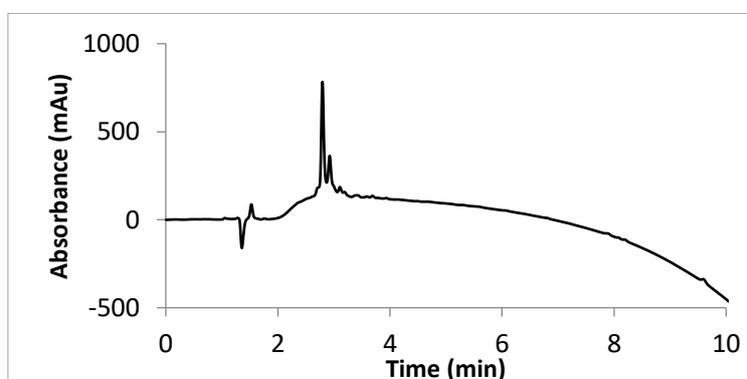


Figure 22: RP-HPLC chromatogram of **P47** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P52** was synthesized using previous method. ESI-MS: (Mw 1775.01) m/z 888,11

$[M+2H]^{2+}$, 592.44 $[M+3H]^{3+}$, 444.59 $[M+3H]^{3+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 2.29 min.

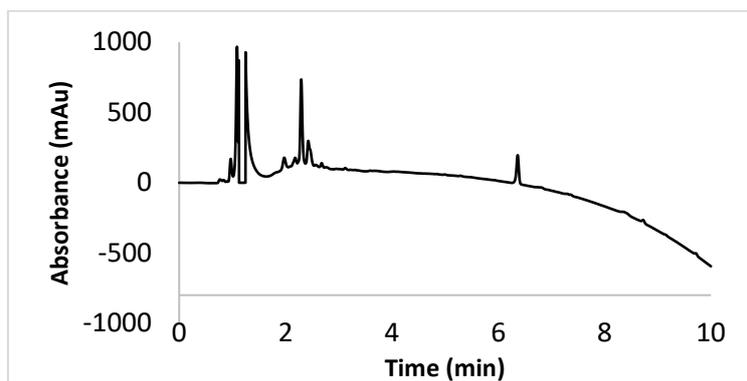


Figure 23: RP-HPLC chromatogram of P52 (λ = 200 nm).

b) General procedure for ivDde deprotection

Procedure A: Deprotection mixture was prepared as follows: 1.25 g (514 eq., 18 mmol) of NH₂OH.HCl and 0.918 g (385 eq., 13.5 mmol) of imidazole were suspended in 5 mL of NMP, and the mixture was sonicated until complete dissolution. This solution can be stored for at least 2 weeks at -20 °C. Just before reaction, 5 volumes of this solution were diluted with 1 volume of DCM or DMF and added on the resin. The mixture was stirred at room temperature for 3 min then the reaction was repeated for 1h and 1h30. A small amount of resin was finally swelled in a mixture of TFA/TIS/H₂O/EDT (94:2.5:2.5:1, v/v/v/v) and left to react for 120 min. After that time, the resin was filtered off, washed with TFA (2 x 2mL), DCM (2 x 2 mL) and the filtrate was evaporated under reduced pressure and lyophilized.

Procedure B: Peptide **P1** (19 μ mol, 0,019 M) was dissolved in DMF and N₂H₄.H₂O (21 eq., 0.4 mmol) was added. The mixture was stirred at RT for 2hours. After that, LC/MS and HPLC analysis were performed and the initial product remains as the major product nevertheless 30 % were converted into **P1-ivDde**. A small amount of resin was finally swelled in a mixture of TFA/TIS/H₂O/EDT (94:2.5:2.5:1, v/v/v/v) and left to react for 120 min. After that time, the resin was filtered off, washed with TFA (2 x 2mL), DCM (2 x 2 mL) and the filtrate was evaporated under reduced pressure and lyophilized

Intermediate **P4** was obtain in 11 % purity following procedure A and 30 % following procedure B. ESI-MS: (Mw 1843.72) m/z 922.85 $[M+2H]^{2+}$, 615.55 $[M+3H]^{3+}$, 461.90 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 3.39 min.

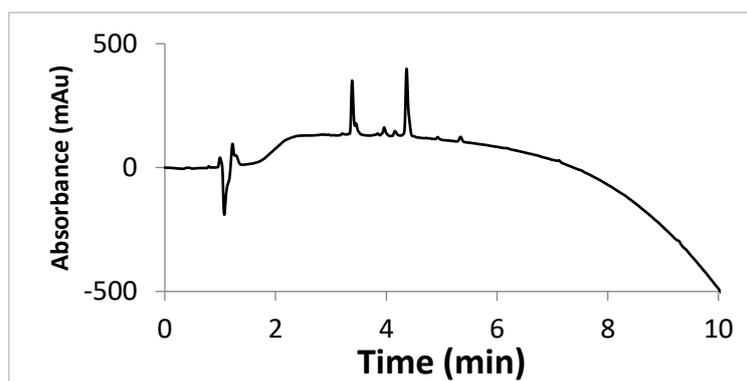


Figure 24: RP-HPLC chromatogram of **P4** ($\lambda = 200$ nm).

Procedure C: NaBH_4 (10 eq., 0.25 mmol, 9.45 mg) was added on **P3** (25 μmol) in DMF (300 μL). The mixture was stirred at RT for 15h. A small amount of resin was finally swelled in a mixture of TFA/TIS/ H_2O /EDT (94:2.5:2.5:1, v/v/v/v) and left to react for 120 min. After that time, the resin was filtered off, washed with TFA (2 x 2mL), DCM (2 x 2 mL) and the filtrate was evaporated under reduced pressure and lyophilized. Removal of Fmoc was in competition with the deprotection of ivDde. The expected compound was not obtained and **P3-[ivDde-Fmoc]** was recovered.

c) General procedure for Mtt deprotection

The Mtt protecting group was removed by three 30 min treatments of the resin with a DCM/TFE/ HFIP/TES mixture (6.5/1/2/0.5: v/v/v/v) followed by washes with DCM. Crude compound was directly engaged in the next step.

Compounds **P8**, **P12**, **P17**, **P22**, **P28**, **P33**, **P39**, **P44**, **P49** and **P56** were synthesized *via* this method.

Intermediate **P8** was synthesized through the previous method followed by an acetylation with 2 mL of acetic anhydride for 20 min. ESI-MS: (M_w 2043.33) m/z 1022.16 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 682.13 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 461.90. HPLC: H_2O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 4.46$ min.

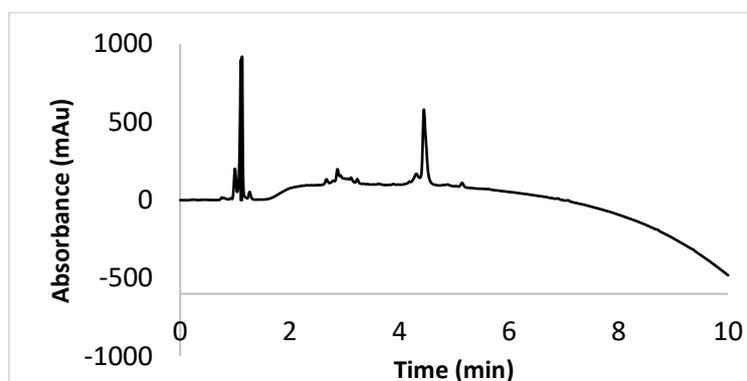


Figure 25: RP-HPLC chromatogram of **P8** ($\lambda = 200$ nm).

3) Stapled peptides synthesisa) Synthesis of **P53**

This step was performed under microwave irradiation on the Discover system (CEM). The temperature was maintained by modulation of power and controlled with a fiber optic sensor. Fmoc-Gly-OH (6 eq. relative to the resin loading), DIC (5 eq. relative to the resin loading), oxyma (5 eq. relative to the resin loading) were dissolved in DMF. The mixture was added into the reaction vessel (CEM Discover). The vessel was then placed inside the microwave reactor (CEM Discover) and irradiated (50W, 75 °C, 5 min). The coupling was repeated twice and followed by Kaiser's colorimetric test. After that, the resin was filtered and washed with DMF. Fmoc was deprotected with 20 % of piperidine in DMF, under microwave irradiation (50W, 50 °C, 10 min). A small amount of resin was finally swelled in a mixture of TFA/TIS/H₂O/EDT (94:2.5:2.5:1, v/v/v/v) and left to react for 120 min. After that time, the resin was filtered off, washed with TFA (2 x 2mL), DCM (2 x 2 mL) and the filtrate was evaporated under reduced pressure and lyophilized. ESI-MS: (Mw 2054.31) *m/z* 1028.14 [M+2H]²⁺, 685.79 [M+3H]³⁺, 514.35 [M+3H]³⁺. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; *t_R* = 3.99 min.

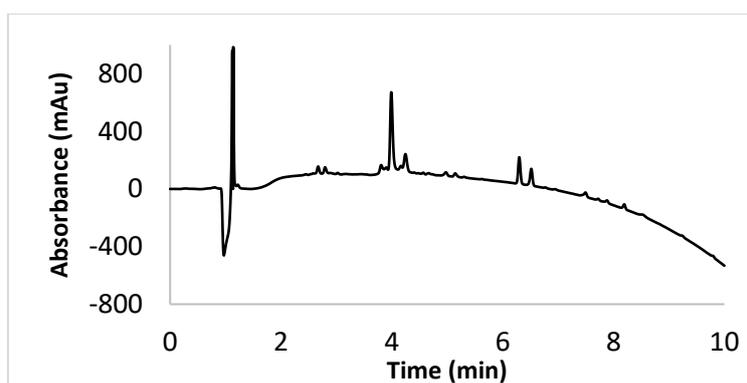
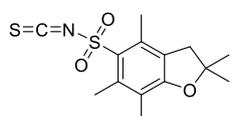
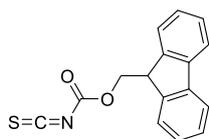


Figure 26: RP-HPLC chromatogram of **P53** ($\lambda = 200$ nm).

b) Synthesis of isothiocyanate derivatives **10** and **12**Synthesis of 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl isothiocyanate **10**.¹

Pbf chloride **9** (1eq., 1.73 mmol, 500 mg) and tetrabutylammonium thiocyanate (5 eq., 8.65 mmol, 2.59 g) in 40 mL anhydrous dichloromethane were refluxed at 38-39 °C for 40 min under N₂. After most of solvent was removed, the light brown colored residue was quickly loaded onto a short silica gel column and eluted with 500 mL DCM/ cyclohexane (from 70:30 to 50:50, vol/vol). The eluent was concentrated to give Pbf isothiocyanate **10** as colorless oil (14 mg, 3 %). Pbf isothiocyanate is stable in freezer for a few months, but decomposes at rt overnight. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm): 2.99 (s, 2H), 2.58 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 1.49 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, δ in ppm): 136.48, 122.22, 85.99, 42.39, 28.78, 19.41, 18.63, 11.73.

Synthesis of Fluorenylmethylloxycarbonyl isothiocyanate **12**.²



Fluorenylmethoxycarbonyl chloride **11** (1 eq., 10 mmol, 2.6 g) was dissolved in 20 mL of anhydrous THF. This solution was added dropwise to a suspension of dry potassium thiocyanate (1.1 eq., 11 mmol, 1.07 g) in 10 mL of anhydrous ethyl acetate at 0 °C under a nitrogen atmosphere. The solution was allowed to warm to room temperature for 7 hours. After the reaction with the Fmoc-chloride, the reaction mixture was passed through a Celite pad to remove residual salts, and solvents were removed by rotary evaporation. The crude product was purified *via* flash chromatography eluting with a mixture of DCM/cyclohexane (from 1:9 to 2:8, vol/vol) to give 1.53 g of the Fmoc-isothiocyanate **12** as an off-white solid (54 % yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, δ in ppm): 7.70 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.43 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 4.45 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 4.25 (t, J = 7.4 Hz, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, δ in ppm): 150.45, 147.43, 142.89, 141.37, 128.21, 127.39, 125.16, 120.31, 70.75, 46.36.

c) General procedure for thiourea formation

Fmoc-NCS (1 eq., 100 μmol, 28 mg) was added on the resin in anhydrous DCM. After 1h at room temperature, the resin was filtered and washed exclusively with DCM. A small amount of resin was finally swelled in a mixture TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v) or TFA/TIS/H₂O/EDT (94:2.5:2.5:1, v/v/v/v) when appropriate and left to react for 120 min. 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 and lyophilized.

Intermediate **P3** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 2247.09) *m/z*, 1125.10 [M+2H]²⁺, 750.40 [M+3H]³⁺. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; *t_R* = 5.20 min.

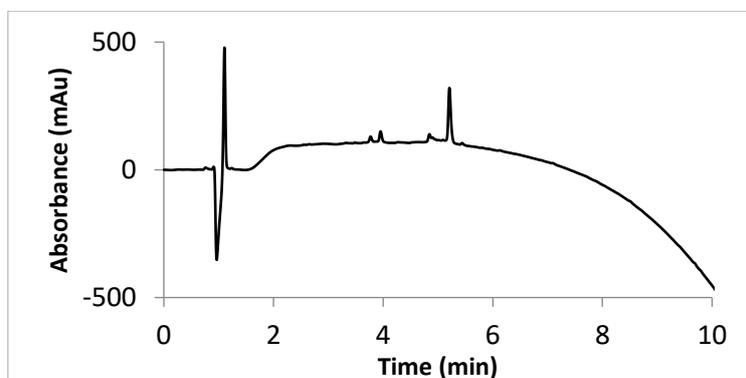


Figure 27: RP-HPLC chromatogram of **P3** (λ = 200 nm).

Intermediate **P7** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 2040.95) *m/z*, 1022.02 [M+2H]²⁺, 681.68 [M+3H]³⁺, 511.51 [M+4H]⁴⁺. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; *t_R* = 4.23 min.

Experimental part

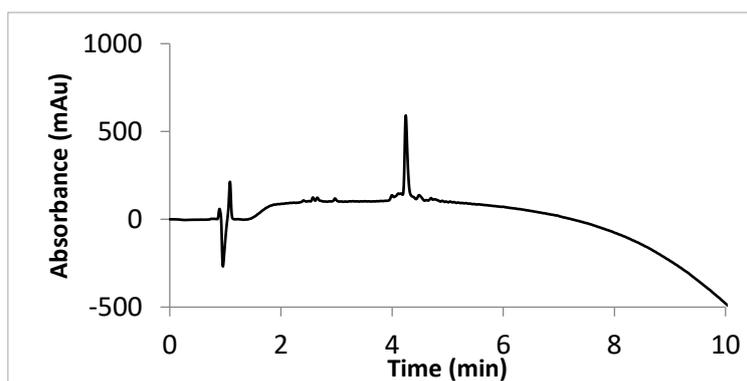


Figure 28: RP-HPLC chromatogram of **P7** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P11** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 2001.29) m/z , 667.74 $[M+3H]^{3+}$, 501.06 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 4.36$ min.

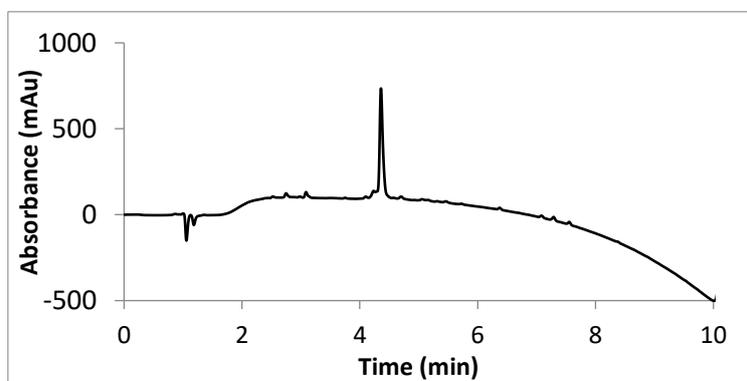


Figure 29: RP-HPLC chromatogram of **P11** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P16** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 1974.22) m/z , 658.72 $[M+3H]^{3+}$, 494.30 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 4.55$ min.

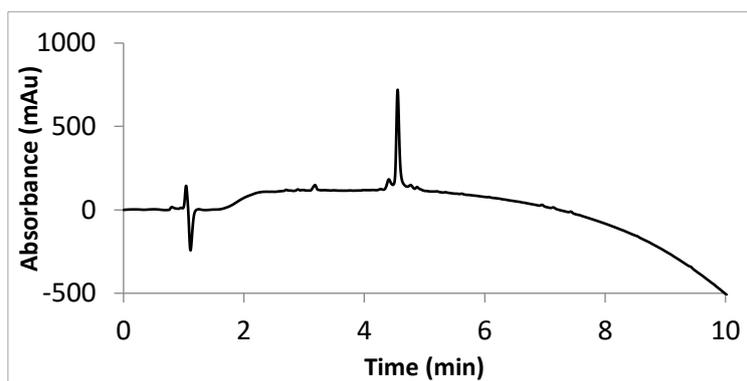


Figure 30: RP-HPLC chromatogram of **P16** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P21** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 1973.24) m/z , 658.40 $[M+3H]^{3+}$, 494.05 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 2.32 min.

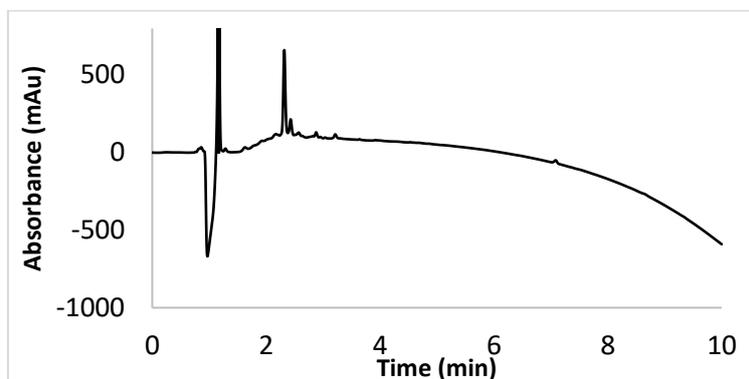


Figure 31: RP-HPLC chromatogram of **P21** (λ = 200 nm).

Intermediate **P27** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 2127.47) m/z , 709.69 $[M+3H]^{3+}$, 532.52 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 4.30 min.

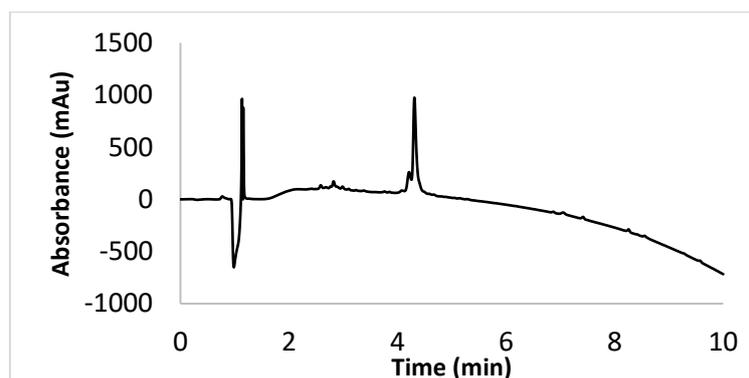


Figure 32: RP-HPLC chromatogram of **P27** (λ = 200 nm).

Intermediate **P32** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 2100.39) m/z , 1051.22 $[M+2H]^{2+}$, 701.18 $[M+3H]^{3+}$, 526.13 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 4.48 min.

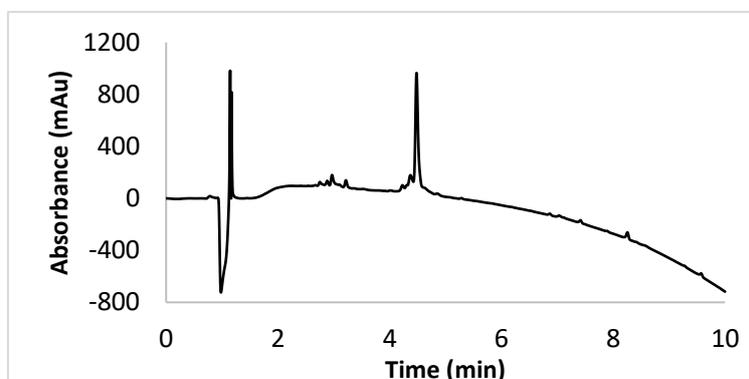


Figure 33: RP-HPLC chromatogram of **P32** (λ = 200 nm).

Intermediate **P38** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 1821.12) m/z , 1822.05 $[M+1H]^+$, 911.56 $[M+2H]^{2+}$, 608.06 $[M+3H]^{3+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 7.59 min.

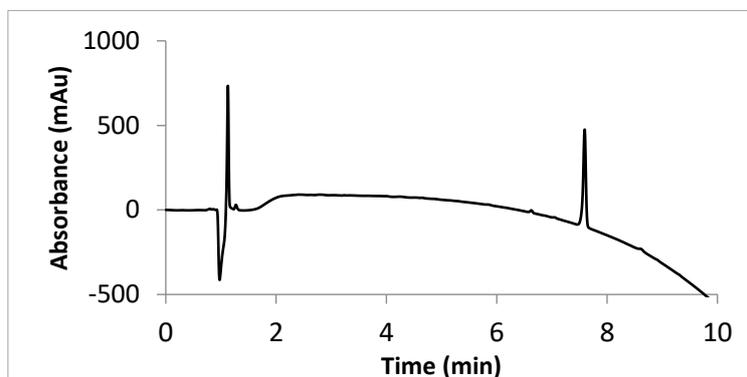


Figure 34: RP-HPLC chromatogram of **P38** (λ = 200 nm).

Intermediate **P43** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 1881.23) m/z , 941.23 $[M+2H]^{2+}$, 628.11 $[M+3H]^{3+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 5.52 min.

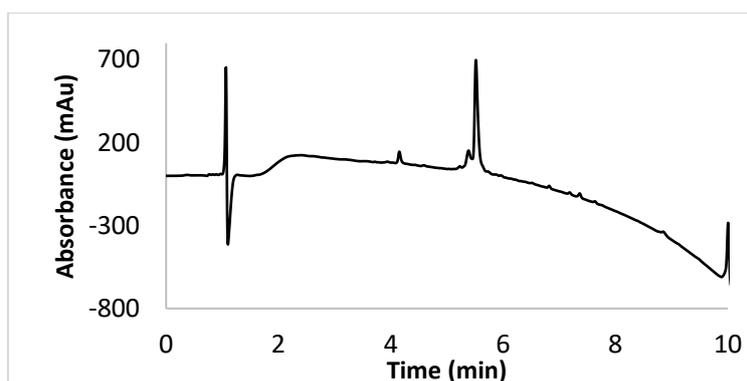


Figure 35: RP-HPLC chromatogram of **P43** (λ = 200 nm).

Intermediate **P48** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 1944.19) m/z , 971.98 $[M+2H]^{2+}$, 647.99 $[M+3H]^{3+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 4.94 min.

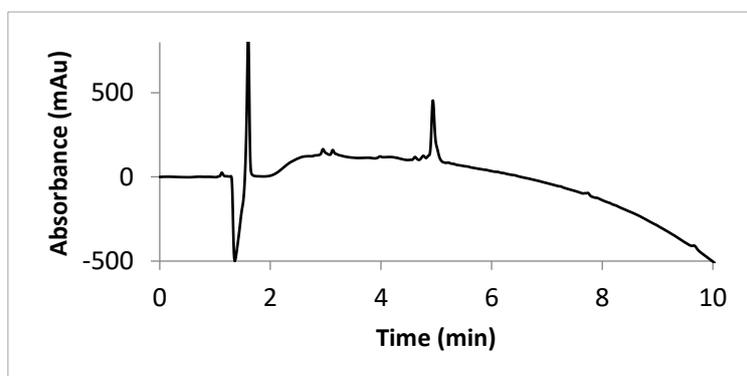


Figure 36: RP-HPLC chromatogram of **P48** (λ = 200 nm).

Intermediate **P55** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 2097.33) m/z , 1057.66 $[M+2H]^{2+}$, 705.46 $[M+3H]^{3+}$, 529.36 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 4.46 min.

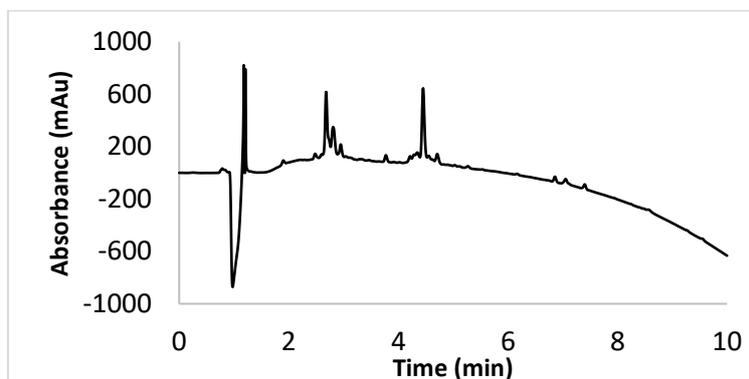


Figure 37: RP-HPLC chromatogram of **P55** (λ = 200 nm).

d) General procedure for guanidinylation

The guanidinylation was performed in DCM (2.5 mL) using DIEA (1.2 eq., 120 μ mol, 21 μ L) to basify the free amine and then EDC (1.2 eq., 120 μ mol, 23 mg) was added. The mixture was stirred under Argon at room temperature for 17h. The reaction was repeated once to obtain a complete conversion. The resin was filtered off and washed with DCM. A small amount of resin was finally swelled in a mixture TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v) or TFA/TIS/H₂O/EDT (94:2.5:2.5:1, v/v/v/v) when appropriate and left to react for 120 min. After that time, the resin was filtered off, washed with TFA (2 x 2mL), DCM (2 x 2 mL) and the filtrate was evaporated under reduced pressure and lyophilized.

Intermediate **P14** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 1967.22) m/z , 656.41 $[M+3H]^{3+}$, 492.56 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 4.13 min.

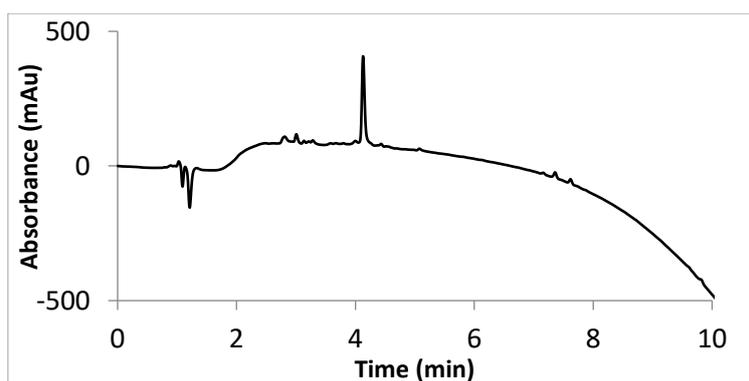


Figure 38: RP-HPLC chromatogram of **P14** (λ = 200 nm).

Intermediate **P13** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 1940.14) m/z , 647.39 $[M+3H]^{3+}$, 485.81 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 4.17 min.

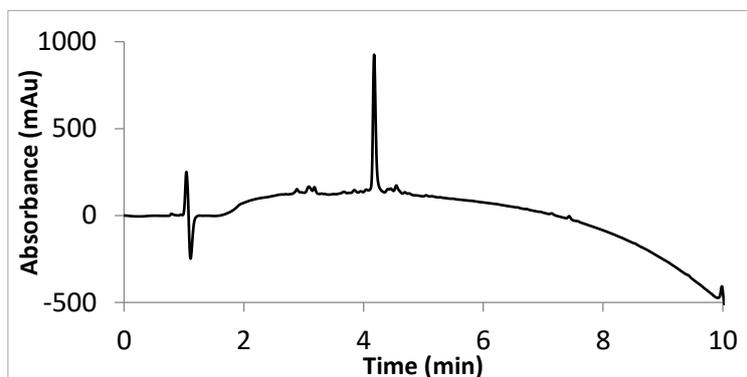


Figure 39: RP-HPLC chromatogram of **P13** (λ = 200 nm).

Intermediate **P23** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 1939,16) m/z , 647.06 $[M+3H]^{3+}$, 485.56 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 5.53 min.

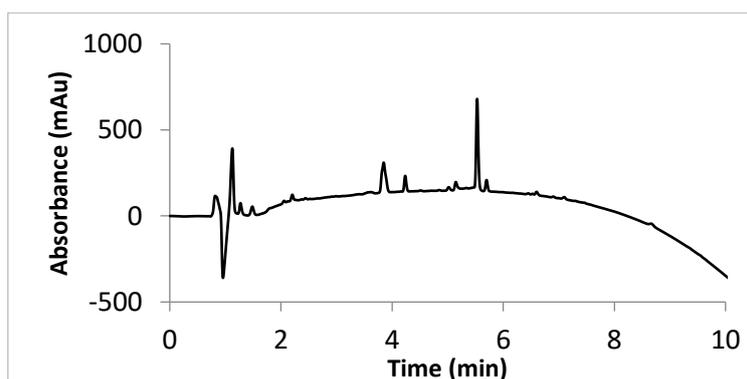


Figure 40: RP-HPLC chromatogram of **P23** (λ = 200 nm).

Intermediate **P29** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 2093.39) m/z , 1047.04 $[M+2H]^{2+}$, 698.36 $[M+3H]^{3+}$, 524.03 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 3.74 min.

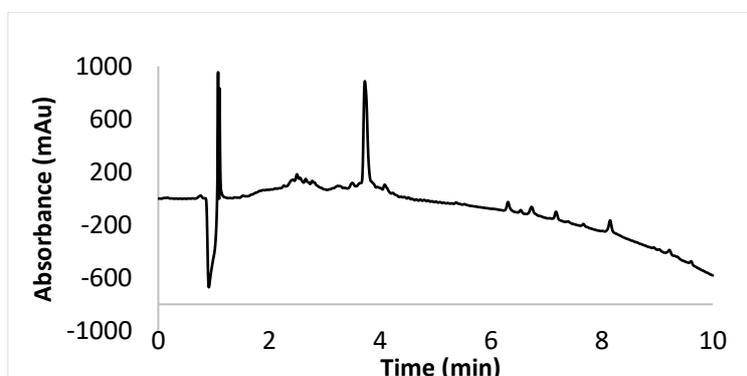


Figure 41: RP-HPLC chromatogram of **P29** (λ = 200 nm).

Intermediate **P34** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 2066.32) m/z , 1034.22 $[M+2H]^{2+}$, 689.85 $[M+3H]^{3+}$, 517.65 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 4.00 min.

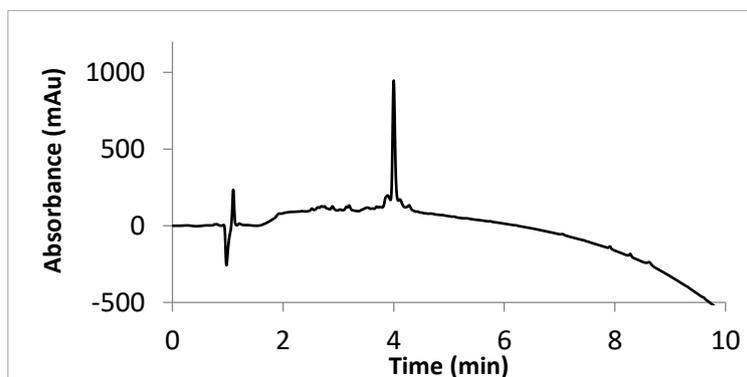


Figure 42: RP-HPLC chromatogram of **P34** (λ = 200 nm).

Intermediate **P40** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 1787.05) m/z , 1788.14 $[M+1H]^{1+}$, 894.6 $[M+2H]^{2+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B) gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 6.12 min.

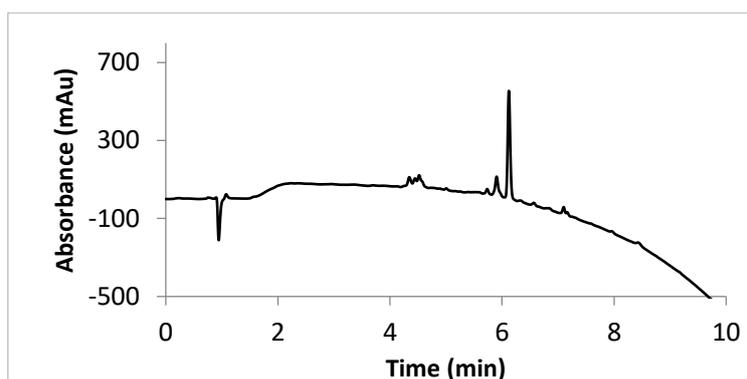


Figure 43: RP-HPLC chromatogram of **P40** (λ = 200 nm).

Intermediate **P45** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 1847.16) m/z , 1848.25 $[M+1H]^{1+}$, 924.16 $[M+2H]^{2+}$, 616.80 $[M+3H]^{3+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B) gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 5.51 min.

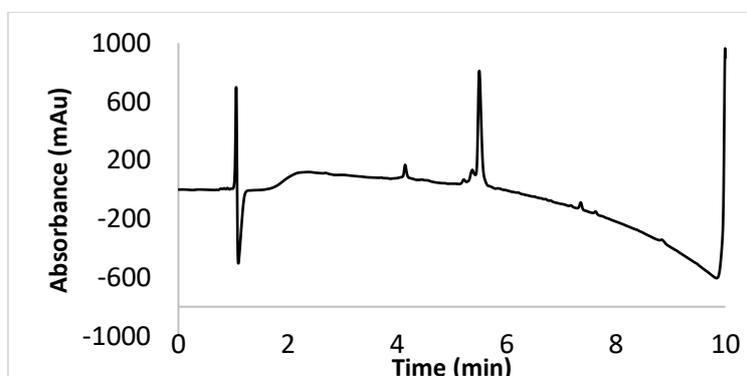


Figure 44: RP-HPLC chromatogram of **P45** (λ = 200 nm).

Intermediate **P50** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 1910.12) m/z 954.50 $[M+2H]^{2+}$, 636.67 $[M+3H]^{3+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 3.36$ min.

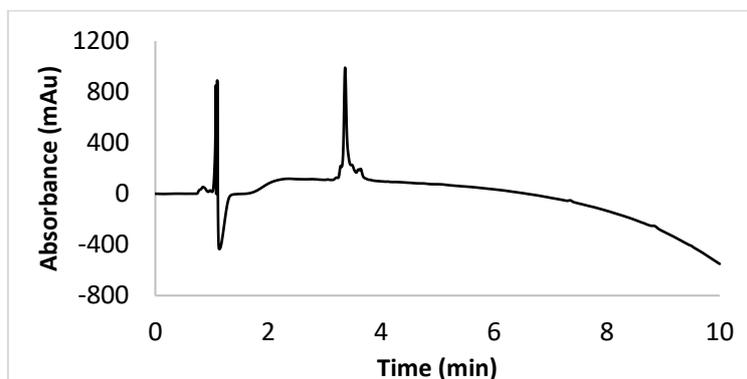


Figure 45: RP-HPLC chromatogram of **P50** ($\lambda = 200$ nm).

Intermediate **P57** was synthesized using previous strategy. ESI-MS: (Mw 2079.32) m/z 1040.63 $[M+2H]^{2+}$, 694.11 $[M+3H]^{3+}$, 520.85 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; 10 min; $t_R = 2.53$ min.

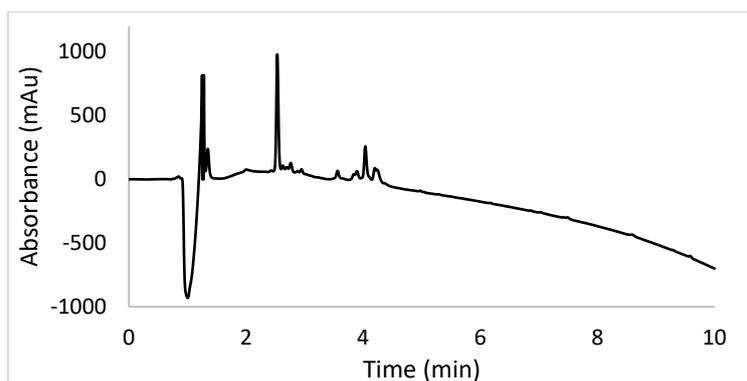


Figure 46: RP-HPLC chromatogram of **P57** ($\lambda = 200$ nm).

e) General procedure for Fmoc removal

The Fmoc protecting group was removed by three 15 min treatments of the resin with a 20 % piperidine in DMF mixture followed by washes with DCM. The resin was finally swelled in a mixture TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5, v/v/v) or TFA/TIS/H₂O/EDT (94:2.5:2.5:1, v/v/v/v) when appropriate and left to react for 120 min. After that time, the resin was filtered off, washed with TFA (2 x 2mL), DCM (2 x 2 mL) and the filtrate was recovered to perform a precipitation with cold Et₂O. The crude stapled peptides were finally purified by preparative or semi-preparative RP-HPLC using the appropriate gradient to a final purity ≥ 95 % and lyophilized.

Stapled peptide **AP1** was obtained as a white solid after purification in a yield of 19% (34 mg). The product was purified by preparative HPLC: H₂O (0.1 % TFA), (ACN 0.1 % TFA); gradient 20-30 %, 20 min, flow = 20 mL/min. ESI-MS: (Mw 1744.97) m/z , 873.05 $[M+2H]^{2+}$, 582.39 $[M+3H]^{3+}$,

437.25 [M+4H]⁴⁺. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 3.65 min.

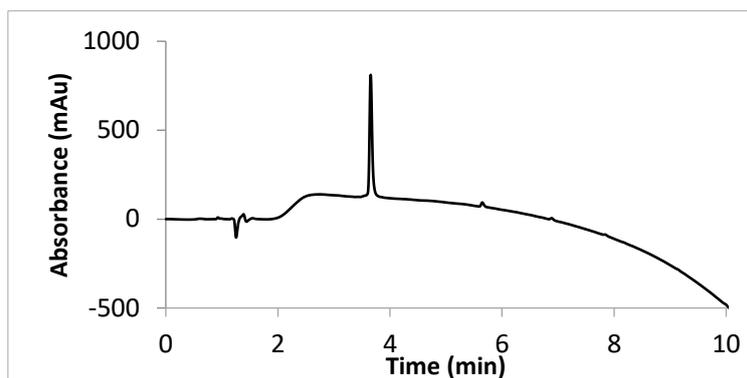


Figure 47: RP-HPLC chromatogram of **AP1** after purification ($\lambda = 200$ nm).

Stapled peptide **AP2** was obtained as a white solid after purification in a yield of 10% (18 mg). The product was purified by preparative HPLC: H₂O (0.1 % TFA), (ACN 0.1 % TFA); gradient 10-40 %, 20 min, flow = 20 mL/min. ESI-MS: (Mw 1717.90) *m/z*, 859.52 [M+2H]²⁺, 573.36 [M+3H]³⁺, 430.04 [M+4H]⁴⁺. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 3.73 min.

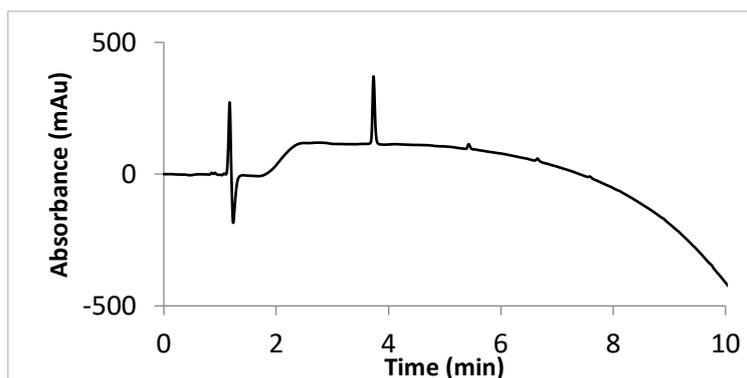


Figure 48: RP-HPLC chromatogram of **AP2** after purification ($\lambda = 200$ nm).

Stapled peptide **AP3** was obtained as a white solid after purification in a yield of 16 % (27 mg). The product was purified by preparative HPLC: H₂O (0.1 % TFA), (ACN 0.1 % TFA); gradient 15-40 %, 20 min, flow = 20 mL/min. ESI-MS: (Mw 1716.92) *m/z*, 859.04 [M+2H]²⁺, 573.04 [M+3H]³⁺, 430.04 [M+4H]⁴⁺. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 2.86 min.

Experimental part

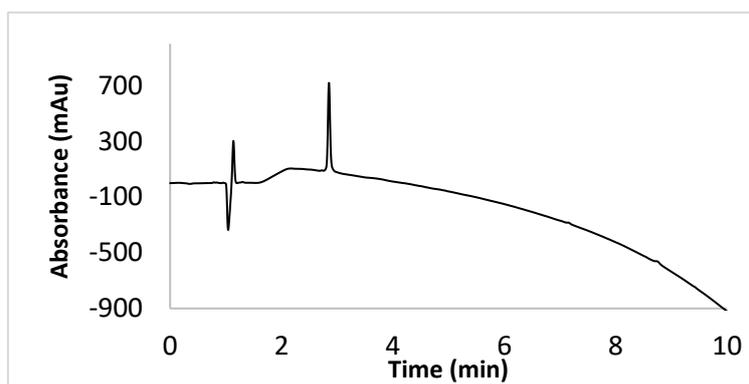


Figure 49: RP-HPLC chromatogram of **AP3** after purification ($\lambda = 200$ nm).

Stapled peptide **AP4** was obtained as a white solid after purification in a yield of 17 % (31 mg). The product was purified by preparative HPLC: H₂O (0.1 % TFA), (ACN 0.1 % TFA); gradient 10-30 %, 20 min, flow = 20 mL/min. ESI-MS: (Mw 1871.15) m/z , 936.01 [M+2H]²⁺, 624.34 [M+3H]³⁺, 468.51 [M+4H]⁴⁺. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 2.88$ min.

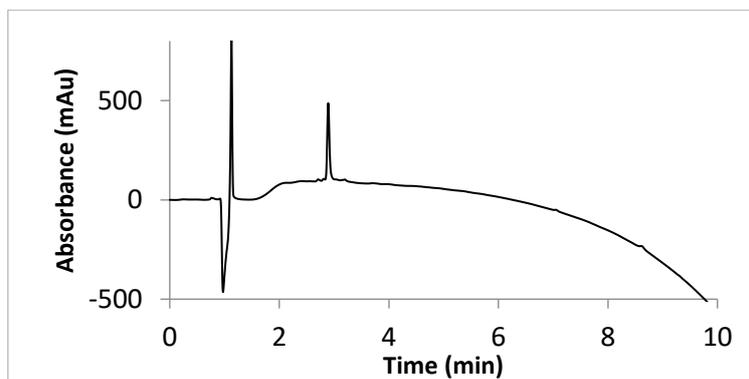


Figure 50: RP-HPLC chromatogram of **AP4** after purification ($\lambda = 200$ nm).

Stapled peptide **AP5** was obtained as a white solid after purification in a yield of 10 % (19 mg). The product was purified by preparative HPLC: H₂O (0.1 % TFA), (ACN 0.1 % TFA); gradient 10-30 %, 20 min, flow = 20 mL/min. ESI-MS: (Mw 1844.08) m/z , 923.17 [M+2H]²⁺, 6215.82 [M+3H]³⁺, 461.88 [M+4H]⁴⁺. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 3.43$ min.

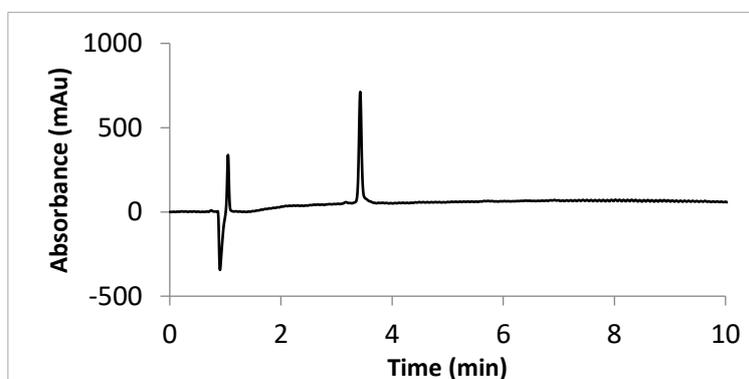


Figure 51: RP-HPLC chromatogram of **AP5** after purification ($\lambda = 200$ nm).

Stapled peptide **AP6** was obtained as a white solid after purification in a yield of 2 % (3 mg). The product was purified by preparative HPLC: H₂O (0.1 % TFA), (ACN 0.1 % TFA); gradient 30-60 %, 20 min, flow = 20 mL/min. ESI-MS: (Mw 1564.80) m/z , 783.06 [M+2H]²⁺, 6215.82. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 5.27 min.

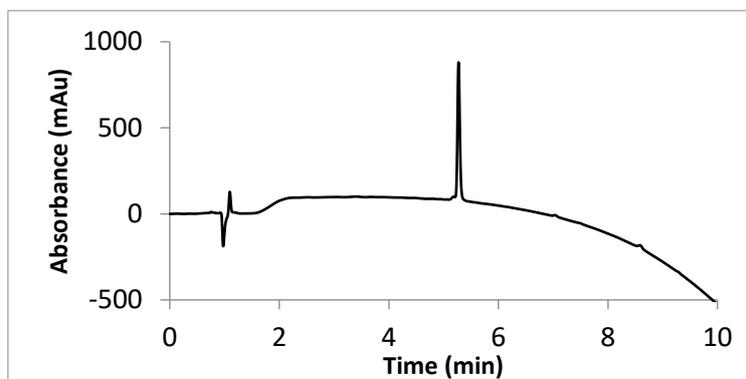


Figure 52: RP-HPLC chromatogram of **AP6** after purification (λ = 200 nm).

Stapled peptide **AP7** was obtained as a white solid after purification in a yield of 2 % (3 mg). The product was purified by preparative HPLC: H₂O (0.1 % TFA), (ACN 0.1 % TFA); gradient 30-60 %, 20 min, flow = 20 mL/min. ESI-MS: (Mw 1624.91) m/z , 783.06 [M+2H]²⁺, 6215.82. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 4.00 min.

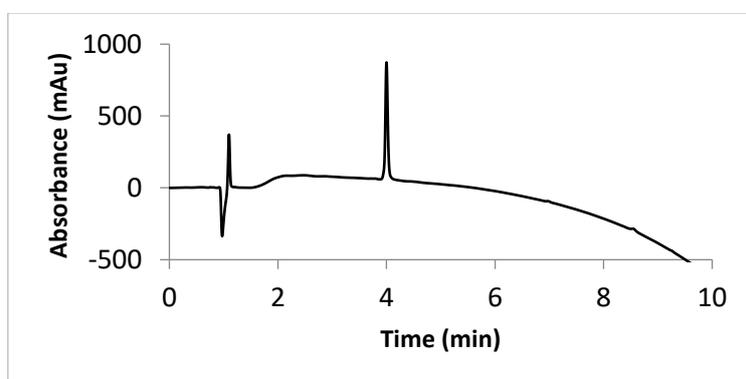


Figure 53: RP-HPLC chromatogram of **AP7** after purification (λ = 200 nm).

Compound **AP8** has not been isolated. ESI-MS: (Mw 1687.87) m/z , 843.47 [M+2H]²⁺, 562.65 [M+3H]³⁺. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; t_R = 2.61 min.

Experimental part

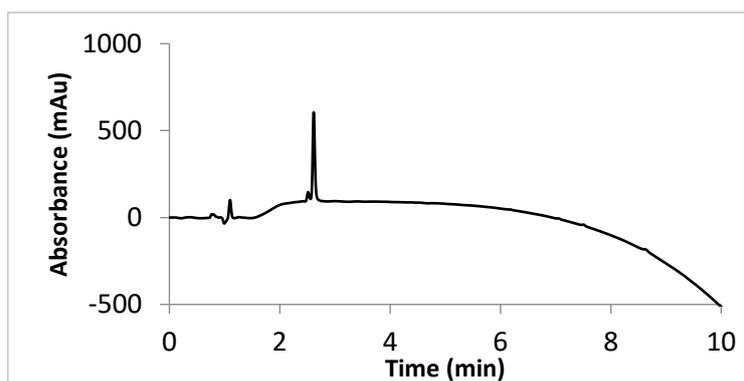


Figure 54: RP-HPLC chromatogram of **AP8** after purification ($\lambda = 200$ nm).

Compound **AP8a** was a side product resulting from a dimerization of **AP8**. ESI-MS: (Mw 3373,73) m/z , 562.65 $[M+6H]^{6+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 2.78$ min.

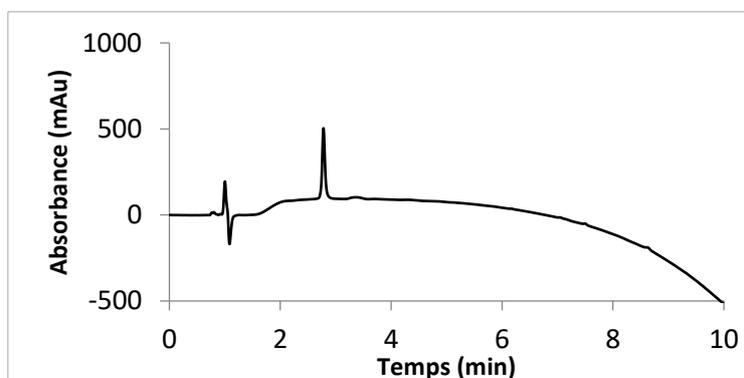


Figure 55: RP-HPLC chromatogram of **AP8a** after purification ($\lambda = 200$ nm).

Compound **AP9** has not been isolated. ESI-MS: (Mw 1857.07) m/z , 929.67 $[M+2H]^{2+}$, 619.82 $[M+3H]^{3+}$, 465.13 $[M+4H]^{4+}$. HPLC: H₂O + 0.1 % TFA (solvent A), ACN + 0.1 % TFA; (solvent B), gradient 10-100 % of B in A, 10 min; $t_R = 3.26$ min.

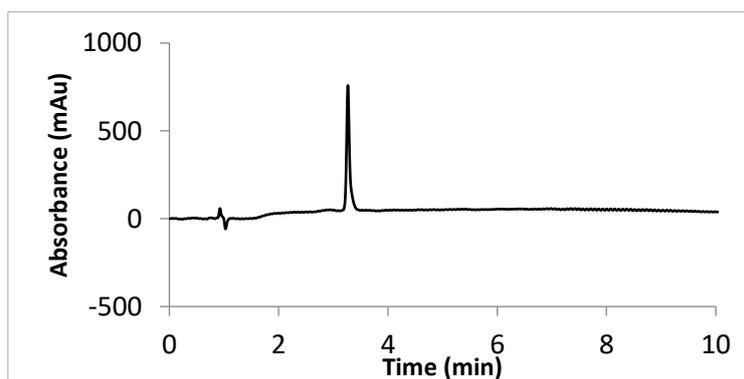


Figure 56: RP-HPLC chromatogram of **AP9** after purification ($\lambda = 200$ nm).

4) Circular dichroism studies

Samples concentrations were determined using Nanodrop equipment to measure their absorbance at 205 nm. Molar extinction coefficients of stapled peptides were calculated

following G.M Clore procedure to determine concentrations of proteins that do not contain tyrosine or tryptophan residues.³

We found: $\epsilon_{0.1\%} = 29$ for AP1, AP2, AP4 and AP5 ; $\epsilon_{0.1\%} = 30$ for AP3 and P24.

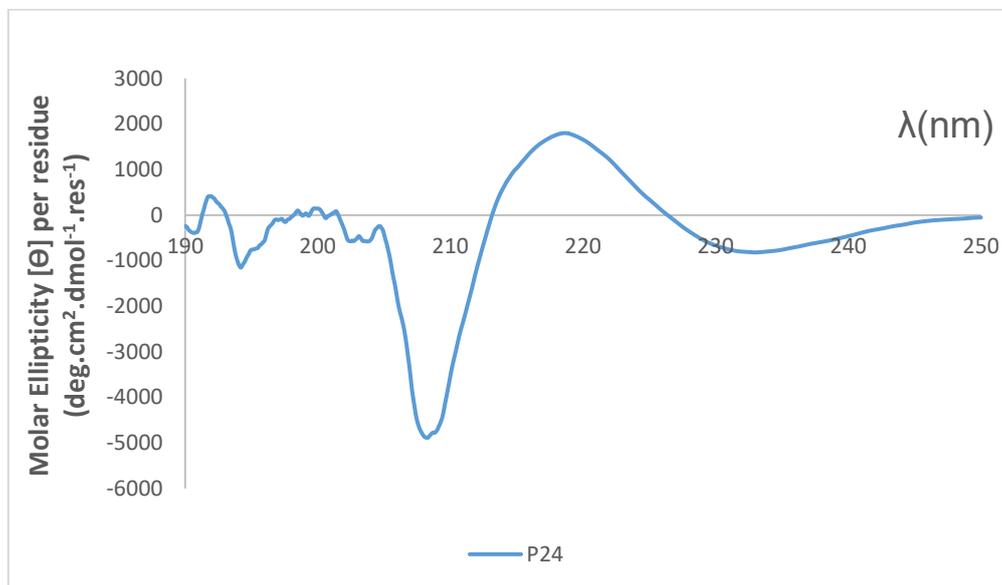


Figure 57: CD spectrum of **P24** recorded at 3 °C in H₂O (151 μM).

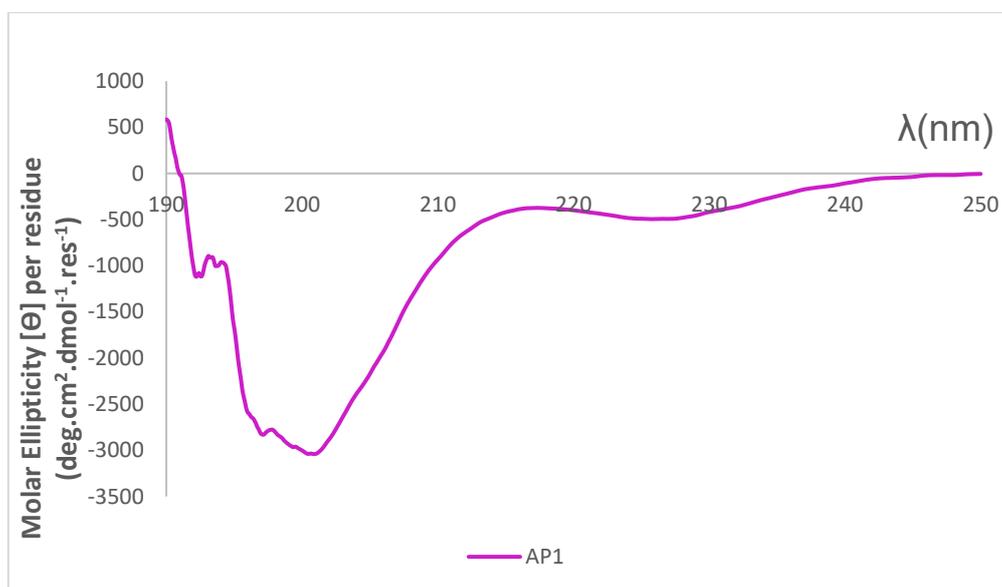


Figure 58: CD spectrum of **AP1** recorded at 3 °C in H₂O (240 μM)

Experimental part

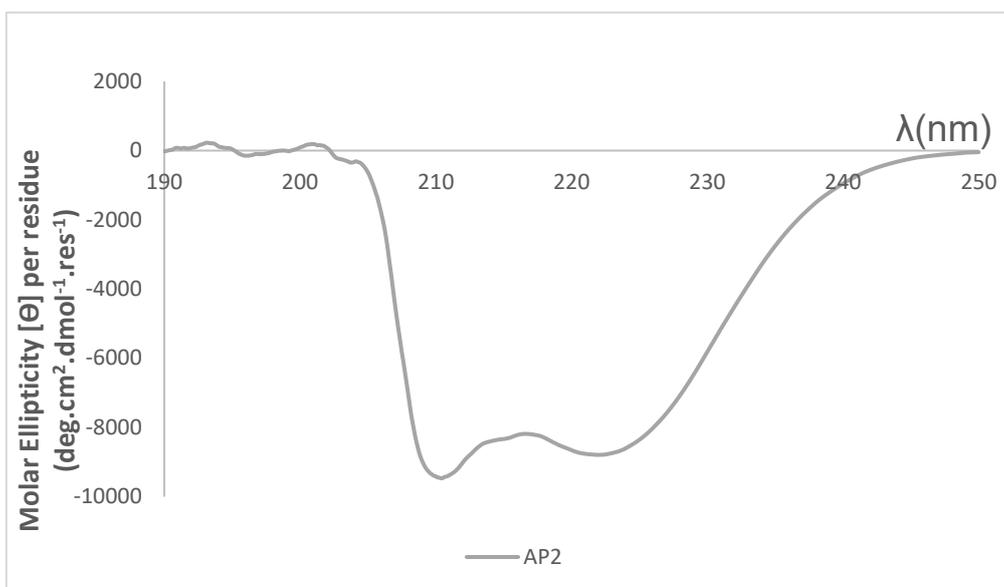


Figure 59: CD spectrum of AP2 recorded at 3 °C in H₂O (186 μM)

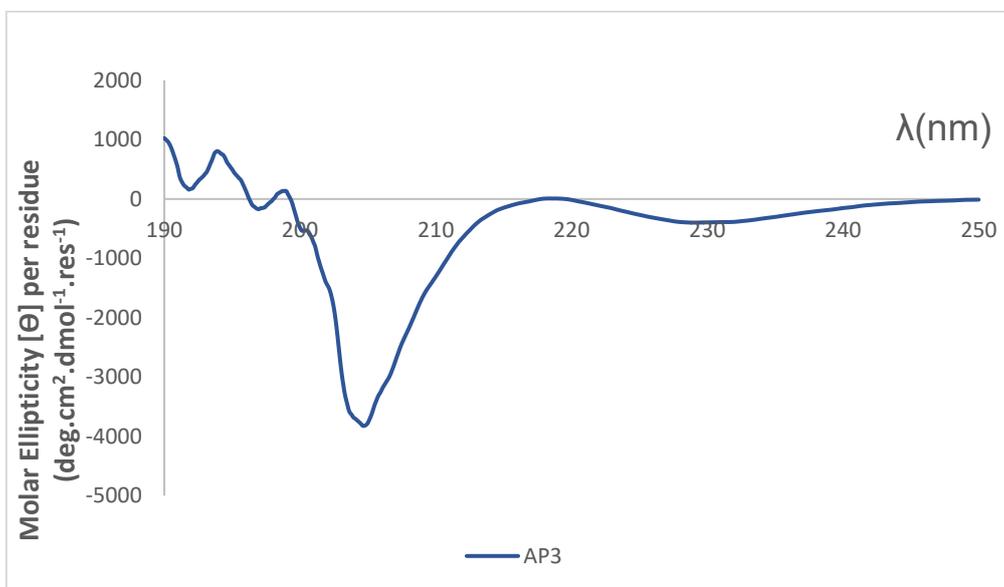


Figure 60: CD spectrum of AP3 recorded at 3 °C in H₂O (297 μM)

Experimental part

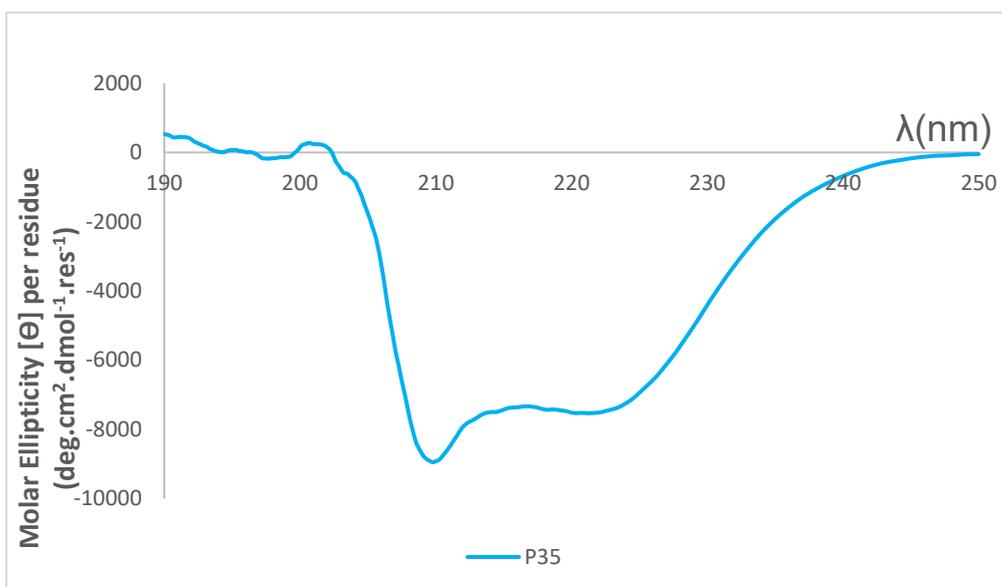


Figure 61: CD spectrum of P35 recorded at 3 °C in H₂O (177 μM)

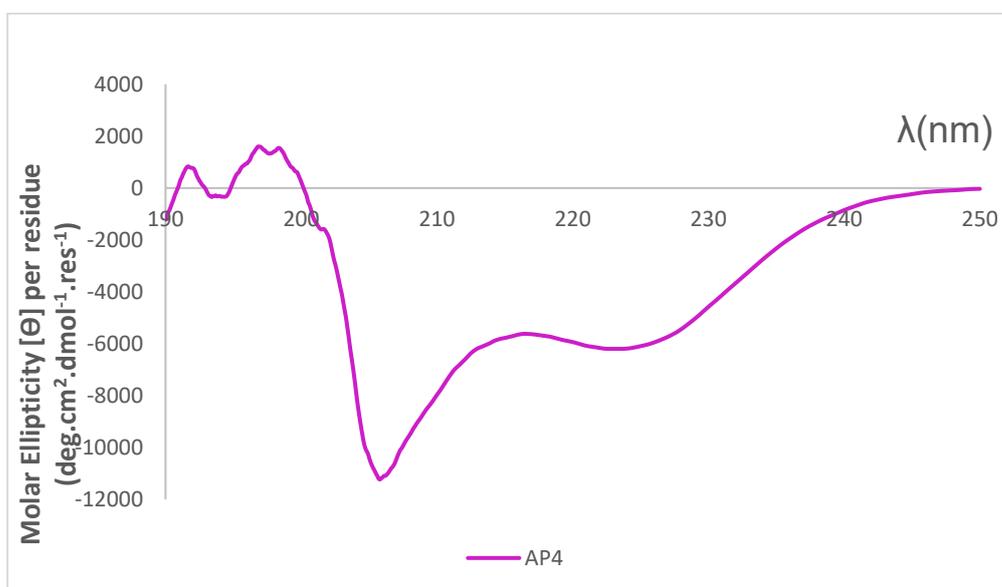


Figure 62: CD spectrum of AP4 recorded at 3 °C in H₂O (107 μM)

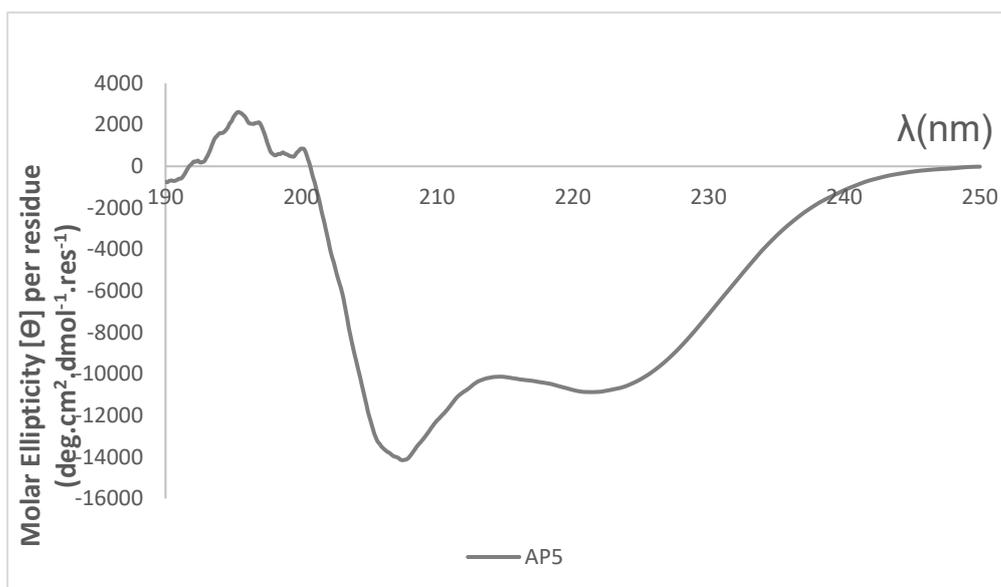


Figure 63 : CD spectrum of **AP5** recorded at 3 °C in H₂O (108 μM)

5) Crystallography assays

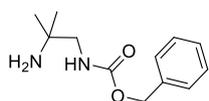
Each peptide was dissolved with the S-protein in a buffer composed of 20 mM TrisHCl pH = 8 according to a 5/1 molar ratio in stapled peptide/S-protein (1.75 mM/ 0.35 mM). Crystallization trials were performed at room temperature in standard aqueous hanging drops composed of 0.7 μL of stapled peptide+ S-protein (5/1) solution plus 0.7 μL of the crystalliaation buffer. The screens used were: JBS Classic 2, 3, 6 and a plate of conditions described to promote S-peptide crystallization. The plates were then incubated at 19 °C for several weeks.

III. Experimental data of chapter 3

1) Synthesis of precursor III.2 and compound 11

a) Synthesis of the turn-strand motif III.2

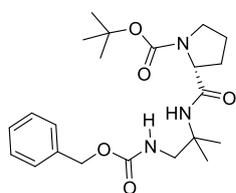
Mono-protection of 1,2-diamino-2-methylpropane with a benzyl group to obtain 2.



Compound 1,2-diamino-2-methylpropane **1** (1 eq., 10.9 mmol, 1.13 mL) was dissolved in absolute EtOH (45 mL) and benzylphenylcarbonate was added (2 eq., 21.9 mmol, 5 g). The reaction mixture was stirred at room temperature for 17 hours. Solvent was removed under reduced pressure and distilled water (50 mL) was added. Then, pH was adjusted at 3 by adding a solution of HCl (2M). The product was extracted with DCM (2x100 mL) and the organic layers were gathered to readjust the pH at 10 by adding a solution of NaOH (2M). The product was re-extracted with DCM (6x50 mL) and the organic layers were combined, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced atmosphere to obtain the pure compound **2** as a colorless oil (2.43 g, quantitative yield). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm): 7.39-7.27 (m, 5H), 5.21 (brs, 1H), 5.12 (s, 2H), 3.08

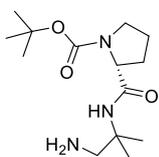
(d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.12 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 157.03, 136.65, 128.61, 128.21, 66.84, 53.57, 50.83, 50.14, 28.34.

Peptide coupling to reach the turn motif 3.



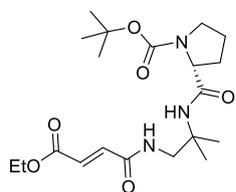
The proline protected with a Boc group (Boc-Pro-OH) (1 eq., 10.9 mmol, 2.35 g) was dissolved in dry DCM (18 mL). Then, HOBt (1.2 eq., 13 mmol, 2 g) and EDC (1.2 eq., 13 mmol, 2.51 g) agents were added. The resulting mixture was cooled down to 0 °C and stirred during 15 minutes. In the meantime, the amine compound **2** (1 eq., 10.9 mmol, 2.43 g) was dissolved in dry DCM (9.5 mL) and DIEA (1.2 eq., 13 mmol, 2.27 mL) was added to this mixture. The latter solution was added to the first one containing the acid and the resulting mixture was stirred at room temperature during 17 hours. Solvents were removed under reduced pressure to give a yellow oil. The crude residue was dissolved in DCM (25 mL) and was washed with an aqueous solution of KHSO_4 (1M, 20 mL), with distilled water (20 mL), with an aqueous saturated solution of NaHCO_3 (20 mL) and with brine (20 mL). The organic layers were collected and dried over MgSO_4 . The solvents were removed under reduced pressure. The pure product **3** (4.14 g, 91 % yield) was obtained without any further purification as a white powder. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 7.33 (m, 5H), 6.52 (m, 2H), 5.08 (s, 2H), 3.92 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.57-3.12 (m, 4H), 2.27-1.69 (m, 4H), 1.40 (s, 9H), 1.28 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 174.29, 158.99, 155.91, 138.80, 128.87, 129.22, 80.76, 67.55, 62.7, 55.74, 51.85, 48.99, 48.20, 31.01, 29.06, 25.00, 14.23.

Benzyl removal on the turn unit leading to compound 4



Compound **3** (1 eq., 0.59 mmol, 250 mg) was dissolved in absolute EtOH (40 mL). A catalytic amount of palladium catalyst (10 % weight) was poured into the flask. The flask was sealed with a septum and then successively an argon and vacuum atmosphere has been done three times. Then, the mixture was placed under a hydrogen atmosphere (pressure provided by hydrogen balloons) and stirred at room temperature for 1 hour. The reaction mixture was filtered off with a Millipore device and solvents were removed under reduced pressure to afford compound **4** (157 mg, 92 % yield) as a white powder. ^1H NMR (CD_3CN , 300 MHz, δ in ppm): 6.63 (brs, 1H), 4.28 (s, 1H), 3.69-2.87 (m, 4H), 3.36-1.79 (m, 4H), 1.45 (m, 9H), 1.11 (d, $J = 7.2$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (CD_3CN , 75 MHz, δ in ppm): 172.71, 155.52, 80.43, 61.10, 60.33, 50.62, 47.30, 29.75, 28.68, 24.68, 14.20.

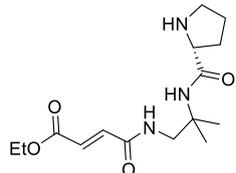
Peptide coupling towards the strand-turn unit 6



Compound mono-ethyl fumarate **5** (1 eq., 0.55 mmol, 79.2 mg), EDC (1.2 eq., 0.60 mmol, 126.5 mg), HOBt (1.2 eq., 0.60 mmol, 101 mg) were dissolved in dry DCM (4 mL). The solution was stirred at 0 °C for 15 minutes. Then, a solution of amine compound **4** (1 eq., 0.55 mmol, 157 mg) and DIEA (1.2 eq., 0.60 mmol, 115 μL) dissolved in dry DCM (2.5 mL) was dropwise added to the previous solution. The resulting mixture was stirred at room temperature under N_2 for 70 hours. The reaction mixture was diluted with DCM (25 mL) and was washed with an aqueous solution of KHSO_4 (1M, 15 mL), with distilled water (15 mL), with an aqueous saturated solution of NaHCO_3 and with brine (15 mL). The organic layers were collected, dried over MgSO_4 and filtered. Solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified on silica column eluting with a mixture of cyclohexane:AcOEt (50:50, vol/vol) to obtain compound **6** (205 mg, 90 % yield) as a white solid.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 7.73 (brs, 1H), 7.10 (d, $J = 15.90$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 15.90$ Hz, 1H), 5.92 (brs, 1H), 4.22 (t, $J = 7.33$ Hz, 2H), 3.98 (brs, 1H), 3.72 (s, 2H), 3.53-3.36 (m, 2H), 2.15-1.79 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.34 (s, 3H), 1.29 (t, $J = 7.06$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 172.71, 160.80, 164.33, 137.03, 130.19, 80.81, 61.23, 54.67, 47.55, 45.68, 29.86, 28.58, 26.19, 25.13, 24.81, 14.29.

Boc removal to form strand-turn unit III.2

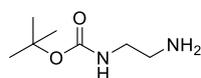


Compound **5** (0.44 mmol, 183 mg) was dissolved in a solvent mixture of DCM:TFA (1:1, vol/vol, 2mL). The reaction was stirred at room temperature during 1 hour. The disappearance of the initial product was followed through TLC plates. Solvents were evaporated (TFA residual removed by azeotrope formation with toluene) and dried under reduced pressure.

Compound **III.2** (13.5 mg, quantitative yield) was obtained without any further purification and can be directly used in the following step. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 10.58 (brs, 1H), 7.49 (brs, 1H), 7.03 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H), 4.45 (brs, 1H), 4.24 (dd, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.83 (dd, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.58-3.36 (m, 3H), 2.35 (s, 2H), 2.17-2.00 (m, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.26 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 172.73, 160.83, 164.36, 137.04, 130.20, 61.25, 54.66, 47.57, 45.69, 29.90, 28.57, 26.20, 25.15, 24.83.

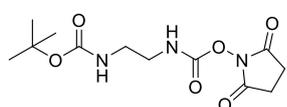
b) Synthesis of compound 11

Synthesis of Boc mono-protected ethylenediamine 9

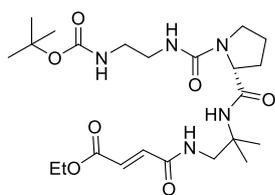


To a solution of ethylenediamine (1 eq., 150 mmol, 10 mL) diluted in dry DCM (100 mL), a solution of Boc_2O (0.17 eq., 2 mmol, 5.45 g) dissolved in dry DCM (200 mL) was added dropwise. The resulting mixture was stirred at room temperature for 17 hours, during which time a white precipitate appeared. The solvent was evaporated and the crude residue was dissolved in an aqueous solution of NaHCO_3 (20 % weight, 100 mL). The product was extracted with DCM (3x100 mL) and the organic layers were combined, dried over MgSO_4 and filtered. Solvents were removed under reduced pressure to obtain the desired compound **9** (3.2 g, 85 % yield) as a colorless oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 4.89 (brs, 1H), 3.17 (dd, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.80 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 164.12, 79.52, 42.03, 41.36, 28.68.

Activation of mono-protected diamine as succinimide carbonate 10



To a solution of disuccinimidylcarbonate (1.2 eq., 7.49 mmol, 1.92 g) dissolved in dry DCM (30 mL), the amine compound **9** (1 eq., 6.24 mmol, 1 g) dissolved in dry DCM (15 mL) was added dropwise. The resulting reaction mixture was stirred at room temperature overnight. After 17h, the reaction was stopped and filtered to remove the white precipitate formed. The crude product was washed with an aqueous solution of KHSO_4 (1M, 30 mL) and with distilled water (30 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure to give a white solid. The crude residue was dissolved in DCM and Et_2O was added slowly to make the pure product **10** precipitate as a white powder (1.38 g, 74 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 5.99 (brs, 1H), 4.85 (bs, 1H), 3.38 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.33 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.02 (s, 4H), 1.46 (s, 9H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz, δ in ppm): 170.21, 156.80, 151.96, 80.09, 42.76, 40.01, 28.48, 25.60.

Synthesis of compound 11

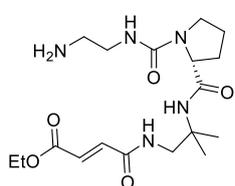
To a solution of compound **5** (1 eq., 0.48 mmol, 151 mg) dissolved in dry DCM (1 mL) DIEA (3 eq., 1.44 mmol, 253 μ L) was added. The solution was cooled down to 0 °C. In the meantime, compound **10** (0.95 eq., 0.46 mmol, 138 mg) was dissolved in DMF (1.2 mL) and was added dropwise to the previous mixture. The resulting solution was stirred at room temperature for 17 hours. Then, solvents were evaporated under reduced pressure. The crude residue was dissolved in DCM (25 mL) and was washed with an aqueous solution of KHSO_4 (1M, 20 mL), with distilled water (20 mL), with an aqueous saturated solution of NaHCO_3 (20 mL) and with brine (20 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on a silica column chromatography eluting with a solvent mixture of DCM:MeOH (from 100:0 to 95:5, vol/vol). Compound **11** (245 mg, 85 % yield) was obtained as a white powder. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, δ in ppm): 7.94 (brs, 1H), 7.27 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H), 5.98 (s, 1H), 5.31 (brs, 1H), 5.20 (bs, 1H), 4.23 (dd, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.04 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 3.72 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.47-3.15 (m, 6H), 2.26-1.88 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.33-1.20 (m, 9H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz, δ in ppm): 173.13, 166.46, 164.26, 157.83, 157.36, 138.06, 129.54, 79.58, 62.08, 61.17, 54.53, 46.48, 45.30, 42.43, 40.43, 29.74, 28.47, 26.10, 25.37, 14.28.

2) Synthesis of cyclic ethylenediamine derivatives **8**, **14**, trisubstituted urea **17** and hydantoin derivative **21**

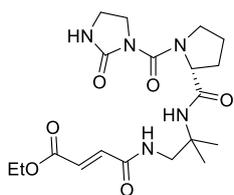
a) Synthesis of 2-imidazolidinone **8** and compound **14**

Activation of ethylenediamine leading to compound 8

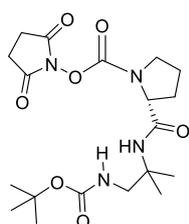
To a solution of DSC (2.4 eq., 19.92mmol, 5.10 g) suspended in DCM (40 mL) ethylenediamine (1 eq., 8.3 mmol, 555 μ L) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 17 hours. A white precipitate has been formed corresponding to HOSu that was filtered off. The resulting solution was washed with an aqueous solution of KHSO_4 (1M) and with distilled water. The organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and solvents were removed under reduced pressure. The crude residue was obtained as white powder. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 6.61(brs, 2H), 3.52(s, 4H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 164.81, 40.59.

Boc removal leading to compound 12

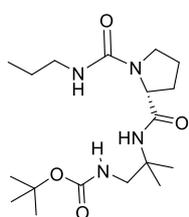
Compound **11** (0.4 mmol, 20 mg) was dissolved in a solvent mixture made of DCM:TFA (1:1, vol/vol, 1 mL). The reaction was stirred at room temperature during 1 hour. The disappearance of the starting material was followed through TLC plates. Solvents were evaporated (TFA residual removed by azeotrope formation with toluene) and dried under reduced pressure. Compound **12** (16 g, quantitative yield) was obtained without any further purification as a white powder. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, δ in ppm): 7.62 (brs, 1H), 7.20 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 6.30 (brs, 1H), 5.66 (brs, 1H), 4.25 (dd, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.13 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 3.71 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.60-2.97 (m, 6H), 2.25-1.92 (m, 4H), 1.36 (s, 3H), 1.30 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.25 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz, δ in ppm): 172.80, 166.36, 164.10, 157.91, 138.10, 129.56, 62.09, 61.10, 54.52, 46.51, 45.33, 42.46, 40.45, 29.76, 28.48, 26.12, 25.39.

Synthesis of 14 resulting from ethylenediamine cyclisation

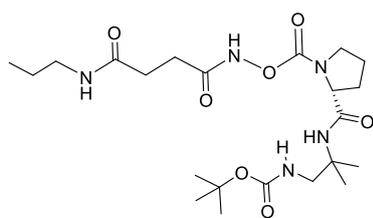
N,N'-disuccinimidylcarbonate (1.2 eq., 0.53 mmol, 147 mg) was dissolved in dry DCM (5 mL) and stirred at room temperature. In the meantime, amine compound **11** (1 eq., 0.49 mmol, 197 mg) was dissolved in dry DCM (5 mL) and DIEA (3 eq., 1.47 mmol, 250 μ L) was added. This second solution added dropwise in the first one. The resulting mixture was stirred at room temperature for 64 hours. The reaction was stopped and the solution filtered to remove DSC residues. Then, the product was washed with an aqueous solution of KHSO_4 (1M, 30 mL) and with distilled water (30 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure to give compound **14** (145 mg, 70 % yield) as a white powder. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, δ in ppm): 7.33 (brs, 1H), 7.08 (d, $J = 15.52$ Hz, 1H), 6.80 (brs, $J = 16.1$ Hz, 1H), 6.61 (brs, 1H), 5.28 (s, 1H), 4.43 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.21 (dd, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.11 (dd, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.82-3.56 (m, 5H), 3.51 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.33-1.80 (m, 4H), 1.33 (s, 3H), 1.29 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.19 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz, δ in ppm): 171.68, 166.14, 163.93, 158.24, 155.21, 137.38, 129.65, 62.08, 61.04, 54.46, 49.34, 46.18, 43.95, 37.83, 29.73, 25.48, 24.92, 24.67, 14.18. MS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 424.2 found 424.2.

b) Synthesis of trisubstitued urea 17**Activation of D-Pro-DADME-Boc by DSC to form 16**

To a solution of compound D-Pro-DADME-Boc **15** (1 eq., 0.24 mmol, 70 mg) dissolved in dry DCM (5 mL), DSC (1.2 eq., 0.28 mmol, 25 mg) agent was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 hours. Solvent was removed under reduced pressure. The crude residue was dissolved in EtOAc (10 mL) and was washed three times with an aqueous solution of KHSO_4 (1M, 5 mL) and with distilled water. The organic layers were collected, dried over MgSO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. Compound **16** (80 mg, 77 % yield) was obtained as a white solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 6.70 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 5.23 (s, 1H), 4.37 (s, 1H), 4.21 (s, 1H), 3.68 (s, 1H), 3.51-3.65 (m, 1H), 3.16-3.38 (m, 2H), 2.82 (s, 4H), 2.23 (s, 1H), 1.84-2.11 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 1.32 (d, $J = 18.3$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 170.5, 169.8, 169.4, 157.2, 156.8, 150.4, 149.4, 79.3, 78.9, 62.2, 61.4, 55.1, 54.9, 50.0, 48.6, 48.5, 47.0, 31.4, 29.0, 28.2, 25.3, 24.5, 24.3, 23.8, 23.7, 23.0. MS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 427.21 found 427.20.

Synthesis of trisubstitued urea 17

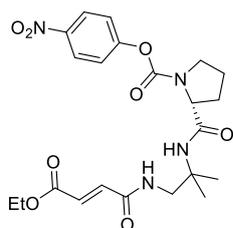
To a solution of propylamine (1.5 eq., 0.31 mmol, 30 μ L) dissolved in dry DCM (500 μ L), DIEA (1.5 eq., 0.32 mmol, 55 μ L) was added. The reaction mixture was cooled down to 0 $^\circ\text{C}$ for 10 min and carbamate compound **15** (1 eq., 0.21 mmol, 90 mg) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 hours. Solvents were removed under reduced pressure. The crude residue was purified by silica chromatography (SiO_2) eluting with DCM:MeOH (from 100:0 to 92:8, vol/vol) to obtain compound **17** (10 mg, 13 % yield) as a white solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 6.80 (s, 1H), 5.66 (s, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.20 (s, 1H), 3.15-3.43 (m, 6H), 1.91-2.26 (m, 4H), 1.67 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.26 (s, 6H), 0.92 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). MS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 371.26 found 371.30.



Note that side-product **18** (60 mg, 58 % yield) was also obtained as a white solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 6.51 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 4.11-4.30 (s, 1H), 3.51-3.62 (m, 3H), 3.13-3.31 (m, 4H), 2.57 (s, 4H), 1.87-2.22 (m, 6H), 1.44 (s, 9H), 1.25-1.36 (m, 6H) 0.88-0.93 (m, 3H). MS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 486.28 found 486.30.

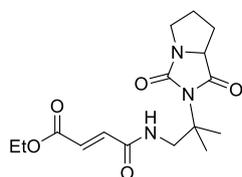
c) Synthesis of hydantoin derivative **21**

Activation of the strand-turn unit as *para*-nitrophenyl carbamate **19**



To a solution of compound **14** (1 eq., 1.18 mmol, 367 mg) dissolved in dry DCM (10 mL), DIEA (1 eq., 1.18 mmol, 205 μL) was added. Then, 4-nitrophenylchloroformate (1 eq., 1.18 mmol, 237 μL) was added. The reaction was stirred at room temperature during 65 hours. After that, solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on silica column chromatography eluting with a mixture of DCM:MeOH (from 100:0 to 98:2, vol/vol) to give compound **17** (343 mg, 61 % yield) as a white solid. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz, δ in ppm): 8.26 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 0.6$ Hz, 2H), 7.29 (brs, 1H), 6.73 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 5.85 (brs, 1H), 4.18 (dd, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.06 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 3.82-3.70 (m, 2H), 3.66 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.28-1.90 (m, 4H), 1.39 (s, 3H), 1.26 (t, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.21 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 171.44, 165.53, 164.42, 155.73, 152.77, 145.19, 136.67, 130.28, 125.36, 122.51, 62.12, 61.11, 55.35, 47.90, 46.21, 29.96, 26.23, 25.05, 24.60, 14.05.

Synthesis of hydantoin derivative **21**

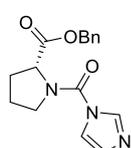


Compound **19** (1 eq., 0.07 mmol, 35 mg) was dissolved in MeOH (2 mL) in a microwave reaction tube and propylamine (2 eq., 0.14 mmol, 24.2 μL) was added so that, the solution became orange. The reaction tube was stirred at 70 °C in a microwave reactor for 2x15 min (25 W). An orange solution appeared. Solvents were evaporated under reduced pressure to obtain compound **21** (55 mg). The crude residue was purified on silica column chromatography eluting with a mixture of DCM:MeOH (from 100:0 to 98:2) to afford compound **21** (36 % yield). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, δ in ppm): 6.91 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 6.88 (brs, 1H), 6.78 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 4.24 (dd, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.96 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.79 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.61 (m, 1H), 3.27-3.17 (m, 1H), 2.30-1.94 (m, 3H), 1.76-1.62 (m, 1H), 1.54 (d, $J = 1.6$ Hz, 6H), 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz, δ in ppm): 175.35, 165.75, 164.19, 161.51, 136.62, 130.73, 62.63, 61.44, 61.19, 47.90, 45.87, 27.93, 26.74, 24.20, 23.99, 14.21. MS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 338.16 found 338.2.

3) Synthesis of 3-stranded β -sheet foldamer β_7

a) Synthesis of precursor III.5

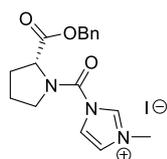
Activation of (D)-Proline as imidazole carbamate **23**



To a solution of 1,1'-carbonyldiimidazole (1.1 eq., 16.5 mmol, 2.67 g) dissolved in dry DCM (25 mL), compound (D)-proline benzylester **22** (1 eq., 15 mmol, 3.08 g) and TEA (1 eq., 15 mmol, 2.09 mL) were added. The mixture was stirred at room temperature for 72 hours. Then, the reaction medium was washed with distilled

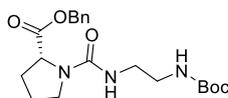
water (2x40 mL) and with brine (40 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and then solvents were evaporated. The crude residue was purified *via* silica gel flash column chromatography eluting with a mixture of DCM:MeOH (from 99:1 to 96:4, vol/vol). The activated compound **23** (3.58 g, 80 % yield) was obtained as a white solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 8.01 (s, 1H), 7.34 (m, 6H), 7.07 (s, 1H), 5.18 (dd, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.66 (dd, $J = 5.4$ Hz, 1H), 3.76 (m, 2H), 2.35 (m, 1H), 2.05 (m, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 171.21, 149.97, 136.93, 135.39, 129.88, 128.77, 128.64, 128.37, 117.70, 67.51, 61.06, 49.99, 29.56, 25.21.

Activation of *D*-Proline as carbamoylimidazolium salt **24**⁴



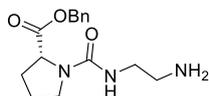
The imidazole carbamate derivative **23** (1 eq., 7 mmol, 2.09 g) was dissolved in acetonitrile (14 mL). MeI (4 eq., 28 mmol, 1.74 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 72 hours. After that, solvents were removed under reduced pressure to obtain salt compound **24** (2.97 g, 96 % yield) as a white solid which can be engaged in the next step without any further purification. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 10.23 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.33 (m, 6H), 7.07 (s, 1H), 5.16 (m, 2H), 4.67 (m, 1H), 4.21 (s, 3H), 3.89 (m, 2H), 2.45 (m, 1H), 2.09 (m, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 170.28, 145.53, 136.70, 135.12, 128.93, 128.67, 128.33, 123.74, 120.88, 67.63, 62.02, 51.51, 38.15, 29.37, 25.16.

Synthesis of trisubstituted urea **25**⁵

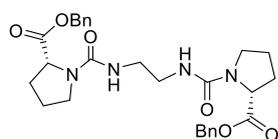


To a solution of the carbamoyl salt **24** (1 eq., 6.32 mmol, 2.79 g) dissolved in DCM (4 mL), compound Boc-ethylenediamine **9** (1 eq., 6.32 mmol, 1.01 g) and TEA (1 eq., 6.32 mmol, 0.88 mL) were added. Once the pH of the reaction was confirmed to be basic, the reaction mixture was stirred at room temperature for 5 days under a N_2 atmosphere. Then, the reaction medium was washed with HCl (1M, 2x50 mL), with brine (50 mL). The organic layers were collected, dried over MgSO_4 and filtered. Solvent was evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified by silica gel flash column chromatography eluting with a mixture of AcOEt:DCM (40:60 vol/vol) to obtain compound **25** (761 mg, 31 % yield) as a yellow solid. ^1H NMR (CD_3CN , 300 MHz, δ in ppm): 7.34 (m, 5H), 5.17 (dd, $J = 1.6$ Hz, 2H), 5.08 (brs, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.47 (dd, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.45 (m, 2H), 3.34 (m, 2H), 3.26 (m, 2H), 2.15 (m, 1H), 2.00 (m, 3H), 1.43 (s, 9H). ^{13}C NMR (CD_3CN , 75 MHz, δ in ppm): 173.12, 157.13, 157.05, 136.06, 128.65, 128.29, 128.14, 79.61, 66.80, 59.16, 45.82, 41.94, 41.03, 29.81, 28.47, 24.60.

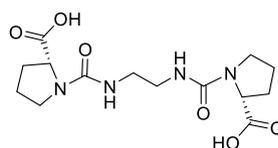
Boc removal to form **26**



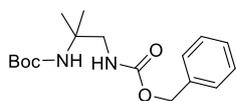
Trisubstituted urea compound **25** (1 eq., 2.05 mmol, 0.8 mg) was dissolved in TFA (10 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature during 1 hour. Solvents were evaporated (TFA residual removed by azeotrope formation with toluene) and dried under reduced pressure to obtain amine compound **26** (597 mg, quantitative yield) as a yellow oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 7.60 (s, 2H), 7.33 (m, 5H), 5.75 (s, 1H), 5.13 (dd, $J = 12.6$ Hz, 2H), 4.43 (m, 1H), 3.62-3.27 (m, 4H), 3.19 (m, 2H), 2.20 (m, 1H), 2.00 (m, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 1573.13, 157.63, 136.06, 128.93, 128.77, 128.34, 67.65, 59.64, 46.24, 41.35, 38.62, 29.79, 24.39.

Formation of the second trisubstituted urea 27

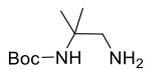
The carbamoyl salt **24** (2.3 eq., 4.71 mmol, 2.07 g) was dissolved in dry DCM (20 mL). Then, amine compound **26** (1 eq., 2.05 mmol) and NEt_3 (6.3 eq., 12.9 mmol, 2.02 mL) were added. Once the pH of the solution was confirmed to be basic, the reaction mixture was stirred at room temperature for 6 days under a N_2 atmosphere. The reaction was monitored by TLC analysis (5 % MeOH in DCM). Then, the reaction medium was washed with HCl (1M, 2x50ml) and with brine (50ml). The organic layers were collected, dried over MgSO_4 and filtered. Solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified *via* silica gel flash column chromatography eluting with a mixture of DCM:MeOH (from 100:0 to 97:3, vol/vol) three times. Compound **27** (213 mg, 20 % yield) was obtained as a white powder. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 7.34 (m, 10H), 5.31 (s, 2H), 5.16 (dd, $J = 11.1$ Hz, 4H), 4.45 (dd, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.46 (m, 2H), 3.35 (m, 6H), 2.15 (m, 2H), 1.97 (m, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 173.14, 157.65, 136.07, 128.75, 128.41, 128.23, 66.89, 59.25, 46.01, 41.91, 30.00, 24.66.

Removal of the Benzyl group leading to the central strand III.5

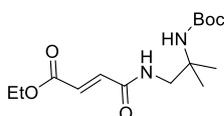
Compound **27** (1 eq., 0.38 mmol, 200 mg) and Pd/C (20 % weight) were poured into a round-bottom flask. The flask was sealed with a septum and successively a vacuum and argon atmosphere was done three times. Absolute EtOH (2 mL) was added with a syringe. Again, a vacuum and argon atmosphere has been done three times. Then, the mixture was placed under a hydrogen atmosphere (pressure provided by hydrogen balloons) and stirred at room temperature for 12 hours. The reaction mixture was filtered off with a millipore device and solvent was removed under reduced pressure to afford compound **III.5** as a white powder (108 mg, 83 % yield) without any further purification. This compound was only soluble into DMSO. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz, δ in ppm): 6.42 (s, 2H), 4.19 (dd, $J = 8.1$ Hz, 2H), 3.01 (s, 4H), 2.53 (m, 6H) 2.08 (m, 2H), 1.87 (m, 6H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz, δ in ppm): 173.14, 157.65, 66.89, 59.25, 41.91, 30.00, 24.66.

b) Synthesis of precursor III.4**Boc protection to get 28**

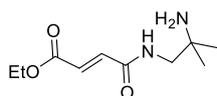
Compound **2** (1 eq., 8.9 mmol, 1.99 g) was dissolved in dry DCM (20 mL). Then, a solution of Boc_2O (1 eq., 8.9 mmol, 1.94 g) dissolved in dry DCM (10 mL) was dropwise added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 48 hours under a N_2 atmosphere. The resulting solution was washed with an aqueous solution of KHSO_4 (1M, 2x30 mL) and with brine (40 mL). The organic layers were collected, dried over MgSO_4 , filtered and solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified *via* silica flash column chromatography eluting with a mixture of cyclohexane:AcOEt (from 100:0 to 80:20, vol/vol) to obtain compound **28** (2.53 g, 88 % yield) as a colorless oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 7.35 (m, 5H), 5.35 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.57 (s, 1H), 3.39 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.24 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 157.03, 154.94, 136.65, 128.61, 128.21, 79.45, 66.84, 53.31, 49.33, 28.43, 26.94, 25.46.

Benzyl removal to get 29

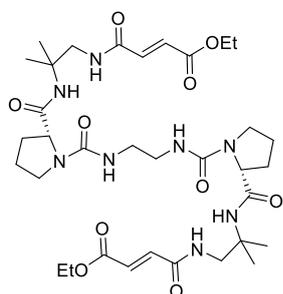
Compound **28** (1 eq., 7.8 mmol, 2.53 g) and Pd/C (10 % weight) were suspended in absolute EtOH (30 mL). The flask was sealed with a septum and successively a vacuum and argon atmosphere was done three times. Then, the reaction mixture was placed under a H₂ atmosphere (pressure provided by 3 hydrogen balloons) and stirred at room temperature for 1 hour. The reaction mixture was filtered off with a millipore device and solvent was removed under reduced pressure to afford compound **29** (1.46 g, quantitative yield) as a colorless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm): 4.77 (brs, 1H), 2.74 (s, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.24 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, δ in ppm): 155.85, 78.72, 53.85, 51.47, 28.66, 24.86.

Peptide coupling to get 30

Mono-ethyl fumarate compound **5** (1 eq., 7.8 mmol, 1.12 g), EDC (1.2 eq., 9.36 mmol, 1.79 g) and HOBT (1.2 eq., 9.36 mmol, 1.43 g) were dissolved in dry DCM (20 mL). The solution was stirred at 0 °C for 15 minutes. Then a solution of **28** (1 eq., 7.8 mmol, 1.46 g) and DIEA (1.2 eq., 9.36 mmol, 1.63 mL) dissolved in dry DCM (10 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 hours. Then, the reaction mixture was diluted with DCM (100 mL) and was washed with a solution of aqueous KHSO₄ (1M, 100 mL), with distilled water (100 mL), with an aqueous saturated solution of NaHCO₃ (100 mL) and with brine (100 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO₄ and filtered. Solvents were removed under reduced pressure. The crude product was purified on silica column chromatography eluting with a mixture of cyclohexane:AcOEt (from 100:0 to 1:1, vol/vol) to obtain **30** (2.07 g, 84 % yield) as a white solid. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm): 7.47 (brs, 1H), 6.93 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 4.61 (brs, 1H), 4.24 (dd, *J* = 7.2, 14.3 Hz, 2H), 3.51 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.26 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, δ in ppm): 164.87, 164.14, 155.81, 136.74, 130.43, 79.96, 61.36, 53.15, 49.62, 28.40, 26.13, 14.14.

Removal of Boc to obtain precursor III.4

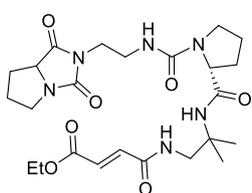
Boc-protected compound **30** (1 eq., 0.84 mmol, 47 mg) was dissolved in TFA (0.7 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature during 30 min. TFA was removed under reduced pressure with toluene as azeotrope. Compound **III.4** (32 mg, quantitative yield) was obtained as a colorless oil without any further purification. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm): 7.53 (brs, 1H), 7.08 (d, *J* = 14.4 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H), 4.29 (dd, *J* = 7.3, 14.6 Hz, 2H), 3.63 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.46 (s, 6H), 1.35 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, δ in ppm): 166.36, 166.14, 136.45, 131.49, 62.12, 56.53, 47.73, 24.03, 14.21.

c) Synthesis of 3-stranded foldamer β_7 **Synthesis of 3-stranded foldamer β_7** 

Path A: Diacid compound **III.5** (1 eq., 0.2 mmol, 68 mg) and PyBop (2.5 eq., 0.5 mmol, 260 mg) were dissolved in anhydrous DMF (3.7 mL). The solution was stirred at 0 °C for 15 minutes. Then, a solution of amine compound **III.4** (2.2 eq., 0.5 mmol, 107 mg) and DIEA (4 eq., 0.8 mmol, 140 μ L) was added to the first one. To reach a pH = 10, more DIEA (2.5 eq., 0.5 mmol, 86 μ L) was introduced. The mixture was stirred at room temperature for 4 days. Solvents were removed under reduced pressure. The crude residue was dissolved in DCM (10 mL) and was washed with an aqueous solution of KHSO₄ (1M, 10 mL), with distilled

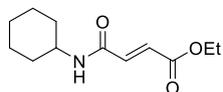
water (10 mL), with an aqueous saturated solution of NaHCO₃ (10 mL) and with brine (10 mL). The organic layers were dried over MgSO₄ and solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified on silica column flash chromatography eluting with a mixture of DCM:MeOH (from 100:0 to 9:1, vol/vol) to afford the compound **β_7** (67 mg, 46 % yield) as a white powder. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm): 8.01 (brs, 2H), 7.34 (d, J = 15.76 Hz 2H), 6.89 (d, J = 15.07 Hz, 2H), 5.96 (brs, 2H), 5.79 (s, 2H), 4.18 (q, J = 7.28 Hz, 4H), 4.01 (m, 2H), 3.76 (d, J = 5.79 Hz, 4H), 3.37 (m, 8H), 2.16-1.85 (m, 8H), 1.28 (m, 18H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, δ in ppm): 173.13, 166.97, 163.92, 158.07, 138.22, 129.33, 62.12, 61.06, 54.33, 46.43, 44.85, 40.91, 29.77, 25.94, 25.08, 25.04, 14.17. MS (ES⁺): *m/z* calcd for C₃₄H₅₄N₈O₁₀ [M+H]⁺ 735.39 found 735.27.

Path B: Diacid compound **III.5** (1 eq., 0.32 mmol, 108 mg), EDC (2.5 eq., 0.83 mmol, 396 mg) and HOBt (2.5 eq., 0.83 mmol, 127 mg) agents were dissolved in dry DCM (2 mL). The solution was stirred at 0 °C for 15 minutes. Then, a solution of amine compound **III.4** (2.5 eq., 0.83 mmol, 179 mg) and DIEA (3.6 eq., 1.15 mmol, 234 μ L) dissolved in dry DCM (1 mL) was dropwise added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 days. The reaction mixture was diluted with DCM (10 mL) and was washed with an aqueous solution of KHSO₄ (1M, 10 mL), with distilled water (10 mL), with an aqueous saturated solution of NaHCO₃ (10 mL) and with brine (10 mL). The organic layers were dried over MgSO₄ and solvents were evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified on silica column flash chromatography eluting with a mixture of DCM:MeOH (from 100:0 to 90:10, vol/vol) to afford the compound **β_7** (42 mg, 18 % yield) as a white powder.

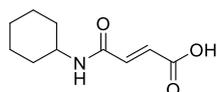


In both procedures compound **31** was obtained as a side product.

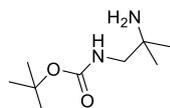
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm): 7.88 (brs, 1H), 7.18 (d, 15.22 Hz, 1H), 6.83 (d, 15.22 Hz, 1H), 6.18 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 4.24 (m, 2H), 4.10 (m, 2H), 3.70 (m, 4H), 3.64-3.33 (m, 4H), 3.27 (m, 2H), 2.32-1.90 (m, 8H), 1.29 (m, 9H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, δ in ppm): 174.52, 172.95, 165.75, 164.34, 160.90, 157.46, 137.42, 129.75, 63.70, 61.98, 60.88, 54.47, 46.48, 45.70, 41.00, 39.13, 29.58, 27.52, 27.17, 25.88, 25.41, 25.12, 14.39, 1.15.

4) Synthesis of 5-stranded β -sheet foldamer **8**a) Synthesis of precursor **III.8****Peptide coupling leading to **32****

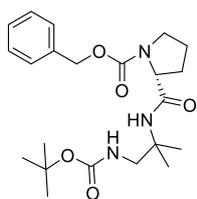
Mono-ethyl fumarate compound **5** (1 eq., 10 mmol, 1.44 g), HOBT (1.2 eq., 12 mmol, 1.83 g) and EDC (1.2 eq., 12 mmol, 2.3 g) agents were dissolved in dry DCM (10 mL) and the solution was stirred at 0 °C for 15 minutes. A solution of cyclohexylamine (1.2 eq., 12 mmol, 1.37 mL) and DIEA (1.2 eq., 12 mmol, 2.08 mL) dissolved in dry DCM (10 mL) was added to the previous one. The reaction mixture was stirred at room temperature for 39 hours. Then, the solution was diluted with DCM (100 mL) and was washed with an aqueous solution of KHSO_4 (1M, 100 mL), with distilled water (100 mL), with an aqueous saturated solution of NaHCO_3 (100 mL) and with brine (100 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 and solvent was removed under reduced pressure. Compound **32** (1.45 g, 64 % yield) was obtained as a white powder without any further purification. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 6.82 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 5.60 (brs, 1H), 4.23 (dd, $J = 7.0, 14.1$ Hz, 2H), 3.87 (m, 1H), 1.96 (m, 2H), 1.79-1.59 (m, 3H), 1.46-1.34 (m, 2H), 1.30 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.27-1.09 (m, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 165.78, 162.71, 136.77, 130.45, 61.27, 48.85, 33.19, 25.60, 24.94, 14.34.

Synthesis of the peripheral strand **33**

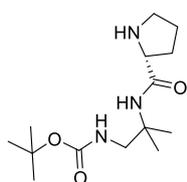
Compound **32** (1 eq., 6.4 mmol, 1.75 g) was dissolved in a mixture of THF:MeOH (28 mL, 3:1, vol/vol). Then, a solution of LiOH (3 eq., 19.2 mmol, 805 mg) dissolved in distilled water was added. The mixture was stirred at room temperature for 20 minutes. Organic solvents were removed under reduced pressure and an aqueous solution of KHSO_4 (1M, 30mL) was added making the product precipitated. After filtration, compound **33** (783 mg, 62 % yield) was obtained as a white powder. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz, δ in ppm): 8.35 (brs, 1H), 6.62 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 6.51 (d, 15.7 Hz, 1H), 3.22 (m, 1H), 1.85-1.65 (m, 4H), 1.38-1.08 (m, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 166.80, 162.37, 136.71, 130.29, 47.81, 32.23, 25.35, 24.59.

Synthesis of mono-protected ethylenediamine **34**

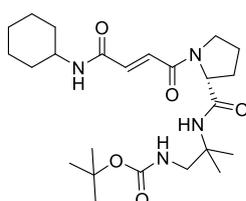
Compound 1,2-diamino-2-methylpropane **1** (1 eq., 10 mmol, 1.05 mL) was dissolved in absolute EtOH (40 mL) and *tert*-butylphenylcarbonate (2 eq., 20 mmol, 3.69 mL) was added. The reaction mixture was stirred for 80 °C for 18 hours. Solvents were removed under reduced pressure. The crude residue was dissolved in water (50 mL) and pH was adjusted at 3 by adding a solution of HCl (2M). An extraction was done (4x50 mL of DCM) to recover the aqueous phase which was basified by addition of a solution of NaOH (2M). The product was extracted with DCM (3x60 mL). The organic layers were dried over MgSO_4 and solvents were removed under reduced pressure. Compound **34** (981 g, 52 % yield) was obtained as a white solid without any further purification. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 4.88 (brs, 1H), 2.99 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.08 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 129.59, 115.60, 79.28, 52.46, 50.13, 28.54, 28.39.

Synthesis of the protected turn unit 35

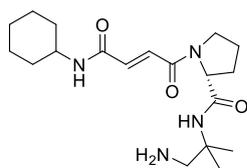
Cbz-(D)-Proline-OH (1 eq., 4.33 mmol, 1.08 g), HOBt (1.2 eq., 5.2 mmol, 0.796 mg) and EDCI (1.2 eq., 5.2 mmol, 0.99 g) agents were dissolved in dry DCM (8 mL). The solution was stirred at 0 °C for 15 minutes. A solution of amine compound **34** (1.2 eq., 5.2 mmol, 0.98 g) and DIEA (1.2 eq., 5.2 mmol, 0.9 mL) dissolved in dry DCM (8 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 64 hours. Then, the solution was diluted with DCM (50 mL) and was washed with an aqueous solution of KHSO₄ (1M, 50 mL), with distilled water (50 mL), with an aqueous saturated solution of NaHCO₃ (50 mL) and with brine (50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and solvents was removed under reduced pressure. Compound **35** (1.76 g, 81 % yield) was obtained as a white powder without any further purification. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm): 7.36 (m, 5H), 6.40 (brs, 1H), 5.54 (brs, 1H), 5.17 (m, 2H), 4.23 (m, 1H), 3.65-3.10 (m, 4H), 2.26-1.79 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.26 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, δ in ppm): 176.10, 156.21, 154.52, 136.63, 128.67, 128.26, 128.17, 79.40, 67.54, 61.78, 55.01, 48.25, 47.23, 28.60, 24.84.

Synthesis of the turn unit 36

Compound **35** (1 eq., 4.19 mmol, 1.76 g) and Pd/C (10 % weight) was suspended in absolute EtOH (16 mL). The flask was sealed with a septum and successively a vacuum and argon atmosphere was done three times. Then, the reaction mixture was placed under a H₂ atmosphere (pressure provided by hydrogen balloons) and stirred at room temperature for 17 hours. The reaction mixture was filtered off with a Millipore device and solvent was removed under reduced pressure to afford compound **36** (1.19 g, quantitative yield) as white solid without any further purification. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm): 7.66 (brs, 1H), 5.56 (brs, 1H), 5.33 (brs, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.33 (m, 1H), 3.10-2.84 (m, 2H), 2.23-1.78 (m, 4H), 1.78-1.51 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.28 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, δ in ppm): 174.79, 156.83, 79.39, 61.95, 61.11, 49.59, 47.39, 30.97, 28.60, 26.23, 25.22.

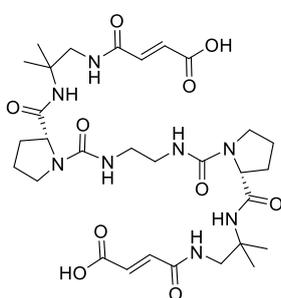
Synthesis of the turn-strand motif protected with a Boc 37

Acid compound **33** (1 eq., 3.97 mmol, 783 mg), HOBt (1.2 eq., 4.76 mmol, 728 mg.) and EDC (1.2 eq., 4.76 mmol, 912 mg) agents were dissolved in dry DCM (25 mL) and anhydrous DMF (5 mL). Then, a solution of compound **36** (1.05 eq., 4.17 mmol, 1.19 g) and DIEA (1.2 eq., 4.76 mmol, 0.83 mL) dissolved in dry DCM (7 mL) was added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 24 hours. Solvents were evaporated under reduced pressure and the crude residue was dissolved in DCM (30 mL). The solution was washed with an aqueous solution of KHSO₄ (1M, 30 mL), with distilled water (30 mL), with an aqueous saturated solution of NaHCO₃ (30 mL) and with brine (30 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and solvents were removed under reduced pressure. The crude product was purified on silica column chromatography eluting with a mixture of DCM:MeOH (from 100:0 to 95:5, vol/vol) to obtained compound **37** (1.38 g, 75 % yield) as a white powder. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ in ppm): 6.88-6.74 (m, 2H), 5.68 (brs, 1H), 5.42 (brs, 1H), 4.46-4.26 (m, 2H), 3.93-3.57 (m, 4H), 3.31 (d, J = 7.26 Hz, 2H), 2.29-1.85 (m, 12H), 1.43 (s, 9H), 1.28 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, δ in ppm): 170.79, 164.60, 163.04, 156.97, 135.14, 130.51, 79.14, 61.49, 54.91, 48.74, 48.55, 47.92, 33.14, 28.59, 28.45, 28.28, 25.55, 25.10, 24.77.

Boc removal to get the turn-strand motif III.8

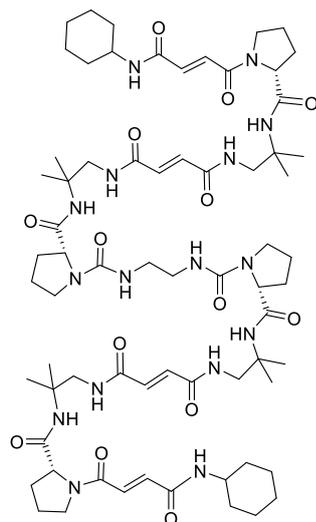
Compound **37** (1 eq., 0.16 mmol, 74 mg) was dissolved in TFA (0.8 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature during 1 hour. Solvents were evaporated (TFA residual removed by azeotrope formation with toluene) and dried under reduced pressure. The expected product **III.8** (58 mg, quantitative yield) was obtained as a white powder.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ in ppm): 8.37 (s, 1H), 8.07 (m, 1H), 7.16 (d, $J = 14.88$ Hz, 1H), 6.50 (d, $J = 14.83$ Hz, 1H), 4.36 (m, 1H), 3.88-3.45 (m, 4H), 2.32-1.77 (m, 12H), 1.45 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): 170.79, 164.60, 163.04, 156.97, 135.14, 130.51, 79.14, 61.49, 54.91, 48.74, 48.55, 47.92, 33.14, 28.59, 28.45, 28.28, 25.55, 25.10, 24.77.

b) Synthesis of diacid III.7**Synthesis of precursor III.7: Saponification on β_7** 

Compound β_7 (1 eq., 49.9 μmol , 36 mg) was dissolved in THF (170 μL) and MeOH (51 μL). Then, LiOH (6 eq., 0.29 mmol, 12 mg) dissolved in distilled water (100 μL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 minutes. Organic solvents were removed under reduced pressure. The expected product precipitated while adding an aqueous solution of KHSO_4 (1M, 5mL) and wash with DCM to remove impurities. After filtration, compound **III.7** (22 mg, 65 % yield) was obtained as a white solid and was only soluble into DMSO.

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz, δ in ppm): 8.44 (brs, 2H), 7.52 (brs, 2H), 7.11 (d, $J = 15.1$ Hz, 2H), 6.56 (d, $J = 15.7$ Hz, 2H), 6.34 (brs, 2H), 2.05-1.71 (m, 8H), 1.18 (m, 12H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz, δ in ppm): 173.27, 167.01, 164.03, 158.08, 138.36, 129.28, 62.13, 61.04, 46.33, 44.76, 41.00, 29.89, 25.82, 14.24. HRMS (ESI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_8$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 679.3337 found 679.3063.

c) Synthesis of 5-stranded foldamer β_8 

Diacid compound **III.7** (1 eq., 25 μmol , 17 mg), EDC (2.5 eq., 62.5 μmol , 12 mg) and HOBT (2.5 eq., 62.5 μmol , 9.5 mg) agents were dissolved in dry DCM (0.1 mL). The solution was stirred at 0 $^\circ\text{C}$ for 15 minutes. Then, a solution of amine compound **III.8** (2.7 eq., 68 μmol , 25 mg) and DIEA (2.7 eq., 68 μmol , 12 μL) dissolved in dry DCM (0.1 mL) was dropwise added. DMF (0.2 mL) was added to solubilized all the compounds. The reaction mixture was stirred at room temperature for 65 hours. Solvents were evaporated under reduced pressure and the crude residue was purified on silica column flash chromatography eluting with a mixture of DCM:MeOH (from 100:0 to 95:5, vol/vol) to afford the compound β_8 but this compound was still not pure and needed further purification by HPLC. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, δ in ppm): 8.38 (brs, 2H), 8.03 (brs, 2H), 7.77 (brs, 2H), 7.58 (d, $J = 14.66$ Hz, 2H), 7.35 (dd, $J = 8.67$ Hz, 4H), 7.17 (d, $J =$

14.86 Hz, 2H), 6.77 (brs, 2H), 5.74 (s, 2H), 5.71 (s, 2H), 4.11 (m, 2H), 4.00 (m, 2H), 3.91-3.68 (m, 12H), 3.67-3.33 (m, 10H), 2.36-1.54 (m, 36H), 1.37-1.19 (m, 24H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ in ppm): Signal too low. MS (ESI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_{10}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 1371.8074 found 1371.8552

5) X-ray crystallographic data

Table 1. Crystal data and refinement details for 5.

Identification code	5
Chemical formula	C ₂₀ H ₃₃ N ₃ O ₆
Formula weight	411.49 g/mol
Temperature	386.3 K
Wavelength	Cu K α
Crystal system	orthorhombic
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell dimensions	$a = 9.7739 (4) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$ $b = 10.3261 (5) \text{ \AA}$, $\beta = 90^\circ$ $c = 22.1693 (16) \text{ \AA}$, $\gamma = 90^\circ$
Volume	2237.5 (2) \AA^3
Z	4
Density (calculated)	1.222 g/cm ³
Absorption coefficient	0.744 mm ⁻¹
Absorption correction	Multi-scan
Crystal size	0.2 × 0.2 × 0.2 mm ³
Index ranges	-5 ≤ h ≤ 10, -10 ≤ k ≤ 10, -23 ≤ l ≤ 21
Reflections collected	6335
R _{int}	0.0666
Data/parameters/restrains	268/0
Goodness-of-fit on F ²	1.142
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	R ₁ = 0.0779, wR ₂ = 0.1717
R indices (all data)	R ₁ = 0.1241, wR ₂ = 0.2290
Largest diff. peak and hole	0.34 and -0.30 e \AA^{-3}

*SQUEEZE procedure was used to remove severely disordered solvent molecules

Table 2. Crystal data and refinement details for β_7 .

Identification code	β_7
Chemical formula	$C_{34}H_{54}N_8O_{10}$
Formula weight	734.85 g/mol
Temperature	100 K
Wavelength	Cu $K\alpha$
Crystal system	monoclinic
Space group	$P2_1$
Unit cell dimensions	$a = 14.5471 \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$ $b = 9.8800 \text{ \AA}$, $\beta = 90^\circ$ $c = 17.8129 \text{ \AA}$, $\gamma = 92.9230^\circ$
Volume	2556.83 \AA^3
Z	11
Density (calculated)	1.422 g/mm^3
Absorption coefficient	5 mm^{-1}
Absorption correction	Multi-scan
Crystal size	$0.09 \times 0.05 \times 0.02 \text{ mm}^3$
Index ranges	$-18 \leq h \leq 17$, $-11 \leq k \leq 11$, $-21 \leq l \leq 21$
Reflections collected	200964
R_{int}	0.0288
Parameters/restraints	619/16
Goodness-of-fit on F^2	1.031
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0554$, $wR_2 = 0.1536$
R indices (all data)	$R_1 = 0.0573$, $wR_2 = 0.1559$
Largest diff. peak and hole	0.93 and -0.64 e \AA^{-3}

*SQUEEZE procedure was used to remove severely disordered solvent molecules

References

- (1) Zhang, Z.; Pickens, J. C.; Hol, W. G. J.; Fan, E. Solution- and Solid-Phase Syntheses of Guanidine-Bridged, Water-Soluble Linkers for Multivalent Ligand Design. *Organic Letters* **2004**, *6* (9), 1377–1380. <https://doi.org/10.1021/ol049835v>.
- (2) Kearney, P. C.; Fernandez, M.; Flygare, J. A. Solid-Phase Synthesis of 2-Aminothiazoles. 5.
- (3) Anthis, N. J.; Clore, G. M. Sequence-Specific Determination of Protein and Peptide Concentrations by Absorbance at 205 Nm. *Protein Science* **2013**, *22* (6), 851–858. <https://doi.org/10.1002/pro.2253>.
- (4) Grzyb, J. A.; Shen, M.; Yoshina-Ishii, C.; Chi, W.; Brown, R. S.; Batey, R. A. Carbamoylimidazolium and Thiocarbamoylimidazolium Salts: Novel Reagents for the Synthesis of Ureas, Thioureas, Carbamates, Thiocarbamates and Amides. *Tetrahedron* **2005**, *61* (30), 7153–7175. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.05.056>.
- (5) Batey, R. A.; Santhakumar, V.; Yoshina-Ishii, C.; Taylor, S. D. An Efficient New Protocol for the Formation of Unsymmetrical Tri- and Tetrasubstituted Ureas. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (35), 6267–6270. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)01330-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)01330-6).

Stabilisation et mimes de structures secondaires peptidiques : applications aux hélices α et aux feuillets β

Des avancées en biologie moléculaire ont permis de voir émerger des molécules biologiques (anticorps, hormones) comme agents thérapeutiques. Les peptides qui peuvent adopter les structures secondaires (hélices α et feuillets β) rencontrées dans les protéines et qui possèdent des caractéristiques intermédiaires entre les petites molécules et les protéines, représentent donc un enjeu thérapeutique intéressant. Leurs principaux inconvénients résident dans leur faible stabilité plasmatique, leur faible pénétration cellulaire et leur flexibilité conformationnelle qui limitent leur développement thérapeutique. Stabiliser la structure secondaire de peptides dans leur conformation bioactive ou développer des squelettes non naturels comme peptidomimes sont devenus des moyens de contourner ces difficultés. A ce jour, diverses approches chimiques ont été proposées pour stabiliser le repliement en hélice α comme la macrocyclisation entre deux chaînes latérales d'un peptide. Une première partie de cette thèse a consisté à développer une stratégie de macrocyclisation menant à des agrafes peptidiques originales, comportant une fonction guanidine polaire. Différentes séquences peptidiques ont ainsi pu être macrocyclisées en $(i, i+4)$ ou $(i, i+7)$, et des études structurales ont été amorcées. L'introduction d'une guanidine pourrait apporter de nouvelles propriétés aux peptides macrocyclisés dont l'amélioration de leur perméabilité cellulaire. Le feuillet β multi-brins, l'autre structure secondaire d'intérêt, s'avère être moins étudié par les chimistes malgré son importance biologique, en raison probablement d'une tendance excessive à l'agrégation et la précipitation. Pour réussir à obtenir des peptidomimes stables de ces feuillets β , il est possible d'avoir recours à des squelettes non naturels comme les foldamères. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la conception d'une nouvelle classe de molécules programmées pour se replier en feuillets β , par formation de liaisons hydrogène intramoléculaires. Des foldamères alternant des motifs coudes et brins artificiels comportant des dérivés de diamine et diacide ont alors été synthétisés. Des études en solution et à l'état solide sur ces molécules ont attesté leur repliement en feuillet β multi-brins.

Mots clés : Peptides, structures secondaires, hélice α , agrafes peptidiques, feuillet β , foldamères.

Stabilisation and mimics of peptidic secondary structures: applications to α -helices and β -sheets

Recent advances in molecular biology gave rise to the emergence of biologics (antibodies, hormones) as therapeutic agents. Peptides which are able to adopt secondary structures encountered in proteins and presenting intermediates features between small molecules and biologics are seen as potent therapeutics. The disadvantages of peptides lie in poor plasma stability and their poor cell membrane permeability as well as conformational flexibility, thus limiting their therapeutic potential. Stabilizing peptide secondary structures in their bioactive conformations and the development of non natural peptidomimetics became important tools to counteract those difficulties. Nowadays, several chemical approaches have been considered to stabilize α -helix folding such as the macrocyclization between two side chains of a peptide. The first project of this PhD thesis has focused on the design and synthesis of new stapled peptides containing a guanidine motif. Several macrocyclized peptides with a guanidine bridge in $(i, i+4)$ or in $(i, i+7)$ positions have thus been obtained and some structural studies performed. Introduction of the guanidine moiety could provide new properties to peptides such as improvement of their cell permeability. Notwithstanding their importance in biology, multi-stranded β -sheets, another protein secondary structure of interest, have comparatively been less studied by chemists probably because of their tendencies towards aggregation and precipitation. To obtain stable peptidomimetics folded into β -sheets it is possible to use non natural moieties such as foldamers. In this context, we have been interested in the design of a novel class of molecules programmed to fold into β -sheet structures through the formation of intramolecular hydrogen bonds. Foldamers alternating artificial strands and turns composed of diamine and diacid have been synthesized. Studies were performed in solution and in the solid state to confirm their folding into multi-stranded β -sheets architectures.

Keywords: Peptide, secondary structures, α -helix, stapled peptides, β -sheet, foldamers.

Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjets (CBMN)

Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB),
UMR 5248, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac cedex