



HAL
open science

**Conception d'inhibiteurs de protéase à sérines,
impliquées dans les processus inflammatoires, par chimie
combinatoire dynamique sur des scaffolds peptidiques
structurés**

Taleen Peker

► **To cite this version:**

Taleen Peker. Conception d'inhibiteurs de protéase à sérines, impliquées dans les processus inflammatoires, par chimie combinatoire dynamique sur des scaffolds peptidiques structurés. Chimie thérapeutique. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS451 . tel-04332672

HAL Id: tel-04332672

<https://theses.hal.science/tel-04332672>

Submitted on 9 Dec 2023

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.

Sorbonne Université

École doctorale 406 – Chimie Moléculaire de Paris Centre

*UMR7203 - Laboratoire des Biomolécules – Pôle : Peptides, Glycoconjugués et Métaux en
Biologie*

*UMR8256 - Laboratoire Adaptation Biologique et Vieillessement – Équipe Vieillessement
Cellulaire Intégré et Inflammation*

**Conception d'inhibiteurs sélectifs de protéases à sérine,
impliquées dans les processus inflammatoires par chimie
combinatoire dynamique sur des *scaffolds* peptidiques
structurés**

Par Taleen Peker

Thèse de doctorat de Chimie Moléculaire

Dirigée par Dr. Roba Moumné et Pr. Chahrazade El Amri

Présentée et soutenue publiquement le 8 décembre 2021

Devant un jury composé de :

| | | |
|-----------------------|---|------------------------|
| Joëlle Vidal | Professeure – Université de Rennes 1 | Rapporteuse |
| Nicolas Masurier | Professeur – Université de Montpellier | Rapporteur |
| Dominique Guianvarc'h | Professeure – Université Paris-Saclay | Examinatrice |
| Roba Moumné | Maître de Conférences – Sorbonne Université | Directrice de thèse |
| Chahrazade El Amri | Professeure – Sorbonne Université | Co-directrice de thèse |

Table des matières

| | |
|---|-----|
| Introduction | 5 |
| Chapitre I - Mise en place des librairies combinatoires dynamiques | 63 |
| Chapitre II - Stratégie d'analyse des librairies générées | 115 |
| Chapitre III - Amplification par les protéases à sérine | 159 |
| Conclusion générale | 211 |
| Partie expérimentale | 217 |

INTRODUCTION

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Liste de figures | 8 |
| 1. Conception rationnelle de mimes peptidiques | 14 |
| 1.1. Identification du pharmacophore | 16 |
| 1.2. Introduction de contraintes conformationnelles | 17 |
| 1.2.1. <i>Contraintes conformationnelles locales</i> | 17 |
| 1.2.2. <i>Contraintes conformationnelles globales</i> | 19 |
| 1.2.2.1. <i>Macro-cyclisation tête à queue</i> | 20 |
| 1.2.2.2. <i>Cyclisation entre chaînes latérales</i> | 21 |
| 1.3. Utilisation de mimes topologiques | 23 |
| 1.3.1. <i>Les mini-protéines naturelles</i> | 24 |
| 1.3.2. <i>Plateformes artificielles</i> | 25 |
| 1.4. Conclusion | 27 |
| 2. Synthèse et Criblage aléatoire haut débit de bibliothèques | 27 |
| 2.1. Les méthodes chimiques | 28 |
| 2.2. Les méthodes biologiques | 31 |
| 2.3. Conclusion | 34 |
| 3. Développement d'une méthode d'accès à des bibliothèques peptidiques par chimie combinatoire dynamique | 35 |
| 3.1. La chimie combinatoire dynamique | 35 |
| 3.2. Application de la DCC aux peptides | 39 |
| 3.3. Objectif du projet de thèse | 51 |
| Références | 53 |

Liste de figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 - Poids moléculaire différents composés utilisés en thérapie. ⁴ | 11 |
| Figure 2 - Chronologie des étapes-clés, des développements et des approbations de médicaments dans le domaine des peptides thérapeutiques. ⁵ | 12 |
| Figure 3 - Statistique sur les peptides dans le marché du médicament. | 13 |
| Figure 4 - Interaction protéine-protéine entre l'hormone de croissance humaine et le domaine extracellulaire de son récepteur. | 14 |
| Figure 5 - Structure primaire et secondaire des peptides et des protéines. ¹⁶ | 15 |
| Figure 6 - Représentation des deux stratégies permettant la structuration d'un peptide linéaire flexible portant un pharmacophore : introduction de contraintes conformationnelles et utilisation de mimes topologiques. | 16 |
| Figure 7 - Représentation des angles dièdres d'un acide aminé. | 17 |
| Figure 8 - Diagramme de Ramachandran d'un acide aminé L. ¹⁹ | 17 |
| Figure 9 - Acides aminés modifiés et contraintes des angles dièdres. | 18 |
| Figure 10 - Conformations générées par la L-Pro et la D-Pro. | 18 |
| Figure 11 - Représentation des différentes possibilités de cyclisation d'un peptide linéaire. | 20 |
| Figure 12 - Représentation schématique de la macro-cyclisation (en noir) de structure secondaire (une hélice α , et d'un coude β) et supersecondaires (β hairpin et hairpin hélicoïdal) | 21 |
| Figure 13 - Exemples de cyclisation d'un feuillet β via les chaînes latérales de résidus. | 21 |
| Figure 14 - Exemples de stabilisation d'une hélice α via les chaînes latérales de résidus. | 22 |
| Figure 15 - Comparaison des méthodes à un composant et à deux composants. | 23 |
| Figure 16 - Exemples de mini-protéines utilisées comme plateforme peptidique. | 24 |
| Figure 17 - Exemple de plateformes artificielles utilisées pour obtenir des peptidomimes structurés. | 26 |
| Figure 18 - Schéma représentatif des stratégies Mix & Split et de synthèse parallèle reposant sur la chimie combinatoire. | 29 |
| Figure 19 - Principe de la stratégie d'encodage par ADN. | 31 |
| Figure 20 - Étapes de criblage des bibliothèques obtenues par phage display. | 32 |
| Figure 21 - Exemples de cyclisation in vitro. | 33 |
| Figure 22 - Principe de la chimie combinatoire dynamique. | 36 |
| Figure 23 - Résultats obtenus par le groupe de Greaney. ⁹⁰ | 37 |
| Figure 24 - Composés générés lors de l'échange hydrazide/aldéhyde et superposition des chromatogrammes obtenus par le groupe de Vincent. ⁹¹ | 38 |
| Figure 25 - Stratégie de chimie combinatoire développée par le groupe de O'Brien pour la sélection d'inhibiteurs de la Caspase-3. ⁹² | 39 |
| Figure 26 - Schéma de DCC appliqué à la formation de liaison peptidique. | 39 |
| Figure 27 - Amplification de peptides hydrazides par l'acétylcholine. ⁹⁴ | 40 |
| Figure 28 - Amplification de dipeptides, générés grâce à la thermolysine, par l'héparine ou le chitosane. ⁹⁵ | 41 |
| Figure 29 - Chimie combinatoire dynamique appliquée à la ligation chimique. ⁹⁶ | 42 |

| | |
|---|----|
| Figure 30 - Assemblage de fragments peptidiques par chimie combinatoire dynamique résultant en structure tridimensionnelle plus étendue. | 42 |
| Figure 31 - Échange thiol/thioester entre deux fragments peptidiques conduisant à un peptide structuré. ⁹⁷ | 43 |
| Figure 32 - Système développé par Bartus et al. pour identifier des ligands de la calmoduline. ⁹⁹ | 44 |
| Figure 33 - Macrocycles générés par chimie combinatoire dynamique. ¹⁰⁰ | 45 |
| Figure 34 - Greffage de chaînes latérales sur une plateforme préexistante. | 45 |
| Figure 35 - Chimie combinatoire dynamique sur un squelette polymérique avec amplification par une cible supportée. ¹⁰⁵ | 46 |
| Figure 36 - Génération de librairie de tPNA par chimie combinatoire dynamique. ¹⁰⁴ | 47 |
| Figure 37 - Fonctionnalisation de nanoparticules d'or par chimie combinatoire dynamique et amplification par ADN. ¹⁰⁶ | 48 |
| Figure 38 - Utilisation de la chimie combinatoire dynamique pour fonctionnaliser un squelette organique. ¹⁰¹ | 49 |
| Figure 39. Fonctionnalisation d'une plateforme peptidique par des blocs hydrazides et complexation à l'ADN. ¹⁰⁷ | 50 |
| Figure 40 - Application de la chimie combinatoire dynamique au greffage de groupements à la surface d'un peptide de structure définie. | 51 |

Les peptides tiennent une place centrale dans le vivant. En effet, plus de 7000 peptides dit bioactifs ou régulateurs ont été identifiés ces dernières décennies comme jouant des rôles clés dans les processus biologiques, en tant qu'hormones, neurotransmetteurs, facteurs de croissance.¹

Cependant, au cours des 20 dernières années, l'industrie pharmaceutique s'est essouffée dans la recherche de nouvelles molécules ciblant toujours les mêmes cibles classique (RCPG, canaux ioniques, enzymes) et une transition s'est opérée vers des cibles moins conventionnelles, telles que des facteurs de transcriptions ou des inhibiteurs d'interactions protéine-protéine intracellulaires (PPI). Néanmoins, du fait de leur surface d'interaction très large et plane, ces cibles représentent un véritable défi pour la découverte de ligand, face auquel les petites molécules type médicament ont montré peu de succès. Les peptides en revanche de par leur taille plus grande sont capables d'interagir avec ces cibles de manière plus efficace. Occupant un espace moléculaire intermédiaire entre les petites molécules (1 à 500 Da) et les molécules biologiques (>5000 Da) (Figure 1)² ils combinent l'avantage de la spécificité d'actions des molécules plus larges tout en conservant des propriétés pharmacocinétiques proches des petites molécules. Leur dégradation sous forme d'acides aminés limite leur risque de toxicité. Le séquençage et la synthèse des peptides bioactifs peuvent être aisément réalisés à grande échelle, à faible coût en comparaison aux autres molécules biologiques grâce au développement technologiques.³

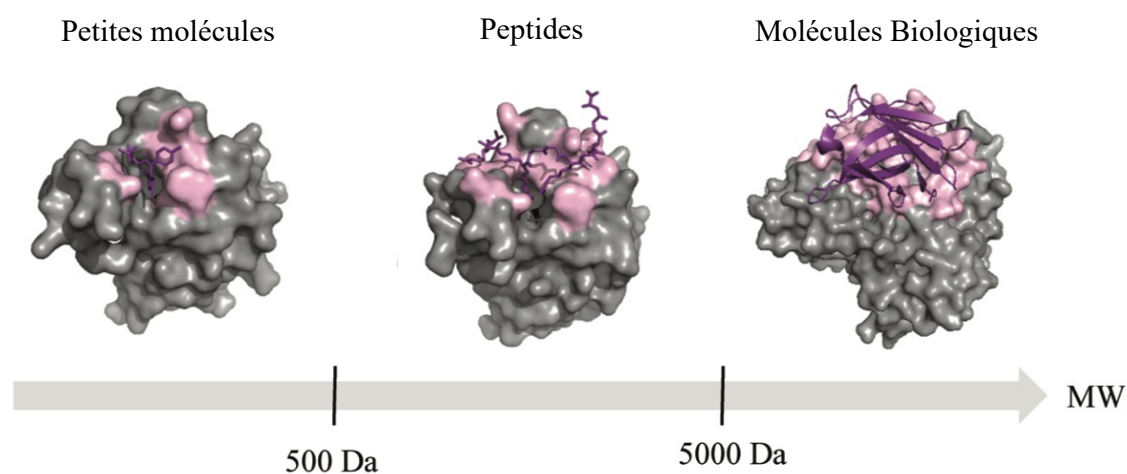


Figure 1 - Poids moléculaire différents composés utilisés en thérapie.⁴

Introduction

Pour ces raisons, ils ont fortement impacté le développement de l'industrie pharmaceutique et ont considérablement contribué à l'avancée de la science en Biologie et en Chimie dès début du 20^{ème} siècle. La meilleure illustration de l'usage des peptides est la découverte et le développement de l'insuline, qui a été introduite en 1982 comme première protéine recombinante en tant que médicament. Cependant, malgré tout cet engouement autour de ces molécules, les peptides en tant que médicaments ont été rapidement mis de côté à la fin du 20^{ème} siècle.⁵

Malgré des propriétés intrinsèques attrayantes pour le développement de peptides thérapeutiques, les peptides naturels étaient notamment réputés pour leur grande flexibilité, leur courte demi-vie dans le plasma et de fait leur faible biodisponibilité.⁶ De grand progrès ont été réalisés afin de compenser les faiblesses des peptides naturels et moduler leur propriétés pharmacocinétiques.^{1,7,8} De nombreuses stratégies ont été développées permettant de stabiliser les peptides *in vivo*. Certaines de ces étapes clés sont résumées dans la frise chronologique Figure 2, celle-ci résume les différents enjeux et obstacles au développement des peptides en tant que médicaments potentiels.

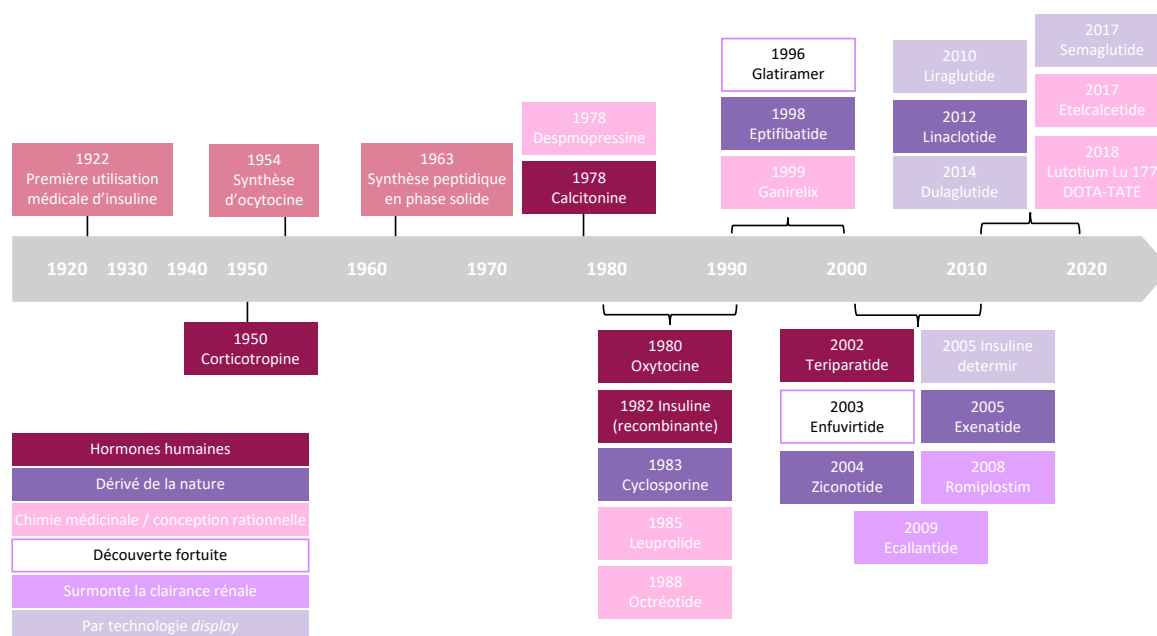
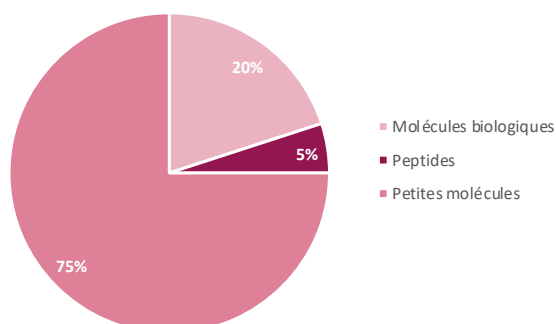


Figure 2 - Chronologie des étapes-clés, des développements et des approbations de médicaments dans le domaine des peptides thérapeutiques.⁵

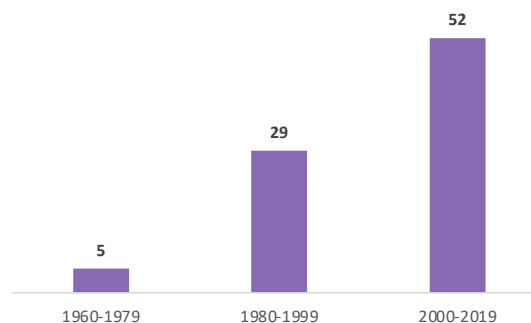
La modification de la chaîne peptidique en introduisant des acides aminés non naturels ou des contraintes conformationnelles permet par exemple de diminuer leur dégradation par les protéases.⁹ La conjugaison à des molécules organiques, des lipides, des polymères, a également permis de stabiliser la structure des peptides, d'augmenter leur hydrophilie et leur biodisponibilité.^{10,11}

Ainsi, les deux dernières décennies ont vu renaître les peptides en tant que molécules d'intérêt thérapeutique ou outil pour la recherche en biologie et depuis 2000, 28 nouveaux médicaments peptidiques non insuliniques, obtenus par modification de ligands endogènes, ont été approuvés dans le monde et plusieurs d'entre eux ont connu un succès commercial. Ce succès a conduit les industriels à reconsidérer l'usage des peptides pour la découverte de nouveaux médicaments (Figure 3).^{1,6,12} Les applications thérapeutiques sont assez diverses allant de l'oncologie à la médecine reproductive. Les propriétés d'interférence sont majoritairement des antagonistes.

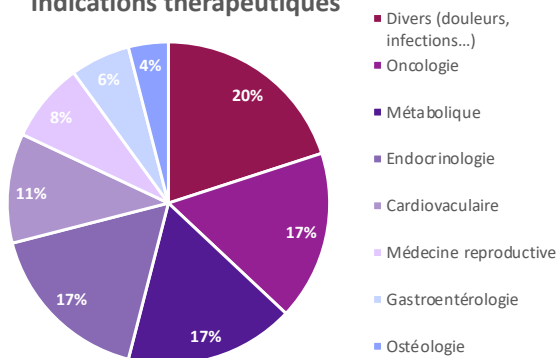
Marché pharmaceutique en 2019



Peptides médicaments sur le marché



Indications thérapeutiques



Fonctions des peptides médicaments

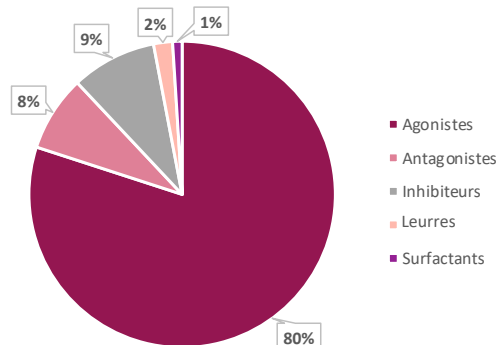


Figure 3 - Statistique sur les peptides dans le marché du médicament.

Par ailleurs, de nombreuses approches sont développées permettant de concevoir *de novo* des séquences peptidiques capables d'interférer avec des processus biologiques. Ces approches sont basées soit sur la structure du complexe formé par le ligand endogène avec son récepteur, soit sur le criblage aléatoire haut débit de chimiothèques. Ces deux approches seront décrites ci-après.

1. Conception rationnelle de mimes peptidiques

Cette première approche repose sur l'identification des interactions-clés entre un ligand et son récepteur à partir de données structurales et expérimentales permettant ainsi d'identifier le pharmacophore du ligand, nombre restreint d'atomes ou de fonctions impliqué dans la reconnaissance avec la cible (Figure 4).^{4,13-15}

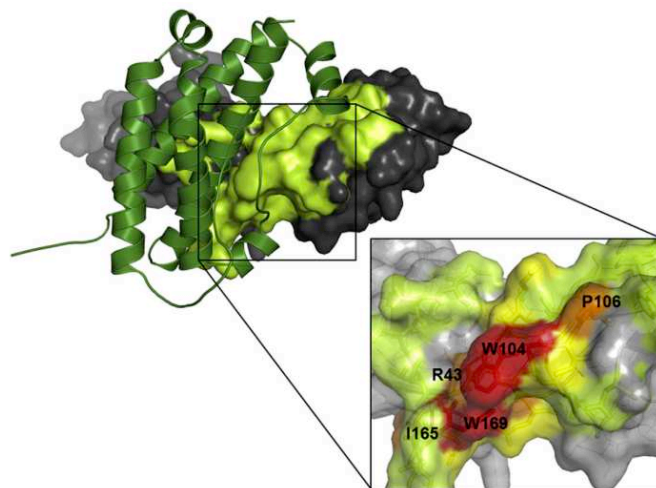


Figure 4 - Interaction protéine-protéine entre l'hormone de croissance humaine et le domaine extracellulaire de son récepteur.

L'hormone de croissance est représentée en vert et son récepteur en gris. Le domaine d'interaction sur le récepteur est représenté en vert clair et les résidus cruciaux pour la reconnaissance en rouge et orange en fonction de leur degré d'interaction.

Les peptides sont composés d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques ou liaison amide formant ainsi un squelette peptidique appelé séquence primaire. Des conformations locales privilégiées autour des liaisons N-C α (angle dièdre φ) et C α -CO (angle dièdre ψ) de chacun des résidus entraîne le repliement du squelette peptidique en une structure régulière appelée structure secondaire (Figure 5).

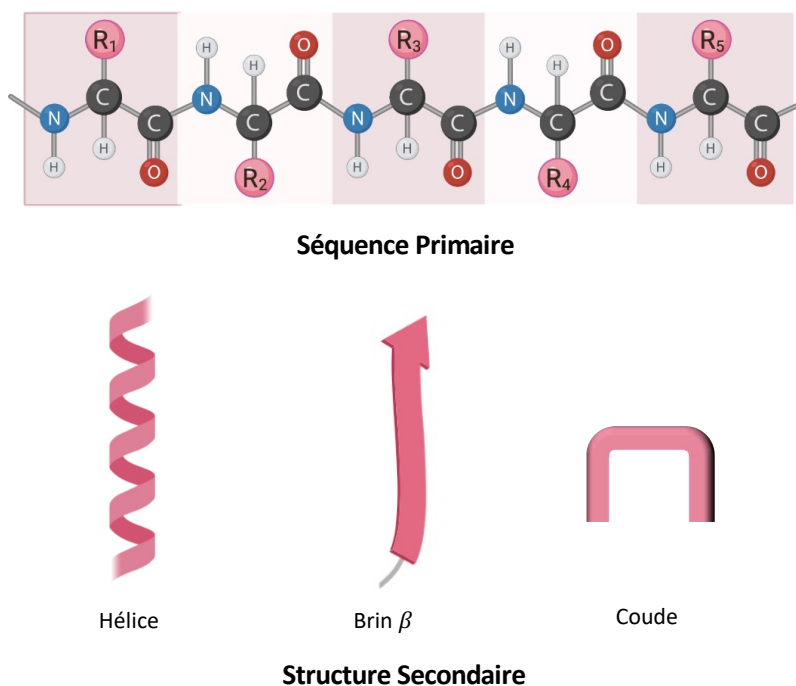


Figure 5 - Structure primaire et secondaire des peptides et des protéines.¹⁶

Le pharmacophore d'une protéine ou d'un peptide est le plus souvent inclus dans un segment peptidique court possédant une structure secondaire définie de type hélice α , brins β ou un coude (Figure 5). Bien souvent, extraite de son contexte protéique, cette séquence conserve une affinité pour la cible. Néanmoins, les courts peptides linéaires sont en général très flexibles et perdent leur conformation bioactive ce qui entraîne une perte entropique lors de la liaison et une diminution de l'affinité pour la cible.¹⁷ La stabilisation de la conformation bioactive apparaît donc comme un prérequis pour accéder à des ligands efficaces.

La démarche consiste donc à identifier dans un premier temps cette conformation bioactive ainsi que les interactions clés entre les deux partenaires qui contribuent de manière significative à l'énergie de l'interaction puis à créer une structure qui récapitule l'arrangement spatiale des chaînes latérales impliquées. Deux méthodes peuvent être alors envisagées (Figure 6). La première consiste à introduire des contraintes conformationnelles locales ou globales afin de pré-organiser la conformation bioactive. La seconde est basée sur l'utilisation de mimes topologiques, appelés *scaffolds*, plateforme rigide permettant de projeter les chaînes latérales du pharmacophore dans les orientations adéquates.

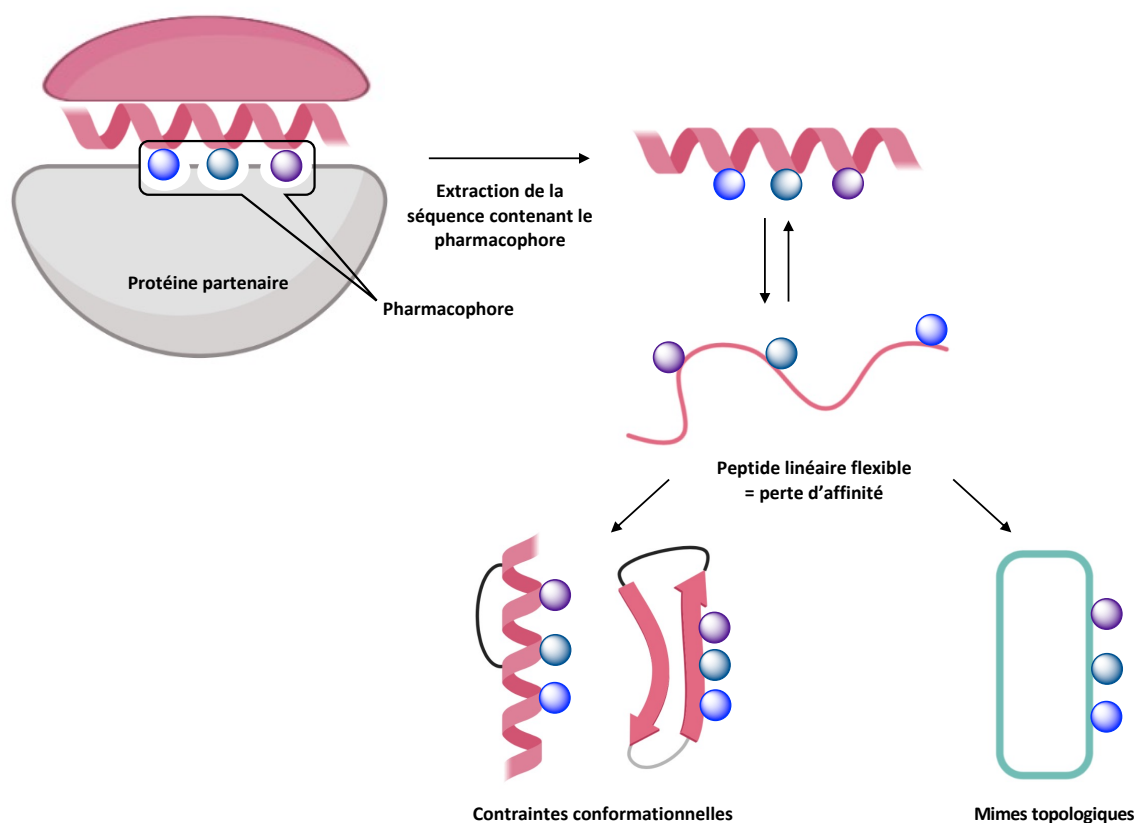


Figure 6 - Représentation des deux stratégies permettant la structuration d'un peptide linéaire flexible portant un pharmacophore : introduction de contraintes conformationnelles et utilisation de mimes topologiques.

Les résidus composant le pharmacophore sont représentés par les boules de couleurs et les contraintes conformationnelles en noir.

1.1. Identification du pharmacophore

Dans le cas de peptides, plusieurs outils permettent d'identifier le pharmacophore :

- Les données structurales d'interactions protéine-ligand disponibles, obtenues par RMN, diffraction des rayons X ou par approche computationnelle, afin de générer une représentation des contacts entre le ligand et sa cible.
- La génération de peptide tronqué afin de déterminer la séquence minimale pouvant induire une activité.
- La mutagenèse systématique, type Ala-scanning, consistant à remplacer individuellement chaque acide aminé du peptide par une alanine suivi d'une mesure de l'affinité/activité et permettant d'identifier les résidus cruciaux pour l'interaction.
- L'utilisation d'acides aminés contraints sur les angles φ et ψ afin d'accéder aux valeurs de ces angles dans la conformation bioactive.

1.2. Introduction de contraintes conformationnelles

Ces contraintes conformationnelles peuvent être appliquées localement au niveau d'un résidu ou plus globalement par introduction d'un lien covalent entre des résidus éloignés dans la séquence et qui se retrouve rapproché dans la structuration 3D.

1.2.1. Contraintes conformationnelles locales

De manière générale, pour les acides aminés, il existe un nombre restreint de combinaisons d'angles phi φ et psi ψ accessibles, les autres étant énergétiquement défavorables dues aux gênes stériques.

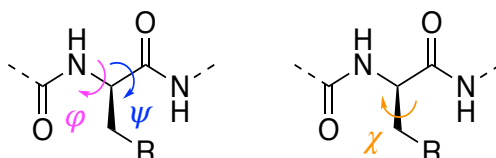


Figure 7 - Représentation des angles dièdres d'un acide aminé.

L'ensemble des combinaisons des angles phi φ et psi ψ autorisé dans l'espace 3D sont résumées dans le diagramme de Ramachandran, du nom du chimiste qui l'a développé.¹⁸ Il montre que la majeure partie des acides aminés L contenu dans une protéine a des combinaisons d'angles comprises dans deux régions principales de ce diagramme. Ces combinaisons correspondent aux structures secondaires « hélice α » et « feuillet β » ce qui explique la tendance naturelle des peptides à adopter ce type de structuration (Figure 8).

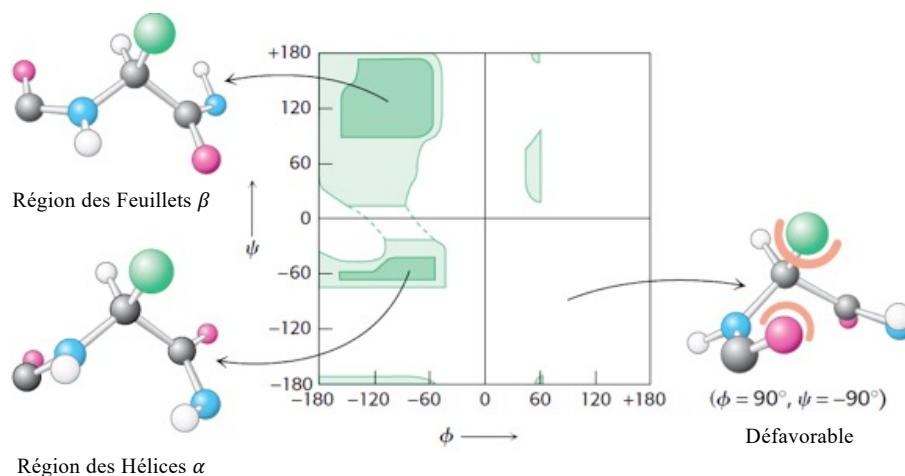


Figure 8 - Diagramme de Ramachandran d'un acide aminé L.¹⁹

Les combinaisons d'angles les plus favorables sont représentées en vert foncé, celles acceptables en vert clair. La structure à gauche est défavorable énergétiquement en raison de gêne stérique.

L'introduction de contraintes conformationnelles locales peut être obtenues par remplacement des acides aminés naturels par des résidus pour lesquels l'espace conformationnel autour des angles dièdres phi φ et psi ψ va être restreint d'avantage (Figure 9).

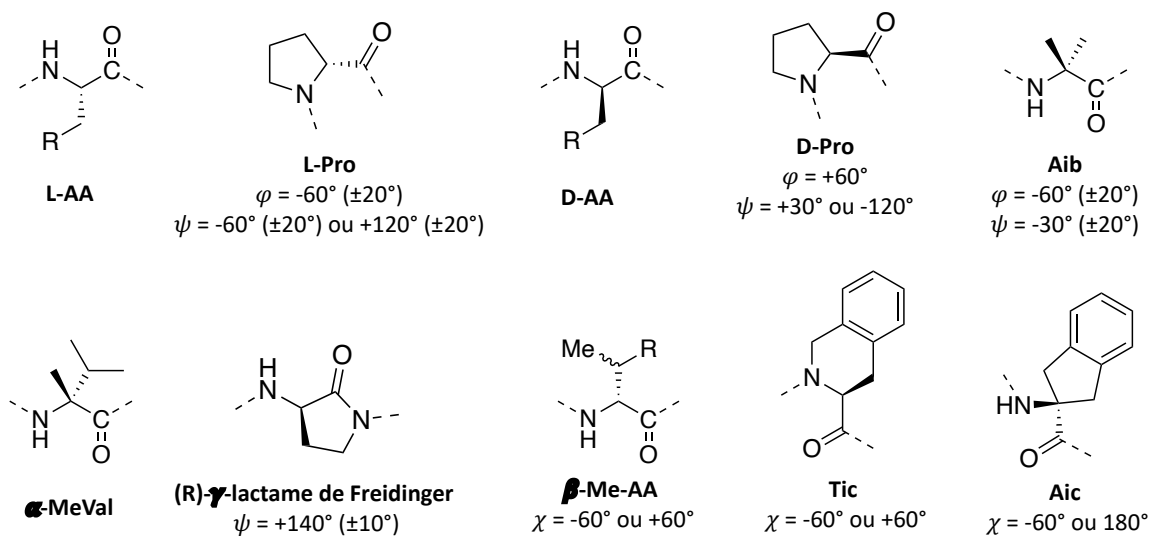


Figure 9 - Acides aminés modifiés et contraintes des angles dièdres.

Typiquement dans la proline le cycle pentanique entraîne une contrainte sur la valeur de l'angle φ plus grande que celle des autres acides aminés naturels. Cette restriction favorise la formation de coude β de type I et II. À l'inverse son énantiomère D-Pro favorise les coudes de type I' et II' (Figure 10).^{16,20}

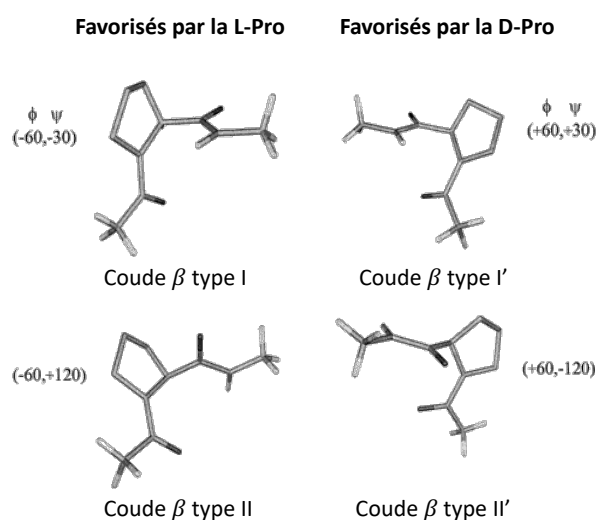


Figure 10 - Conformations générées par la L-Pro et la D-Pro.

De nombreux acides aminés non naturels pour lesquels les combinaisons φ/ψ sont restreintes ont été développés. Par exemple, la présence d'un groupement Me sur l'atome de carbone α de l'acide α -aminobutyrique (Aib) favorise une conformation hélicoïdale.^{21,22} D'autres dérivés α -substitués combinant cette contrainte tout en maintenant la chaîne latérales des acides aminés naturels ont été synthétisé, par exemple l' α -méthylvaline.²³ Les lactames de Freidinger et leurs analogues constituent une autre famille de résidus contraint, cette fois sur l'angle ψ stabilisant les coudes β et γ .²⁴ Ils ont été très utilisés comme outils pharmacologiques pour l'identification de la conformation biologique de peptide naturel, par exemple c'est celle la substance P et des neurokinines.²⁵

Il est également possible de jouer sur l'angle χ en bloquant les conformations gauche (-), gauche (+) autour de la liaison $C\alpha-C\beta$.²⁶ L'utilisation d'un groupement Me sur le carbone β permet par exemple de diminuer la rotation autour de cette angle. L'utilisation de β -Me-Phe ou β -Me-Trp a par exemple contribué fortement à l'identification de la conformation bioactive de la somatostatine.²⁷ Des contraintes plus fortes sous forme de cycle ou de centre spiranique permettent de bloquer encore d'avantage la rotation autour de cette liaison. C'est le cas par exemple des résidus Tic (acide 1,2,3,4- tetrahydroisoquinoline-3-carboxylique) ou Aic (acide 2-amino-indane-2-carboxylique).²⁸

1.2.2. Contraintes conformationnelles globales

Une autre manière de bloquer la conformation bioactive d'un peptide consiste à introduire une contrainte plus globale sur la structure 3D par utilisation d'un lien covalent entre des résidus éloignés dans la séquence primaire et qui se retrouvent à proximité dans l'arrangement 3D (Figure 11). Cette cyclisation peut être effectuée en tête à queue, c'est à dire entre les extrémités ou entre deux chaînes latérales. La cyclisation est également possible entre une extrémité et une chaîne latérale mais n'a pas été beaucoup exploitée pour la conception de peptidomimes.²⁹⁻³²

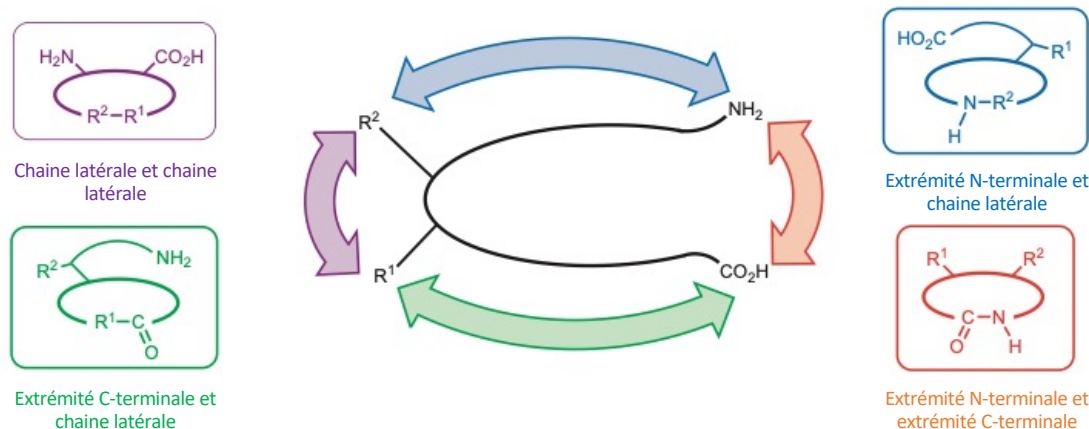


Figure 11 - Représentation des différentes possibilités de cyclisation d'un peptide linéaire.

1.2.2.1. Macro-cyclisation tête à queue

La cyclisation tête à queue a lieu entre les extrémités *N*-terminale (*N*-ter) et *C*-terminale (*C*-ter) d'un peptide linéaire (Figure 12).³³ Cette stratégie est classiquement utilisée pour stabiliser un coude β . Des analogues plus courts et plus stables de la somatostatine ont été par exemple préparés par cette méthode et conduit à un mime efficace.⁹ Elle peut également être appliquée à la stabilisation d'hélice α ou encore de structures tertiaires ou supersecondaires type épingle à cheveux β (β -*hairpin*).^{9,33-35} Chan et al., ont montré que la cyclisation du peptide antimicrobien Gomésine entre ses résidus *N*-ter et *C*-ter permet d'accroître sa stabilité et sa bio-activité par stabilisation du feuillet β .³⁵⁻³⁷ Wu *et al.*, introduisent un motif organique pour cycliser une hélice α composée de 10 résidus et envisage d'utiliser cette stratégie pour concevoir des structures tertiaires ou quaternaires et développer des inhibiteurs d'interactions protéine-protéine.³⁸

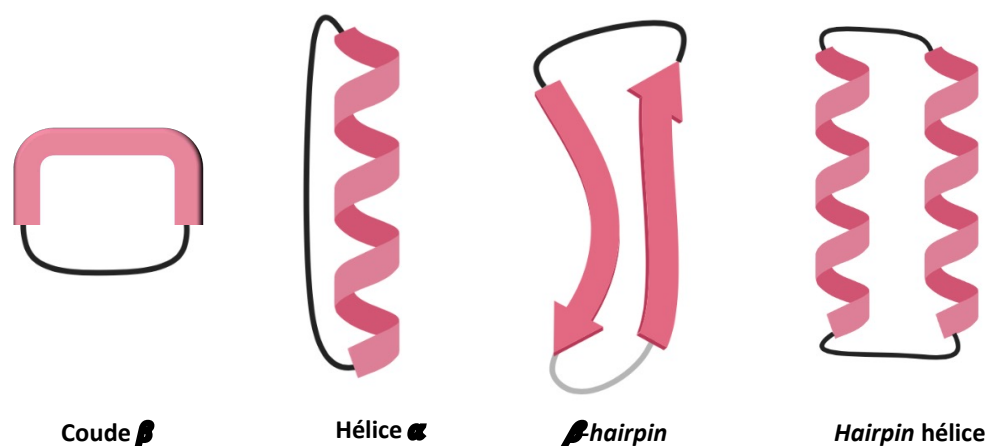


Figure 12 - Représentation schématique de la macro-cyclisation (en noir) de structure secondaire (une hélice α , et d'un coude β) et supersecondaires (β *hairpin* et *hairpin* hélicoïdal)

1.2.2.2. Cyclisation entre chaînes latérales

Une autre stratégie possible consiste à créer un lien, covalent ou non, entre des chaînes latérales de résidus qui se trouvent à proximité dans la structure 3D, non impliqués dans le pharmacophore. Cette stratégie est appelée *stapled peptides* ou peptides agrafes. Par exemple, un feuillet β peut être stabilisé par un lien entre les chaînes latérales de résidus situés entre deux brins β . Différentes réactions/interactions ont été utilisées à cet effet (Figure 13) : des ponts disulfures entre cystéines, des interactions π - π ou π -cation ou encore par l'utilisation de résidus non naturels permettant d'introduire un pont triazole.³⁶

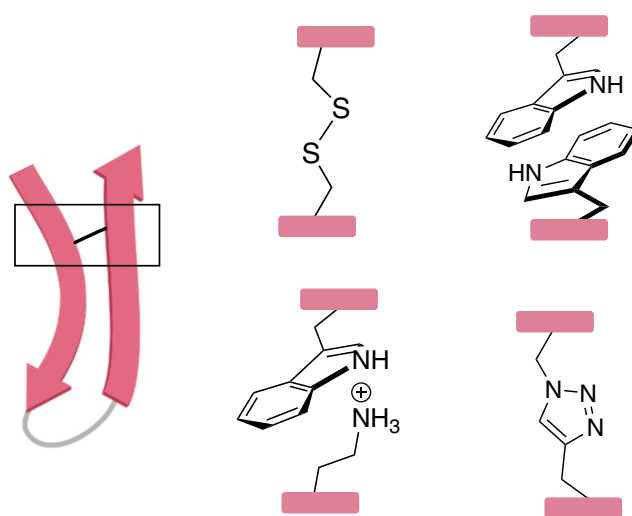


Figure 13 - Exemples de cyclisation d'un feuillet β via les chaînes latérales de résidus.

Cette stratégie peut également être utilisée pour la stabilisation d'hélice α . Par exemple, dans une hélice α , les chaînes latérales des résidus en position relative i et $i+4$ sont situés sur la même face de l'hélice et dans des orientations quasi-parallèles. L'introduction de liens covalents entre ces résidus permet de stabiliser la conformation (Figure 14).

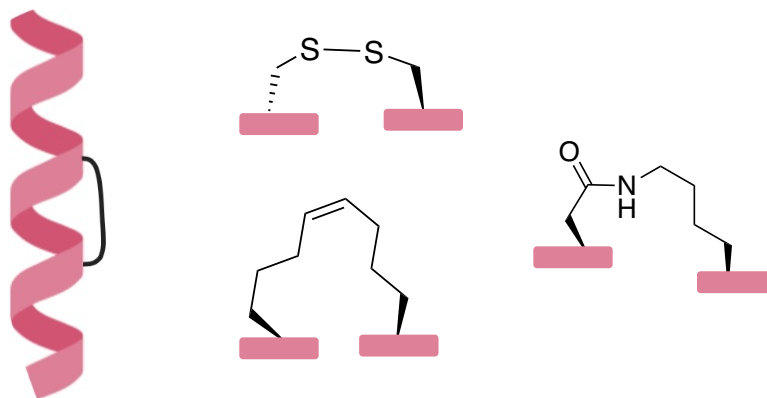


Figure 14 - Exemples de stabilisation d'une hélice α *via* les chaînes latérales de résidus.

Là encore, de nombreuses réactions chimiques peuvent être considérées pour l'introduction de ces agrafes. La première décrite est la formation de pont disulfures à l'aide de résidus cystéines.³⁹ Elle est néanmoins peu utilisée du fait de l'instabilité des liaisons S-S en conditions réductrices *in cellulo*. De ce fait, d'autres méthodes ont été envisagées. La métathèse d'oléfines à l'aide du catalyseur de Grubbs développé par le groupe de Verdine est l'une des plus populaire.⁴⁰ La lactamisation *via* le couplage entre les chaînes d'un résidu Asp et les chaînes d'un résidu Lys est également très utilisée et présente l'avantage de faire appel à des résidus naturels.^{41,42} Le succès de cette stratégie repose beaucoup sur le choix des positions des résidus dans la séquence, de la longueur du lien généré et de la nature des agrafes, et nécessite souvent la synthèse et le criblage d'un nombre important de peptides avant d'accéder à la combinaison optimale. Afin de faciliter la conception, une méthode à deux composants a été développée, consistant à faire réagir un lien covalent simultanément avec deux chaînes latérales en position relative i et $i+4$ (Figure 15). Là encore, différentes réactions chimiques peuvent être appliquées pour l'introduction du lien : l'alkylation de cystéines, la double lactamisation ou encore une double réaction click suivant la réaction de cycloaddition de Huisgen.⁴⁰⁻⁴²

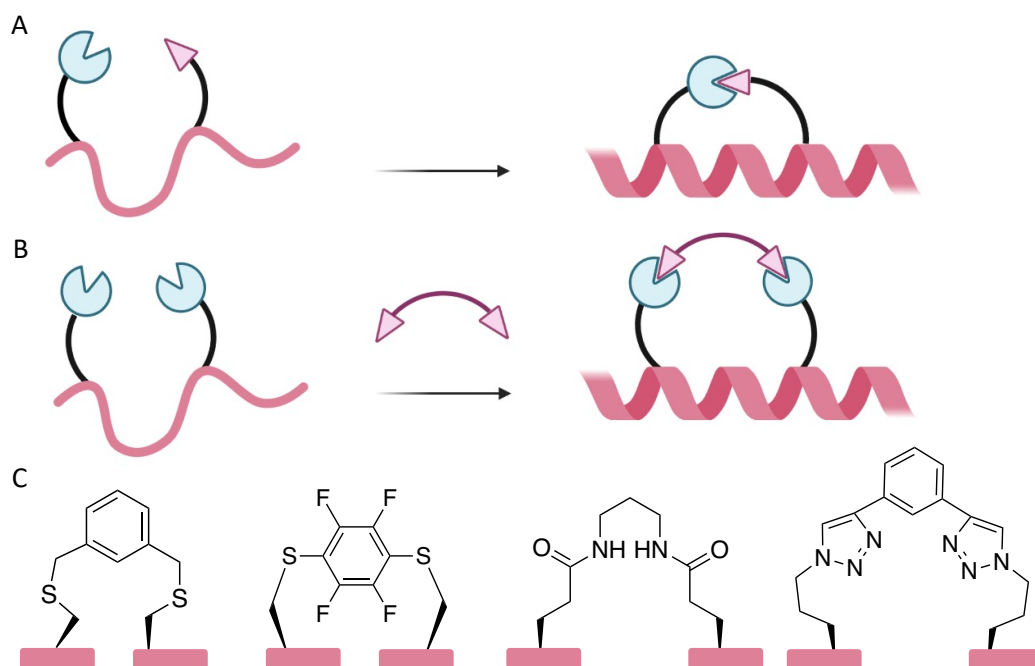


Figure 15 - Comparaison des méthodes à un composant et à deux composants.
 A : stratégie à un composant, B : stratégie à deux composants, C : exemple de lien bifonctionnels.

Les résidus situés aux extrémités d'un peptide linéaire flexible peuvent se trouver relativement longue distance compliquant la cyclisation. Pour aider, il est possible de combiner des stratégies de cyclisation avec des contraintes locales favorisant le repliement de la chaîne peptidique comme vu dans le paragraphe précédent.

1.3. Utilisation de mimes topologiques

Une seconde stratégie pour concevoir des peptidomimétiques de structure définie est l'utilisation de mimes topologiques. Elle repose sur l'utilisation d'une plateforme rigide ou *scaffold*, peptidique ou non, capable de projeter les chaînes latérales dans des orientations bien définies identiques à celles du ligand naturel.⁴³ Ces séquences contiennent donc un nombre restreint de résidus responsables de la conformation 3D. Tous les autres résidus et en particulier ceux qui sont exposés à la surface du *scaffold* peuvent être modifiés sans affecter la structuration et peuvent donc être exploités pour le greffage du pharmacophore. Il s'agit donc ici de dissocier la structure d'un peptide de sa fonction. Différentes protéines naturelles de petite taille, souvent qualifiées de mini-protéines, ont été utilisées comme *scaffold*. De plus,

afin d'accéder à des structures plus petites et plus stables, de nombreux *scaffolds* artificiels ont également été développés.

1.3.1. Les mini-protéines naturelles

Les mini-protéines sont des petites protéines de moins de 40 acides aminés qui possèdent une structure 3D comportant au moins deux structures secondaires autour d'un cœur hydrophobe (Figure 16).⁴⁴

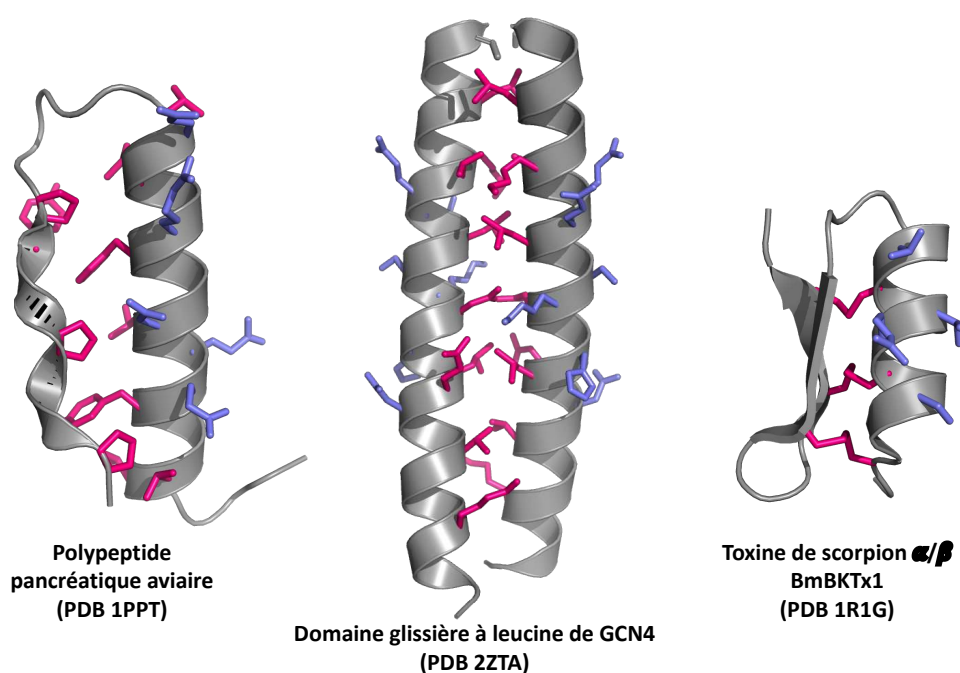


Figure 16 - Exemples de mini-protéines utilisées comme plateforme peptidique.

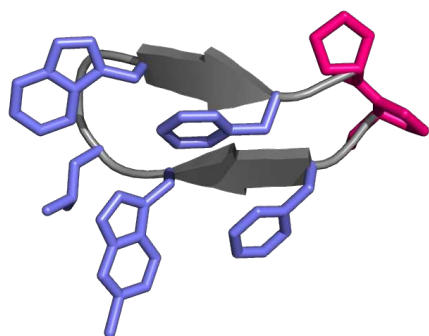
Les résidus cruciaux pour la bonne structuration 3D des protéines sont colorés en rose, les résidus qui ont été modifiés afin de concevoir des mimes sont colorés en mauve.

De nombreuses mini-protéines ont été décrites à partir des années 1980 et ont fait l'objet de nombreuses optimisations afin d'en améliorer la stabilité et pouvoir ensuite leur attribuer de nouvelles fonctions. Par exemple, le polypeptide pancréatique aviaire ou aPP décrit en 1981, composé d'une hélice α et d'une boucle poly-proline II (PP2)⁴⁵, a été largement utilisé comme *scaffold* de référence par le groupe de Schepartz pour l'identification/sélection de petites protéines ligands d'ADN ou de protéines, par projection de pharmacophores sur l'hélice α ou la boucle PP2.⁴⁶ Smith *et al.* ont synthétisé des variants de aPP en mutant des résidus non cruciaux pour la structuration du peptide de manière à placer 4, 5 ou 6 arginines dans l'hélice α et lui conférer ainsi une perméabilité membranaire.⁴⁷ Le domaine leucine zipper du facteur de transcription GCN4, structuré en deux hélices parallèles contenant des répétitions

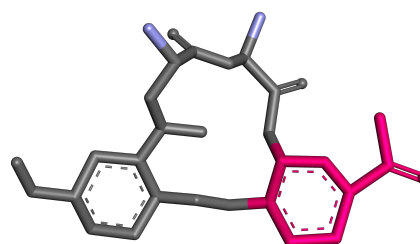
régulières de résidus leucine a servi de plateforme pour inhiber l'interaction entre la protéine PF4 et l'héparine,^{48,49} ou pour mimer le domaine de transactivation de p53 endogène.⁵⁰ La toxine de scorpion BmBKTx1 a également été exploitée. Elle est constituée de deux parties : une hélice α et à une épingle à cheveux β (deux brins β reliés par un coude β)⁵¹ et a, par exemple, été utilisée pour mimer le domaine de transactivation de p53.⁵² Ces structures permettent en général d'accéder à des ligands de haute affinité et sélectivité pour leur cible mais leur taille importante reste néanmoins un frein à leur développement comme agent thérapeutique.

1.3.2. Plateformes artificielles

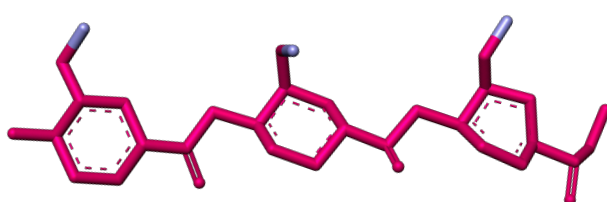
Dans le but d'accéder à des mimes topologiques de taille réduite, des plateformes artificielles ont été développées par conception de séquences courtes hautement structurées (Figure 17). Il peut s'agir de peptide dans lesquels des résidus contraints ont été introduits afin d'induire la structuration. Par exemple, le groupe de Robinson a développé des cyclopeptides incluant le motif ^DPro-^LPro inducteur de coude β . Ce *scaffold* a été utilisé par exemple pour le développement de peptides antimicrobiens et antiviraux, d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine ou de protéases.⁵³ Burgess *et al.* ont développé un dipeptide mimant un coude β en utilisant un fragment organique aromatique forçant la structure à adopter une conformation coplanaire.⁵⁴ Herman *et al.* proposent un *scaffold* peptidique linéaire structuré β -*hairpin* ou le repliement est favorisé par une interaction π - π stabilisante entre les chaînes latérales de 2 résidus Trp sur les deux brins, désigné *Trp-cage*. Ce *scaffold* a été utilisé pour le développement de composés capable de se lier aux cellules épithéliales des bronches.⁵⁵



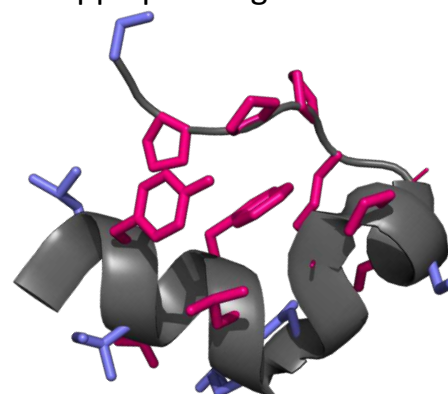
Développé par Robinson *et al.*



Développé par Burgess *et al.*



Développé par Hamilton *et al.*



Développé par Herman *et al.*

Figure 17 - Exemple de plateformes artificielles utilisées pour obtenir des peptidomimes structurés.

Les résidus cruciaux pour la bonne structuration 3D des protéines sont colorés en rose, les positions modifiables de concevoir des mimes sont colorés en mauves.

Des *scaffolds* non peptidiques ont également été développés basés sur des foldamères. Ils sont définis par Gellman comme « toute structure polymérique capable d'adopter une conformation spécifique ». ⁵⁶ Le groupe d'Hamilton a montré par exemple qu'il était possible de mimer des d'hélices α avec un polymère trispyridylamide formant un réseau de liens hydrogènes s'établissant entre les NH situés entre chaque cycle aromatique et les oxygènes porteurs de chaînes latérales. ⁵⁷ Ce *scaffold* a par exemple été utilisé pour la conception d'inhibiteur de l'interaction Bcl-xL impliqué dans l'apoptose.

1.4. Conclusion

De nombreuses études ont été menées afin de concevoir des peptides thérapeutiques de manière rationnelle et les peptidomimes bioactifs sont nombreux. Néanmoins des limites existent¹⁴ :

- Les données structurales de la cible doivent être disponibles et suffisamment précises pour permettre une conception efficace.
- La conception rationnelle permet en général l'accès à un premier *hit* d'affinité modéré, qui doit ensuite être optimisé par des cycles de synthèse/criblage long et coûteux avant d'arriver à un peptidomimétique efficace.

2. Synthèse et Criblage aléatoire haut débit de bibliothèques

Le développement de techniques de criblage à haut débit automatisées a permis d'augmenter drastiquement le nombre de candidats qu'il est possible de tester. Très utilisé dans les entreprises pharmaceutiques grâce à l'essor de la robotisation, il permet de cribler plusieurs dizaines de milliers de composés par jour grâce à des tests d'affinité ou d'activité simples et automatisables.⁵⁸ Bien que le criblage haut débit soit l'objet de nombreuses critiques dans le monde biomédical, et est parfois qualifié « d'irrationnel » puisqu'il permet seulement d'effectuer des expériences de manière plus rapide sans augmenter les chances de succès de celle-ci, il a cependant permis la découverte de nombreuses molécules, par exemple des inhibiteurs de la réplication du virus de l'hépatite C.⁵⁹ Ceci implique de disposer d'une large collection de composés, appelée chimiothèque, qui vont être testés de manière systématique afin d'identifier un composé interagissant avec une cible d'intérêt. Plus le nombre de composés criblés est important et plus les chances d'identifier une molécule affine augmente. C'est pourquoi des stratégies permettant l'accès à de très large collections de peptides sont développés.⁶⁰

Plusieurs moyens existent pour avoir accès à des bibliothèques de molécules. Il est possible de faire appel à des collections historiques c'est à dire des composés synthétisés au fil des années par un laboratoire ou une entreprise qui sont stockés et mis à disposition. L'exploration de ressources naturelles est également une voie d'accès à des molécules naturelles. La

chimiothèque Nationale française regroupe plus de 70 000 composés et 15 000 extraits naturels originaux.⁶¹ Cependant les collections historiques présentent généralement peu de diversité structurale et les molécules naturelles sont en général de grande complexité dont les possibilités de synthèse totale sont souvent très limitées. Il a donc été nécessaire de développer de nouvelles stratégies pour la synthèse de grandes séries de composés structuralement différents. En ce qui concerne les peptides, deux approches sont utilisées à cet effet : les méthodes chimiques et les méthodes biologiques.

2.1. Les méthodes chimiques

L'accès à de larges bibliothèques de peptides est possible par voie chimique et repose sur la chimie combinatoire (Figure 18).

Le principe de la chimie combinatoire est la synthèse simultanée de plusieurs molécules en mélange en partant non pas d'un réactif A et d'un réactif B comme en chimie classique mais d'une série de réactif A_i et B_i.

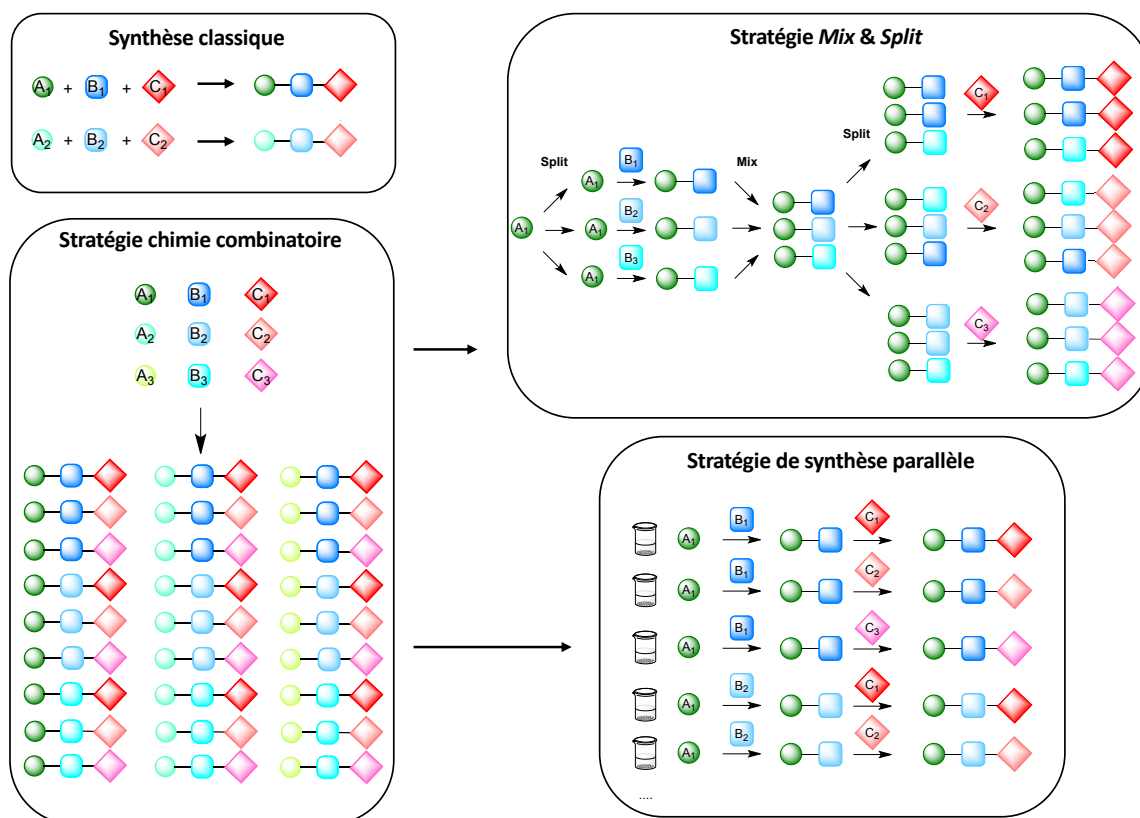


Figure 18 - Schéma représentatif des stratégies *Mix & Split* et de synthèse parallèle reposant sur la chimie combinatoire.

Cette stratégie donne accès à un très grand nombre de produits non isolés en peu de temps.⁶² La taille de la librairie augmente rapidement en fonction du nombre de réactif et du nombre d'étapes réactionnelles effectuées. En revanche, plusieurs contraintes sont imposées par le simple fait de combiner plusieurs entités : une réactivité similaire de tous les partenaires est nécessaire et la formation de sous-produits doit être limitée.⁶³ Afin de dépasser ces limitations, de nouvelles méthodes de chimie combinatoire ont émergé notamment la stratégie « Mélange & Partage » (*Mix & Split*).

Décrite par Furka *et al.*⁶⁴ puis par Lam *et al.*,⁶⁵ la stratégie *Mix & Split* permet de s'affranchir des problèmes liés à la différences de réactivité des composés dans un mélange. Elle est particulièrement adaptée à la synthèse de peptide sur support solide. Après greffage du premier acide aminé sur support, la résine est divisée en plusieurs lots sur lesquels vont être greffés de manière indépendante différents résidus. Les différents lots vont être alors mélangés et redivisés à nouveau pour l'introduction des résidus suivants. Ce procédé est répété jusqu'à la fin de la synthèse.⁶² Cette méthode permet donc d'éviter la compétitions

entre les différents réactifs mais aussi les problèmes de réactivité et de cinétique entre les différentes espèces.

Le criblage des mélanges obtenus par chimie combinatoire se fait sans séparation des composés de la librairie. La cible est donc introduite directement dans la librairie. Lorsqu'une affinité/activité est mesurée, il s'agit alors d'identifier dans le mélange le ou les composés qui en sont responsables. La première stratégie consiste à séparer les ligands liés à la cible (RL) de ceux non liés (L), par exemple par chromatographie d'exclusion, puis de dissocier le ligand de la cible et d'identifier sa séquence. Il est également possible d'appliquer des méthodes de déconvolution itérative. Il s'agit d'une approche d'identification progressive où un seul acide aminé est identifié à la fois et fait donc appel à des cycles de synthèse/criblage de sous-librairies de peptides de taille plus restreinte. La synthèse de ces sous-librairies est dictée par le résultat obtenu lors du criblage de la sous-librairie précédente.⁶⁶ Des techniques colorimétriques peuvent également être utilisées, en particulier lorsque la librairie est générée sur support solide. Par exemple, le marquage d'un des partenaires, généralement la cible, permet une identification rapide des composés liés à celle-ci après ajout dans le mélange d'un composé fluorescent capable de reconnaître ce marqueur.⁶⁷ Des méthodes d'encodage ont également été développées et ont permis une avancée majeure de cette technologie. La méthode consiste à greffer sur la résine, à chaque étape de la synthèse, une étiquette spécifique à l'étape qui va servir à l'identification des séquences. Après criblage, le clivage et l'identification de l'étiquette permettent de tracer la séquence bioactive. En particulier la méthode DEL (pour *DNA Encoding chemical Library*) est très efficace puisqu'elle fait appel à des étiquettes ADN qui peuvent être facilement obtenues par amplification et séquençage (Figure 19).⁶⁸

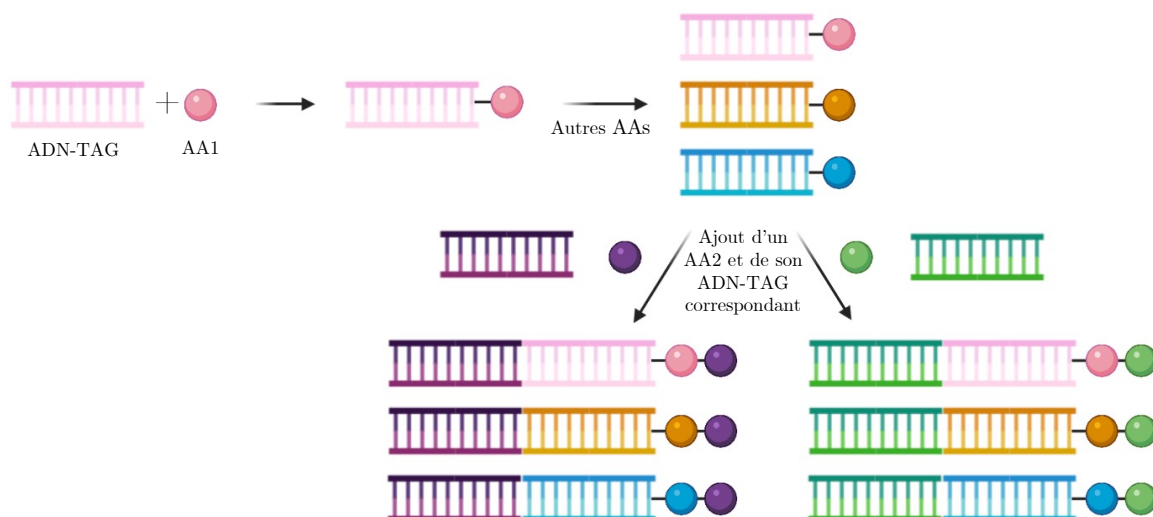


Figure 19 – Principe de la stratégie d'encodage par ADN.

Ces méthodes simplifient fortement le criblage de librairie combinatoire. Néanmoins, l'utilisation de composés immobilisés sur résine peut constituer une limite et diminuer ou augmenter leur affinité pour une cible. C'est pourquoi des méthodes de synthèse parallèle, en solution ou sur support solide, où les membres de la librairies sont synthétisés dans des contenants différents ont été développées.⁶⁹ Différents support permettant de miniaturiser ou de faciliter ces synthèses ont été développés (sur une membrane⁷⁰, sur des aiguilles dans des puits⁷¹). Des robots de synthèse parallèle permettant l'automatisation de ces synthèses sont aujourd'hui utilisés. L'avantage ici est que chaque composé synthétisé peut ensuite être testé individuellement vis-à-vis de la cible, évitant ainsi les problèmes liés au criblage.

2.2. Les méthodes biologiques

Dans le cas des peptides, de larges librairies peuvent être préparées par des voies biologiques. Ces méthodes reposent sur l'introduction d'une séquence d'ADN codant pour une séquence peptidique prédéfinie dans un vecteur biologique afin que le peptide correspondant y soit exprimé. Il sera finalement exposé à la surface du support biologique et criblé directement sur cette surface. Il s'agit des méthodes dites de « *display* » (phage *display*, *yeast display*, *bacterial display* etc.). Ces techniques présentent l'avantage de relier le phénotype (peptide) au génotype (ADN ou ARN) permettant le criblage des peptides et l'accès direct à leurs séquences par amplification et séquençage du matériel génétique^{60,72}

La technique du phage *display* est la première à avoir été décrite et reste de loin la plus utilisée aujourd'hui. Elle repose sur l'utilisation du phage, virus capable d'infecter des bactéries (Figure 20). Cette stratégie permet de générer des bibliothèques de 10^8 - 10^{11} peptides différents .^{60,72,73}

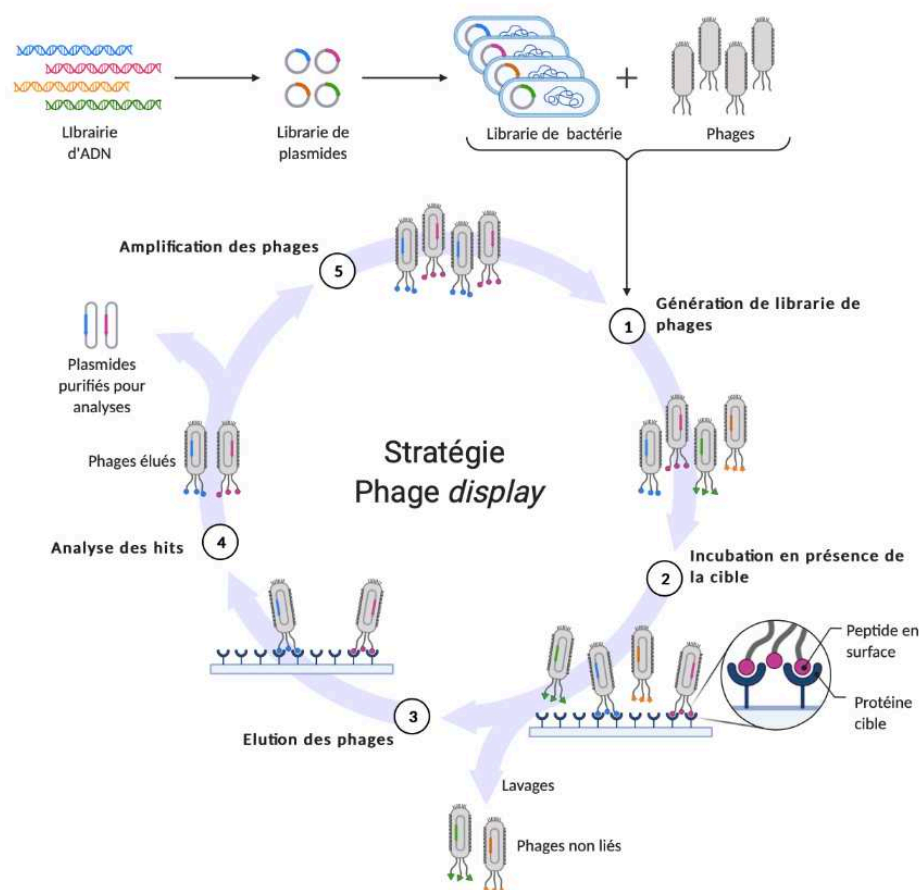


Figure 20 - Étapes de criblage des bibliothèques obtenues par phage *display*.

Cette technique a longtemps été limitée à la synthèse de peptides linéaires ou cyclisés par formation de ponts disulfures^{69,74}, or ces peptides ont de manière générale des propriétés pharmacologiques faibles (stabilité protéolytique, perméabilité membranaire, biodisponibilité...) et une phase d'optimisation est en générale nécessaire après le criblage pour accéder à des molécules plus performantes. Ces propriétés peuvent de manière générale être améliorées par cyclisation du squelette peptidique, c'est pourquoi de nombreuses approches ont émergés pour l'accès à des peptides cycliques stables *in vivo*. Par exemple, la stratégie SICLOPPS permet de générer *in cellulo* dans des bactéries, des peptides qui sont capables de cycliser spontanément grâce à une séquence spécifique, appelée *split-intein*, situées aux extrémités du peptide. Lorsque ses extrémités se trouvent à proximité, une cyclisation tête à queue spontanée se produit et la séquence signal est relarguée. Le criblage

est alors réalisé directement dans les cellules. Cette stratégie a conduit à l'identification de nombreux ligands peptidiques en particulier pour des cibles PPI.^{75,76} Une autre méthode consiste en l'introduction d'un lien covalent sur les peptides issus de phage *display* après synthèse, comme le dibromoxylène permettant la formation de thioester avec des cystéines ou un lien disuccinimidyl entre l'amine *N*-ter et une lysine.⁷⁷

Le développement de système de translation *in vitro* (mRNA et ribosome *display*) ont permis d'étendre la méthode à l'introduction de résidus non naturels par utilisation des flexizymes, enzymes capables de charger n'importe quel tRNA avec un large panel de résidu non naturel. Grâce à cette technique, des bibliothèques de peptides incorporant des résidus contraints ou des résidus prompts à se cycliser dans le milieu réactionnel peuvent être préparés (Figure 21).

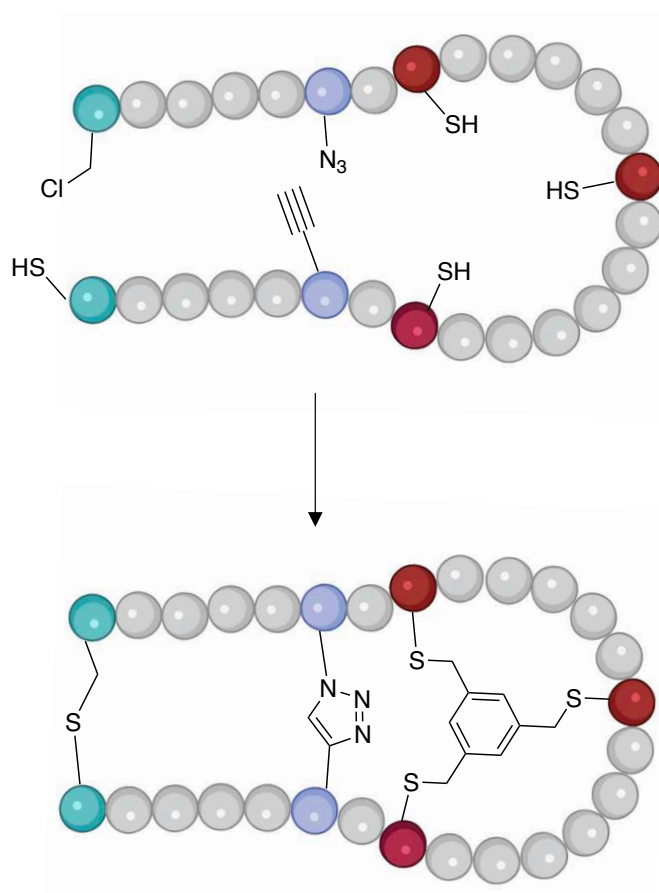


Figure 21- Exemples de cyclisation *in vitro*.

Par exemple, l'incorporation d'un groupement chloroacétyl en *N*-ter formant, avec la cystéine *C*-ter, un lien thioéther.⁷⁸ Il est également possible de réaliser une cyclisation entre chaînes latérales par cycloaddition de Huisgen ou encore par tricyclisation à l'aide

tribromométhylbenzène sur des cystéines.^{79,80} Plus récemment, une cyclisation entre les extrémité *C*-ter et *N*-ter basée sur la ligation chimique a été décrite.^{81,82}

Cette technique très prometteuse a permis de fournir des bibliothèques de peptides de structure sophistiquée pour le criblage de ligand dans des contextes où le criblage de petites molécules s'était montré infructueux. Bien qu'aucun médicament issu de cette technologie n'ait encore vu le jour, un peptide est actuellement en phase III d'essai clinique pour le traitement de la myasthénie grave, une maladie auto-immune neuromusculaire.⁸² Néanmoins, cette stratégie présente des inconvénients liés à la présence de mRNA sur les peptides criblés. En effet, des interactions non spécifiques entre le matériel génétique et les cibles polaires représentant 35% des protéines du génome peuvent fausser le criblage. Des interactions entre le peptide et l'ARN lui-même peuvent également se former. De plus, la mise en place de cette technique requiert un environnement propre exempt de RNAases pour éviter la dégradation des mRNA durant la sélection.

2.3. Conclusion

Les méthodes de criblage aléatoire permettent d'accéder très rapidement à des bibliothèques très large et les avancées technologiques permettent aujourd'hui de cribler ces bibliothèques en des temps records donnant ainsi accès très rapidement à des séquences possédant de bonnes affinités et efficacités pour une cible donnée. Néanmoins les séquences obtenues par ces méthodes ne sont généralement pas compatibles avec une utilisation *in vivo*. Les propriétés pharmacologiques sont alors optimisées dans un second temps. D'un autre côté, de nombreuses approches de conception rationnelle utilisant non plus uniquement la simple oligomérisation d'acides aminés mais toutes les réactions sophistiquées de la chimie organique (métathèse croisée, chimie click etc.) sont développées et permettent de créer des composés de manière plus intégrative en prenant en considération toutes les propriétés nécessaires à l'activité du peptide *in vivo* dès sa conception. Ces méthodes sont à ce jour principalement limitées par le défi du *design in silico* dans le domaine des peptides lié à la complexité des repliements, la nature des interactions, aux changements subtiles de conformation des peptides un fois liés à leur cible, et surtout à l'absence de données structurales dans de nombreux cas. Le résultat est que bien souvent, l'approche rationnelle conduit à une première

touche d'affinité modérée et c'est ensuite par des campagnes d'optimisation que celle-ci est améliorée. Ceci passe par la synthèse de bibliothèques/cribleurs le plus souvent réalisée par synthèse parallèle, méthode chronophage et coûteuse pouvant freiner la découverte de nouveaux peptides bioactifs. Les récents développements dans le domaine du mRNA *display* permettent l'accès à des bibliothèques de peptide de structure plus complexe et pourrait entraîner une percée dans ce domaine. Néanmoins, l'accès à des squelettes complexes incorporant par exemple des agrafes de nature à améliorer les propriétés pharmacocinétiques des peptides, tel que cela est fait aujourd'hui en *design rationnel*, n'est pas encore à l'ordre du jour.

Le développement de nouvelles méthodes d'accès à de larges bibliothèques de peptides de structure 3D complexe représentent donc toujours un enjeu dans le développement de futurs peptides médicaments.

3. Développement d'une méthode d'accès à des bibliothèques peptidiques par chimie combinatoire dynamique

3.1. La chimie combinatoire dynamique

Depuis son apparition dans les années 1990 grâce à l'essor de la chimie supramoléculaire et aux travaux de Jean Marie Lehn, la chimie combinatoire dynamique (DCC) est devenue un outil précieux dans les domaines de la chimie et de la biologie, en particulier pour la découverte de nouvelles molécules bioactives.⁸³⁻⁸⁸ Elle repose sur la formation de liaisons réversibles, covalentes ou non, entre différentes entités appelée *building blocks* (BB) de manière à créer une bibliothèque combinatoire dynamique (DCL) où toutes les combinaisons de produits sont représentées et en équilibre thermodynamique les unes avec les autres au sein du mélange. Un changement des conditions expérimentales de la bibliothèque conduit à un réarrangement de cette dernière afin de répondre aux nouvelles conditions qui lui sont imposées. En particulier, l'introduction d'une protéine cible dans la bibliothèque conduira à une auto-réorganisation de celle-ci selon la loi de Le Chatelier, en faveur du produit de la DCL avec lequel elle s'est liée (Figure 22). Celui-ci sera donc majoritairement formé au dépend des autres membres. Ce phénomène est communément appelé amplification.⁸⁵ La chimie

combinatoire dynamique propose donc de réunir la synthèse et le criblage en une étape unique puisque la cible guide la synthèse du produit qui lui est le plus adapté.

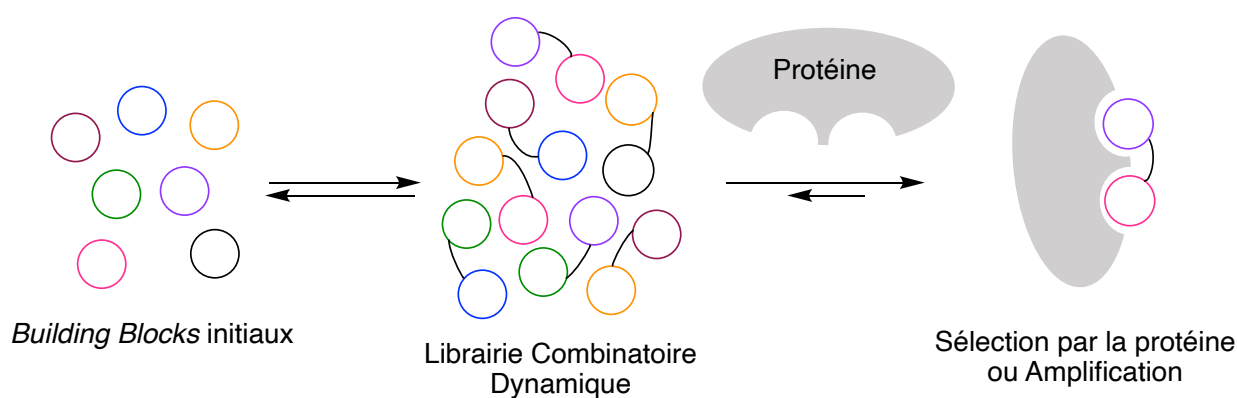


Figure 22 - Principe de la chimie combinatoire dynamique.

Il existe de très nombreux exemples d'application de la chimie combinatoire dynamique.⁸⁹ Afin d'illustrer cette stratégie, nous décrirons ici quelques exemples.

Le groupe de Greaney a choisi d'utiliser la DCC pour identifier des inhibiteurs de la glutathion S-transférase, jouant un rôle important dans la détoxification.⁹⁰ Pour cela, une librairie dynamique est générée par réaction entre le GSH (γ -Glu-Cys-Gly) et différents fragments par réaction d'échange thiol/énone réversible à pH physiologique avec la chaîne latérale de la cystéine. En comparant les chromatogrammes des librairies obtenues avec et sans enzyme, ils observent l'amplification d'un signal qu'ils identifient ensuite en spectrométrie de masse. Après synthèse individuelle, des CI_{50} de l'ordre du bas μ M sont mesurées pour ces produits (Figure 23).

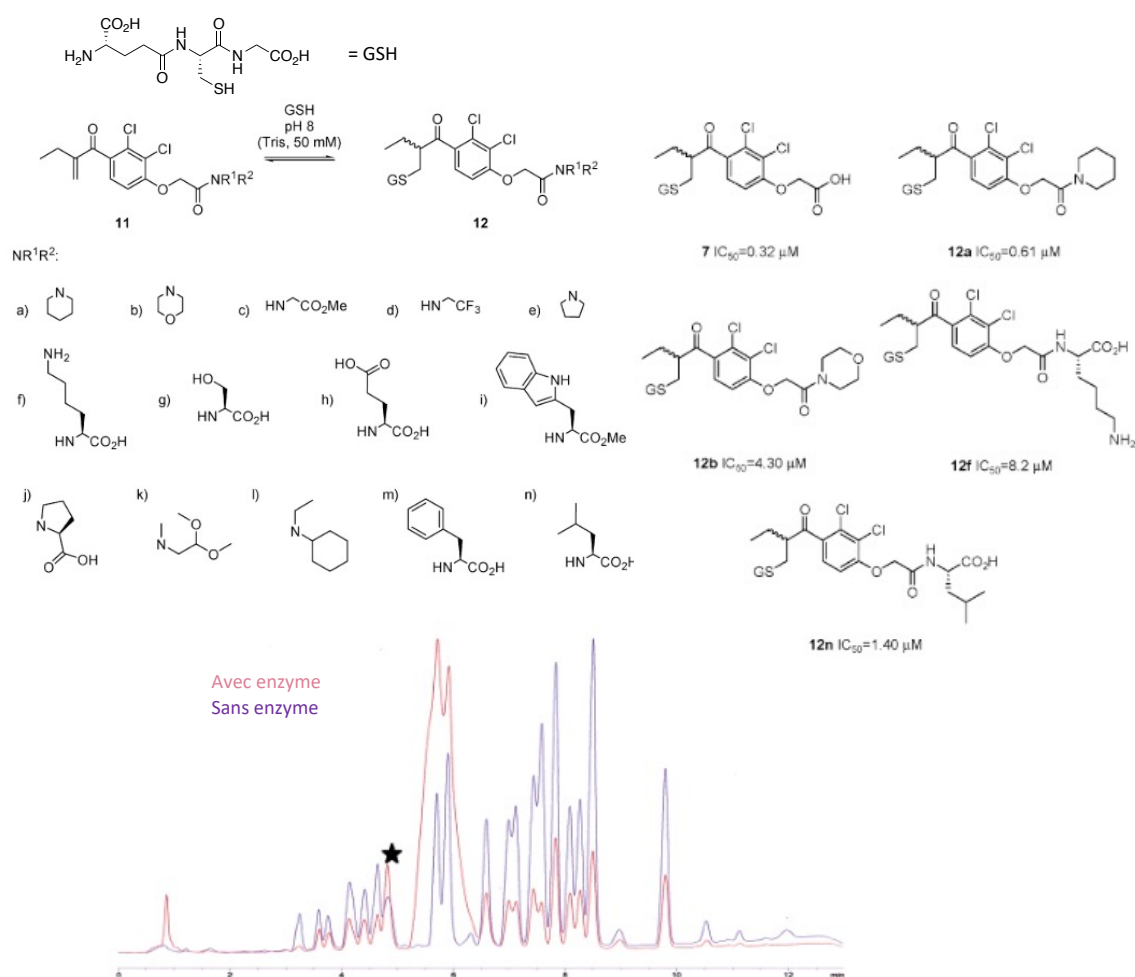


Figure 23 - Résultats obtenus par le groupe de Greaney.⁹⁰

En haut à gauche: réaction et réactif utilisés, en haut à droite : molécules amplifiées, en bas : superposition des chromatogrammes obtenus avec et sans enzyme.

Fu *et al.*⁹¹ utilise la chimie combinatoire dynamique pour identifier des inhibiteurs de l'UDP-galactopyranose mutase impliquée dans la biosynthèse des membranes cellulaires des mycobactéries. Ils choisissent la formation d'acylhydrazone pour la formation petites bibliothèques dynamiques entre deux fragments porteurs des groupements aromatiques. L'analyse par HPLC des bibliothèques en absence et en présence d'enzyme montre l'amplification de deux composés en présence de la cible (Figure 24). Après resynthèse, et mesure individuelle des activités de chacun, ils montrent que le composé H3+A1 est un ligand puissant des 3 principales l'UDP-galactopyranose mutases d'*E. coli* avec des K_d de l'ordre du μM et une activité antimicrobienne intéressante avec des concentrations minimales inhibitrices faible (MIC) de l'ordre de $25 \mu\text{g/mL}$.

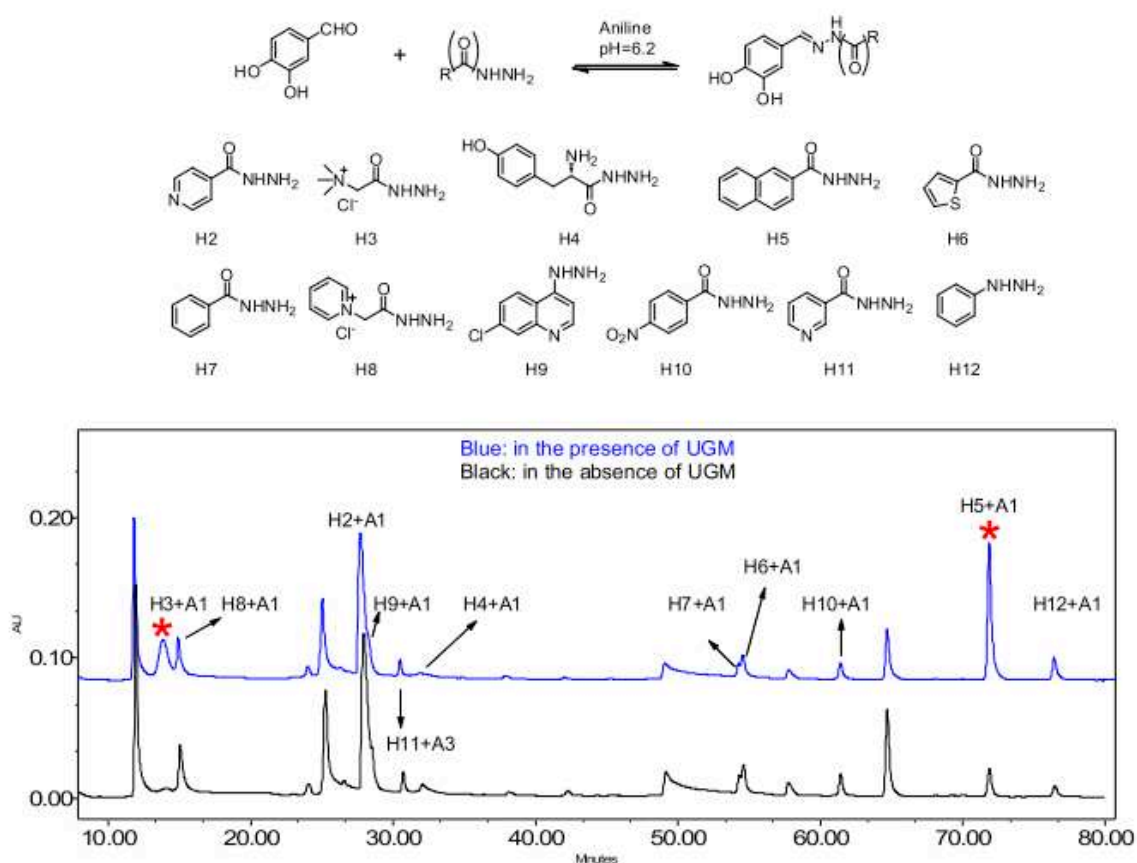


Figure 24 - Composés générés lors de l'échange hydrazide/aldéhyde et superposition des chromatogrammes obtenus par le groupe de Vincent.⁹¹

Le groupe de O'Brien s'est quant à lui intéressé à l'inhibition de la caspase-3, enzyme impliquée dans des processus apoptotiques par chimie combinatoire dynamique. Une réaction d'échange thiol/disulfure est utilisée pour greffer sur un ligand de l'enzyme une très large librairie de fragments.⁹² Ils ont développé une stratégie de DCC originale où la réaction s'effectue directement sur la cible. Cette enzyme a la particularité de posséder un résidu cystéine nucléophile dans son site actif. Celui-ci est exploité pour lier de manière covalente le 1^{er} ligand sur l'enzyme. La librairie est alors générée par réaction du second fragment par l'échange de disulfure. Une large collection de 7000 fragments a ainsi été criblée. Après identification des molécules les plus affines, celles-ci sont resynthétisées en remplaçant le lien disulfure instable *in cellulo* par un lien phénolique, ils obtiennent deux composés inhibiteurs de la caspase-3 avec des K_i de 0,2 et 0,33 μM plus ou moins sélectifs des autres caspases (Figure 25).

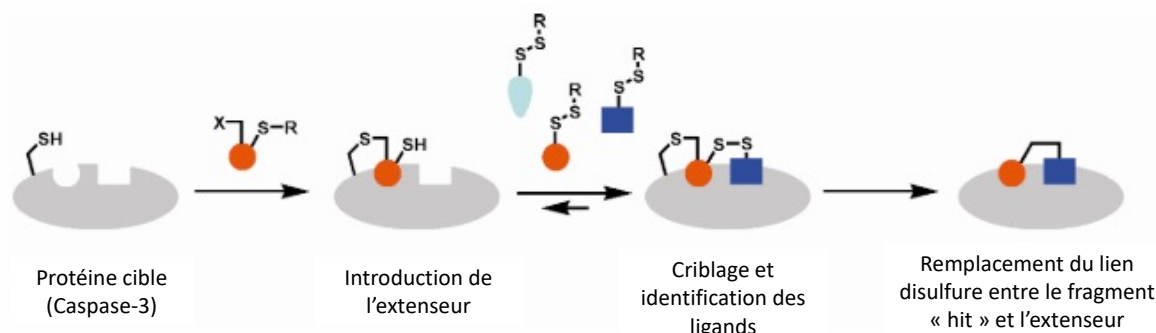


Figure 25 - Stratégie de chimie combinatoire développée par le groupe de O'Brien pour la sélection d'inhibiteurs de la Caspase-3.⁹²

3.2. Application de la DCC aux peptides

La chimie combinatoire dynamique a été peu appliquée à la synthèse de peptides ou peptidomimétiques jusqu'à maintenant, il existe néanmoins quelques exemples dans la littérature.⁹³ Une première approche consiste à utiliser la DCC pour assembler la séquence peptidique des acides aminés (Figure 26). Néanmoins, la formation de liens amide n'étant pas réversibles en milieux aqueux, des substitués de lien amides sont le plus généralement utilisés conduisant alors à des peptidomimétiques.⁸⁹

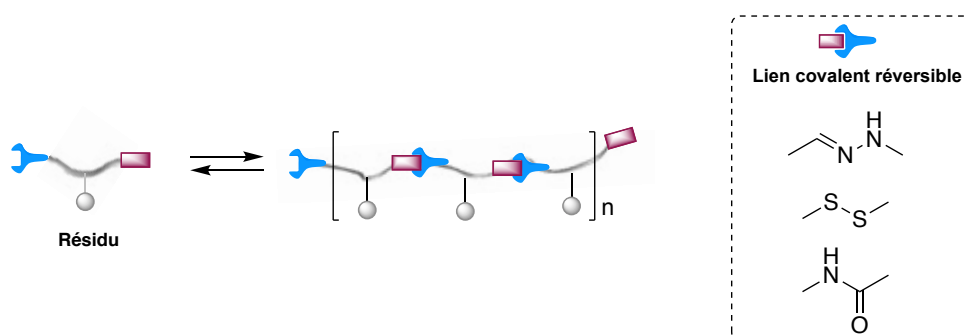


Figure 26 - Schéma de DCC appliqué à la formation de liaison peptidique.

Lam *et al.* ont généré des bibliothèques dynamiques basées sur un lien acylhydrazone formés à partir d'aldéhydes et d'hydrazides pour l'assemblage de dipeptides en oligomères cycliques plus longs (Figure 27). Cette bibliothèque a été criblée vis-à-vis de l'acétylcholine et après plusieurs jours d'équilibration, l'amplification de composés atypiques de type [2]-caténane a été observée.⁹⁴

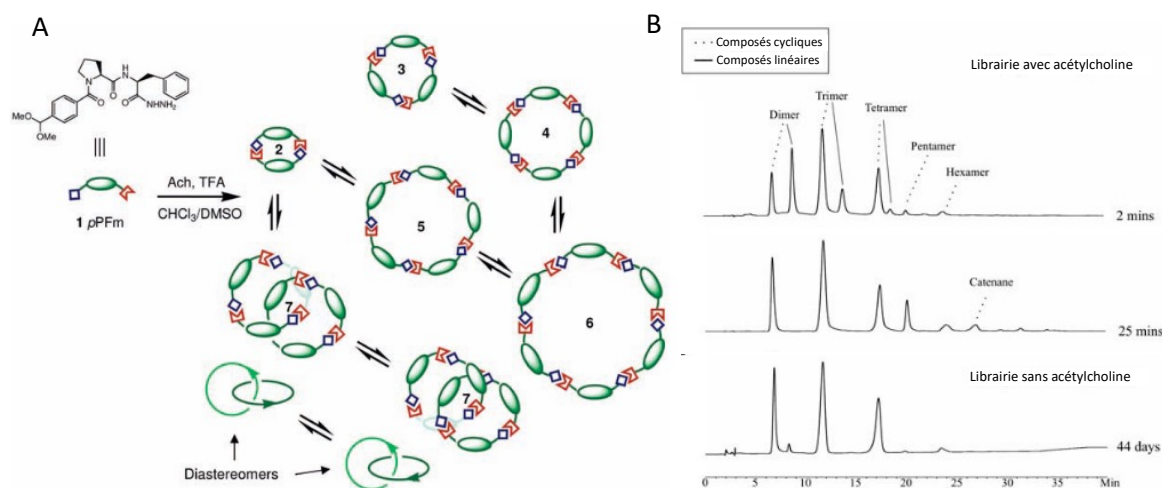


Figure 27 - Amplification de peptides hydrazides par l'acétylcholine.⁹⁴

A : structure de la brique peptidique hydrazide. B : chromatogrammes obtenus après 2 minutes, 25 minutes, 3 jours et 44 jours de réaction avec apparition du caténane. C : structure du composé de type [2]-caténane

Deux stratégies permettant l'accès à des peptides formés par des liens amides natifs ont également été proposés. Le groupe de Ulijn a utilisé une enzyme protéolytique, la thermolysine, catalysant l'hydrolyse et la formation de liaison amide (Figure 28). Des bibliothèques de dipeptides composés d'un résidu phénylalanine et d'un résidu à caractère acide ou basique ont été générés en milieu aqueux à pH 7.4. La thermolysine assure la réversibilité de la réaction entre les blocs. L'addition de chitosane ou d'héparine dans la bibliothèque permet d'amplifier la séquence dipeptidique la plus apte à se lier à l'un ou l'autre de ces sucres. Cette amplification résulte en la formation de nanotubes ou nanofeuillets en fonction du sucre ajouté et a été visualisée par HPLC, microscopie électronique à transmission (TEM) permettant d'observer la formation des structures supramoléculaires.⁹⁵

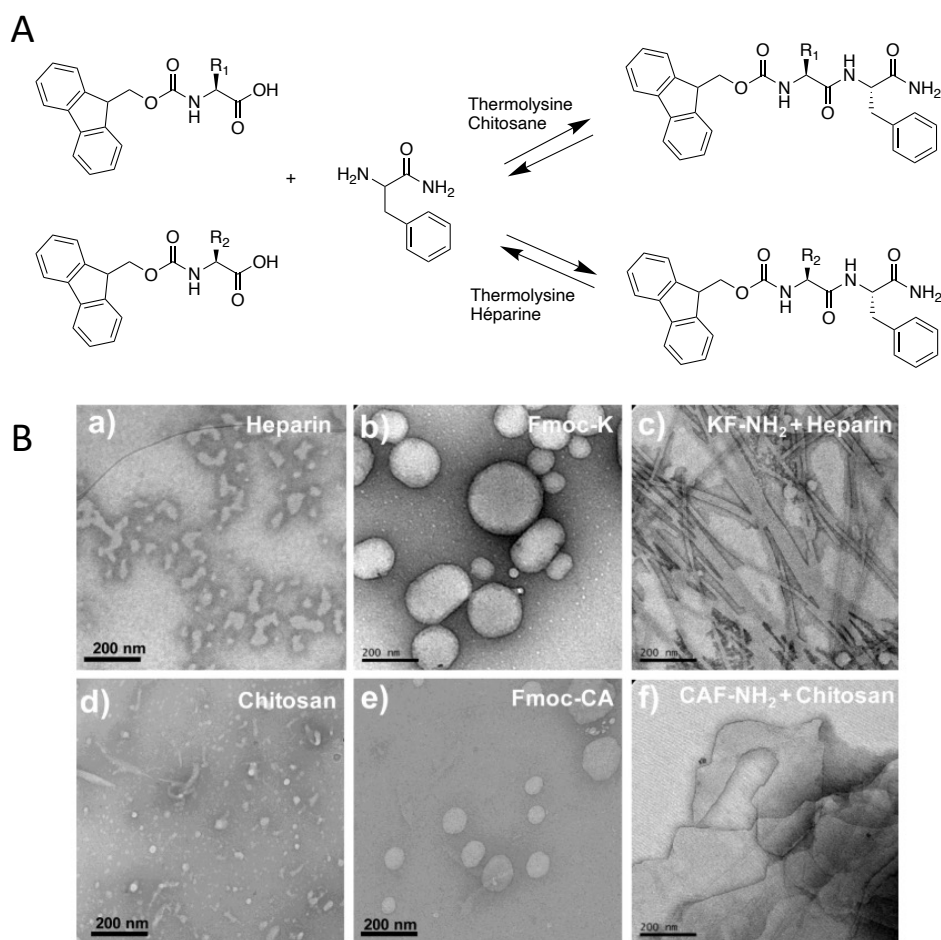


Figure 28 - Amplification de dipeptides, générés grâce à la thermolysine, par l'héparine ou le chitosane.⁹⁵

A : Schéma réactionnel entre des peptides porteurs de chaîne latérale basique (R1), de chaîne latérale basique (R2) et de phénylalanine amide. B : images TEM a) d'héparine, b) de peptide fmoc-lysine, c) du dipeptide fmoc-lysine-phénylalanine en présence d'héparine, d) de chitosane, e) de peptide porteur d'une chaîne $\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, c) du dipeptide $\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ -phénylalanine en présence de chitosane.

Ruff et al. ont judicieusement choisi d'exploiter la ligation chimique native, stratégie très utilisée pour la synthèse de protéine par voie chimique (Figure 29). Pour se faire, des séquences peptidiques situées de part et d'autre d'une *N*-(acétyl)-cystéine sont échangées par transthioestérification réversible permettant le brassage des séquences. La réaction a lieu en milieu aqueux à pH 7 et en présence d'un réducteur permettant d'éviter la formation de pont disulfures. L'évolution du mélange est suivie par HPLC et les séquences identifiées par MS. En revanche, aucune application biologique basée sur cette chimie n'a été décrite à ce jour.⁹⁶

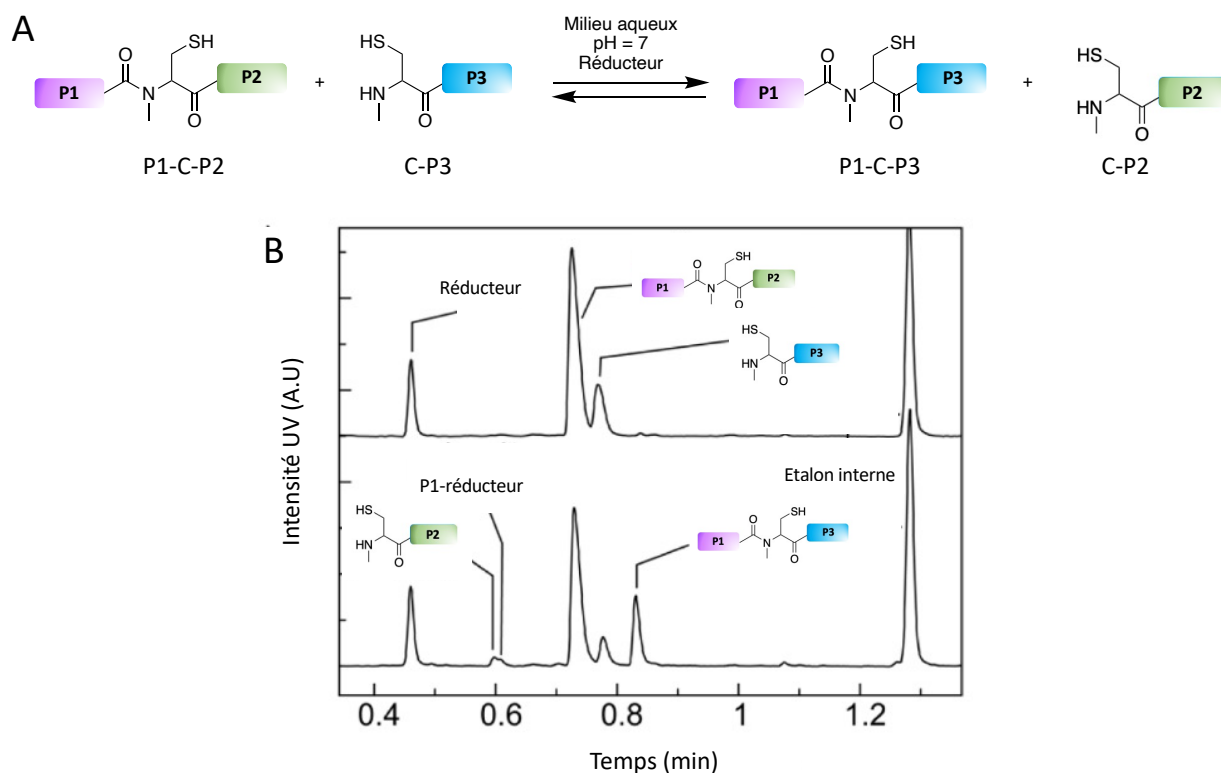


Figure 29 - Chimie combinatoire dynamique appliquée à la ligation chimique.⁹⁶

A : Schéma réactionnel de la réaction de ligation. B : Chromatogramme de l'évolution de la librairie à $t=0h$ (en haut) et $t=98h$ (en bas).

Une autre approche consiste à assembler plusieurs petits fragments peptidiques flexibles de manière à accéder à une structure protéique tridimensionnelle plus large (Figure 30).

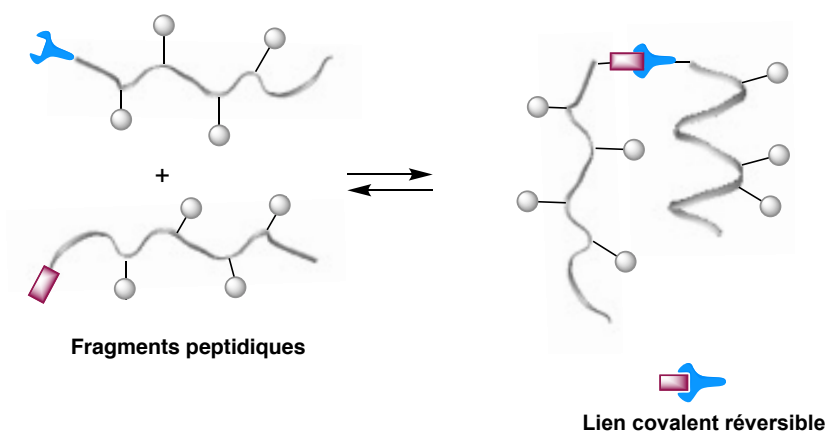


Figure 30 - Assemblage de fragments peptidiques par chimie combinatoire dynamique résultant en structure tridimensionnelle plus étendue.

Les travaux du groupe de Gellman, pionnier dans ce domaine, consistent à assembler des fragments peptidiques par une réaction de transthioestérification (Figure 31) et à étudier la

stabilité conformationnelle des structures formées par mesure de la constante d'équilibre de la réaction.⁹⁷ La réaction est conduite en milieu aqueux à pH 7 et suivie par HPLC. Cette méthode a été appliquée pour étudier la stabilité de structure de type coiled-coil ou β -hairpin.⁹⁸

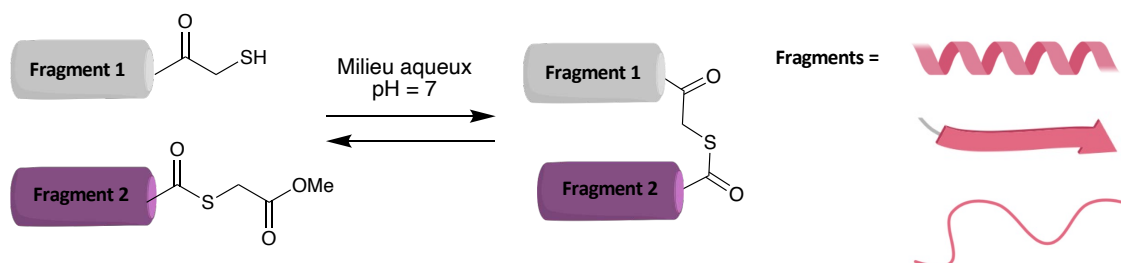


Figure 31 - Échange thiol/thioester entre deux fragments peptidiques conduisant à un peptide structuré.⁹⁷

Bartus *et al.* utilise une stratégie similaire pour accéder cette fois à des peptidomimétiques 3D capables de reconnaître une protéine cible, la calmoduline. Pour cela, des courts foldamères composés de β -peptides conçus pour se structurer en hélice et portant une cystéine en *C*-ter, réagissent ensemble *via* à échange thiol/disulfure par chimie combinatoire dynamique formant ainsi une structure de type α -hairpin (Figure 32).⁹⁵ La réaction de DCC a lieu dans un milieu tamponné a pH 7.4 contenant un réducteur. Les séquences amplifiées sont identifiées après séparation des complexes RL par filtration centrifuge, dissociation de la protéine et analyse par HPLC, RMN ou titration calorimétrique isotherme (ITC pour *isothermal titration calorimetry*). Des β -peptides possédant des affinités de l'ordre du nM pour la calmoduline ont ainsi pu être obtenus.

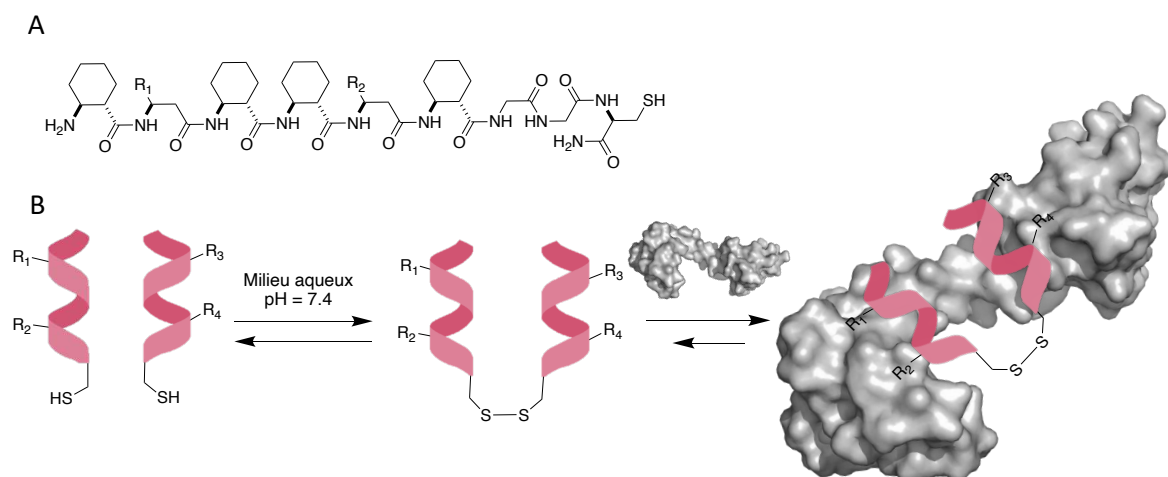


Figure 32 - Système développé par Bartus *et al.* pour identifier des ligands de la calmoduline.⁹⁹

A : structure du foldamères hélicoïdal utilisé (R_1 et R_2 = chaîne latérale d'acide aminé β). B : schéma réactionnel entre deux foldamères porteurs de chaînes latérales R_1 , R_2 , R_3 , R_4 et amplification par la calmoduline.

Le groupe de Anslyn. a généré des macrocycles à partir de peptides porteurs de fonctions aldéhydes et des peptides porteurs de fonctions hydrazides pour l'accès à des agents antibactériens (Figure 33). Les réactions ont lieu en milieu aqueux et sont analysées par MS, RMN et électrophorèse capillaire sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Le criblage de ces composés vis-à-vis des différentes bactéries dont *Staphylococcus aureus* a permis d'identifier des molécules avec de bonnes activités antibactériennes.¹⁰⁰

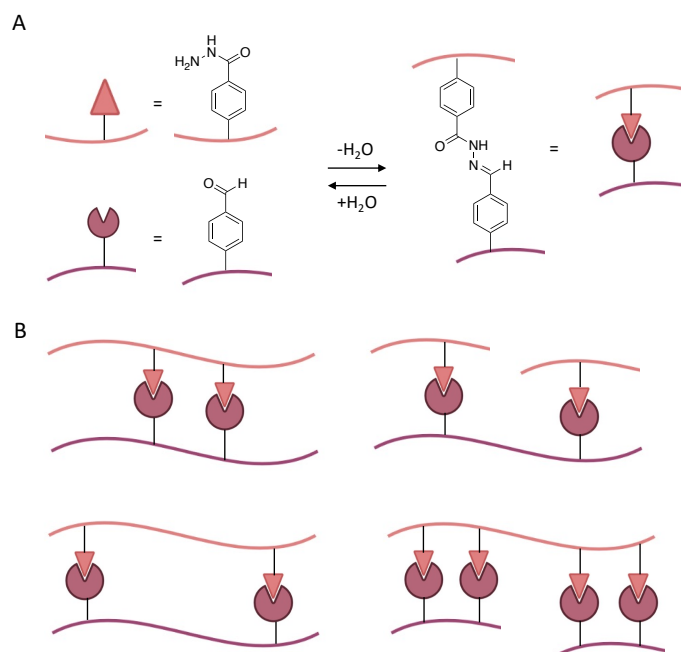


Figure 33 - Macrocycles générés par chimie combinatoire dynamique.¹⁰⁰
 (A) Schéma réactionnel, (B) exemple de structures générées.

La DCC a également été appliquée au greffage de chaînes latérales, d'acides aminés ou autres, sur des plateformes portant diverses fonctions réactives, des molécules organiques^{101,102}, des polymères¹⁰³⁻¹⁰⁵, des nanoparticules¹⁰⁶, ou encore des peptides.¹⁰⁷(Figure 34)

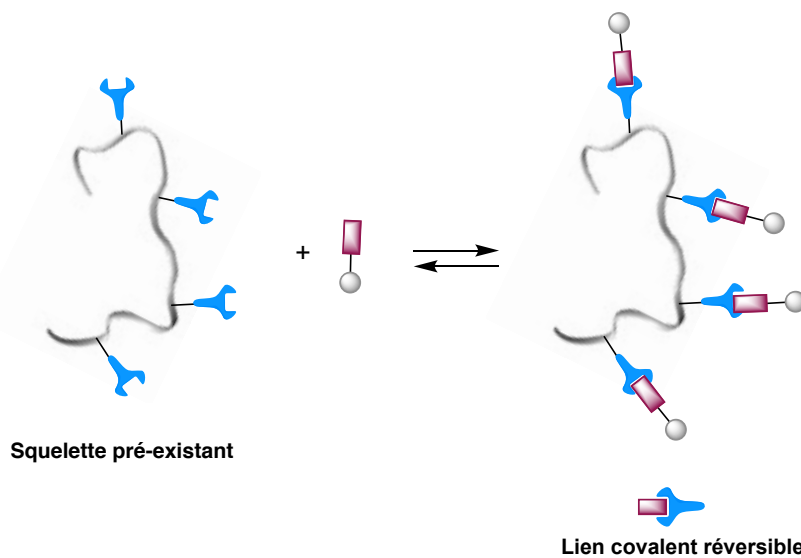


Figure 34 - Greffage de chaînes latérales sur une plateforme préexistante.

Le premier exemple a été décrit par Mahon *et al.*, qui applique la chimie combinatoire dynamique à la fonctionnalisation d'un polymère porteur de plusieurs fonction aldéhyde (Figure 35). Ils génèrent des bibliothèques dynamiques par formation réversible d'acylhydrazones dans un milieu tamponné à pH 4.5. La cible est immobilisée sur support solide permettant

l'isolation du complexe. Les bibliothèques avant et après addition de la cible sont analysées par RMN.¹⁰⁵ A travers l'addition de cibles biologiques comme la BSA (pour *Bovine Albumin Serum*), ils montrent le déplacement de l'équilibre en faveur des polymères ayant les interactions les plus favorables avec la cible. Cette stratégie reste à démontrer sur des cibles d'intérêt biologique.

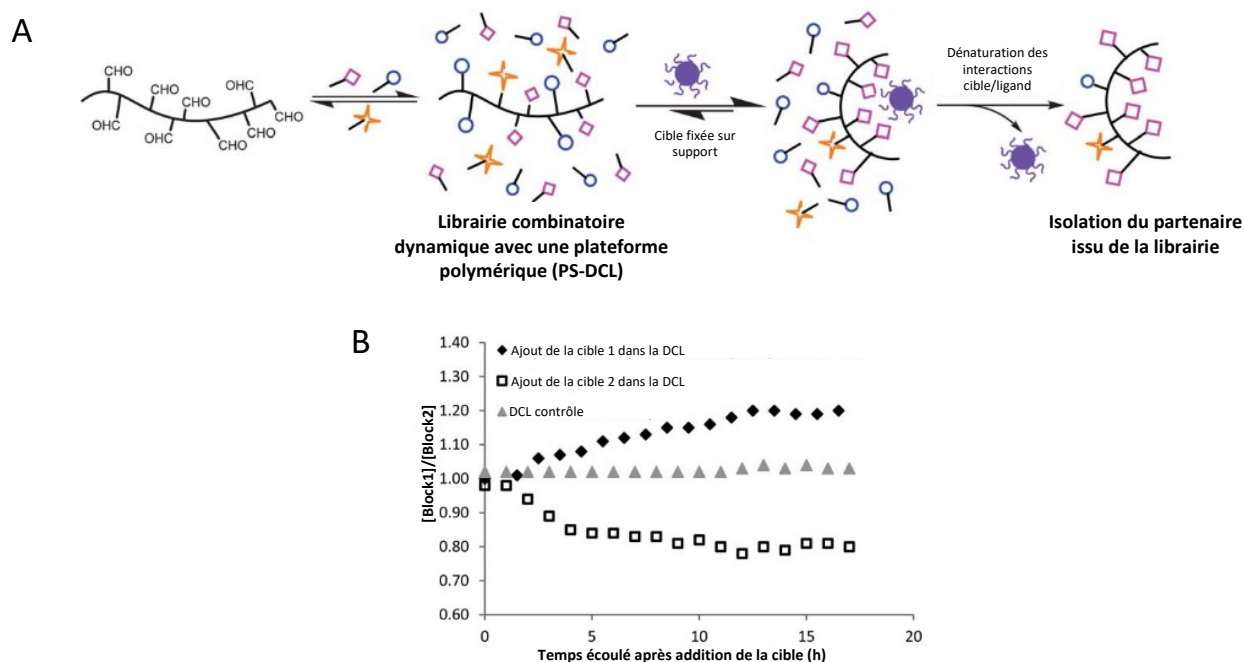


Figure 35 - Chimie combinatoire dynamique sur un squelette polymérique avec amplification par une cible supportée.¹⁰⁵

A : Schéma du système de chimie combinatoire dynamique entre le polymère porteur de fonction aldéhyde bricole d'hydrazine, amplification par une cible fixée sur support puis isolation du polymère ayant la meilleure affinité pour la cible. B : Évolution des concentrations, dans la bibliothèque, du bloc hydrazine n°1 par rapport au bloc hydrazine n°2 dans le temps après ajout de deux cibles différentes.

Ura *et al.* a décrit la fonctionnalisation dynamique d'une séquence peptidique polycystéine par transthioestérification sur des thioesters porteurs de bases azotées pour générer des mimes de PNA appelés tPNAs (thioester peptide nucleic acid) (Figure 36). Après génération de la bibliothèque de tPNAs et analyse des produits par spectrométrie de masse MALDI, l'introduction de différents oligonucléotides conduit à l'amplification des séquences tPNA complémentaires à l'oligonucléotide introduit par déplacement de l'équilibre de la réaction.¹⁰⁴

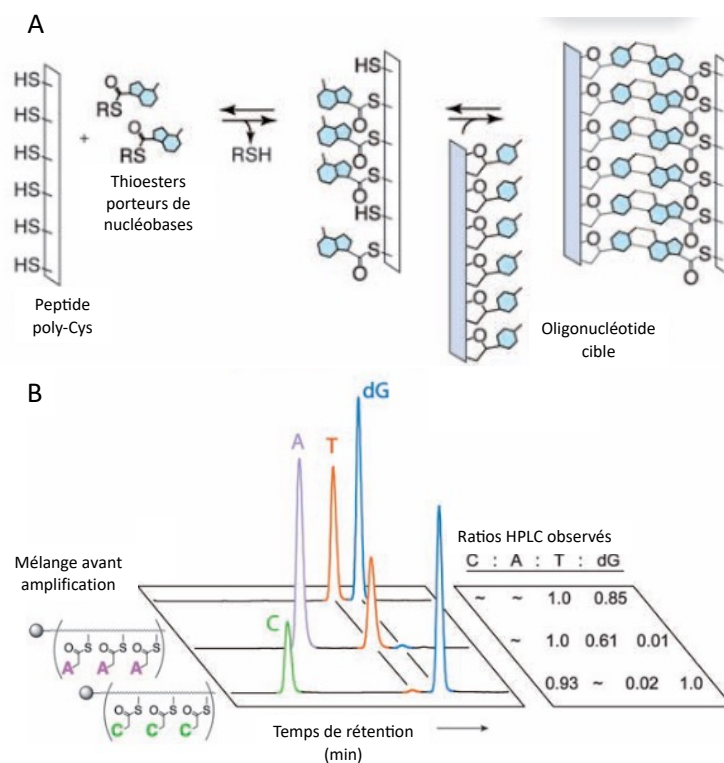


Figure 36 - Génération de librairie de tPNA par chimie combinatoire dynamique.¹⁰⁴

A : Fonctionnalisation d'un peptide polycystéines par des thioesters porteurs de base azotée puis amplification par ajout d'oligonucléotide. B : Trace HPLC et ratio correspondant observé avant et après ajout d'oligonucléotide.

Le groupe de Otto a mis en place une stratégie de fonctionnalisation de nanoparticules d'or par chimie combinatoire dynamique basée sur la formation de liaisons imines en milieu aqueux entre des nanoparticules possédant à leur surface des fonctions aldéhydes et des blocs amines (Figure 37).¹⁰⁶ Les nanoparticules fonctionnalisées uniquement en présence de cible, comme l'ADN, sont facilement isolables par filtration centrifuge. Les amines libres peuvent donc être quantifiées par HPLC et permettent d'identifier celles qui ont réagi. Les nano-objets sont finalement traités par de l'hydroxylamine afin de cliver les liaisons imines et libérer ainsi les amines correspondantes qui peuvent alors être quantifiées.

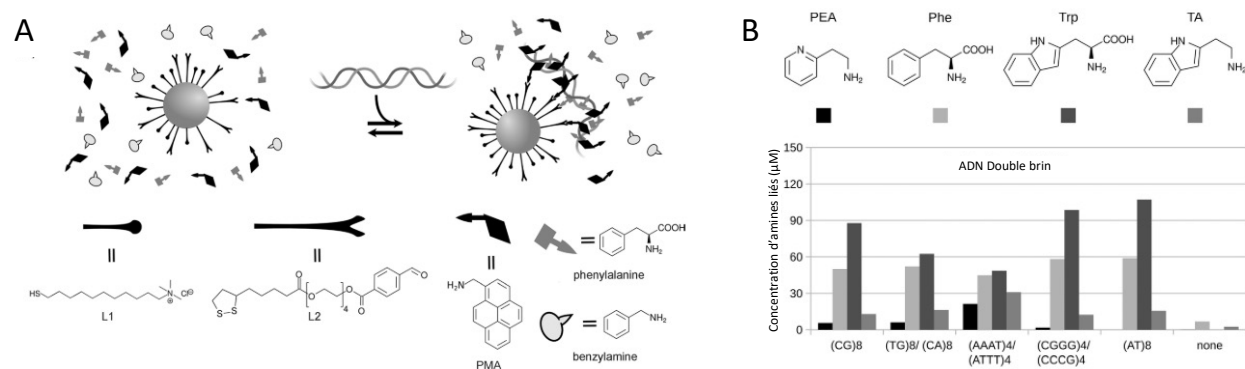


Figure 37 - Fonctionnalisation de nanoparticules d'or par chimie combinatoire dynamique et amplification par ADN.¹⁰⁶

A : Schéma de la stratégie de fonctionnalisation de nanoparticules d'or par chimie combinatoire dynamique en présence d'ADN double brin. B : Évolution de la concentration en amines liés aux nanoparticules en fonction des bases azotées composant l'ADN double brin utilisé.

Les systèmes de DCC décrit dans les exemples précédents incluent l'utilisation de plateformes sur lesquels les chaînes latérales vont être greffées dans des orientations aléatoires. Récemment, des stratégies basées sur la DCC ont également été développées sur des *scaffolds* structurés où les orientations obtenus pour ces chaînes latérales vont être contrôlées.

En 2017, le groupe d'Hamilton a décrit l'utilisation de foldamères mimes d'hélices α comme plateforme pour le greffage de chaîne latérale par DCC (Figure 38). Ainsi, un oligoamide aromatique portant des fonctions aldéhydes réagit avec des blocs hydrazines de manière à créer une librairie dynamique de peptidomimes pré-organisés. Cet échange est effectué dans un mélange DMSO/tampon acétate à un pH de 4.2. L'objectif est d'appliquer cette stratégie à la découverte de nouveaux inhibiteurs d'interaction protéine-protéine impliquant une hélice α .¹⁰¹ Néanmoins, les conditions utilisées dans cette stratégie (DMSO, pH 4,2) ne sont pas compatibles avec de telles cibles et il resterait ici à adapter ces conditions afin de pouvoir envisager cette réaction dans de telles applications.

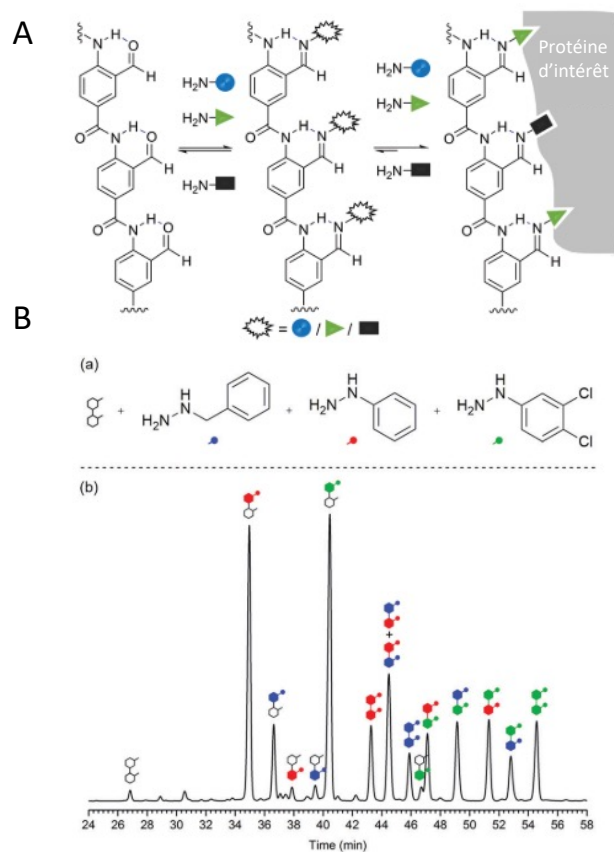


Figure 38 - Utilisation de la chimie combinatoire dynamique pour fonctionnaliser un squelette organique.¹⁰¹

A : Schéma du système de chimie combinatoire dynamique entre le peptidomimétique oligoaldéhyde et les *building blocks* porteur de fonction amine et amplification avec une protéine d'intérêt. B(a) : génération d'une librairie dynamique entre une plateforme porteuse de deux aldéhydes réactionnels et 3 briques aromatiques hydrazine. B(b) : chromatogramme de la librairie avec attribution des pics correspondants aux espèces formées.

Le groupe d'Ulrich a utilisé un *scaffold* peptidique structuré en β -*hairpin* portant à sa surface des groupements aldéhydes réactifs vis-à-vis de blocs hydrazides pour le greffage de chaînes cationiques capables d'interagir avec l'ADN.¹⁰⁷ Après réaction dans un tampon acétate à pH 5, ils observent en HPLC et en MALDI-MS la formation des liens acylhydrazones entre les différents réactifs. Après introduction dans la librairie d'un ADN double brin, ils montrent la complexation de la structure portant 4 chaînes latérales arginine. Le complexe a été caractérisé par fluorescence, électrophorèse et ITC. Après addition de méthoxyamine au complexe ADN-ligand, ils observent le relargage de l'ADN par échange avec les chaînes latérales cationiques (Figure 39).

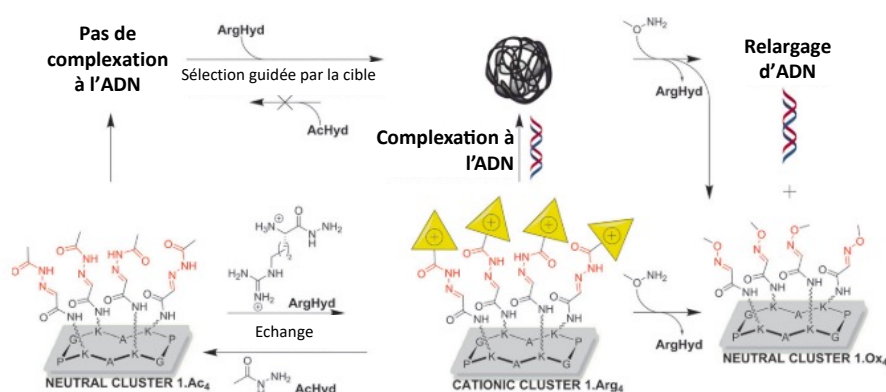


Figure 39. Fonctionnalisation d'une plateforme peptidique par des blocs hydrazides et complexation à l'ADN.¹⁰⁷

Cependant, l'aspect combinatoire n'a pas été considérée dans cette stratégie puisqu'un seul bloc hydrazide capable de reconnaître l'ADN est utilisé en large excès et un seul composé peut donc être obtenu. De plus, là encore les conditions de l'échange (pH 5) restent limitées en termes d'application biologique. Néanmoins cet exemple qui combine un *scaffold* 3D conçu rationnellement pour se structurer en β -*hairpin* avec un auto-assemblage des chaînes latérales en présence de la cible représente une stratégie intéressante pour l'accès à des systèmes permettant de sélectionner les chaînes latérales à la surface du *scaffold* les plus aptes à interagir avec une cible.

3.3. Objectif du projet de thèse

L'objectif de ce projet de thèse est de mettre au point une nouvelle stratégie combinant la conception rationnelle de peptides structurés et l'aspect aléatoire de la chimie combinatoire dynamique. (Figure 40)

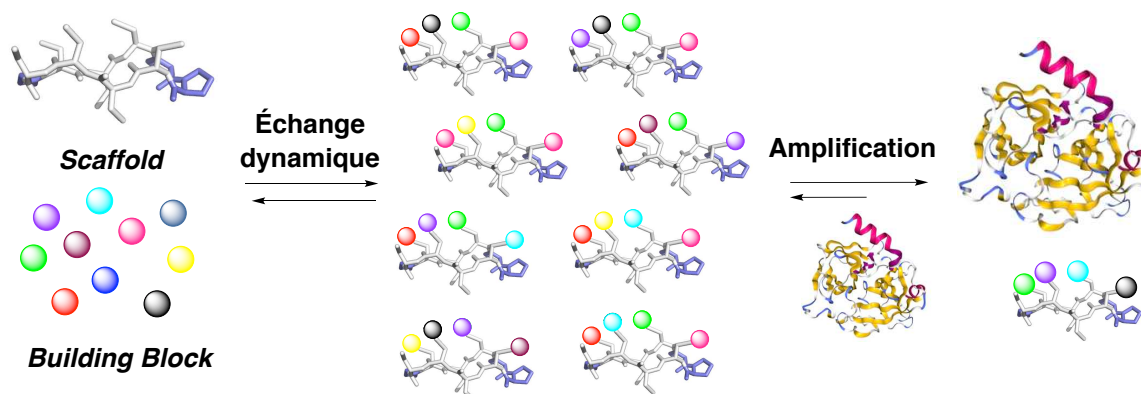


Figure 40 - Application de la chimie combinatoire dynamique au greffage de groupements à la surface d'un peptide de structure définie.

Pour ce faire, les chaînes latérales d'acides aminés sont greffées par auto-assemblage sur une plateforme 3D, conçue de manière rationnelle, et possédant à sa surface des fonctions capables de réagir de manière réversible. La réaction d'échange, effectuée dans des conditions physiologiques, entre le *scaffold* et les différents blocs utilisés portant les chaînes latérales des acides aminés conduit à une bibliothèque de peptides fonctionnalisés de structure bien définie, en équilibre thermodynamique, possédant de multiples combinaisons de chaînes latérales. Lors de l'ajout d'une cible biologique, l'équilibre de cette librairie se verra déplacée vers la formation de l'espèce qui aura le plus d'affinité pour cette cible au détriment des autres. Cette stratégie est appliquée à la conception de nouveaux peptides bioactifs inhibiteurs sélectifs de protéase à sérine. Ces enzymes sont impliquées dans de multiples processus physiologiques. Éléments clé de la réponse inflammatoire, leur dérégulation est à l'origine de nombreuses pathologies de premier plan en santé public comme le psoriasis, la maladie Crohn ou encore certaines maladies neurodégénératives et pulmonaires. De ce fait, elles sont cibles de nombreuses recherches visant à la découverte de molécules capables de moduler leur activité.

Ce manuscrit présente les différentes étapes qui ont été nécessaires à l'élaboration de la stratégie.

- Le **Chapitre I** est consacré à la mise en place des librairies combinatoires dynamiques, travail commencé par Benjamin Zagiel dans le cadre de sa thèse (2015-2018). D'abord, le choix de la réaction de DCC est explicité. Le travail de conception, de synthèse et de caractérisation des différents éléments impliqués dans cette stratégie, réalisé en amont ou pendant ce projet de thèse, est développé. Puis la réaction est décrite avec une plateforme simple ne comportant qu'un site de fonctionnalisation. Ce système a permis l'optimisation des conditions réactionnelles, l'observation de l'influence de la nature des blocs et l'étude de la réversibilité de la réaction. Enfin, après avoir réalisé une première librairie sur ce système à un seul site, la structure de la plateforme a été complexifiée donnant accès à des librairies dynamiques plus importantes.
- Le **Chapitre II** est consacré à la mise au point des conditions d'analyse nécessaires à l'identification des peptides générés dans les librairies. Après avoir évoqué les problèmes liés à l'analyse de peptides cycliques et les différentes stratégies précédemment utilisées pour analyser les produits, de nouvelles méthodologies sont décrites et ont permis la caractérisation par HPLC-UV visible et par spectrométrie de masse des librairies.
- Pour finir, le **Chapitre III** porte sur l'étape d'amplification par les protéases à sérine. Après une introduction sur ces enzymes protéolytiques et leurs inhibiteurs, la méthodologie de l'étape d'amplification a proprement parlé est décrite. Après des expériences de modélisation permettant l'accès à de nouveaux *scaffolds*, elle est finalement appliquée à la plasmine dans le but d'identifier un inhibiteur sélectif de celle-ci comme preuve de concept.

Étendre à d'autres cibles thérapeutiques cette nouvelle stratégie basée sur la chimie combinatoire en utilisant différents *scaffolds* structurés est le but ultime recherché.

Références

- (1) Fosgerau, K.; Hoffmann, T. Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (1), 122–128.
- (2) Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S.; Price, D. The Future of Peptide-Based Drugs. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81* (1), 136–147.
- (3) Bozovičar, K.; Bratkovič, T. Evolving a Peptide: Library Platforms and Diversification Strategies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (1).
- (4) Bakail, M.; Ochsenbein, F. Targeting Protein–Protein Interactions, a Wide Open Field for Drug Design. *Comptes Rendus Chim.* **2016**, *19* (1–2), 19–27.
- (5) Muttenthaler, M.; King, G. F.; Adams, D. J.; Alewood, P. F. Trends in Peptide Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (4), 309–325.
- (6) Lau, J. L.; Dunn, M. K. Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26* (10), 2700–2707.
- (7) Hruby, V. J.; Al-Obeidi, F.; Kazmierski, W. Emerging Approaches in the Molecular Design of Receptor-Selective Peptide Ligands: Conformational, Topographical and Dynamic Considerations. *Biochem. J.* **1990**, *268* (2), 249–262.
- (8) Recio, C.; Maione, F.; Iqbal, A. J.; Mascolo, N.; De Feo, V. The Potential Therapeutic Application of Peptides and Peptidomimetics in Cardiovascular Disease. *Front. Pharmacol.* **2017**, *7* (JAN), 1–11.
- (9) Ovadia, O.; Greenberg, S.; Laufer, B.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H. Improvement of Drug-like Properties of Peptides: The Somatostatin Paradigm. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *5* (7), 655–671.
- (10) Parrott, M. C.; DeSimone, J. M. Drug Delivery: Relieving PEGylation. *Nat. Chem.* **2012**, *4* (1), 13–14.
- (11) Guryanov, I.; Bondesan, A.; Visentini, D.; Orlandin, A.; Biondi, B.; Toniolo, C.; Formaggio, F.; Ricci, A.; Zanon, J.; Cabri, W. Innovative Chemical Synthesis and Conformational Hints on the Lipopeptide Liraglutide. *J. Pept. Sci.* **2016**, No. March, 471–479.
- (12) Kaspar, A. A.; Reichert, J. M. Future Directions for Peptide Therapeutics Development. *Drug Discov. Today* **2013**, *18* (17–18), 807–817.
- (13) Mandal, S.; Moudgil, M.; Mandal, S. K. Rational Drug Design. *Eur. J. Pharmacol.*

- 2009**, *625* (1–3), 90–100.
- (14) Wilson, G. L.; Lill, M. A. Integrating Structure-Based and Ligand-Based Approaches for Computational Drug Design. *Future Med. Chem.* **2011**, *3* (6), 735–750.
- (15) Ferreira, L. G.; Dos Santos, R. N.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. *Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies*; 2015; Vol. 20.
- (16) Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balaram, P. Design of Folded Peptides. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (10), 3131–3152.
- (17) Hill, T. A.; Shepherd, N. E.; Diness, F.; Fairlie, D. P. Constraining Cyclic Peptides to Mimic Protein Structure Motifs. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (48), 13020–13041.
- (18) Ramachandran, G. N.; Sasisekharan, V. Conformation of Polypeptides and Proteins. *Adv. Protein Chem.* **1968**, *23* (C), 283–437.
- (19) Kuriyan, J.; Konforti, B.; Wemmer, D. *The Molecules of Life: Physical and Chemical Principles*, New York;; 2013.
- (20) Hong, S. Y.; Oh, J. E.; Lee, K. H. Effect of D-Amino Acid Substitution on the Stability, the Secondary Structure, and the Activity of Membrane-Active Peptide. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58* (11), 1775–1780.
- (21) Karle, I. L.; Flippen-Anderson, J. L.; Sukumar, M.; Balaram, P. Helix Packing of Leucine-rich Peptides: A Parallel Leucine Ladder in the Structure of Boc-Aib-Leu-Aib-Aib-Leu-Leu-Leu-Aib-Leu-Aib-OMe. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **1992**, *12* (4), 324–330.
- (22) Banerjee, R.; Basu, G.; Chène, P.; Roy, S. Aib-Based Peptide Backbone as Scaffolds for Helical Peptide Mimics. *J. Pept. Res.* **2002**, *60* (2), 88–94.
- (23) Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Schoemaker, H. E.; Rutjes, F. P. J. T.; Veerman, J. J. N.; Kamphuis, J.; Peggion, C.; Formaggio, F.; Toniolo, C. Enantiopure C α -Tetrasubstituted α -Amino Acids. Chemo-Enzymatic Synthesis and Application to Turn-Forming Peptides. *Tetrahedron* **2001**, *57* (30), 6567–6577.
- (24) Perdih, A.; Kikelj, D. The Application of Freidinger Lactams and Their Analogs in the Design of Conformationally Constrained Peptidomimetics. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13* (13), 1525–1556.
- (25) Millet, R.; Goossens, L.; Bertrand-Caumont, K.; Goossens, J.-F.; Houssin, R.; Hénichart, J.-P. A Flexible Approach to the Design of New Potent Substance P Receptor Ligands. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *53* (7), 929–934.

- (26) Hruby, V. J.; Toth, G.; Gehrig, C. A.; Kao, L.; Knapp, R.; Lui, G. K.; Yamamura, H. I.; Kramer, T. H.; Davis, P.; Burksl, T. F. Topographically Designed Analogues of [D-Pen,D-Pen⁵]Enkephalin. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1823–1830.
- (27) Gairí, M.; Saiz, P.; Madurga, S.; Roig, X.; Erchegeyi, J.; Koerber, S. C.; Reubi, J. C.; Rivier, J. E.; Giralt, E. Conformational Analysis of a Potent SSTR3-Selective Somatostatin Analogue by NMR in Water Solution. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12* (2), 82–91.
- (28) Van Der Poorten, O.; Knuhtsen, A.; Sejer Pedersen, D.; Ballet, S.; Tourwé, D. Side Chain Cyclized Aromatic Amino Acids: Great Tools as Local Constraints in Peptide and Peptidomimetic Design. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (24), 10865–10890.
- (29) Pelay-Gimeno, M.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. “Head-to-Side-Chain” Cyclodepsipeptides of Marine Origin. *Mar. Drugs* **2013**, *11* (5), 1693–1717.
- (30) Zhang, L.; Tam, J. P. Metal Ion-Assisted Peptide Cyclization. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (25), 4375–4378.
- (31) Acosta, G. A.; Royo, M.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. Facile Solid-Phase Synthesis of Head-Side Chain Cyclothiodepsipeptides through a Cyclative Cleavage from MeDbz-Resin. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58* (28), 2788–2791.
- (32) Acosta, G. A.; Murray, L.; Royo, M.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. Solid-Phase Synthesis of Head to Side-Chain Tyr-Cyclodepsipeptides Through a Cyclative Cleavage From Fmoc-MeDbz/MeNbz-Resins. *Front. Chem.* **2020**, *8* (April), 1–9.
- (33) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10827–10852.
- (34) Ye, Y. H.; Gao, X. M.; Liu, M.; Tang, Y. C.; Tian, G. L. Studies on the Synthetic Methodology of Head to Tail Cyclization of Linear Peptides. *Lett. Pept. Sci.* **2003**, *10* (5–6), 571–579.
- (35) Chan, L. Y.; Zhang, V. M.; Huang, Y. H.; Waters, N. C.; Bansal, P. S.; Craik, D. J.; Daly, N. L. Cyclization of the Antimicrobial Peptide Gomesin with Native Chemical Ligation: Influences on Stability and Bioactivity. *ChemBioChem* **2013**, *14* (5), 617–624.
- (36) Pelay-Gimeno, M.; Glas, A.; Koch, O.; Grossmann, T. N. Structure-Based Design of Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54* (31), 8896–8927.
- (37) White, C. J.; Yudin, A. K. Contemporary Strategies for Peptide Macrocyclization. *Nat. Chem.* **2011**, *3* (7), 509–524.

- (38) Wu, H.; Acharyya, A.; Wu, Y.; Liu, L.; Jo, H.; Gai, F.; DeGrado, W. F. Design of a Short Thermally Stable α -Helix Embedded in a Macrocyclic. *ChemBioChem* **2018**, *19* (9), 902–906.
- (39) Jackson, D. Y.; Schultz, P. G.; King, D. S.; Chmielewski, J.; Singh, S. General Approach to the Synthesis of Short α -Helical Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (24), 9391–9392.
- (40) Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. **2000**, No. 6, 12364–12365.
- (41) FELIX, A. M.; HEIMER, E. P.; WANG, C. -T; LAMBROS, T. J.; FOURNIER, A.; MOWLES, T. F.; MAINES, S.; CAMPBELL, R. M.; WEGRZYNSKI, B. B.; TOOME, V.; et al. Synthesis, Biological Activity and Conformational Analysis of Cyclic GRF Analogs. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, *32* (6), 441–454.
- (42) Shepherd, N. E.; Hoang, H. N.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. Single Turn Peptide Alpha Helices with Exceptional Stability in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (9), 2974–2983.
- (43) Milroy, L.-G.; Grossmann, T. N.; Hennig, S.; Brunsveld, L.; Ottmann, C. Modulators of Protein–Protein Interactions. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (9), 4695–4748.
- (44) Baker, E. G.; Bartlett, G. J.; Porter Goff, K. L.; Woolfson, D. N. Miniprotein Design: Past, Present, and Prospects. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (9), 2085–2092.
- (45) Blundell, T. L.; Pitts, J. E.; Tickle, I. J. X-Ray Analysis (1.4-Å Resolution) of Avian Pancreatic Polypeptide: Small Globular Protein Hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78* (7 I), 4175–4179.
- (46) Yang, L.; Schepartz, A. Relationship between Folding and Function in a Sequence-Specific Miniature DNA-Binding Protein. *Biochemistry* **2005**, *44* (20), 7469–7478.
- (47) Smith, B. A.; Daniels, D. S.; Coplin, A. E.; Jordan, G. E.; McGregor, L. M.; Schepartz, A. Minimally Cationic Cell-Permeable Miniature Proteins via α -Helical Arginine Display. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (10), 2948–2949.
- (48) O’Shea, E. K.; Klemm, J. D.; Kim, P. S.; Alber, T. X-Ray Structure of the GCN4 Leucine Zipper, a Two-Stranded, Parallel Coiled Coil. *Science* (80-.). **1991**, *254* (5031), 539–544.
- (49) Butcher, D. J.; Kowalska, M. A.; Li, S.; Luo, Z.; Shan, S.; Lu, Z.; Niewiarowski, S.;

- Huang, Z. A Natural Motif Approach to Protein Design: A Synthetic Leucine Zipper Peptide Mimics the Biological Function of the Platelet Factor 4 Protein. *FEBS Lett.* **1997**, *409* (2), 183–187.
- (50) Lee, J. H.; Kang, E.; Lee, J.; Kim, J.; Lee, K. H.; Han, J.; Kang, H. Y.; Ahn, S.; Oh, Y.; Shin, D.; et al. Protein Grafting of P53tad onto a Leucine Zipper Scaffold Generates a Potent HDM Dual Inhibitor. *Nat. Commun.* **2014**, *5* (May).
- (51) Szyk, A.; Lu, W.; Xu, C.; Lubkowski, J. Structure of the Scorpion Toxin BmBKTtx1 Solved from Single Wavelength Anomalous Scattering of Sulfur. *J. Struct. Biol.* **2004**, *145* (3), 289–294.
- (52) Li, C.; Liu, M.; Monbo, J.; Zou, G.; Li, C.; Yuan, W.; Zella, D.; Lu, W. Y.; Lu, W. Turning a Scorpion Toxin into an Antitumor Miniprotein. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13546–13548.
- (53) Robinson, J. A. β -Hairpin Peptidomimetics: Design, Structures and Biological Activities. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (10), 1278–1288.
- (54) Lee, H. B.; Pattarawarapan, M.; Roy, S.; Burgess, K. Syntheses of Second Generation, 14-Membered Ring β -Turn Mimics. *Chem. Commun.* **2003**, *3* (14), 1674–1675.
- (55) Herman, R. E.; Badders, D.; Fuller, M.; Makienko, E. G.; Houston, M. E.; Quay, S. C.; Johnson, P. H. The Trp Cage Motif as a Scaffold for the Display of a Randomized Peptide Library on Bacteriophage T7. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (13), 9813–9824.
- (56) Gellman, S. H. Foldamers: A Manifesto. **1998**, *31* (4), 173–180.
- (57) Ernst, J. T.; Becerril, J.; Park, H. S.; Yin, H.; Hamilton, A. D. Design and Application of an α -Helix-Mimetic Scaffold Based on an Oligoamide-Foldamer Strategy: Antagonism of the Bak BH3/Bcl-XL Complex. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, No. 5, 553–557.
- (58) Mishra, K. P.; Ganju, L.; Sairam, M.; Banerjee, P. K.; Sawhney, R. C. A Review of High Throughput Technology for the Screening of Natural Products. *Biomed. Pharmacother.* **2008**, *62* (2), 94–98.
- (59) MacArron, R.; Banks, M. N.; Bojanic, D.; Burns, D. J.; Cirovic, D. A.; Garyantes, T.; Green, D. V. S.; Hertzberg, R. P.; Janzen, W. P.; Paslay, J. W.; et al. Impact of High-Throughput Screening in Biomedical Research. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10* (3), 188–195.
- (60) Gray, B. P.; Brown, K. C. Combinatorial Peptide Libraries: Mining for Cell-Binding

- Peptides. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (2), 1020–1081.
- (61) Chimiothèque Nationale <https://chembiofrance.cn.cnr.fr/fr/composante/chimiotheque> (accessed Jul 22, 2021).
- (62) Appell, K.; Baldwin, J. J.; Egan, W. J. *Combinatorial Chemistry and High-Throughput Screening in Drug Discovery and Development*; 2001; Vol. 3.
- (63) Gordon, K.; Balasubramanian, S. Solid Phase Synthesis - Designer Linkers for Combinatorial Chemistry: A Review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1999**, *74* (9), 835–851.
- (64) FURKA, Á.; SEBESTYÉN, F.; ASGEDOM, M.; DIBÓ, G. General Method for Rapid Synthesis of Multicomponent Peptide Mixtures. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37* (6), 487–493.
- (65) Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. A New Type of Synthetic Peptide Library for Identifying Ligand-Binding Activity [Published Errata Appear in Nature 1992 Jul 30;358(6385):434 and 1992 Dec 24-31;360(6406):768]. *Nature* **1991**, *354* (6348), 82–84.
- (66) Marasco, D.; Perretta, G.; Sabatella, M.; Ruvo, M. Past and Future Perspectives of Synthetic Peptide Libraries. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2008**, *9* (5), 447–467.
- (67) Kumaresan, P. R.; Lam, K. S. Screening Chemical Microarrays: Methods and Applications. *Mol. Biosyst.* **2006**, *2* (5), 259–270.
- (68) Brenner, S.; Lerner, R. A. Encoded Combinatorial Chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (12), 5381–5383.
- (69) Aina, O. H.; Liu, R.; Sutcliffe, J. L.; Marik, J.; Pan, C. X.; Lam, K. S. From Combinatorial Chemistry to Cancer-Targeting Peptides. *Mol. Pharm.* **2007**, *4* (5), 631–651.
- (70) Frank, R. The SPOT-Synthesis Technique: Synthetic Peptide Arrays on Membrane Supports - Principles and Applications. *J. Immunol. Methods* **2002**, *267* (1), 13–26.
- (71) Geysen, H. M.; Meloen, R. H.; Barteling, S. J. Use of Peptide Synthesis to Probe Viral Antigens for Epitopes to a Resolution of a Single Amino Acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81* (13 I), 3998–4002.
- (72) Sohrabi, C.; Foster, A.; Tavassoli, A. Methods for Generating and Screening Libraries of Genetically Encoded Cyclic Peptides in Drug Discovery. *Nat. Rev. Chem.* **2020**, *4* (2), 90–101.

- (73) Kong, X. D.; Carle, V.; Díaz-Perlas, C.; Butler, K.; Heinis, C. Generation of a Large Peptide Phage Display Library by Self-Ligation of Whole-Plasmid PCR Product. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15* (11), 2907–2915.
- (74) Luzzago, A.; Felici, F.; Tramontano, A.; Pessi, A.; Cortese, R. Mimicking of Discontinuous Epitopes by Phage-Displayed Peptides, I. Epitope Mapping of Human H Ferritin Using a Phage Library of Constrained Peptides. *Gene* **1993**, *128* (1), 51–57.
- (75) Lennard, K. R.; Tavassoli, A. Peptides Come Round: Using SICLOPPS Libraries for Early Stage Drug Discovery. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20* (34), 10608–10614.
- (76) Tavassoli, A. SICLOPPS Cyclic Peptide Libraries in Drug Discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *38*, 30–35.
- (77) Guillen Schlippe, Y. V.; Hartman, M. C. T.; Josephson, K.; Szostak, J. W. In Vitro Selection of Highly Modified Cyclic Peptides That Act as Tight Binding Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (25), 10469–10477.
- (78) Goto, Y.; Ohta, A.; Sako, Y.; Yamagishi, Y.; Murakami, H.; Suga, H. Reprogramming the Translation Initiation for the Synthesis of Physiologically Stable Cyclic Peptides. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3* (2), 120–129.
- (79) Sako, Y.; Morimoto, J.; Murakami, H.; Suga, H. Ribosomal Synthesis of Bicyclic Peptides via Two Orthogonal Inter-Side-Chain Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (23), 7232–7234.
- (80) Bashiruddin, N. K.; Nagano, M.; Suga, H. Synthesis of Fused Tricyclic Peptides Using a Reprogrammed Translation System and Chemical Modification. *Bioorg. Chem.* **2015**, *61*, 45–50.
- (81) Takatsuji, R.; Shinbara, K.; Katoh, T.; Goto, Y.; Passioura, T.; Yajima, R.; Komatsu, Y.; Suga, H. Ribosomal Synthesis of Backbone-Cyclic Peptides Compatible with in Vitro Display. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**.
- (82) Huang, Y.; Wiedmann, M. M.; Suga, H. RNA Display Methods for the Discovery of Bioactive Macrocycles. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (17), 10360–10391.
- (83) Lehn, J. M. Dynamic Combinatorial Chemistry and Virtual Combinatorial Libraries. *Chem. - A Eur. J.* **1999**, *5* (9), 2455–2463.
- (84) Lehn, J. M. From Supramolecular Chemistry towards Constitutional Dynamic Chemistry and Adaptive Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (2), 151–160.
- (85) Ramström, O.; Lehn, J.-M. Drug Discovery by Dynamic Combinatorial Libraries. *Nat.*

- Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (1), 26–36.
- (86) Cousins, G. R. L.; Poulsen, S. A.; Sanders, J. K. M. Molecular Evolution: Dynamic Combinatorial Libraries, Autocatalytic Networks and the Quest for Molecular Function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4* (3), 270–279.
- (87) Klekota, B.; Miller, B. L. Dynamic Diversity and Small-Molecule Evolution: A New Paradigm for Ligand Identification. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17* (5), 205–209.
- (88) Ganesan, A. Strategies for the Dynamic Integration of Combinatorial Synthesis and Screening. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **1998**, *37* (20), 2828–2831.
- (89) Herrmann, A. Dynamic Combinatorial/Covalent Chemistry: A Tool to Read, Generate and Modulate the Bioactivity of Compounds and Compound Mixtures. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (6), 1899–1933.
- (90) Shi, B.; Stevenson, R.; Campopiano, D. J.; Greaney, M. F. Discovery of Glutathione S-Transferase Inhibitors Using Dynamic Combinatorial Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (26), 8459–8467.
- (91) Fu, J.; Fu, H.; Dieu, M.; Halloum, I.; Kremer, L.; Xia, Y.; Pan, W.; Vincent, S. P. Identification of Inhibitors Targeting: Mycobacterium Tuberculosis Cell Wall Biosynthesis via Dynamic Combinatorial Chemistry. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (77), 10632–10635.
- (92) Erlanson, D. A.; Lam, J. W.; Wiesmann, C.; Luong, T. N.; Simmons, R. L.; DeLano, W. L.; Choong, I. C.; Burdett, M. T.; Flanagan, W. M.; Lee, D.; et al. In Situ Assembly of Enzyme Inhibitors Using Extended Tethering. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (3), 308–314.
- (93) Sadownik, J. W.; Ulijn, R. V. Dynamic Covalent Chemistry in Aid of Peptide Self-Assembly. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21* (4), 401–411.
- (94) Lam, R. T. S.; Belenguer, A.; Roberts, S. L.; Naumann, C.; Jarrosson, T.; Otto, S.; Sanders, J. K. M. Amplification of Acetylcholine-Binding Catenanes from Dynamic Combinatorial Libraries. *Science (80-.)*. **2005**, *308* (5722), 667–669.
- (95) Abul-Haija, Y. M.; Ulijn, R. V. Sequence Adaptive Peptide-Polysaccharide Nanostructures by Biocatalytic Self-Assembly. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (11), 3473–3479.
- (96) Ruff, Y.; Garavini, V.; Giuseppone, N. Reversible Native Chemical Ligation: A Facile Access to Dynamic Covalent Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (17), 6333–6339.

- (97) Hadley, E. B.; Witek, A. M.; Freire, F.; Peoples, A. J.; Gellman, S. H. Thermodynamic Analysis of β -Sheet Secondary Structure by Backbone Thioester Exchange. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46* (37), 7056–7059.
- (98) Fisher, B. F.; Hong, S. H.; Gellman, S. H. Helix Propensities of Amino Acid Residues via Thioester Exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (38), 13292–13295.
- (99) Bartus, É.; Edit, W. Ø.; Csipak, B.; Szakonyi, G.; Martinek, A. De Novo Modular Development of a Foldameric Protein – Protein Interaction Inhibitor for Separate Hot Spots: A Dynamic Covalent Assembly Approach. **2017**, 236–241.
- (100) Reuther, J. F.; Dees, J. L.; Kolesnichenko, I. V.; Hernandez, E. T.; Ukraintsev, D. V.; Guduru, R.; Whiteley, M.; Anslyn, E. V. Dynamic Covalent Chemistry Enables Formation of Antimicrobial Peptide Quaternary Assemblies in a Completely Abiotic Manner. *Nat. Chem.* **2018**, *10* (1), 45–50.
- (101) Busschaert, N.; Thompson, S.; Hamilton, A. D. An α -Helical Peptidomimetic Scaffold for Dynamic Combinatorial Library Formation. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (2), 313–316.
- (102) Heemstra, J. M.; Liu, D. R. Templated Synthesis of Peptide Nucleic Acids via Sequence-Selective Base-Filling Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (32), 11347–11349.
- (103) Mahon, C. S.; Jackson, A. W.; Murray, B. S.; Fulton, D. A. Templating a Polymer-Scaffolded Dynamic Combinatorial Library. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (25), 7209–7211.
- (104) Ura, Y.; Beierle, J. M.; Leman, L. J.; Orgel, L. E.; Ghadiri, M. R. Self-Assembling Sequence-Adaptive Peptide Nucleic Acids. *Science (80-.)*. **2009**, *325* (5936), 73–77.
- (105) Mahon, C. S.; Fulton, D. A. Templatation-Induced Re-Equilibration in Polymer-Scaffolded Dynamic Combinatorial Libraries Leads to Enhancements in Binding Affinities. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (9), 3661–3666.
- (106) Nowak, P.; Saggiomo, V.; Salehian, F.; Colomb-Delsuc, M.; Han, Y.; Otto, S. Localized Template-Driven Functionalization of Nanoparticles by Dynamic Combinatorial Chemistry. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54* (14), 4192–4197.
- (107) Bartolami, E.; Bessin, Y.; Gervais, V.; Dumy, P.; Ulrich, S. Dynamic Expression of DNA Complexation with Self-Assembled Biomolecular Clusters. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54* (35), 10183–10187.

CHAPITRE I : MISE EN PLACE DES
LIBRAIRIES COMBINATOIRES
DYNAMIQUES

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| Liste de figures..... | 67 |
| Liste de schémas | 68 |
| Liste de tableaux..... | 68 |
| 1. Généralités | 69 |
| 1.1. Choix de la réaction de chimie combinatoire dynamique..... | 69 |
| 1.2. Conception et synthèse des <i>scaffolds</i> | 71 |
| 1.2.1. <i>Conception</i> | 71 |
| 1.2.1.1. <i>Structure tridimensionnelle</i> | 71 |
| 1.2.1.2. <i>Séquence des scaffolds</i> | 74 |
| 1.2.2. <i>Synthèse des scaffolds</i> | 77 |
| 1.3. Les building blocks | 79 |
| 1.3.1. <i>Considérations structurales</i> | 79 |
| 1.3.2. <i>Synthèse des building blocs</i> | 80 |
| 1.4. Mise au point des conditions réactionnelles de transthioestérification..... | 81 |
| 1.5. Génération de la première librairie | 87 |
| 1.6. Réversibilité de la réaction | 88 |
| 1.7. Conclusion | 91 |
| 2. Étude de l'échange thiol/thioesters | 91 |
| 2.1. Étude de l'influence de la présence d'un thioester à la surface du peptide sur la réaction..... | 91 |
| 2.1.1. <i>Exemple de librairie à un bloc</i> | 92 |
| 2.1.2. <i>Aspect combinatoire : exemple de librairie à deux blocs</i> | 94 |
| 2.2. Système à 4 cystéines..... | 99 |
| 2.2.1. <i>Exemple de bibliothèques à un bloc</i> | 100 |
| 2.2.2. <i>Aspect combinatoire : exemple de librairie à deux blocs</i> | 105 |

Chapitre I : Mise en place des librairies combinatoires dynamiques

| | |
|----------------------------|------------|
| 3. Discussion | 108 |
| Références | 111 |

Liste de figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 - Peptides développés structurés en hélice α et en épingle à cheveux β . | 72 |
| Figure 2 - Structure des différents inducteurs de coude β reliant deux brins β . ¹⁶ | 73 |
| Figure 3 - Schéma général de la structure du scaffold en épingle à cheveux β . | 74 |
| Figure 4 - Peptides synthétisés afin de mettre au point la stratégie de chimie combinatoire dynamique. | 75 |
| Figure 5 -Lien thioester et lien amide. | 76 |
| Figure 6 - Illustration du peptides 3b et du peptide 3b peracétylé. | 79 |
| Figure 7 - Comparaison entre une cystéine portant un thioester au sein d'un peptide (à gauche) et un bloc thioester (à droite). | 80 |
| Figure 8 - Récapitulatif des différents blocs thioesters synthétisés. | 81 |
| Figure 9 - Chromatogrammes obtenus pour les réactions entre 1a et 4(F) aux différents ratios. | 82 |
| Figure 10 - Chromatogrammes obtenus après réaction entre 1a et 4(F) à différents temps en fonction du pH. | 84 |
| Figure 11 - Chromatogramme obtenu pour la librairie combinatoire dynamique générée à partir de 1a et des 8 BB à l'équilibre. | 88 |
| Figure 12 - Chromatogrammes obtenus après chaque équilibration des librairies. | 90 |
| Figure 13 - Séquences des peptides 2a et 2b . | 92 |
| Figure 14 - Chromatogrammes correspondant obtenus après 2 et 6h de réaction. | 93 |
| Figure 15 - Chromatogramme obtenu après 6h30 de réaction entre 2a , 4(A) et 4(L) (10 eq en tout). | 96 |
| Figure 16 - Comparaison des chromatogrammes obtenus pour l'échange de thioester entre les peptides 2a (A-C) ou 2b (D-E) avec 4(A) (C, F), 4(L) (A, D) et 4(A)+4(L) (B, E). | 97 |
| Figure 17 - Structure du peptide 3b . | 99 |
| Figure 18 - Graphique illustrant l'évolution du nombre de membre de la librairie en fonction du nombre de bloc utilisé pour un système à 4 cystéines. | 100 |
| Figure 19 - Superposition des chromatogrammes obtenus de la librairie générée entre 3b et par utilisation de 10 eq de 4(L) (en haut) et 40 eq de 4(L) (en bas). | 102 |
| Figure 20 - Chromatogramme obtenu de la librairie mixte issue du peptide 3b , 4(A) et 4(L) à l'équilibre. | 107 |

Liste de schémas

| | |
|--|-----|
| Schéma 1 - Schéma général de synthèse de peptides cycliques structurés. | 78 |
| Schéma 2 - Synthèse des building blocks thioesters. | 80 |
| Schéma 3 - Exemple de transthioestérification entre le peptide 1a et le BB 4(F) en milieu aqueux tamponné. | 81 |
| Schéma 4 - Mécanisme de la réaction de transthioestérification en milieu faiblement basique. | 84 |
| Schéma 5 - Équilibre formé par la réaction entre le peptide 1a et 8 BB. | 87 |
| Schéma 6 - Expériences parallèles réalisées avec ajout successif de BB. | 89 |
| Schéma 7. Réaction entre 2a et 10 eq de BB 4(F) . | 92 |
| Schéma 8 - Schéma de la librairie mixte formée par l'addition simultanée de 4(A) et 4(L) en présence de 2a . | 95 |
| Schéma 9 - Librairie générée à partir de 3a et 4(L) . | 101 |
| Schéma 10 - Espèces tétrafonctionnalisées issues de la librairie générée par mélange de 3b , 4(A) et 4(L) . | 106 |

Liste de tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 - Réactions réversibles utilisées en DCC. | 70 |
| Tableau 2 - Données analytiques et rendements des peptides synthétisés. | 78 |
| Tableau 3 - Paramètres réactionnels obtenus pour la réaction entre 1a et une concentration croissante en 4(F) | 83 |
| Tableau 4 - Paramètres réactionnels obtenus pour la réaction entre 1a et 5 équivalents de 4(F) à différents pH. | 85 |
| Tableau 5 - Constante d'équilibre obtenue pour les transthioestérifications entre 1 et chaque BB. | 86 |
| Tableau 6 - Récapitulatif des données obtenues après 6h de réaction entre 2a et 4(F) . | 93 |
| Tableau 7 - Récapitulatif des données obtenues après 4 ou 6h de réaction entre 2a , 4(L) , 4(A) ou 4(W) . | 94 |
| Tableau 8 - Récapitulatif des données obtenues après 6h30 de réaction entre 2a et 4(L) et 4(A) (10 eq en tout). | 96 |
| Tableau 9 - Récapitulatif des données obtenues pour les réactions entre 2a et 4(L) , 4(A) et 4(L)+4(A) . | 98 |
| Tableau 10 - Récapitulatif des données obtenues après 24h de réaction entre 3b et 40 équivalents de 4(L) . | 103 |
| Tableau 11. Récapitulatif des données obtenues après pour chaque librairie générée. | 105 |
| Tableau 12. Récapitulatif des données obtenues après 24h de réaction entre 3a , 4(A) et 4(L) (20 équivalents chacun). | 108 |

1. Généralités

La première étape a consisté à mettre au point des conditions efficaces et robustes pour la génération de librairies dynamiques de peptides de structure 3D définie portant les différentes combinaisons de chaînes latérales sur leur surface. Ce travail préliminaire est fondamental pour assurer l'accès à des librairies peptidiques, où toutes les combinaisons de chaînes latérales sont représentées de manière statistique, pouvant être exploitées pour le criblage de cibles biologiques.

1.1. Choix de la réaction de chimie combinatoire dynamique

L'élément clé est la réaction réversible qui permettra la mise en place de la librairie. Cette réaction doit répondre à un certain nombre de critères¹⁻³ pour être sélectionnée :

- Dans la mesure où une cible biologique est ajoutée à la librairie lors de l'étape d'amplification, la réaction doit être conductible en milieu aqueux tamponné à un pH proche du pH physiologique, à température ambiante et avec une cinétique rapide.
- Elle doit être réversible dans ces conditions et atteindre l'équilibre dans un temps raisonnable.
- La solubilité de tous les constituants de la librairie doit être assurée pour ne pas induire de piège cinétique ou thermodynamique.
- Afin d'éviter de possibles interactions parasites avec les biomolécules, la réaction utilisée doit être bioorthogonale.
- La réaction doit pouvoir être cinétiquement stoppée pour permettre l'isolation puis l'identification du composé amplifié.

Le tableau ci-dessous présente différentes réactions, répondant plus ou moins à ces conditions, qui ont été utilisées en chimie combinatoire dynamique pour l'identification de molécules bioactives.

Tableau 1 - Réactions réversibles utilisées en DCC.

| Produit formé | Réaction | Conditions | Réf. |
|----------------|--|---|-------|
| Imines | $R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-H + R_2-NH_2 \rightleftharpoons R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-N(R_2)-R_1$ | <ul style="list-style-type: none"> ○ Milieux aqueux ○ pH faiblement acide | 4,5 |
| Acylhydrazones | $R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-H + H_2N-\overset{\text{H}}{\parallel}{C}-R_2 \rightleftharpoons R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-N(H)-\overset{\text{H}}{\parallel}{C}-R_2$ | <ul style="list-style-type: none"> ○ Milieux aqueux ○ pH acide | 6,7 |
| Acétals | $R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-H + R_2-OH \rightleftharpoons R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-O-R_2$ | <ul style="list-style-type: none"> ○ Milieux aqueux ○ pH neutre | 8,9 |
| Disulfides | $R_1-SH + HS-R_2 \rightleftharpoons R_1-S-S-R_2$ | <ul style="list-style-type: none"> ○ Milieux aqueux ○ pH neutre | 10,11 |
| Thioesters | $R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-S-R + R_2-SH \rightleftharpoons R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-S-R_2 + R-SH$ | <ul style="list-style-type: none"> ○ Milieux aqueux ○ pH neutre | 12,13 |

La formation réversible d'imine, ayant lieu entre une amine et un aldéhyde, est l'une des premières réactions décrites en DCC et a été très largement exploitée pour le ciblage vis-à-vis de cibles biologiques. Elle pourrait être envisagée pour la stratégie développée ici puisqu'elle est réalisable en milieux aqueux et à pH légèrement acide.^{4,5} En revanche, l'utilisation de cette réaction en présence de peptide ou de protéine n'est pas idéale puisque les chaînes latérales des résidus lysines peuvent entrer en compétition avec les blocs amines utilisés et compliquer le système. Il en est de même pour l'échange hydrazide/acylhydrazone réversible à pH acide et qui peut opérer à pH plus élevé (5-6) en présence d'un catalyseur aniline,^{6,7} ou encore pour la formation d'acétals, qui impliquent toutes deux des fonctions susceptibles de réagir avec les peptides.^{8,9}

Les réactions impliquant des thiols, à savoir la formation de pont disulfure et la transthioestérification semblent être de bonnes candidates.¹⁰⁻¹³ En effet, bien que des thiols soient également présents sur les chaînes latérales dans les peptides *via* les cystéines, celles-ci sont de manière générale plus rare dans les protéines (3,3%¹⁴) et plus encore à leur surface puisqu'elles sont le plus souvent enfouit au cœur des objets biologiques où elles assurent un rôle structural par formation de ponts disulfures. Les réactions d'oxydation peptidiques thiol/disulfure et transthioestérification thiol/thioester sont toutes deux réalisables en milieux aqueux à un pH neutre ou

légèrement basique et peuvent être arrêtées par acidification du milieu. De plus le groupement thiol peut facilement être introduit dans un peptide *via* l'acide aminé naturel cystéine.

A la naissance du projet l'échange thiol/disulfure avait été étudié entre un peptide portant des chaînes latérales fonctionnalisées par un thiol et des chaînes latérales fonctionnalisées également par des thiols (Master 2, Albene Petkovic, 2013). Cependant outre les difficultés pratiques associées à l'utilisation de chaînes latérales portant des thiols malodorants, la présence de disulfures obtenus par oxydation entre deux blocs complique fortement l'analyse des mélanges. Nous nous sommes donc rapidement tournés vers la réaction de transthioestérification, entre les blocs porteurs de fonction thioester et un peptide fonctionnalisé à sa surface par des fonctions thiols portées par des cystéines. Les fonctions thioesters sont bien sûr également réactives vis-à-vis des amines portées par la lysine et pourraient conduire de manière irréversible à la formation d'amide déplaçant ainsi l'équilibre réactionnel. Une fine régulation du pH permet de contrôler cette réactivité et donc de s'affranchir de ces réactions secondaires.

La réaction de DCC étant définie, il faut se pencher sur les éléments composant le système : la plateforme peptidique structurée et les briques élémentaires.

1.2. Conception et synthèse des *scaffolds*

1.2.1. Conception

1.2.1.1. Structure tridimensionnelle

L'objectif du projet est de disposer de plateformes générales qui seraient utilisables dans diverses applications, mimant les structures 3D présentes sur les interfaces d'interaction des protéines. Les structures les plus communément impliquées dans ces interactions sont les hélices α et les feuillets β . Deux *scaffolds* basés sur ces structures ont été conçus (Figure 1).

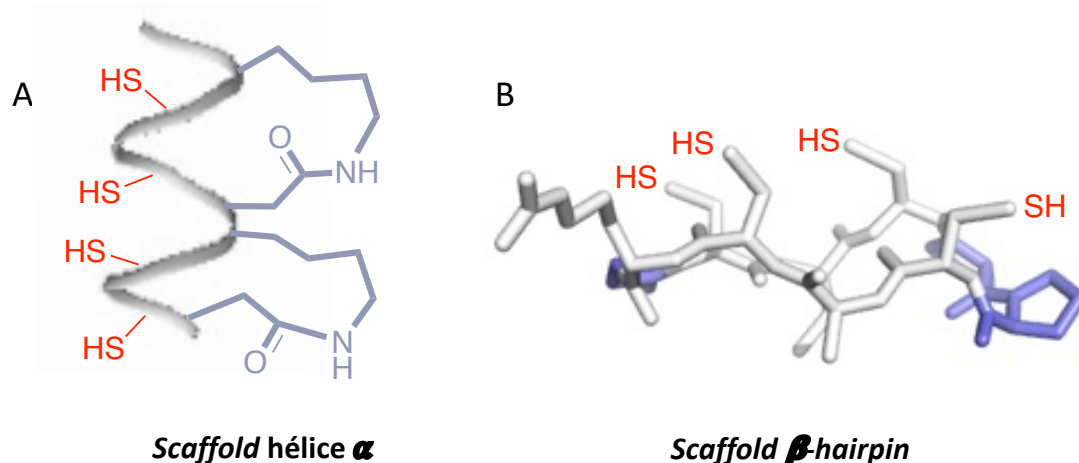


Figure 1 - Peptides développés structurés en hélice α et en épingle à cheveux β .
A : *Scaffold* hélice α développé lors de ce projet structuré par deux agrafes lactame entre en position relative i et $i+4$. B : *Scaffold* β -hairpin développé lors de ce projet avec le motif D Pro- L Pro (coloré en bleu) et les groupements thiols des résidus cystéines exposés du même côté.

Les peptides courts (< 15 acides aminés) sont en général très flexibles et n'adoptent pas de structuration définie. Pour accéder à des peptides possédant une bonne stabilité conformationnelle, des contraintes permettant de pré-organiser ces structures ont été introduites.

En ce qui concerne l'hélice α , comme nous l'avons vu en introduction, celle-ci peut être stabilisée par l'introduction de liens covalents entre les chaînes latérales des résidus en position relative i et $i+4$ qui pointent dans la même direction. En se basant sur les travaux de Fairlie *et al.*, nous avons choisi d'utiliser une cyclisation chaîne à chaîne entre des résidus Lys et Asp.¹⁵ Deux agrafes ont été introduites sur une même face permettant de stabiliser deux tours d'hélice.

En ce qui concerne le feuillet β , nous avons choisi de concevoir un *scaffold* en épingle à cheveux, le plus petit motif représentant cette structuration 3D. Une épingle à cheveux β est composée de deux brins β établissant plusieurs liaisons hydrogènes entre eux et connectés à leur extrémité par un coude. La conception d'un peptide structuré en β -hairpin a été envisagée par combinaison de contrainte locale permettant d'introduire le coude et d'une contrainte globale, la macrocyclisation tête à queue, favorisant le

repliement de la chaîne peptidique. Différents inducteurs de coude β sont illustrés dans la littérature (Figure 2).¹⁶

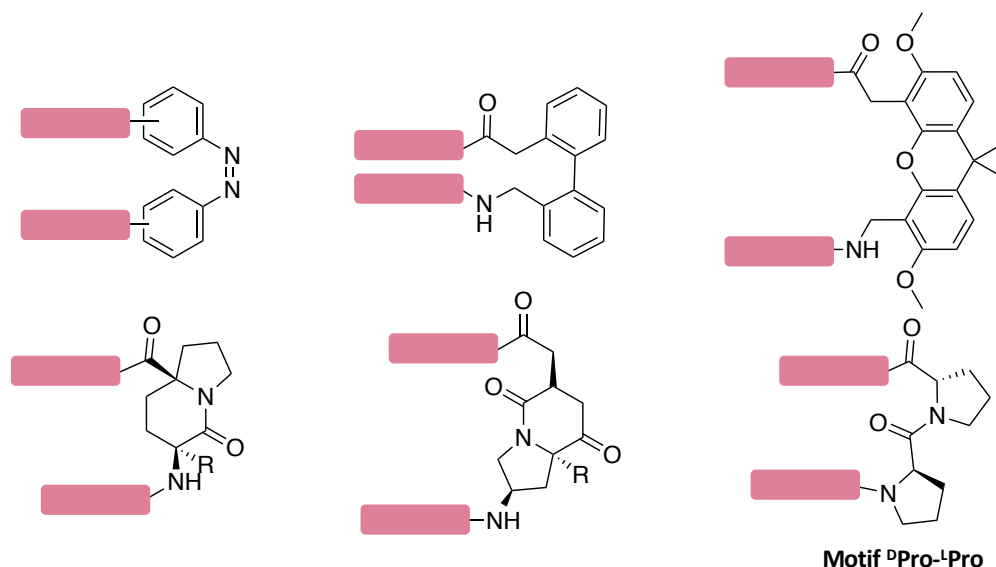


Figure 2 - Structure des différents inducteurs de coude β reliant deux brins β .¹⁶

Nous avons opté pour le dipeptide hétérochiral ^DProline-^LProline qui présente l'avantage de pouvoir être directement inclus dans une séquence peptidique pendant la synthèse à partir d'acides aminés commerciaux.

Le groupe de Robinson a synthétisé de nombreux peptides basés sur cette structure. Il a montré que pour cette famille de peptide, la conformation en β -hairpin était favorisée de manière virtuellement indépendante des résidus localisés dans les brins.¹⁷ Nous avons choisi d'inclure ce motif dans des décapeptides cycliques comportant une glycine dans la boucle opposée au coude β (Figure 1). Les résidus situés directement en *N*-ter et *C*-ter de l'inducteur exposent leur chaîne latérale sur la même face du peptide, les résidus suivants sur la face opposée. Les chaînes latérales des résidus situés de part et d'autre du motif s'alternent donc de manière périodique.

La synthèse de ces peptides β -hairpin étant bien établie et le savoir-faire étant déjà présent au laboratoire, nous avons choisi de mettre en place de la stratégie sur ce scaffold β -hairpin.

1.2.1.2. Séquence des scaffolds

La Figure 3 schématise la structure du scaffold développé et introduit la numérotation des positions utilisées dans ce manuscrit.

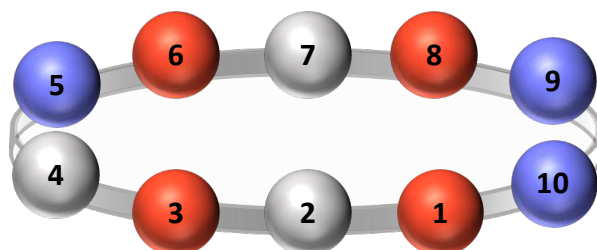


Figure 3 - Schéma général de la structure du scaffold en épingle à cheveux β .

Le squelette peptidique est représenté par le cercle gris, les résidus sont représentés par les boules. En bleu sont colorés les résidus responsables de la structuration, les cystéines sont représentées par les boules rouges et les boules grises représentent les résidus pouvant être adaptés. La position n°1 correspond à une cystéine et le sens de numérotation suit l'enchaînement N-ter vers C-ter.

Comme évoqué dans le paragraphe précédent, le *scaffold* possède des résidus structuraux qu'il n'est pas possible de modifier à savoir la glycine située en position 5 et le motif ^DPro-^LPro situé en position 9 et 10. Les positions des cystéines fonctionnalisables ont été choisies de manière à ce que les groupements thiols soient exposés sur une même face de l'objet (position 1, 3, 6 et 8). Les autres positions du peptide, à savoir les positions 2, 4 et 7, sont modulables et permettent de conférer des propriétés supplémentaires au peptide : une activité UV à une longueur d'onde spécifique pour le suivi des réactions et une bonne solubilité en milieu aqueux.

Ainsi, plusieurs *scaffolds* peptidiques ont été synthétisés afin de répondre au besoin de la méthodologie de chimie combinatoire dynamique développée. Leur structure est détaillée ci-dessous.

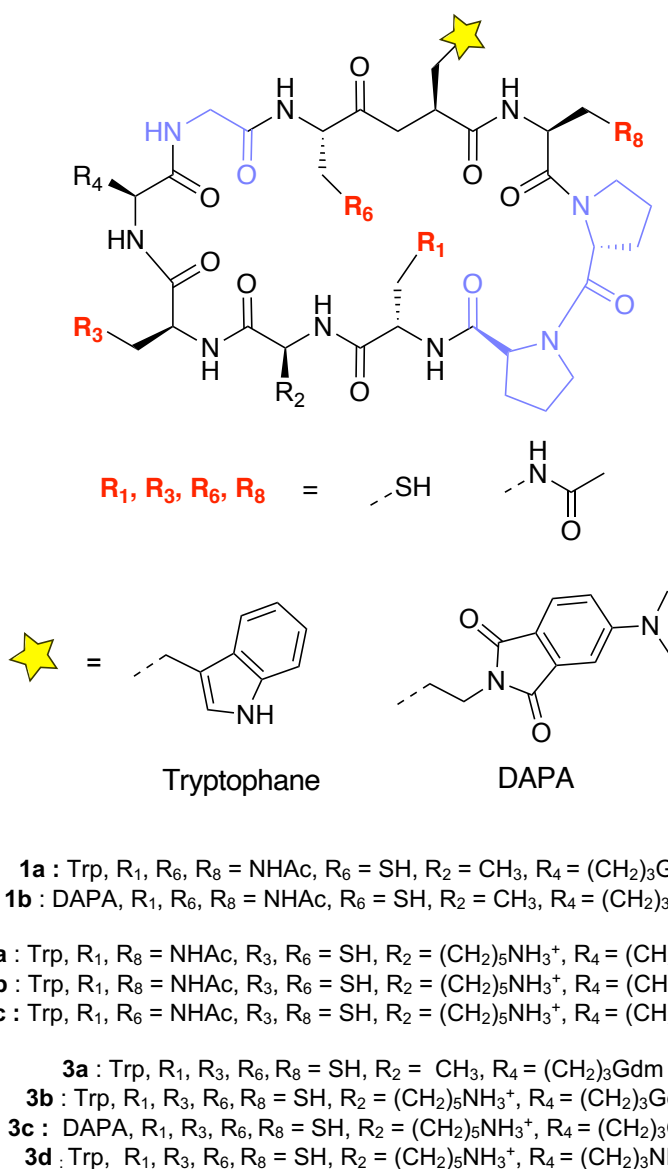


Figure 4 - Peptides synthétisés afin de mettre au point la stratégie de chimie combinatoire dynamique.

- Résidus impliqués dans la DCC

Pour la mise en place de la réaction réversible, nous avons décidé de travailler d'abord sur des systèmes simplifiés, portant une ou deux cystéines (série de peptides **1** et **2**). Ces peptides permettent d'obtenir des bibliothèques de faible complexité et donc facilement analysables. Pour ce faire, certaines cystéines sont remplacées par l'acide *L*-2,3-diaminopropionique acétylé sur l'amine de sa chaîne latérale (NHAc). Ce résidu possède une chaîne latérale iso-structurale à la fonction thioester mais non réactive, le lien amide n'étant pas labile dans les conditions de la réaction (Figure 5). L'acide

aminé correspondant, le Fmoc-Dap(NHAc)-OH a été synthétisé à partir du Fmoc-Dap(Boc)-OH commercial suivant la littérature (voir la partie expérimentale).

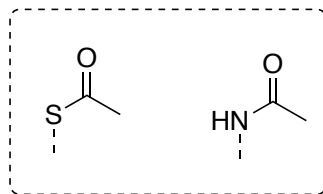


Figure 5 -Lien thioester et lien amide.

- Sonde spectroscopique

Le suivi des réactions de DCC se faisant par HPLC UV-visible, un TAG-UV a été introduit dans les peptides à la position 7. Dans un premier temps un résidu tryptophane, absorbant à 280 nM, a été utilisé (**1a**, **2a**, **2b**, **2c**, **3a**, **3b**, **3d**). Dans un second temps une sonde DAPA, absorbant à 415 nM, est introduite (**3d**). Les raisons motivant ce changement sont développées dans le Chapitre II.

- Solubilité

Pour tous les peptides synthétisés, au minimum un résidu cationique à pH physiologique est présent. Ce résidu (arginine ou ornithine), situé en position 4, est suffisant dans la plupart des cas pour assurer la bonne solubilité des peptides dans l'eau. En revanche, pour les peptides possédant plusieurs cystéines, et en particulier le peptide **3a**, la fonctionnalisation par des chaînes latérales hydrophobes (leucine) pendant les expériences de chimie combinatoire dynamique provoque la précipitation des membres de la librairie modifiant ainsi l'équilibre de la réaction. Afin d'éviter un tel biais dans la composition des librairies, un second résidu cationique (lysine) a été ajouté en position 2 pour les peptides comportant 2 ou 4 cystéines (**2a-b**, **3b-d**) permettant ainsi de retrouver une bonne solubilité des peptides thioestérifiés, quel que soit la chaîne introduite.

1.2.2. Synthèse des scaffolds

La synthèse des *scaffolds* peptidiques structuré en épingle à cheveux β se fait sur support solide en stratégie Fmoc/*t*Bu suivant la littérature (Schéma 1).¹⁸ Le premier acide aminé (situé en *C*-ter dans la séquence linéaire) est accroché sur une résine chlorure de 2-chlorotriyle. Nous avons choisi comme résidu *C*-ter la glycine. Celle-ci ne possédant pas de centre stéréogène, cela évite les risques d'épimérisation qui pourraient survenir après activation de ce résidu pendant l'étape de cyclisation. Ce choix permet en outre de cycliser le peptide dans la boucle opposée au coude β , permettant ainsi une pré-structuration de la séquence facilitant la macrocyclisation. La séquence est assemblée par cycle de déprotection du groupement Fmoc/couplage peptidique. Ces étapes sont effectuées de manière classique : la déprotection est réalisée par traitement de la résine avec une solution de 20% pipéridine dans le DMF ; les couplages sont effectués après activation de l'acide carboxylique par le HBTU et la DIEA basique. La résine étant particulièrement sensible aux conditions acides, le clivage en conditions douces par traitement au HFIPA permet d'accéder à la séquence linéaire sans altérer les groupements protecteurs des chaînes latérales. L'extrémité *C*-ter de la glycine obtenue sous forme d'acide carboxylique est alors cyclisée tête à queue avec l'amine du résidu situé en *N*-ter. Cette cyclisation est réalisée en milieu très dilué pour favoriser la réaction intra *vs.* intermoléculaire, par utilisation d'un agent de couplage plus performant, le HATU. Enfin, la déprotection finale des chaînes latérales est réalisée par traitement du peptide cyclique au TFA en présence de triisopropylsilane (TIS) et d'eau comme *scavengers*, piègeurs des carbocations générés dans cette étape. L'éthanedithiol (EDT) est utilisé pour éviter l'oxydation des thiols. Les peptides sont purifiés par HPLC préparative en phase inverse puis caractérisés par spectrométrie de masse MALDI (Tableau 2).

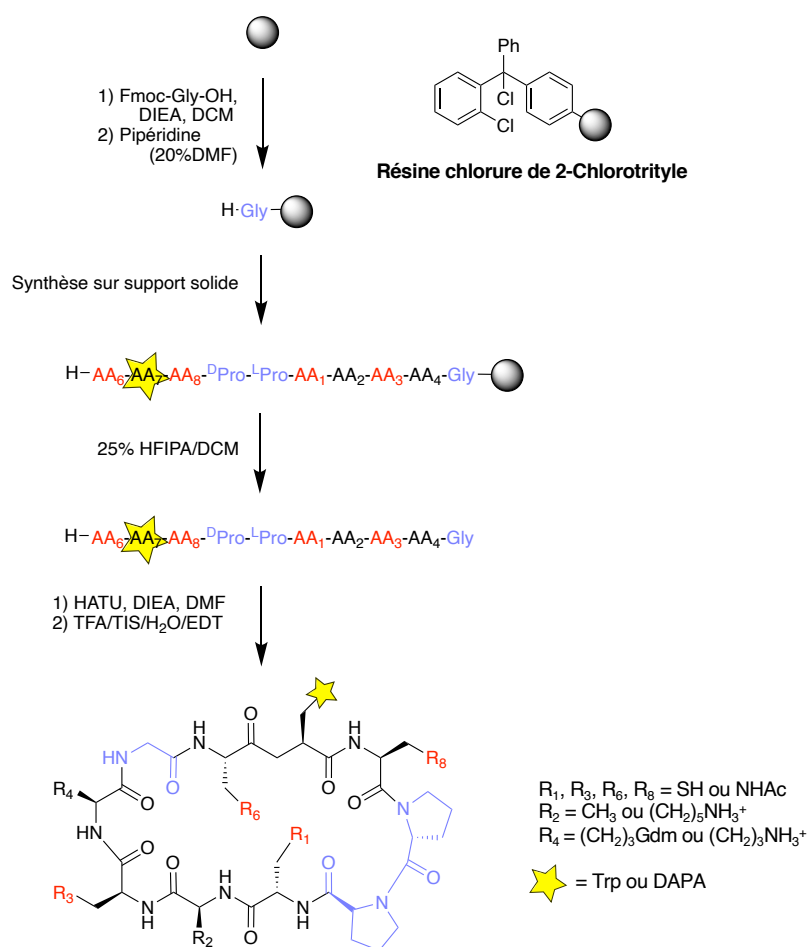


Schéma 1 - Schéma général de synthèse de peptides cycliques structurés.

Tableau 2 - Données analytiques et rendements des peptides synthétisés.

| Peptide | Temps de rétention (min) | m/z calculé | [M+H] ⁺ | Rendement (%) |
|-----------|--------------------------|-------------|--------------------|---------------|
| 1a | 5,2 | 1151,5 | 1152,2 | 14 |
| 1b | 5,3 | 1224,6 | 1225,3 | 6 |
| 2a | 3,96 | 1183,5 | 1184,6 | 14 |
| 2b | 4,9 | 1183,5 | 1184,4 | 14 |
| 2c | 5 | 1141,5 | 1142,3 | 10 |
| 3a | 7,3* | 1076,4 | 1077,5 | 13 |
| 3b | 5,9 | 1133,4 | 1134,4 | 19 |
| 3c | 7* | 1206,5 | 1207,7 | 8 |
| 3d | 5,4 | 1091,4 | 1092,3 | 11 |

* Éluant : H₂O/ACN, 0,1% TFA, 20 à 50% ACN, 10 minutes.

Tous les autres : Éluant : H₂O/ACN, 0,1% TFA, 5 à 100% ACN, 10 minutes.

Des études structurales par RMN ont été préalablement réalisées au laboratoire (Thèse Benjamin Zagiel 2015-2018, Dr. Emeric Miclet) et ont permis de confirmer la structuration en β -hairpin du scaffold sur le peptide **3b**. Des études effectuées sur une

version peracétylée de ce même peptide ont montré que l'introduction des chaînes latérales à la surface du peptide impacte peu cette conformation (Figure 6).

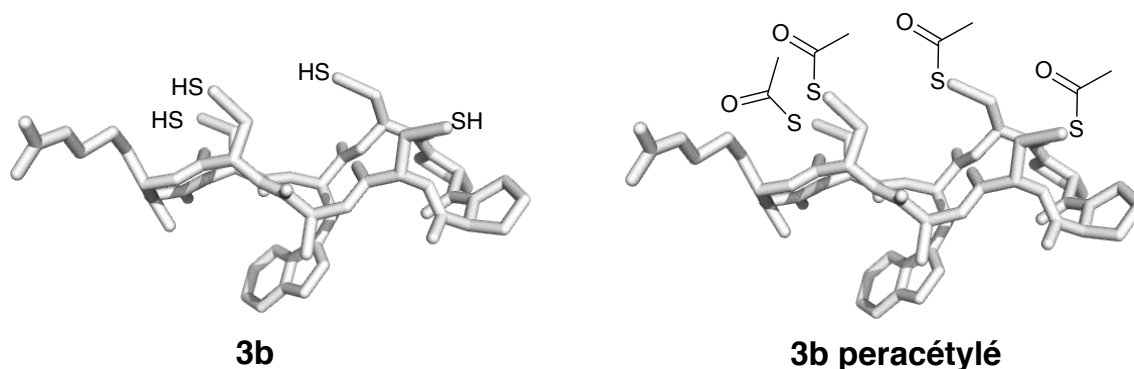


Figure 6 - Illustration du peptides **3b** et du peptide **3b** peracétylé.

1.3. Les building blocks

1.3.1. Considérations structurales

Afin de former les produits de réaction de manière la plus équiprobable possible, il est nécessaire que la réactivité des blocs structurellement différents soit comparable et que les produits obtenus soient isoénergétiques afin d'éviter que certains soient sous- ou sur-représentés dans la bibliothèque ce qui aurait pour conséquence de biaiser les résultats lors d'un criblage.^{19,20}

Le peptide portant les cystéines réactives, les briques élémentaires impliquées dans le système sont fonctionnalisées par un groupement thioester. Les réactivités des fonctions thiol portées par le peptide et les fonctions thioesters devant être le plus proche possible, la cystéine a été choisie comme plateforme pour y greffer les chaînes latérales des acides aminés naturels (Figure 7). Dans un premier temps, différents *building blocks* (BB) sur lesquels une chaîne latérale est greffée sur la fonction thiol d'une cystéine ont été préparés (Dr. Roba Moumné). Néanmoins ces composés se réarrangent très rapidement par le biais d'un transfert S vers N conduisant à la formation irréversible de l'amide correspondant, même à pH acide. Pour masquer la réactivité de cette amine vis-à-vis des thioesters, un groupement *N*-acétyl a été introduit. Il permet

également de se rapprocher de la réactivité des thiols des résidus cystéines contenues dans les séquences peptidiques. La fonction acide carboxylique est laissée libre pour assurer une bonne solubilité des BB mais également des produits libérés pendant la réaction.

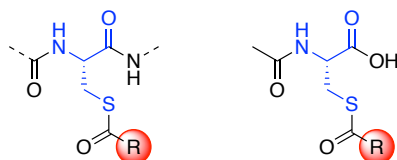


Figure 7 - Comparaison entre une cystéine portant un thioester au sein d'un peptide (à gauche) et un bloc thioester (à droite).

1.3.2. Synthèse des *building blocks*

Adaptée des travaux de Katritzky^{21,22}, une méthode de synthèse des briques thioesters basée sur l'activation d'une fonction acide carboxylique a été mise au point (Thèse Benjamin Zagiel, 2015-2018) (Schéma 2).

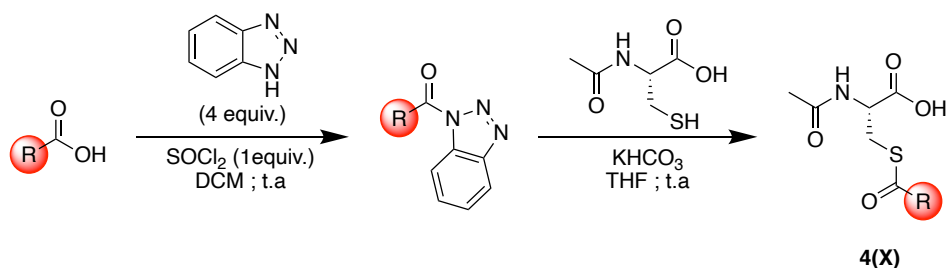


Schéma 2 - Synthèse des *building blocks* thioesters.

Un acide carboxylique portant une chaîne latérale R analogue à celles des acides aminés mimés, est activé par le benzotriazole, en présence de chlorure de thionyle conduisant à l'acylbenzotriazole correspondant. S'en suit le couplage avec la *N*-acétylcystéine permettant d'obtenir le produit thioester **4(X)** désiré. Un large panel de BB porteurs de chaînes latérales d'acides aminés naturels ou non a été ainsi préparé (Figure 8). Pour les BB porteurs de fonctions chimiques réactives sur leurs chaînes latérales, des stratégies de protections orthogonales ont été mises au point (Thèse Benjamin Zagiel, 2015-2018, voir matériel et méthode).

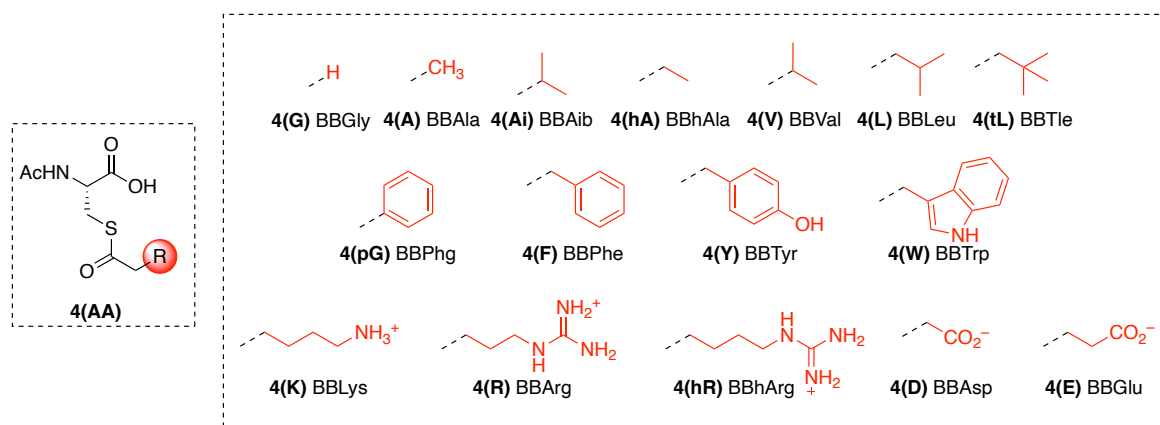


Figure 8 - Récapitulatif des différents blocs thioesters synthétisés.

1.4. Mise au point des conditions réactionnelles de transthioestérification

Les conditions pour la réaction d'échange ont d'abord été étudiées sur un système simple ne comportant qu'une cystéine et conduisant ainsi à un composé unique pour chaque BB utilisé (Schéma 3).

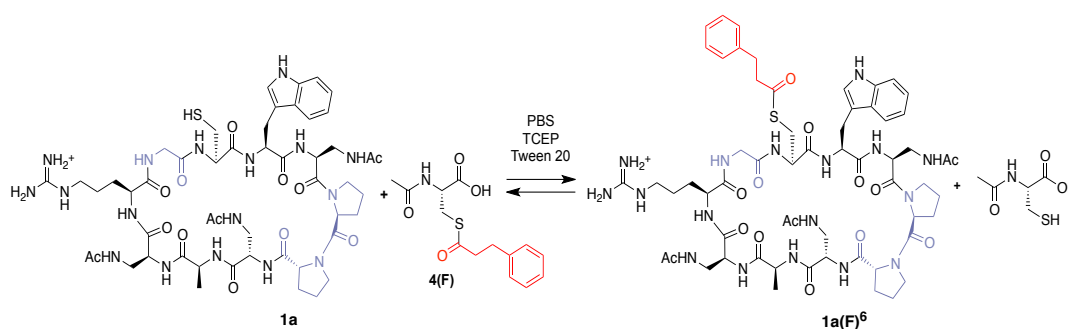


Schéma 3 - Exemple de transthioestérification entre le peptide 1a et le BB 4(F) en milieu aqueux tamponné.

Les réactions ont lieu dans un tampon aqueux à pH physiologique contenant 3 mM de TCEP (tris(2-carboxyéthyl)phosphine), un agent réducteur empêchant l'oxydation des peptides par formation de pont disulfure. Un détergent doux compatible avec un milieu biologique, le Tween-20, est également introduit à hauteur de 1% pour éviter les problèmes d'agrégation. Ce tampon est à la fois utilisé comme milieu réactionnel et comme tampon de conservation des différentes entités impliqués dans le système.

Néanmoins il a été montré que le TCEP peut entraîner la désulfuration des résidus cystéines.²³ Ce phénomène ayant été observé avec certains peptides utilisés lors de ce projet, ces derniers sont conservés dans l'eau.

Le peptide **1a** (1mM) est traité par un unique bloc **4(F)** en proportions différentes : 1 eq, 5 eq et 10 eq. La réaction entre **1a** et **4(F)** est suivie par HPLC à 280 nm. Le milieu réactionnel est neutralisé avec une solution 50% H₂O/Acétonitrile (ACN) contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) permettant de stopper l'échange entre les thiolates libres et les thioesters de manière à obtenir une bibliothèque figée qui peut être analysée sans risque de modification. L'apparition d'un nouveau pic unique est observée après 5 minutes de réaction et correspond au produit acétylé identifié après collecte et analyse MS MALDI-TOF (Figure 9). Ce composé est nommé **1a(F)⁶**, la lettre entre parenthèse correspondant à la nature de la chaîne latérale greffée, ici la phénylalanine, et le chiffre en exposant à la position sur laquelle cette chaîne latérale est greffée. Après 6h de réaction, les proportions relatives de réactifs et de produits n'évoluent plus indiquant que l'équilibre entre **1a** et **1a(F)⁶** est atteint. La conversion obtenue varie en fonction de la quantité de BB utilisée (Tableau 3).

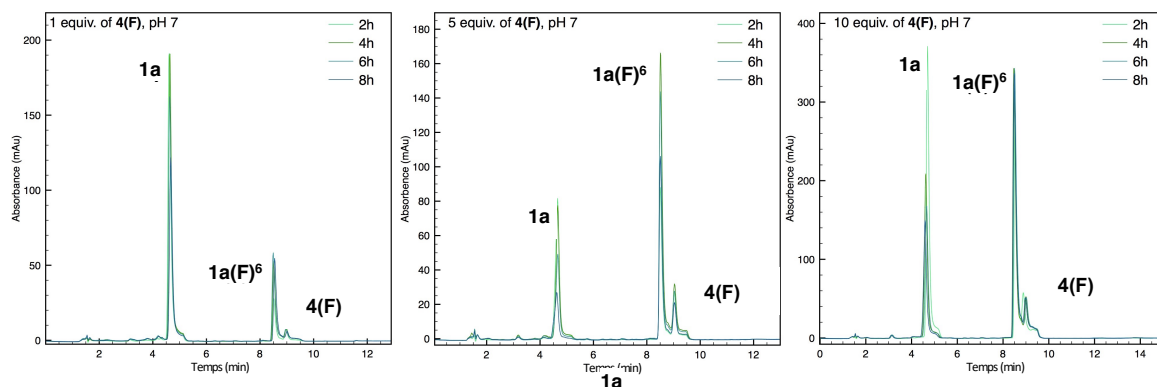


Figure 9 - Chromatogrammes obtenus pour les réactions entre **1a** et **4(F)** aux différents ratios.

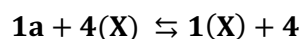
De gauche à droite : ratio 1:1, 1:5 et 1:10.

Tableau 3 - Paramètres réactionnels obtenus pour la réaction entre **1a** et une concentration croissante en **4(F)**

| BB | Ratio | Temps | % Produit à l'équilibre | K' |
|-------------|--------------|--------------|--------------------------------|-----------|
| 4(F) | 1:1 | 8h | 1a(F)⁶ (27%) | * |
| | 1:5 | 8h | 1a(F)⁶ (75%) | 0.4 |
| | 1:10 | 6h | 1a(F)⁶ (90%) | 0.89 |

* = équilibre non atteint

La constante apparente d'équilibre K' est calculée à partir des intégrations des pics HPLC suivant l'équation suivante :



$$K' = \frac{[\mathbf{1a(X)}]_{\text{eq}}[\mathbf{4}]_{\text{eq}}}{[\mathbf{1a}]_{\text{eq}}[\mathbf{4(X)}]_{\text{eq}}}$$

Avec :

- $[\mathbf{1a}]_{\text{eq}}$ et $[\mathbf{1a(X)}]_{\text{eq}}$ sont approximées avec les % HPLC à l'équilibre sachant que $[\mathbf{1a}]_{\text{eq}} + [\mathbf{1a(X)}]_{\text{eq}} = 1\text{mM}$
- $[\mathbf{4}]_{\text{eq}} = [\mathbf{1a(X)}]_{\text{eq}}$
- $[\mathbf{4(X)}]_{\text{eq}} = [\mathbf{4(X)}]_0 - [\mathbf{1a(X)}]_{\text{eq}}$

Ainsi, la constante K' obtenue à l'équilibre pour l'échange entre **1a** et **1a(F)⁶** est de 0,89 et 0,8 avec 5 eq et 10 eq de **4(F)** respectivement, ce qui est satisfaisant. En effet, une constante d'équilibre trop grande indique le déplacement de l'équilibre en faveur de formation des produits et donc une réaction irréversible alors qu'une constante d'équilibre proche de 0 est synonyme d'une réaction déplacée vers la formation des réactifs. Une constante K' située autour de 1 est donc recherchée puisqu'elle traduit un équilibre bien réparti entre les réactifs et les produits. Cependant la réaction est relativement lente dans ces conditions.

L'influence du pH sur la vitesse de la réaction a ensuite été étudiée. En effet, le pKa du couple thiol/thiolate étant proche de 8,²⁴ à pH neutre les thiols présents dans le milieu réactionnel sont partiellement déprotonnés. La forme thiolate étant la forme réactive dans une réaction de transthioestérification, une augmentation du pH permettrait d'accroître la proportion de thiolate dans le milieu et donc d'accélérer la réaction (Schéma 4). Cette hausse de pH doit être modérée puisque la réaction d'hydrolyse de thioester basique irréversible deviendrait prépondérante et romprait l'équilibre de la réaction.

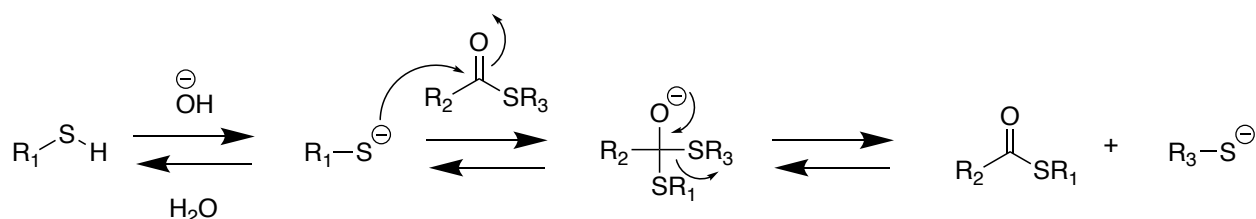


Schéma 4 - Mécanisme de la réaction de transthioestérification en milieu faiblement basique.

La réaction entre **1a** (1mM) et **4(F)** (5 équiv.) a donc été une nouvelle fois étudiée à pH 7, 7,3 et 7,5 dans les mêmes conditions que précédemment. L'évolution du mélange a été suivie par HPLC à 280 nm (Figure 10).

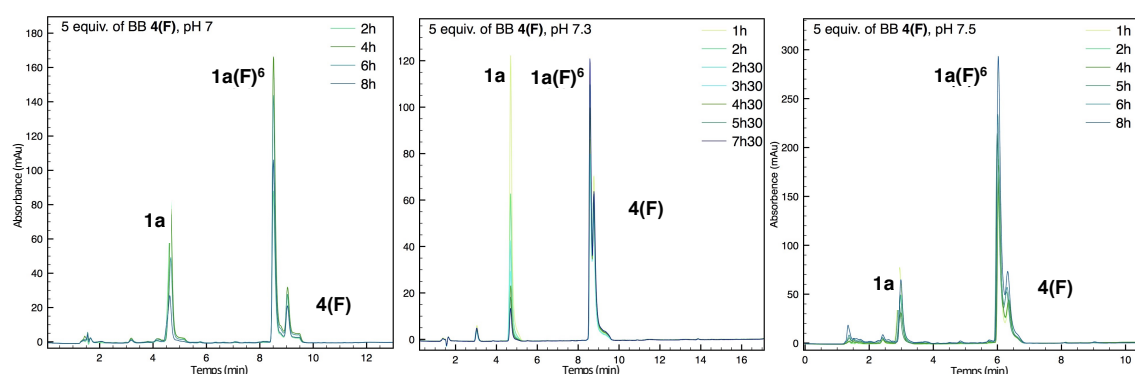


Figure 10 - Chromatogrammes obtenus après réaction entre **1a** et **4(F)** à différents temps en fonction du pH.

De gauche à droite : pH 7, pH 7.3, pH 7.5

Comme anticipé, le pH a un réel impact sur la cinétique de la réaction. Dans les 3 cas, la proportion du composé **1a(F)⁶** obtenue à l'équilibre est d'environ 80%. En revanche,

cet équilibre est atteint en 6h à pH 7, 4h à pH 7.3 et à 2h à pH 7.5. La constante K' quant à elle ne varie pas (Tableau 4).

Tableau 4 - Paramètres réactionnels obtenus pour la réaction entre **1a** et 5 équivalents de **4(F)** à différents pH.

| BB | pH | Temps | % Produit à l'équilibre | K' |
|-------------|-----------|--------------|--------------------------------|------------------------|
| 4(F) | 7 | 6h | 1a(F)⁶ (75%) | 0,4* |
| | 7.3 | 4h | 1a(F)⁶ (82%) | 0.89 |
| | 7.5 | 2h | 1a(F)⁶ (80%) | 0.81 |

* = équilibre non atteint

L'utilisation d'un catalyseur a également été évaluée. En effet, il a été montré que la présence d'imidazole permet d'accélérer les réactions transthioestérification par ligation chimique. Le mécanisme proposé passe par l'activation du thioester de départ par l'imidazole conduisant à un intermédiaire acyl-imidazolium plus réactif vis-à-vis du thiol des cystéines.²⁵ La réaction entre **1a** (1mM) et **4(F)** à pH 7 a donc été réalisée en présence d'imidazole (5 mol% par rapport au BB). D'après les résultats de ces expériences, la vitesse de la réaction n'est pas significativement accélérée puisque l'équilibre n'est pas atteint avant 6h.

La réaction a alors été étendue aux différents BB afin d'évaluer leur constante d'équilibre et vérifier que la réaction est bien iso-énergétique et iso-cinétique. Pour chaque BB, l'expérience a été réalisée 3 fois en utilisant 3 ratios différents de BB par rapport au peptide. Les constantes d'équilibre K' sont obtenus en moyennant les 3 valeurs déterminées (Tableau 5).

Tableau 5 - Constante d'équilibre obtenue pour les transthioestérifications entre 1 et chaque BB.

| BB | Ratio | Temps | % produit dans le mélange à l'équilibre | K' |
|--------------|-------|-------|---|-------------|
| 4(F) | 1:1 | 24h | 1(F)⁶ (52%) | 0.9±0.2 |
| | 1:5 | 3h | 1(F)⁶ (81%) | |
| | 1:10 | 3h | 1(F)⁶ (88%) | |
| 4(A) | 1:1 | 24h | 1(A)⁶ (43%) | 0.5±0.1 |
| | 1:5 | 3h | 1(A)⁶ (76%) | |
| | 1:10 | 3h | 1(A)⁶ (83%) | |
| 4(W) | 1:1 | 4h | 1(W)⁶ (53%) | 1.2±0.1 |
| | 1:2 | 4h | 1(W)⁶ (69%) | |
| | 1:5 | 5h | 1(W)⁶ (85%) | |
| 4(L) | 1:1 | 24h | 1(L)⁶ (54%) | 1±0.4 |
| | 1:5 | 3h | 1(L)⁶ (78%) | |
| | 1:10 | 3h | 1(L)⁶ (88%) | |
| 4(V) | 1:5 | 24h | 1(V)⁶ (81%) | 0.7±0.2 |
| | 1:10 | 3h | 1(V)⁶ (88%) | |
| | 1:20 | 3h | 1(V)⁶ (92%) | |
| 4(Ai) | 1:1 | 24h | 1(Ai)⁶ (60%) | 1.5±0.1 |
| | 1:5 | 24h | 1(Ai)⁶ (85%) | |
| | 1:10 | 24h | 1(Ai)⁶ (92%) | |
| 4(hA) | 1:1 | 4h | 1(hA)⁶ (55%) | 1.2±0.3 |
| | 1:5 | 4h | 1(hA)⁶ (85%) | |
| | 1:10 | 4h | 1(hA)⁶ (90%) | |
| 4(tL) | 1:1 | 24h | 1(tL)⁶ (<1%) | Non atteint |
| | 1:5 | 24h | 1(tL)⁶ (26%) | |
| | 1:10 | 24h | 1(tL)⁶ (35%) | |
| 4(G) | 1:1 | 4h | 1(G)⁶ (55%) | 1.2±0.8 |
| | 1:5 | 4h | 1(G)⁶ (85%) | |
| | 1:10 | 4h | 1(G)⁶ (90%) | |
| 4(Y) | 1:10 | 4h | 1(Y)⁶ (44%) | 0.9±0.4 |
| | 1:5 | 4h | 1(Y)⁶ (86%) | |
| | 1:10 | 4h | 1(Y)⁶ (89%) | |
| 4(pG) | 1:1 | 4h | 1(pG)⁶ (42%) | 0.4±0.1 |
| | 1:5 | 4h | 1(pG)⁶ (66%) | |
| | 1:10 | 4h | 1(pG)⁶ (78%) | |
| 4(K) | 1:1 | 4h | 1(K)⁶ (49%) | 1.1±0.2 |
| | 1:5 | 4h | 1(K)⁶ (85%) | |
| | 1:10 | 4h | 1(K)⁶ (92%) | |
| 4(R) | 1:10 | 6h | 1(R)⁶ (ND*) | ND* |
| 4(D) | 1:10 | 6h | 1(D)⁶ (ND*) | ND* |
| 4(E) | 1:1 | 4h | 1(E)⁶ (53%) | 1.2±0.8 |
| | 1:5 | 4h | 1(E)⁶ (83%) | |
| | 1:10 | 4h | 1(E)⁶ (85%) | |

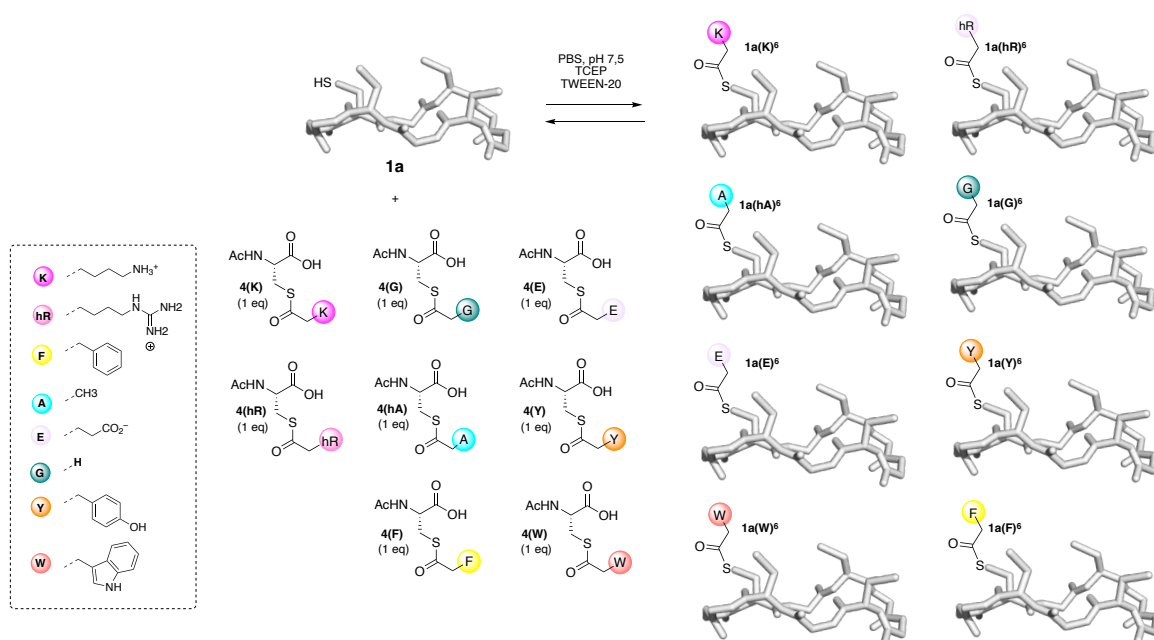
* Superposition du signal HPLC correspondant au peptide libre et au peptide fonctionnalisé. (ND = non déterminé)

Dans chaque cas, la formation d'un unique produit est observée, correspondant au thioester **1a(X)⁶** caractérisé en spectrométrie de masse. Pour la plupart des BB, l'équilibre est atteint en quelques heures. Pour les BB possédant un encombrement

stérique plus important (**4(V)** et **4(Ai)**), la réaction est plus lente et 24h sont nécessaires pour atteindre l'équilibre. Lorsque l'encombrement augmente encore d'avantage (BB tL), l'équilibre n'est pas atteint même après 24h. Dans tous les cas, les constantes d'équilibre sont du même ordre de grandeur, proches de 1, quel que soit la nature des chaînes latérales. Néanmoins, il existe des BB pour lesquels l'équilibre est plus en faveur du thioester (**4(G)**) et d'autres pour lesquels cet équilibre est moins déplacé (**4(pG)**) traduisant des faibles différences de stabilité entre les espèces fonctionnalisées. Ces différences restant faibles, elles ne devraient néanmoins pas constituer de biais dans le criblage des bibliothèques et pourront de plus être modérées par adaptation des quantités de BB utilisées pour générer les bibliothèques.

1.5. Génération de la première librairie

Les conditions de réaction étant maintenant établies, il a été possible de générer la première petite librairie dynamique à partir du peptide **1a** (1 mM). Celui-ci est mis en présence simultanée des BB **4(F)**, **4(A)**, **4(K)**, **4(G)**, **4(E)**, **4(hR)**, **4(Y)** et **4(W)** (1 eq au total) dans un tampon aqueux à pH 7,5 (Schéma 5).



Le mélange est placé sous agitation. Il est ensuite acidifié au TFA puis analysé par HPLC (Figure 11).

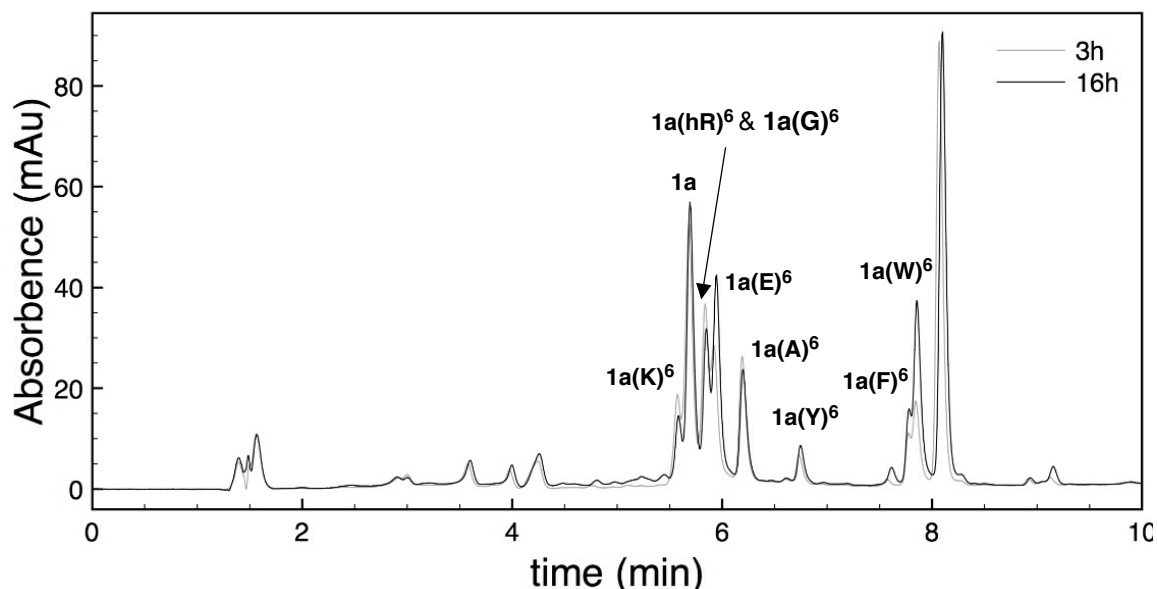


Figure 11 - Chromatogramme obtenu pour la bibliothèque combinatoire dynamique générée à partir de **1a** et des 8 BB à l'équilibre.

Les différents produits de réactions attendus sont présents dans le mélange en adéquation avec leur constante apparente de réaction K' : 3% pour **1a(K)**⁶, 34% pour **1a**, 9% pour **1a(hR)**⁶ et **1a(G)**⁶, 17% pour **1a(E)**⁶, 17% pour **1a(A)**⁶, 5% pour **1a(Y)**⁶, 1% pour **1a(F)**⁶ et 13% pour **1a(W)**⁶. Ceci montre que la réaction d'un bloc sur le *scaffold* n'a pas d'incidence sur la réaction de cette plateforme avec d'autres blocs, en accord avec la réversibilité de la réaction.

1.6. Réversibilité de la réaction

Afin de mettre en évidence encore d'avantage le contrôle thermodynamique de la réaction la réversibilité de l'échange a été étudiée par addition séquentielle des BB dans le milieu réactionnel et étude de la réorganisation induite dans celui-ci.

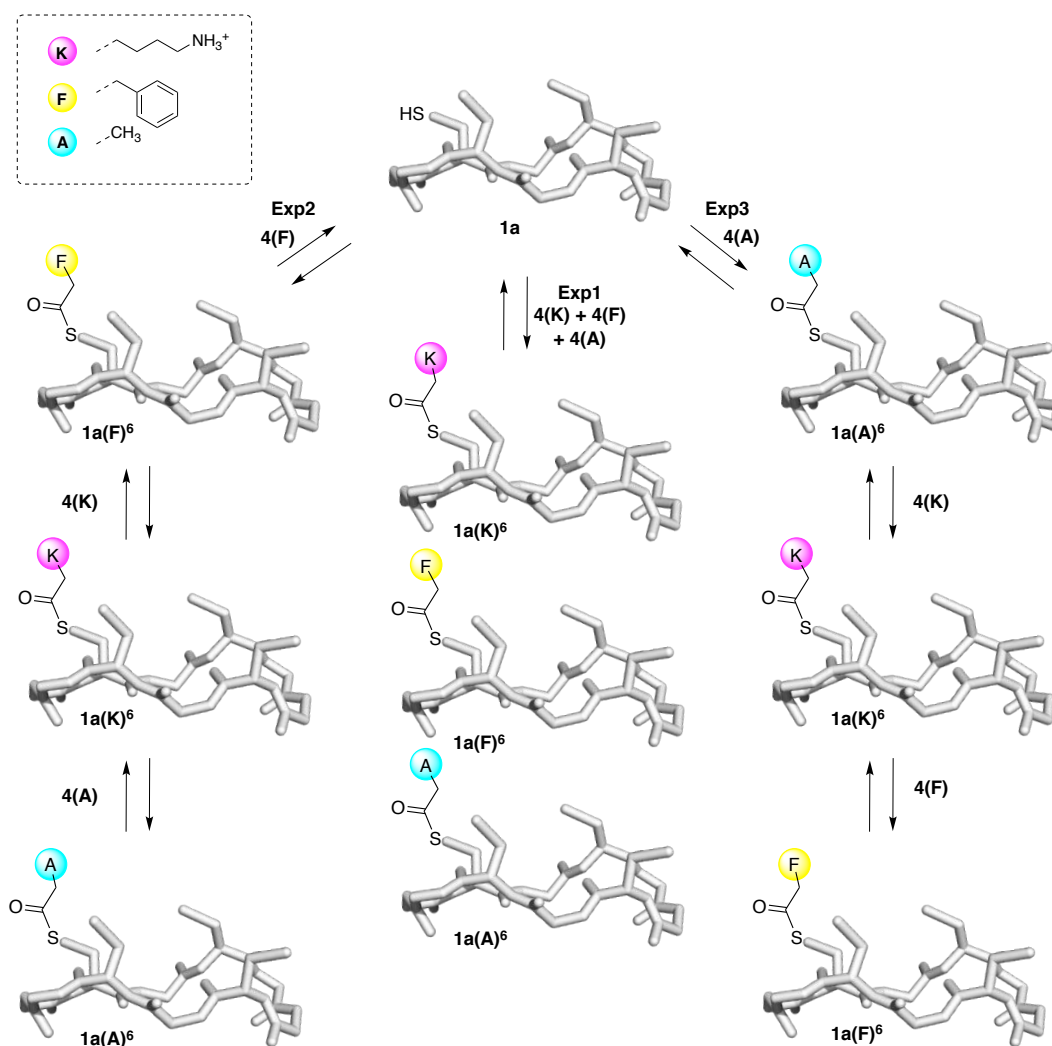


Schéma 6 - Expériences parallèles réalisées avec ajout successif de BB.

Pour cela, trois expériences ont été menées en parallèle : dans une 1^{ère} expérience le peptide **1a** (1mM) est traité simultanément par 3 BB **4(A)**, **4(F)** et **4(K)** (1 eq chacun). Deux autres expériences sont réalisées où les mêmes BB sont utilisés mais introduits cette fois de manière séquentielle dans un sens (exp n°2 : **4(F)** puis **4(K)** puis **4(A)**) et dans l'autre (exp n°3 : **4(K)** puis **4(F)** puis **4(A)**) (Schéma 6). Après introduction de chacun des BB, la réaction est maintenue sous agitation jusqu'à atteindre l'équilibre et un aliquot est prélevé, acidifié et analysé en HPLC avant ajout du BB suivant (Figure 12).

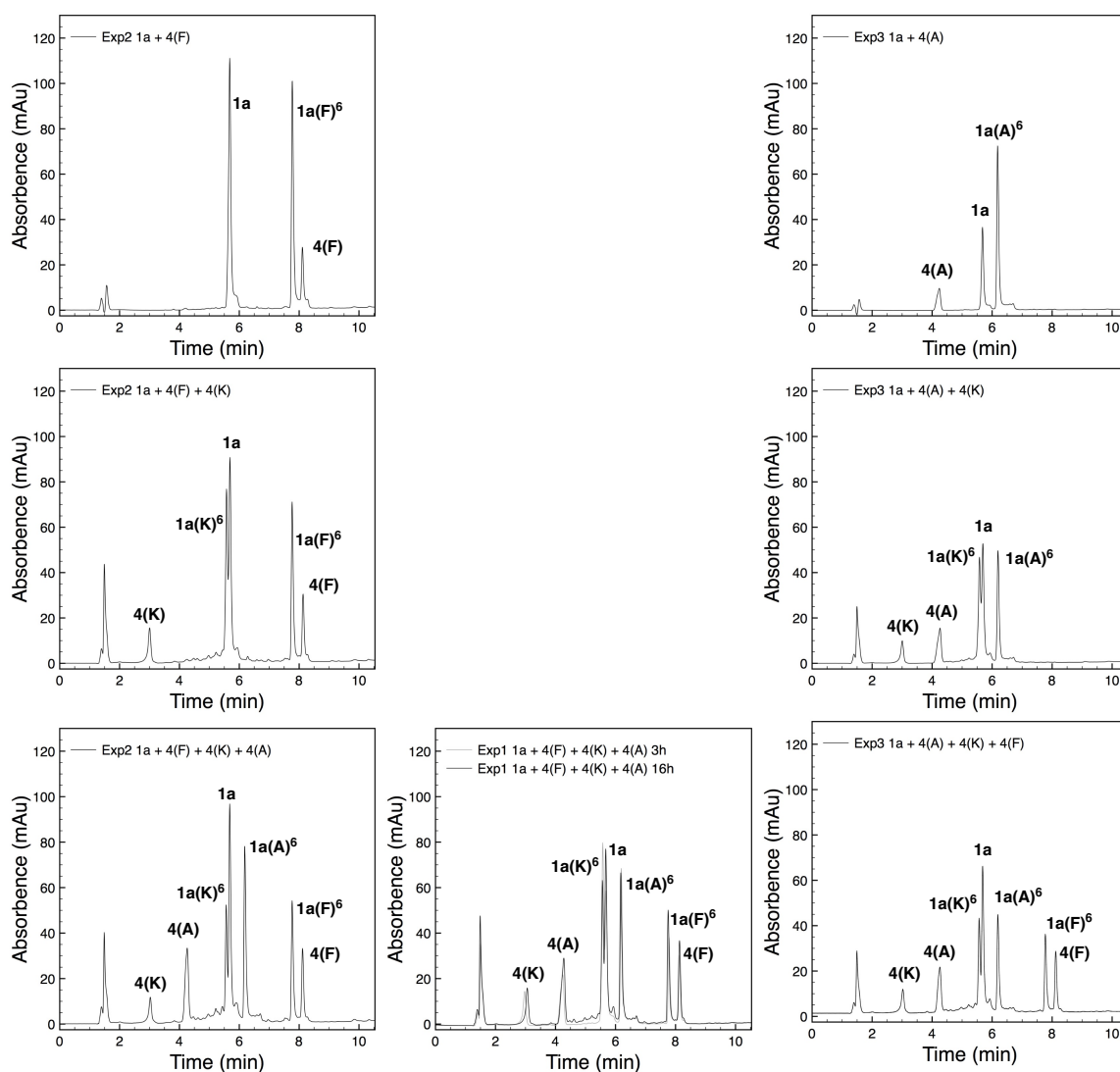


Figure 12 - Chromatogrammes obtenus après chaque équilibration des bibliothèques.

Après ajout de chaque BB, un nouveau pic apparaît sur le chromatogramme correspondant dans chaque cas à la formation du nouveau produit acétylé au dépend du thioester présent dans le milieu réaction. Les proportions de chacun des 3 produits obtenus dans les 3 expériences sont très proches prouvant de manière non ambiguë la réversibilité du processus.

1.7. Conclusion

Cette étude préliminaire a confirmé que la réaction de transthioestérification est compatible avec le peptide et avec les conditions physiologiques. Les différentes expériences réalisées montrent que le pH a une vraie influence sur la vitesse de la réaction puis qu'à pH 7.5 la réaction est 3 fois plus rapide et, pour la plupart des BB, l'équilibre peut être obtenu dans un temps raisonnable laissant envisager la présence d'une cible biologique. Pour les BB portant un encombrement stérique plus important, la réaction est plus lente et leur présence dans la bibliothèque devra être considéré en fonction de la stabilité de la cible utilisée dans les conditions de la réaction.

Les valeurs similaires des K' obtenus pour les différentes réactions en fonction des BB utilisés montrent que les membres des bibliothèques générés sont bien iso-énergétiques. Bien que de faibles différences existent, il est possible néanmoins d'accéder à des bibliothèques équimolaires en adaptant les quantités de BB utilisées. Une première bibliothèque a été préparée en additionnant simultanément 8 BB. Enfin, les expériences menées en parallèle par ajout successif de BB ont établi la réversibilité du système.

Les conditions requises en chimie combinatoire dynamique au niveau de la réaction et des produits semblant remplies, il est maintenant possible de complexifier les systèmes en passant à des peptides porteurs de deux ou quatre fonctions thiols réactives.

2. Étude de l'échange thiol/thioesters

2.1. Étude de l'influence de la présence d'un thioester à la surface du peptide sur la réaction

Deux peptides porteurs de deux cystéines ont été synthétisés (Figure 13). Ils permettent d'évaluer l'influence que peut avoir la première fonctionnalisation par un BB sur la cystéine voisine. Le peptide **2a** porte les cystéines en positions 3 et 6, il a donc ses cystéines face à face et donc les plus proches possibles. De cette manière, ses

groupements thiols sont les plus sensibles l'un vis-à-vis de l'autre. Le peptide **2b** les porte en position 3 et 8, ses cystéines sont donc plus éloignées.

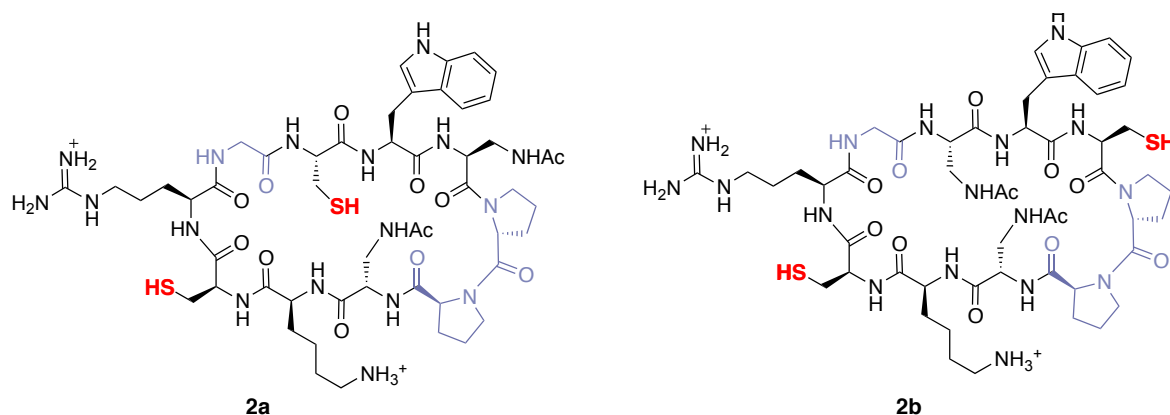


Figure 13 - Séquences des peptides **2a** et **2b**.

2.1.1. Exemple de librairie à un bloc

Le peptide **2a** (1mM) est traité par le BB **4(F)** (10 eq) dans un tampon phosphate contenant du TCEP et du Tween-20, à pH 7,5 (Schéma 7). Après 2h et 6h de réaction, le mélange est acidifié par ajout de TFA puis analysé par HPLC (Figure 14).

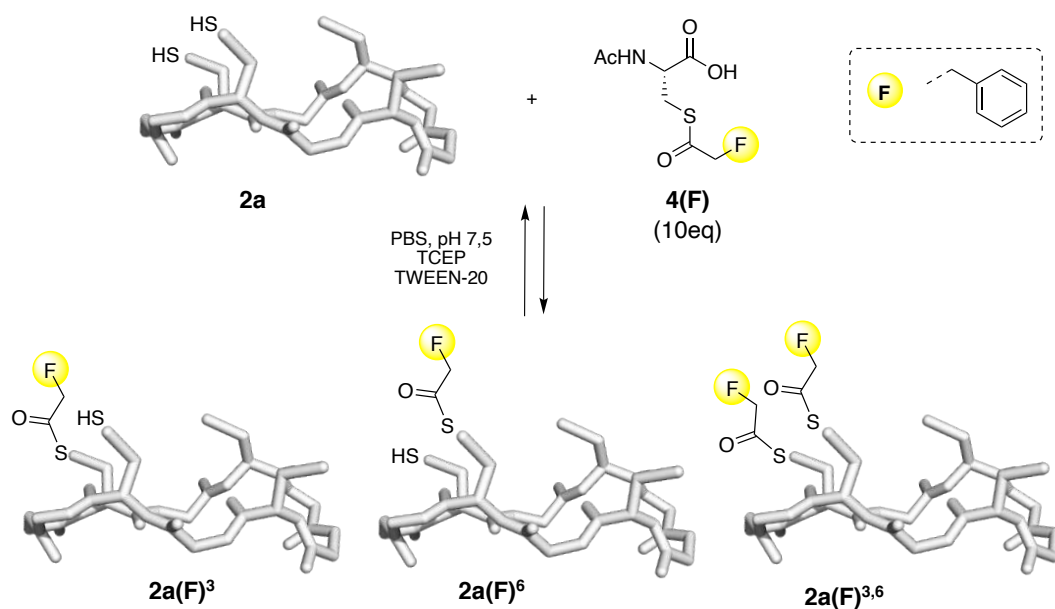


Schéma 7. Réaction entre **2a** et 10 eq de BB **4(F)**.

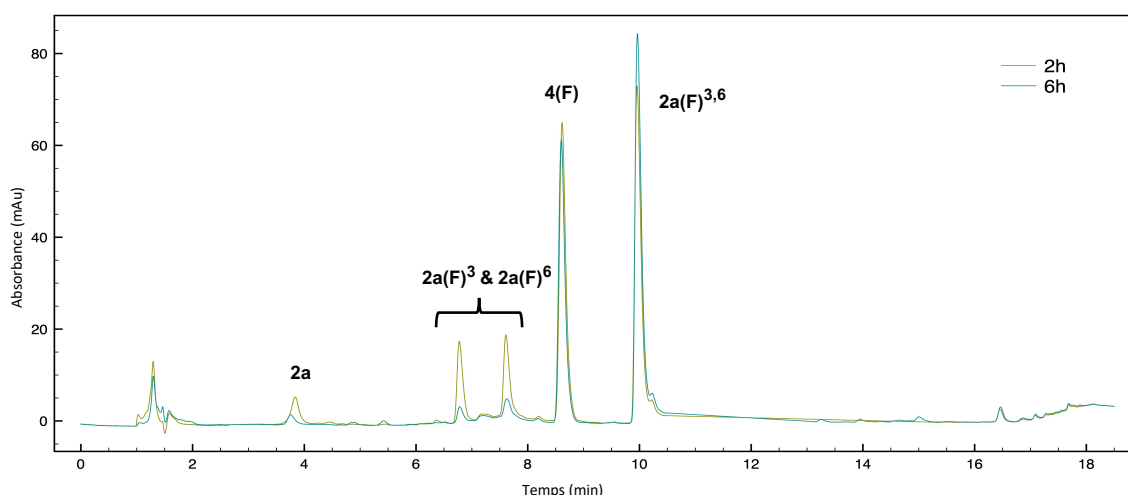


Figure 14 - Chromatogrammes correspondant obtenus après 2 et 6h de réaction.

Tableau 6 - Récapitulatif des données obtenues après 6h de réaction entre **2a** et **4(F)**.

| t_r (min)* | % Aire du pic | m/z (MALDI) | Peptides | Formule brute Masse molaire théorique (g.mol ⁻¹) |
|--------------|---------------|---------------------------|--|---|
| 3,75 | 2% | [M+H] ⁺ 1184.7 | 2a | C ₅₁ H ₇₇ N ₁₇ O ₁₂ S ₂ 1183.5 |
| 6,78 | 3% | [M+H] ⁺ 1316.6 | 2a(F)³ ou 2a(F)⁶ | C ₆₀ H ₈₇ N ₈₅ O ₁₃ S ₂ 1315.57 |
| 7,62 | 4% | [M+H] ⁺ 1316.6 | 2a(F)³ or 2a(F)⁶ | C ₆₀ H ₈₇ N ₈₅ O ₁₃ S ₂ 1315.57 |
| 9,97 | 91% | [M+H] ⁺ 1448.6 | 2a(F)^{3,6} | C ₆₉ H ₉₃ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ 1447.7 |

* Éluant : H₂O/ACN, 0,1% TFA, 20 à 60% ACN, 15 minutes.

La formation de 3 nouveaux pics est observée : deux espèces portant une chaîne acyle **2a(F)³** et **2a(F)⁶** avec des temps de rétention (t_r) respectifs de 6,8 et 7,6 minutes et l'espèce portant deux chaînes acyles **2a(F)^{3,6}** dont le temps de rétention est de 9,9 minutes. Les deux isomères monofonctionnalisés se forment à la même vitesse et dans des proportions identiques indiquant qu'il n'y a pas de différence de réactivité significative entre les deux cystéines. L'attribution des pics a été réalisée après collecte et analyse MALDI-TOF. Cette technique d'analyse permet de distinguer les degrés de fonctionnalisation des peptides ayant des masses m/z différentes. En revanche elle ne permet pas de différencier les peptides isomères tel que **2a(F)³** et **2a(F)⁶**.

La formation du produit doublement fonctionnalisé se fait bien à partir des produits monofonctionnalisés puisqu'en fonction du temps leurs proportions respectives décroissent (d'après la superposition des chromatogrammes à 2h et à 6h). Cette diminution semblant équivalente pour les deux espèces monofonctionnalisées, cela traduit une absence d'influence de la fonctionnalisation d'un site sur la réactivité de l'autre.

La même réaction a été reproduite avec d'autres BB **4(A)**, **4(L)** ou **4(W)** à 2, 10 ou 20 eq de manière à confirmer les observations précédentes (Tableau 7 et partie expérimentale). Les peptides portant une chaîne acyle sont notés **2a(X)₁** et ceux portant deux chaînes acyles sont notés **2a(X)₂**.

Tableau 7 - Récapitulatif des données obtenues après 4 ou 6h de réaction entre **2a**, **4(L)**, **4(A)** ou **4(W)**.

| BB | Ratio | Produit (% à l'équilibre, K') | Masse molaire théorique (g.mol⁻¹) | m/z (MALDI-MS/ESI-MS) |
|-------------|--------------|--------------------------------------|---|------------------------------|
| 4(L) | 1:10 | 2a (1%) | 1183.5 | [MH ⁺] 1184.5 |
| | | 2a(L)₁ (3%) | 1281.6 | [MH ⁺] 1282.6 |
| | | 2a(L)₂ (96%) | 1379.7 | [MH ⁺] 1380.7 |
| 4(A) | 1:10 | 2a (2%) | 1183.5 | [MH ⁺] 1184.6 |
| | | 2a(A)₁ (15%) | 1239.6 | [MH ⁺] 1240.7 |
| | | 2a(A)₂ (83%) | 1295.6 | [MH ⁺] 1296.9 |
| 4(W) | 1:10 | 2a (2%) | 1183.5 | [MH ⁺] 1184.6 |
| | | 2a(W)₁ (5%) | 1304.5 | [MH ⁺] 1305.4 |
| | | 2a(W)₂ (93%) | 1475.6 | [MH ⁺] 1476.5 |

Dans chaque cas, 3 produits sont observés et les peptides ne portant qu'une seule chaîne acyle sont présents dans des proportions similaires.

2.1.2. Aspect combinatoire : exemple de librairie à deux blocs

Une nouvelle librairie a ensuite été générée dans les mêmes conditions à partir du peptide **2a** (1mM) et des BB **4(A)** et **4(L)** ajoutés simultanément (2, 10 ou 20 eq de chaque) (Schéma 8). Outre les 3 produits formés dans la librairie obtenue par

utilisation d'un BB4(A) et 4(L), deux nouveaux adduits issus de la fonctionnalisation par chacun des BB sont observés (Figure 15, Tableau 8 et partie expérimentale).

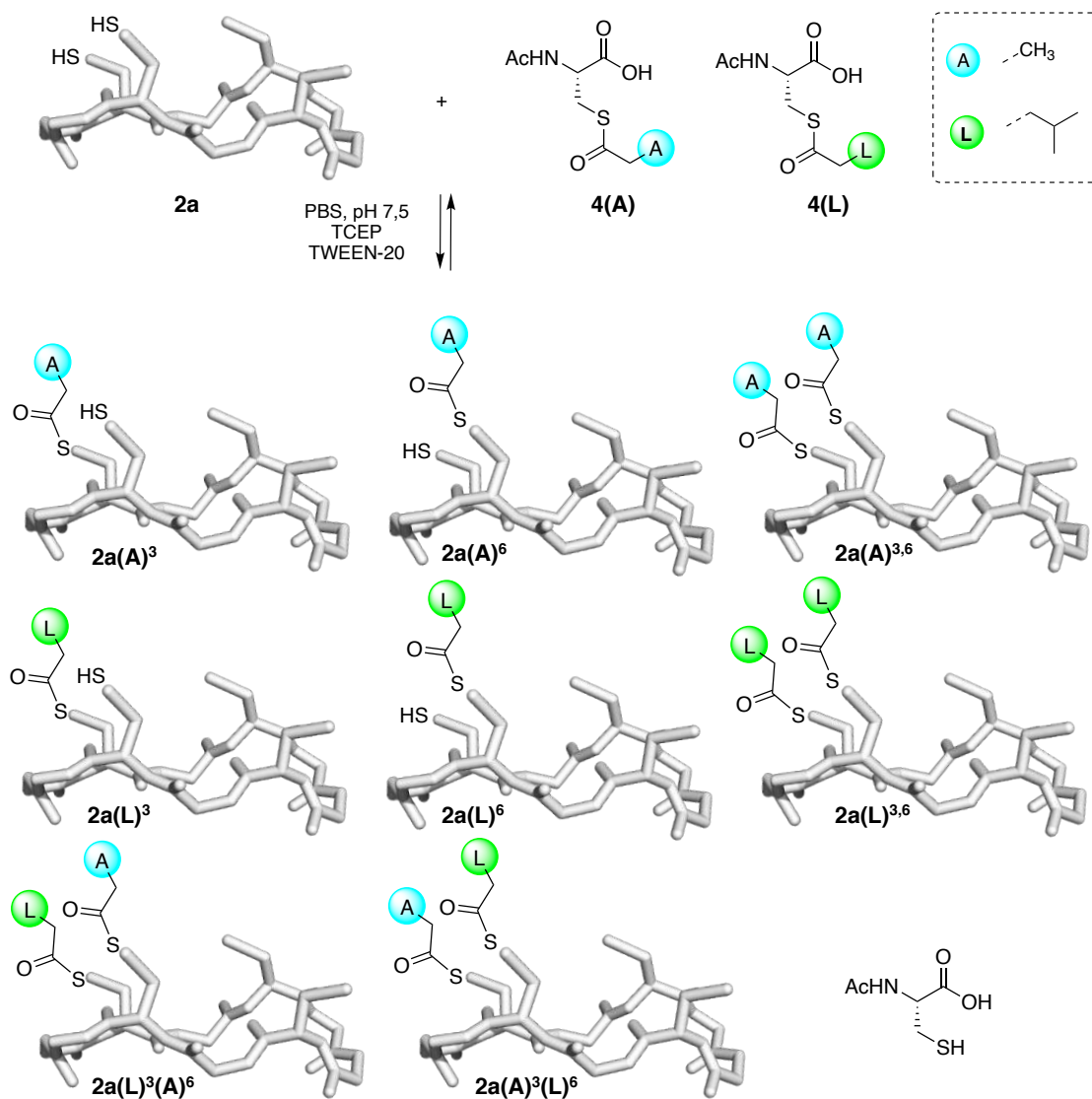


Schéma 8 - Schéma de la bibliothèque mixte formée par l'addition simultanée de 4(A) et 4(L) en présence de 2a.

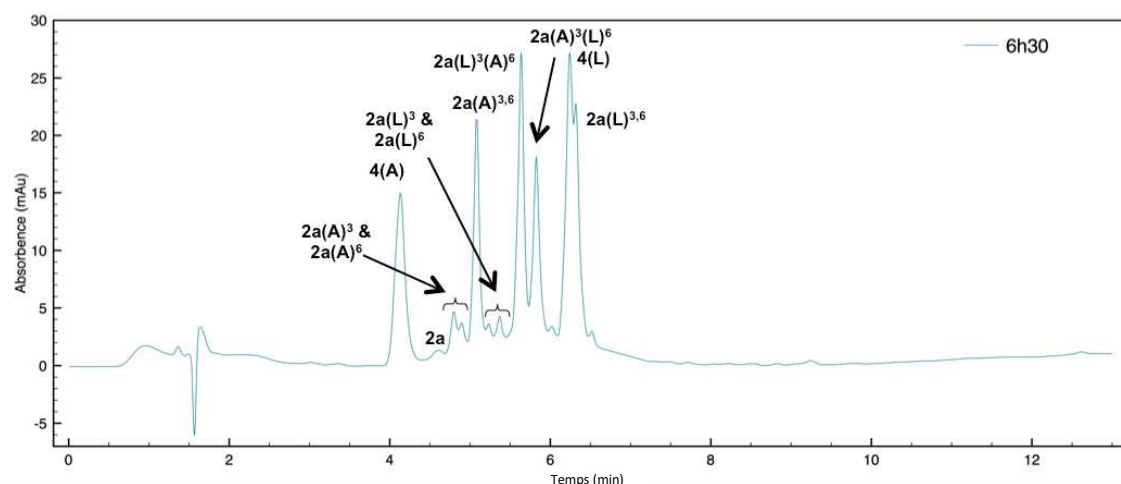


Figure 15 - Chromatogramme obtenu après 6h30 de réaction entre **2a**, **4(A)** et **4(L)** (10 eq en tout).

Tableau 8 - Récapitulatif des données obtenues après 6h30 de réaction entre **2a** et **4(L)** et **4(A)** (10 eq en tout).

| t_r (min)* | % Aire du pic | m/z (MALDI) | Peptides | Formule brute Masse molaire théorique (g.mol ⁻¹) |
|--------------|---------------|---------------------------|---|---|
| 4,7 | 1% | [M+H] ⁺ 1184.6 | 2a | C ₅₁ H ₇₇ N ₁₇ O ₁₂ S ₂ 1183.5 |
| 4,8 4,9 | 5%** | [M+H] ⁺ 1240.6 | 2a(A)³, 2a(A)⁶ | C ₅₄ H ₈₁ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ 1239.6 |
| 5,1 | 21% | [M+H] ⁺ 1296.6 | 2a(A)^{3,6} | C ₅₇ H ₈₅ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ 1295.6 |
| 5,3 | 2% | [M+H] ⁺ 1282.6 | 2a(L)³, 2a(L)⁶ | C ₆₀ H ₉₁ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ 1281.6 |
| 5,6 | 28% | [M+H] ⁺ 1338.8 | 2a(A)⁶(L)³ | C ₇₁ H ₁₁₅ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1337.6 |
| 5,8 | 19% | [M+H] ⁺ 1338.8 | 2a(A)³(L)⁶ | C ₇₁ H ₁₁₅ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1337.6 |
| 6,3 | 20%* | [M+H] ⁺ 1380.7 | 2a(L)^{3,6} | C ₆₃ H ₉₇ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ 1379.7 |

* Éluant : H₂O/ACN, 0,1% TFA, 5 à 100% ACN, 10 minutes.

** Dû au chevauchement des pics, le % d'aire du pic n'a pas pu être déterminé.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec le peptide **2b** (1 mM) et les BB **4(A)**, **4(L)** ou **4(A)+4(L)** 1 : 1 (2, 10 ou 20eq de BB au total). Les résultats obtenus pour les

différentes bibliothèques sont comparables aux chromatogrammes précédents (Figure 16, Tableau 9 et partie expérimentale).

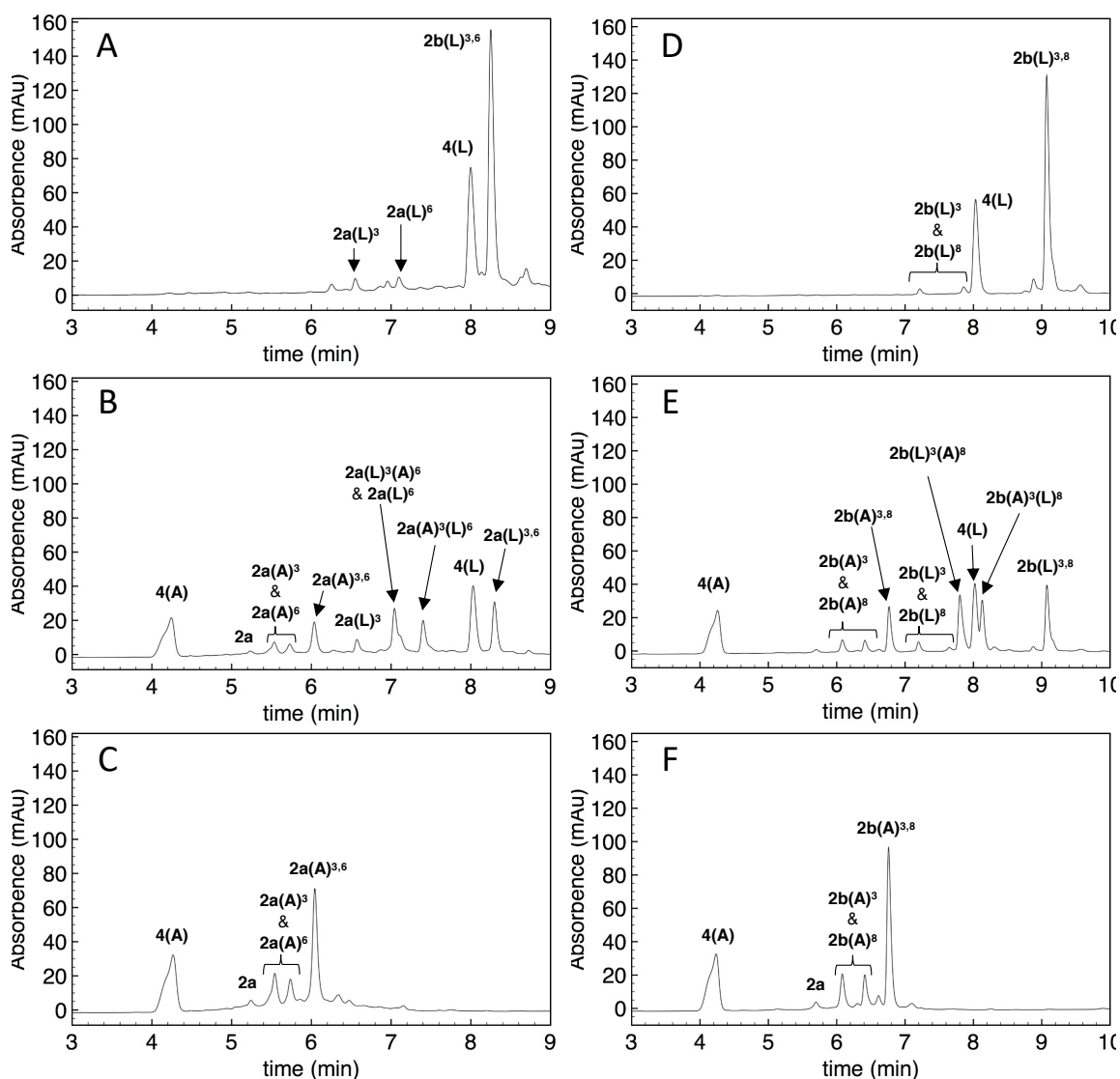


Figure 16 - Comparaison des chromatogrammes obtenus pour l'échange de thioester entre les peptides **2a** (A-C) ou **2b** (D-E) avec **4(A)** (C, F), **4(L)** (A, D) et **4(A)+4(L)** (B, E).

Chapitre I : Mise en place des bibliothèques combinatoires dynamiques

Tableau 9 - Récapitulatif des données obtenues pour les réactions entre **2a** et **4(L)**, **4(A)** et **4(L)+4(A)**.

| BB | t_r (min)* | % Aire du pic | m/z (MALDI) | Peptides | Formule brute Masse molaire théorique (g.mol⁻¹) |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------|--|---|
| 4(L)* | 6,08 | 5% | [M+H] ⁺ 1282.6 | 2b(L)³ ou 2b(L)⁶ | C ₅₇ H ₈₇ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ 1281.6 |
| | 6,87 | 5% | [M+H] ⁺ 1282.7 | 2b(L)³ ou 2b(L)⁶ | C ₅₇ H ₈₇ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ 1281.6 |
| | 8,37 | 90% | [M+H] ⁺ 1380.7 | 2b(L)^{3,6} | C ₆₃ H ₉₇ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ 1379.7 |
| 4(A)** | 7,7 | 7% | [M+H] ⁺ 1240.5 | 2b(A)³ ou 2b(A)⁶ | C ₅₄ H ₈₁ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ 1239.6 |
| | 7,8 | 6% | [M+H] ⁺ 1240.5 | 2b(A)³ ou 2b(A)⁶ | C ₅₄ H ₈₁ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ 1239.6 |
| | 8,3 | 87% | [M+H] ⁺ 1296.6 | 2b(A)^{3,6} | C ₅₇ H ₈₅ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ 1295.6 |
| 4(L)+4(A) *** | 4,2 | 5%** | [M+H] ⁺ 1240.5 | 2b(A)³ ou 2b(A)⁶ | C ₅₄ H ₈₁ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ 1239.6 |
| | 4,6 | | | | |
| | 5,1 | 20% | [M+H] ⁺ 1296.7 | 2b(A)^{3,6} | C ₅₇ H ₈₅ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ 1295.6 |
| | 5,7 | >2% | [M+H] ⁺ 1282.7 | 2b(L)³ ou 2b(L)⁶ | C ₆₀ H ₉₁ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ 1281.6 |
| | 6,5 | 26% | [M+H] ⁺ 1338.7 | 2b(A)⁶(L)³ | C ₇₁ H ₁₁₅ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1337.6 |
| | 6,9 | 20% | [M+H] ⁺ 1338.7 | 2b(A)³(L)⁶ | C ₇₁ H ₁₁₅ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1337.6 |
| | 8,1 | 27%* | [M+H] ⁺ 1380.7 | 2b(L)^{3,6} | C ₆₃ H ₉₇ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ 1379.7 |

*** Éluant : H₂O/ACN, 0,1% TFA, 04 à 60% ACN, 10 minutes.

Les résultats obtenus pour les expériences effectuées sur les peptides **2a** et **2b** sont similaires puisque les pourcentages de chaque espèce sont assez proches (environ 5% de monofonctionnalisés par Ala et 2% par Leu, 20 et 21% de difonctionnalisés par Ala et 20 et 27% par Leu, 26% et 20% respectivement de chacune des espèces fonctionnalisées simultanément par Ala et Leu). Ces résultats montrent bien l'indépendance des cystéines puisque peu importe où elles sont situées sur le peptide, elles gardent la même réactivité et ne semble donc pas avoir d'influence l'une sur l'autre.

2.2. Système à 4 cystéines

La réaction d'échange thiol-thioester a été ensuite étudiée sur le peptide **3b** porteur de 4 cystéines (Figure 17).

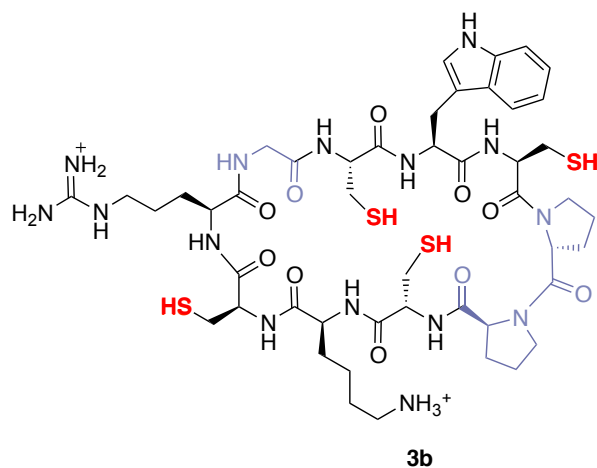


Figure 17 - Structure du peptide **3b**.

L'utilisation d'un peptide porteur de 4 fonctions réactives permet d'obtenir des bibliothèques beaucoup plus complexes. Il permet de générer, en plus des structures tétrafonctionnalisées, différents isomères de position mono, di et trifonctionnalisés. L'utilisation d'un seul bloc permet donc de synthétiser 16 composés peptidiques. En fonction du nombre de BB introduit dans la bibliothèque, le nombre de membre de la bibliothèque suit une loi polynomiale $(n+1)^x$, où n est le nombre de blocs utilisés et x le nombre de positions fonctionnalisables (Figure 18). Cette augmentation rapide du nombre de composés générés souligne la puissance de la stratégie combinatoire dynamique concernant l'accès à de larges bibliothèques de peptides.

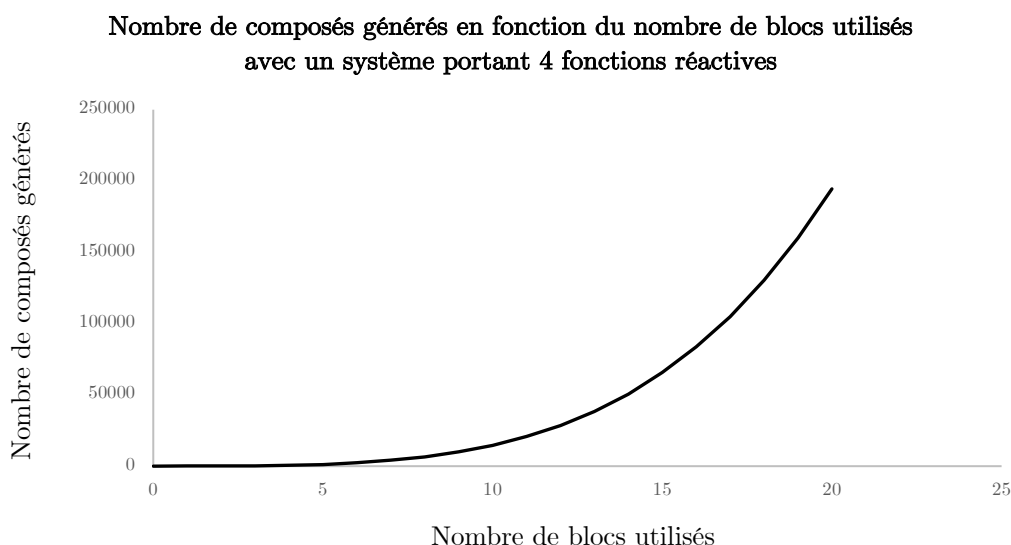


Figure 18 - Graphique illustrant l'évolution du nombre de membre de la librairie en fonction du nombre de bloc utilisé pour un système à 4 cystéines.

2.2.1. Exemple de librairies à un bloc

Dans un premier temps, des librairies ont été générées en utilisant un seul bloc. Des études préliminaires réalisées sur le peptide **3a** avec le BB **4(L)** (10 eq) ont montré que dès lors qu'ils sont formés, les produits portant plusieurs chaînes Leu (3 ou 4) précipitent dans le milieu réactionnel déplaçant ainsi l'équilibre vers leur propre formation (Thèse Benjamin Zagiel) et rendent les librairies inexploitable pour un quelconque criblage. C'est pourquoi, les expériences ont été réalisées avec le peptide **3b** portant une chaîne cationique supplémentaire en position 2. Nous avons vérifié que dans ce cas, tous les produits formés sont bien solubles dans le milieu réactionnel.

Le peptide **3b** (1mM) est mis en présence du BB **4(L)** (10 ou 40 eq) dans un tampon phosphate à pH 7.5 (Schéma 9). Cette réaction conduit à 16 composés potentiels dont : 4 produits monofonctionnalisés que nous nommerons de manière générale **3b(L)₁**, 6 produits difonctionnalisés **3b(L)₂**, 4 produits trifonctionnalisés **3b(L)₃** et un produit tétrafonctionnalisé **3b(L)₄**.

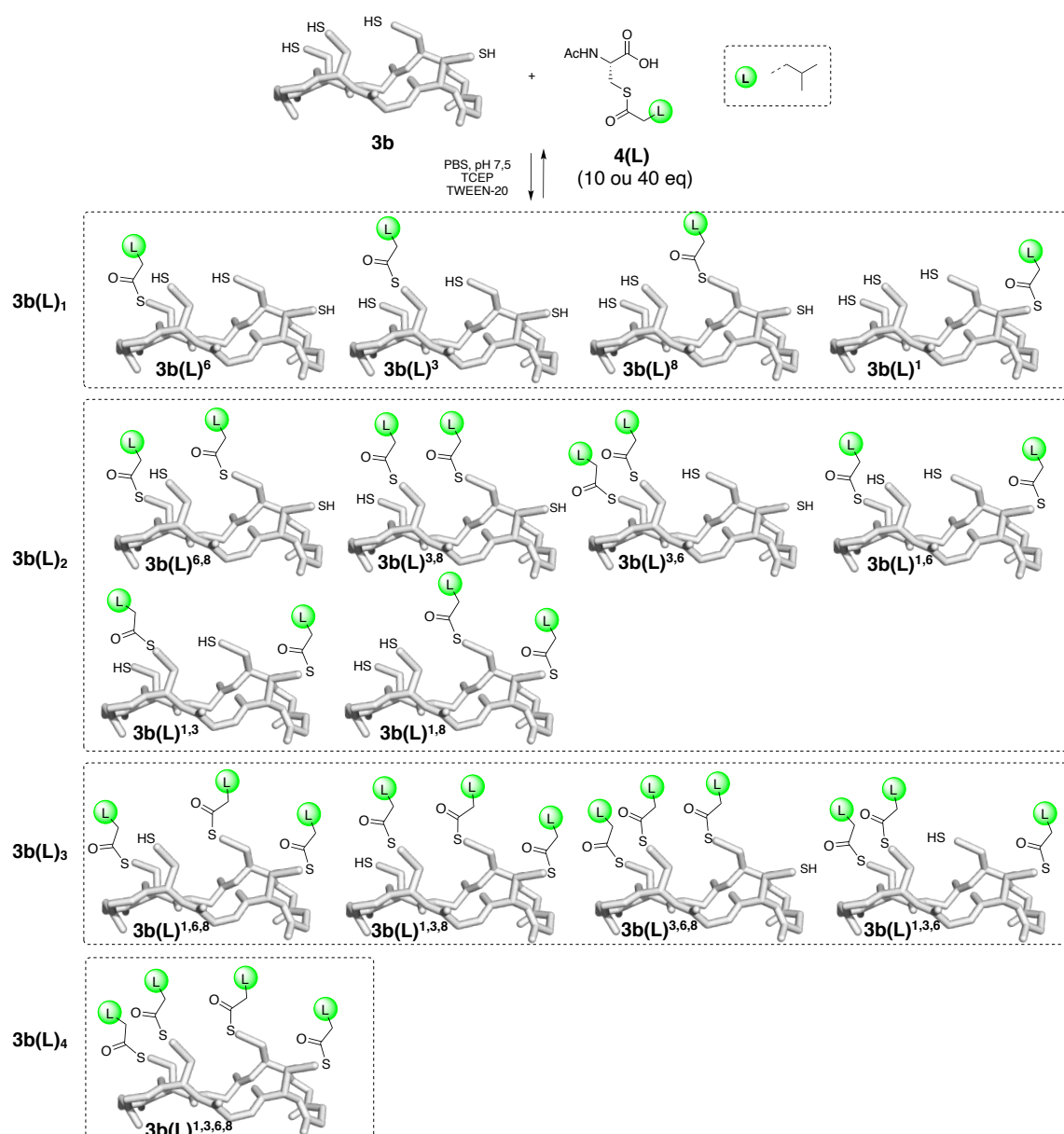


Schéma 9 - Bibliothèque générée à partir de **3a** et **4(L)**.

La réaction est suivie dans le temps : après 40 min de réaction et toutes les deux heures, un prélèvement du mélange réactionnel est effectué, acidifié et analysé en HPLC. Les chromatogrammes obtenus sont superposés pour observer l'évolution de la bibliothèque dans le temps (Figure 19). Après collecte et analyse en spectrométrie de masse, les différents pics ont pu être attribués aux différents degrés de fonctionnalisation possibles.

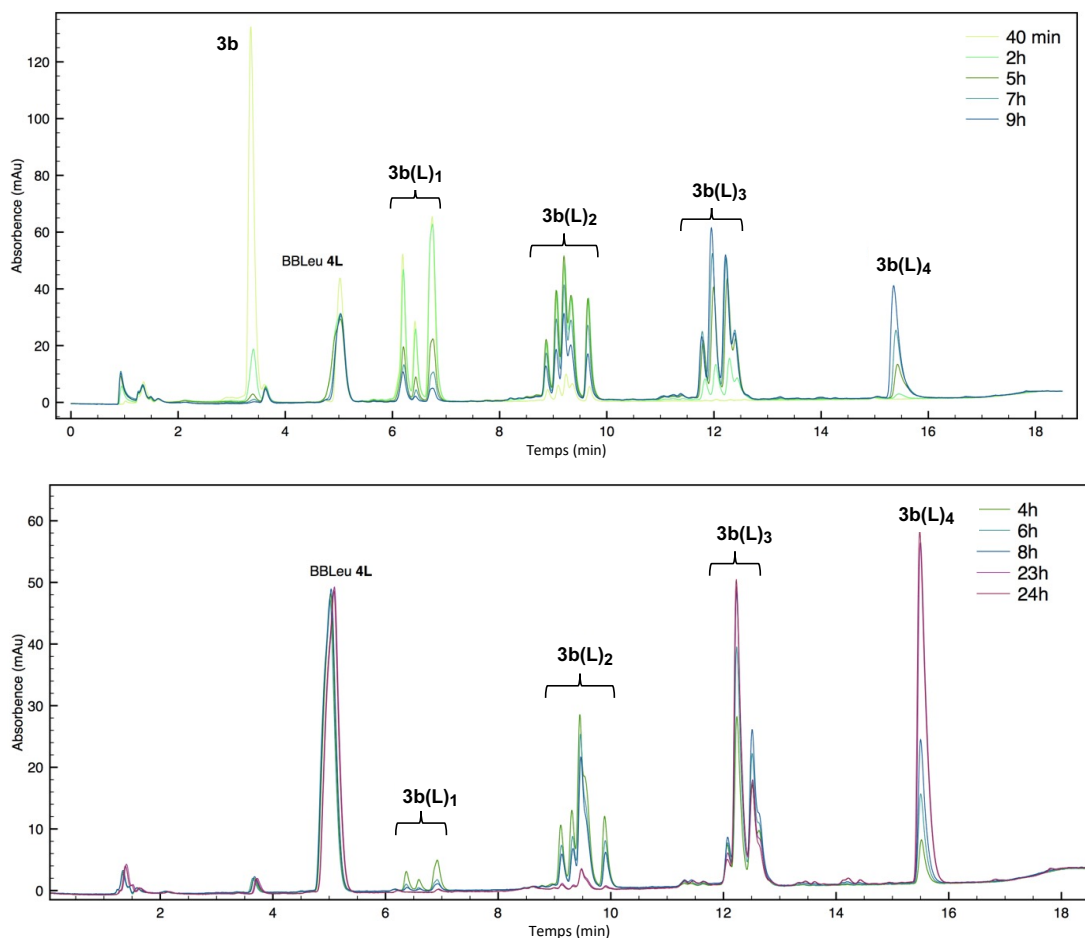


Figure 19 - Superposition des chromatogrammes obtenus de la bibliothèque générée entre **3b** et par utilisation de 10 eq de **4(L)** (en haut) et 40 eq de **4(L)** (en bas).

Le suivi de la réaction révèle la formation majoritaire des composés mono et difonctionnalisés dès le début de la réaction. Ces espèces apparaissent sous la forme de 3 pics pour les 4 espèces **3(L)₁** portant une chaîne Leu, et sous la forme de 5 pics pour les 6 espèces **3(L)₂**. Au fil du temps les espèces tri et tétrafonctionnalisées se forment pour devenir majoritaires. Pour les isomères des membres trifonctionnalisés **3(L)₃**, 4 signaux distincts sont obtenus pour les 4 isomères possibles. Après 9h de réactions, toutes les espèces sont présentes dans des proportions variables.

Il faut noter ici que la faible présence de chevauchement dans les conditions standards entre les signaux sur le chromatogramme puisque 14 pics sont observés sur 16 attendus. Cependant, les conditions de séparation peuvent être optimisées afin d'obtenir une meilleure résolution des pics.

Lorsqu'un plus grand excès de BB est utilisé, les espèces tri et tétrafonctionnalisées sont alors grandement majoritaires contrairement aux espèces mono et difonctionnalisées qui ne sont presque plus détectables (Tableau 10).

Tableau 10 - Récapitulatif des données obtenues après 24h de réaction entre **3b** et 40 équivalents de **4(L)**.

| t_r (min)* | % Aire du pic | m/z (MALDI/ESI) | Peptides | Formule brute Masse molaire théorique (g.mol⁻¹) |
|--------------------------------|----------------------|---|---|---|
| 6.2 min 6.4 min 6.7 min | <1%** | [M+2H] ²⁺ 616.7 ^b | 3b(L)¹, 3b(L)³, 3b(L)⁶, 3b(L)⁸ | C ₅₃ H ₈₁ N ₁₅ O ₁₁ S ₄ 1231.5 |
| 9.1 min 9.4 min | 3%** | [M+H] ⁺ 1329.8 ^a [M+2H] ²⁺ 665.8 ^b | 3b(L)^{1,3}, 3b(L)^{1,6}, 3b(L)^{1,8}, 3b(L)^{3,6}, 3b(L)^{3,8}, 3b(L)^{6,8} | C ₅₉ H ₉₁ N ₁₅ O ₁₂ S ₄ 1329.6 |
| 12 min 12.2 min 12.5 min | 41%** | [M+H] ⁺ 1427.7 ^a [M+2H] ²⁺ 714.8 ^b | 3b(L)^{1,3,6}, 3b(L)^{1,3,8}, 3b(L)^{1,6,8}, 3b(L)^{3,6,8} | C ₆₅ H ₁₀₁ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ 1427.7 |
| 15.4 min | 55% | [M+H] ⁺ 1525.4 ^a [M+2H] ²⁺ 763.8 ^b | 3b(L)^{1,3,6,8} | C ₇₂ H ₁₁₅ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1525.7 |

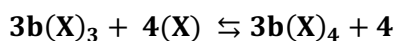
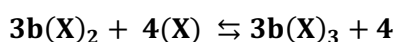
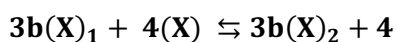
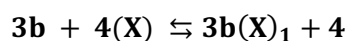
* Éluant : H₂O/ACN, 0,1% TFA, 30 à 80% ACN, 15 minutes.

** Dû aux chevauchements des pics, le % d'aire du pic dans le mélange n'a pas pu être déterminé.

^a obtenu par analyse MALDI-TOF, ^b obtenu par analyse ESI-MS

Afin de montrer la généralité de la réaction, d'autres bibliothèques ont été préparées avec des BB différents (**4(G)**, **4(A)**, **4(W)**). Des résultats similaires ont été obtenus (Tableau 11).

Pour ces bibliothèques, les différentes constantes apparentes d'équilibre K' ont été calculées comme suit :



$$K'_1 = \frac{[\mathbf{3b(X)}_1]_{\text{eq}}[\mathbf{4}]_{\text{eq}}}{[\mathbf{3b}]_{\text{eq}}[\mathbf{4(X)}]_{\text{eq}}}$$

$$K'_2 = \frac{[\mathbf{3b(X)}_2]_{\text{eq}}[\mathbf{4}]_{\text{eq}}}{[\mathbf{3b(X)}_1]_{\text{eq}}[\mathbf{4(X)}]_{\text{eq}}}$$

$$K'_3 = \frac{[\mathbf{3b(X)}_3]_{\text{eq}}[\mathbf{4}]_{\text{eq}}}{[\mathbf{3b(X)}_2]_{\text{eq}}[\mathbf{4(X)}]_{\text{eq}}}$$

$$K'_4 = \frac{[\mathbf{3b(X)}_3]_{\text{eq}}[\mathbf{4}]_{\text{eq}}}{[\mathbf{3b(X)}_4]_{\text{eq}}[\mathbf{4(X)}]_{\text{eq}}}$$

Où :

- $[\mathbf{3b}]_{\text{eq}}$, $[\mathbf{3b(X)}_1]_{\text{eq}}$, $[\mathbf{3b(X)}_2]_{\text{eq}}$, $[\mathbf{3b(X)}_3]_{\text{eq}}$ and $[\mathbf{3b(X)}_4]_{\text{eq}}$ sont approximés avec les % HPLC à l'équilibre sachant que $[\mathbf{3}]_{\text{eq}} + [\mathbf{3b(X)}_1]_{\text{eq}} + [\mathbf{3b(X)}_2]_{\text{eq}} + [\mathbf{3b(X)}_3]_{\text{eq}} + [\mathbf{3b(X)}_4]_{\text{eq}} = 1\text{mM}$
- $[\mathbf{4}]_{\text{eq}} = [\mathbf{3b(X)}_1]_{\text{eq}} + 2 * [\mathbf{3b(X)}_2]_{\text{eq}} + 3 * [\mathbf{3b(X)}_3]_{\text{eq}} + 4 * [\mathbf{3b(X)}_4]_{\text{eq}}$
- $[\mathbf{4(X)}]_{\text{eq}} = [\mathbf{4(X)}]_0 - [\mathbf{3b(X)}_1]_{\text{eq}} - 2 * [\mathbf{3b(X)}_2]_{\text{eq}} - [\mathbf{3b(X)}_3]_{\text{eq}} - [\mathbf{3b(X)}_4]_{\text{eq}}$

Tableau 11. Récapitulatif des données obtenues après pour chaque librairie générée.

| BB | Ratio | Produit (% à l'équilibre, K') | m/z calculé | MALDI-MS/ ESI-MS |
|-------------|-------|---|-------------|---|
| | | 3a (2%) | | |
| 4(L) | 1:10 | 3a(L)₁ (6%, K' ₁ =1.2) | MW = 1231.5 | [M+2H] ²⁺ 616.7 ^b |
| | | 3a(L)₂ (22%, K' ₂ =1.4) | MW = 1329.6 | [M+2H] ²⁺ 665.8 ^b |
| | | 3a(L)₃ (47%, K' ₃ =0.8) | MW = 1427.7 | [M+2H] ²⁺ 714.8 ^b |
| | | 3a(L)₄ (23%, K' ₄ =0.2) | MW = 1525.7 | [M+2H] ²⁺ 763.8 ^b |
| | | 3a (1%) | | |
| 4(A) | 1:40 | 3a(A)₁ (10%, K' ₁ =1.2) | MW = 1189.5 | [M+2H] ²⁺ 595.7 ^b |
| | | 3a(A)₂ (25%, K' ₂ =0.2) | MW = 1245.5 | [M+2H] ²⁺ 623.7 ^b |
| | | 3a(A)₃ (37%, K' ₃ =0.1) | MW = 1301.5 | [M+2H] ²⁺ 651.7 ^b |
| | | 3a(A)₄ (27%, K' ₄ =0.05) | MW = 1357.5 | [M+2H] ²⁺ 679.7 ^b |
| | | 3a (2%) | | |
| 4(G) | 1:40 | 3a(G)₁ (3%, K' ₁ =0.1) | MW = 1175.5 | [MH ⁺] 1176.5 ^a |
| | | 3a(G)₂ (10%, K' ₂ =0.3) | MW = 1217.5 | [MH ⁺] 1218.5 ^a |
| | | 3a(G)₃ (25%, K' ₃ =0.2) | MW = 1259.5 | [MH ⁺] 1260.4 ^a |
| | | 3a(G)₄ (60%, K' ₄ =0.2) | MW = 1301.5 | [MH ⁺] 1302.5 ^a |
| | | 3a(W)₁ (15%)* | MW = 1304.5 | [MH ⁺] 1305.4 ^a |
| 4(W) | 1:10 | 3a(W)₂ (13%, K' ₂ =0.2) | MW = 1475.6 | [MH ⁺] 1476.5 ^a |
| | | 3a(W)₃ (18%, K' ₃ =0.3) | MW = 1646.6 | [MH ⁺] 1647.4 ^a |
| | | 3a(W)₄ (54%, K' ₄ =0.8) | MW = 1817.7 | [MH ⁺] 1818.3 ^a |

* La valeur de K'₁ non déterminée car **3b** n'est pas détectable à l'équilibre.

^a obtenu par analyse MALDI-TOF, ^b obtenu par analyse ESI-M

2.2.2. Aspect combinatoire : exemple de librairie à deux blocs

L'aspect combinatoire a ensuite été étudié sur le peptide **3b** avec 2 blocs différents ajoutés simultanément **4(A)** et **4(L)** (20 équivalents de chaque). La librairie générée par cette réaction contient en théorie 81 composés, l'excès important de BB utilisés devrait néanmoins conduire majoritairement aux composés tétrafonctionnalisés (16 au total) (Schéma 10).

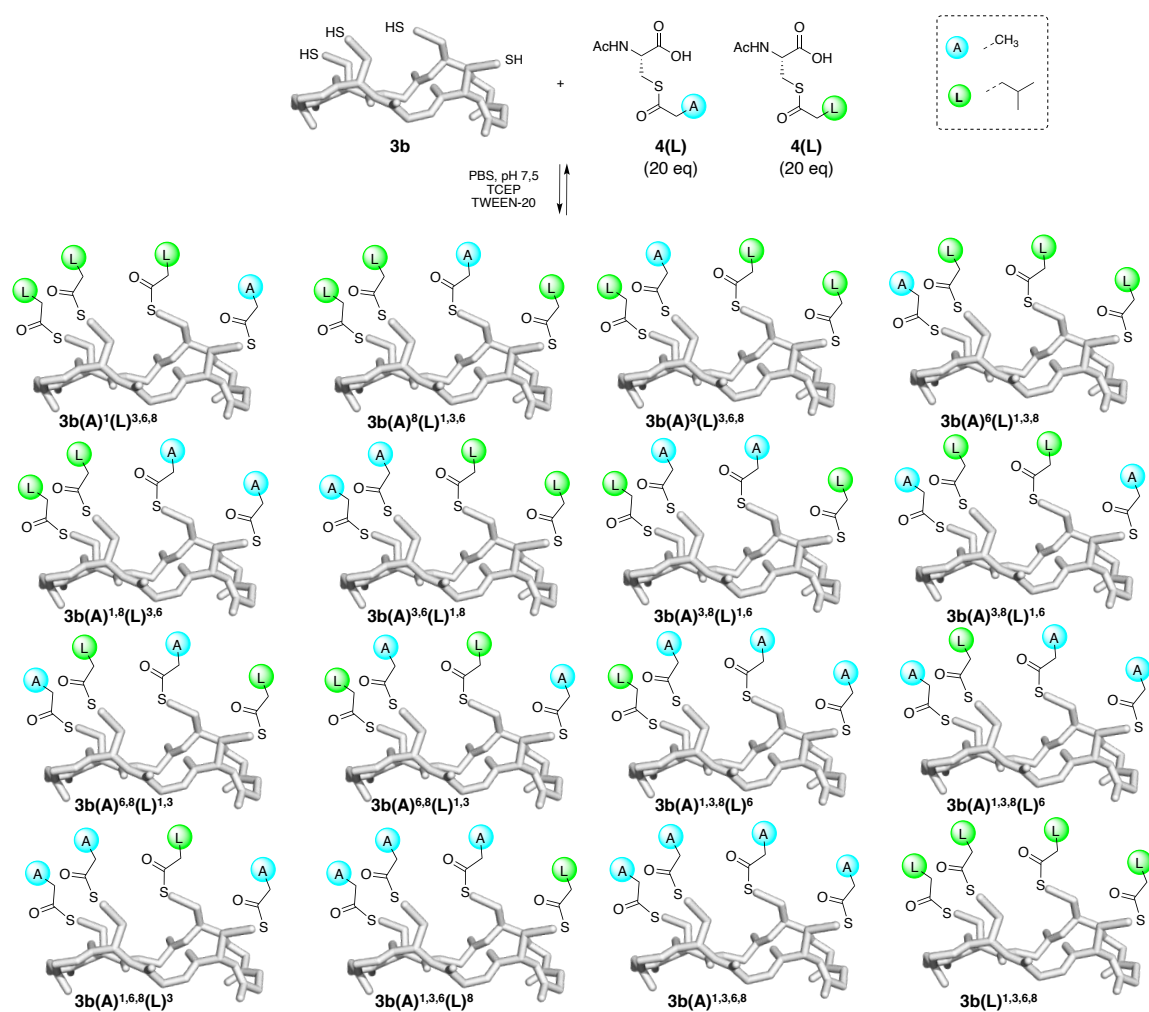


Schéma 10 - Espèces tétrafonctionnalisées issues de la librairie générée par mélange de 3b, 4(A) et 4(L).

Le mélange est agité pendant 24h permettant d'atteindre l'équilibre de manière sûre avant de l'acidifier et de l'analyser en HPLC (Figure 20).

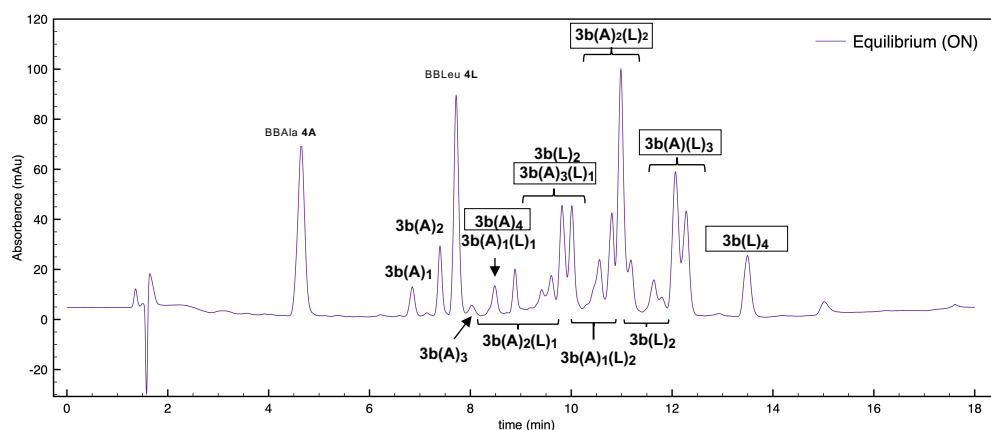


Figure 20 - Chromatogramme obtenu de la bibliothèque mixte issue du peptide **3b**, **4(A)** et **4(L)** à l'équilibre.

Les peptides encadrés sont tétrafonctionnalisés

Même si une bonne résolution totale du signal analytique n'a pas été obtenue, un très grand nombre d'espèce a pu être identifié après collecte et analyse MS (Tableau 12). Le chromatogramme montre en effet la formation de nombreux composés portant les différentes combinaisons de chaînes latérales Ala et Leu. Comme attendu les peptides portant simultanément 4 chaînes (**3b(A)₃(L)₁**, **3b(A)₂(L)₂**, **3b(A)₁(L)₄**, **3b(A)₄** et **3b(L)₄**) sont formés majoritairement.

Chapitre I : Mise en place des librairies combinatoires dynamiques

Tableau 12. Récapitulatif des données obtenues après 24h de réaction entre **3a**, **4(A)** et **4(L)** (20 équivalents chacun).

| t_r (min)* | % Aire du pic | m/z (MALDI/ESI) | Peptides | Formule brute Masse molaire théorique (g.mol ⁻¹) |
|--------------|---------------|---|---|---|
| 6.8 min | 2%** | [M+2H] ²⁺ 595.7 ^b | 3b(A)¹, 3b(A)², 3b(A)⁶, 3b(A)⁸, | C ₅₀ H ₇₅ N ₁₅ O ₁₁ S ₄ 1189.5 |
| 7.4 min | 4%** | [M+2H] ²⁺ 623.7 ^b | 3b(A)^{1,2}, 3b(A)^{1,6}, 3b(A)^{1,8}, 3b(A)^{2,6}, 3b(A)^{2,8}, 3b(A)^{6,8} | C ₅₃ H ₇₉ N ₁₅ O ₁₂ S ₄ 1245.5 |
| 8 min | 0,3%** | [M+2H] ²⁺ 651.7 ^b | 3b(A)^{1,2,6}, 3b(A)^{1,2,8}, 3b(A)^{1,6,8}, 3b(A)^{2,6,8} | C ₅₆ H ₈₃ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ 1301.5 |
| 8.5 min | < 2%** | [M+2H] ²⁺ 679.7 ^b | 3b(A)^{1,2,6,8} | C ₅₉ H ₈₇ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1357.5 |
| 8.5 min | < 2%** | [M+H] ⁺ 1288.6 ^a | 3b(A)¹(L)², 3b(A)¹(L)⁶, 3b(A)¹(L)⁸, 3b(A)²(L)⁶, 3b(A)²(L)⁸, 3b(A)⁶(L)⁸, 3b(L)¹(A)², 3b(L)¹(A)⁶, 3b(L)¹(A)⁸, 3b(L)²(A)⁶, 3b(L)²(A)⁸, 3b(L)⁶(A)⁸ | C ₅₆ H ₈₅ N ₁₅ O ₁₂ S ₄ 1287.6 |
| 8.8 min | | | 3b(A)^{1,2}(L)⁶, 3b(A)^{1,2}(L)⁸, 3b(A)^{1,6}(L)⁸, 3b(A)^{1,8}(L)⁶, 3b(A)^{1,6}(L)⁸, 3b(A)^{1,8}(L)⁶, 3b(A)^{1,8}(L)⁸, 3b(A)^{2,6}(L)¹, 3b(A)^{2,6}(L)⁸, 3b(A)^{2,8}(L)¹, 3b(A)^{2,8}(L)⁶, 3b(A)^{6,8}(L)¹, 3b(A)^{6,8}(L)⁸ | C ₅₉ H ₈₉ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ 1343.6 |
| 9.4 min | 5%** | [M+H] ⁺ 1344.6 ^a | | |
| 9.6 min | | | | |
| 9.8 min | < 14%** | [M+2H] ²⁺ 700.8 ^b | 3b(A)^{2,6,8}(L)¹, 3b(A)^{1,6,8}(L)², 3b(A)^{1,2,8}(L)⁶, 3b(A)^{1,2,6}(L)⁸ | C ₆₂ H ₉₃ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1399.6 |
| 10 min | | | | |
| 9.8 min | < 14%** | [M+2H] ²⁺ 665.8 ^b | 3b(L)^{1,2}, 3b(L)^{1,6}, 3b(L)^{1,8}, 3b(L)^{2,6}, 3b(L)^{2,8}, 3b(L)^{6,8} | C ₅₉ H ₉₁ N ₁₅ O ₁₂ S ₄ 1329.6 |
| 10 min | | | | |
| 10.5 min | < 9%** | [M+H] ⁺ 1386.8 ^a | 3b(A)¹(L)^{2,6}, 3b(A)¹(L)^{2,8}, 3b(A)¹(L)^{6,8}, 3b(A)²(L)^{1,6}, 3b(A)²(L)^{1,8}, 3b(A)²(L)^{6,8}, 3b(A)⁶(L)^{1,2}, 3b(A)⁶(L)^{1,6}, 3b(A)⁶(L)^{2,8}, 3b(A)⁸(L)^{1,2}, 3b(A)⁸(L)^{1,6}, 3b(A)⁸(L)^{2,8} | C ₆₂ H ₉₅ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ 1385.6 |
| 10.8 min | | | | |
| 11 min | > 20%** | [M+2H] ²⁺ 721.8 ^b | 3b(A)^{1,2}(L)^{6,8}, 3b(A)^{1,6}(L)^{2,8}, 3b(A)^{1,8}(L)^{2,6}, 3b(A)^{2,6}(L)^{1,2}, 3b(A)^{2,8}(L)^{1,6}, 3b(A)^{6,8}(L)^{1,8} | C ₆₅ H ₉₉ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1441.6 |
| 11.1 min | | | | |
| 11.6 min | 13%** | [M+2H] ²⁺ 714.8 ^b | 3b(L)^{1,2,6}, 3b(L)^{1,2,8}, 3b(L)^{1,6,8}, 3b(L)^{2,6,8} | C ₆₅ H ₁₀₁ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ 1427.7 |
| 11.8 min | | | | |
| 12 min | 8%** | [M+2H] ²⁺ 742.5 ^b | 3b(A)¹(L)^{2,6,8}, 3b(A)²(L)^{1,6,8}, 3b(A)⁶(L)^{1,2,8}, 3b(A)⁸(L)^{1,2,6} | C ₆₈ H ₁₀₅ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1483.7 |
| 12.3 min | | | | |
| 13.5 min | 6% | [M+H] ⁺ 1525.8 ^a | 3b(L)^{1,2,6,8} | C ₇₁ H ₁₁₁ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1525.7 |

* Éluant : H₂O/ACN, 0,1% TFA, 5 à 100% ACN, 15 minutes.

** Dû aux chevauchements des pics, le % d'aire du pic dans le mélange n'a pas pu être déterminé.

^a obtenu par analyse MALDI-TOF, ^b obtenu par analyse ESI-MS.

3. Discussion

Cette première partie a permis de mettre au point une réaction robuste permettant la génération de librairies dynamiques équilibrées thermodynamiquement.

Nous avons pu montrer que la réaction était compatible avec toutes les chaînes latérales des aminoacides naturels testés et un grand nombre de chaînes latérales non naturelles. Dans la plupart des cas, l'équilibre est atteint en quelques heures (3 à 4h). Cependant pour les BB portant des chaînes latérales plus encombrées (Aib, Val) un temps de réaction plus long (12 à 24h) est nécessaire. Dans le cas extrême de **4(tLe)** pour lequel l'équilibre n'est toujours pas atteint après 24h, un encombrement stérique très élevé défavorise la réaction de transthioestérification. Les différences de constante d'équilibre K' observées sont en générale assez minimales ($K'=0,4$ à $1,5$) et devraient a priori être suffisamment similaires pour permettre l'obtention de librairies isoénergétiques. L'adaptation des quantités de BB pourra de plus permettre de pallier ces différences pour accéder à des librairies équimolaires. Les études menées sur les peptides portant 2 cystéines semblent tout d'abord montrer que les différentes positions des cystéines sur le *scaffold* ont peu d'influence l'une sur l'autre puisque ces cystéines réagissent dans les 2 cas à la même vitesse et mènent aux deux composés isomères dans les mêmes proportions. L'influence de la présence d'une chaîne à la surface du *scaffold* sur la réaction d'acylation de la 2^{ème} cystéine est aussi elle-même assez minimale puisque la seconde acylation, bien que moins rapide, se produit avec une vitesse satisfaisante et conduit au produit di-acylé.

Afin de le vérifier, nous avons établi une collaboration avec Hélène Berthoumieux et Laura Messio, chimistes théoriciennes au Laboratoire de Physique Théorique de la Matière Condensée de Sorbonne-Université (SU). L'objectif est de concevoir, à partir de ces constantes, un modèle prédictif permettant d'évaluer, pour un peptide portant 4 cystéines, les proportions théoriques des différents produits possibles qui seraient présents dans la librairie dynamique. Pour cela, une modélisation de la librairie obtenue avec le peptide porteur de 4 Cys et des 2 BB porteurs des chaînes latérales de Leu et Ala a été effectuée. Pour valider ces résultats théoriques, une confrontation avec les données expérimentales obtenues est en cours et les premiers résultats semblent en accord avec cette conclusion. Néanmoins, à l'heure actuelle, la résolution analytique obtenue pour le mélange comportant en théorie 81 combinaisons possibles n'est pas

suffisante pour valider le modèle. Comme nous en reparlerons dans le Chapitre II, il reste à ici à optimiser cette séparation. De manière plus générale, ces premières expériences ont mis en lumière le défi analytique qu'engendre la formation d'une telle librairie. Les analyses de spectrométrie de masse MS ont permis d'identifier le degré de fonctionnalisation des composés générés dans les librairies à savoir si les composés sont mono, di, tri ou tétra-acétylés. Cependant, ces techniques ne permettent pas de distinguer les différents isomères possédant le même degré de fonctionnalisation. Dans l'optique où un peptide est amplifié par une cible sélectionnée, il devra être de nouveau synthétisé afin de confirmer ces propriétés biologiques en réalisant des expériences d'activité/affinité. Il est donc crucial de connaître d'une part les chaînes avec lesquelles il a été fonctionnalisé et d'autre part la position de ses chaînes au sein du peptide. Le développement d'une stratégie d'identification des isomères est donc une étape cruciale au bon déroulement du projet. Enfin, cette étude de la réaction a soulevé un autre problème lié au choix du mode de suivi de la réaction. En effet, lorsque des BB portant des chaînes latérales qui absorbent elles-mêmes à 280 nm sont présentes dans le mélange, la détection et la quantification des différentes espèces sont compliquées. Nous avons choisi de remplacer le Trp dans le peptide par une autre sonde qui absorbe à une longueur d'onde spécifique orthogonale aux BB.

Ces différents aspects analytiques seront développés dans le Chapitre II.

Références

- (1) Herrmann, A. Dynamic Combinatorial/Covalent Chemistry: A Tool to Read, Generate and Modulate the Bioactivity of Compounds and Compound Mixtures. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (6), 1899–1933.
- (2) Lehn, J. M. Dynamic Combinatorial Chemistry and Virtual Combinatorial Libraries. *Chem. - A Eur. J.* **1999**, *5* (9), 2455–2463.
- (3) Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J.-L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. Dynamic Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (9), 3652–3711.
- (4) Kulchat, S.; Chaur, M. N.; Lehn, J. M. Kinetic Selectivity and Thermodynamic Features of Competitive Imine Formation in Dynamic Covalent Chemistry. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23* (46), 11108–11118.
- (5) Yang, Z.; Fang, Z.; He, W.; Wang, Z.; Gan, H.; Tian, Q.; Guo, K. Identification of Inhibitors for Vascular Endothelial Growth Factor Receptor by Using Dynamic Combinatorial Chemistry. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (7), 1671–1674.
- (6) Mondal, M.; Radeva, N.; Fanlo-Virgós, H.; Otto, S.; Lebe, G.; Hirsch, A. K. H. Drug Design Fragment Linking and Optimization of Inhibitors of the Aspartic Protease Endothiapepsin: Fragment-Based Drug Design Facilitated by Dynamic Combinatorial Chemistry.
- (7) Hewitt, S. H.; Wilson, A. J. Generation of Dynamic Combinatorial Libraries Using Hydrazone-Functionalized Surface Mimetics. *European J. Org. Chem.* **2018**, *2018* (16), 1872–1879.
- (8) Fuchs, B.; Nelson, A.; Star, A.; Stoddart, J. F.; Vidal, S. Amplification of Dynamic Chiral Crown Ether Complexes during Cyclic Acetal Formation. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42* (35), 4220–4224.
- (9) Brachvogel, R. C.; von Delius, M. The Dynamic Covalent Chemistry of Esters, Acetals and Orthoesters. *European J. Org. Chem.* **2016**, *2016* (22), 3662–3670.
- (10) McAnany, J. D.; Reichert, J. P.; Miller, B. L. Probing the Geometric Constraints of RNA Binding via Dynamic Covalent Chemistry. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24* (17), 3940–3946.

- (11) Atcher, J.; Solà, J.; Alfonso, I. Pseudopeptidic Compounds for the Generation of Dynamic Combinatorial Libraries of Chemically Diverse Macrocycles in Aqueous Media. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (1), 213–219.
- (12) Eisenberg, M.; Shumacher, I.; Cohen-Luria, R.; Ashkenasy, G. Dynamic Combinatorial Libraries of Artificial Repeat Proteins. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21* (12), 3450–3457.
- (13) Gagné, M. R.; Ghosh, S.; Ingerman, L. A.; Frye, A. G.; Lee, S. J.; Waters, M. L. Dynamic Cyclic Thiopeptide Libraries from Thiol-Thioester Exchange. *Org. Lett.* **2010**, *12* (8), 1860–1863.
- (14) Dyer, K. F. The Quiet Revolution: A New Synthesis of Biological Knowledge. *J. Biol. Educ.* **1971**, *5* (1), 15–24.
- (15) Lohman, R. J.; Harrison, R. S.; Ruiz-Gómez, G.; Hoang, H. N.; Shepherd, N. E.; Chow, S.; Hill, T. A.; Madala, P. K.; Fairlie, D. P. Helix-Constrained Nociceptin Peptides Are Potent Agonists and Antagonists of ORL-1 and Nociception. *Vitam. Horm.* **2015**, *97*, 1–55.
- (16) Robinson, J. A. The Design, Synthesis and Conformation of Some New α -Hairpin Mimetics: Novel Reagents for Drug and Vaccine Discovery. *Synlett* **2000**, No. 4, 429–441.
- (17) Fasan, R.; Dias, R. L. A.; Moehle, K.; Zerbe, O.; Obrecht, D.; Mittl, P. R. E.; Grütter, M. G.; Robinson, J. A. Structure-Activity Studies in a Family of β -Hairpin Protein Epitope Mimetic Inhibitors of the P53-HDM2 Protein-Protein Interaction. *ChemBioChem* **2006**, *7* (3), 515–526.
- (18) Favre, M.; Moehle, K.; Jiang, L.; Pfeiffer, B.; Robinson, J. A. Structural Mimicry of Canonical Conformations in Antibody Hypervariable Loops Using Cyclic Peptides Containing a Heterochiral Diproline Template. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (12), 2679–2685.
- (19) Sindelar, M.; Wanner, K. T. Library Screening by Means of Mass Spectrometry (MS) Binding Assays-Exemplarily Demonstrated for a Pseudostatic Library Addressing γ -Aminobutyric Acid (GABA) Transporter1 (GAT1). *ChemMedChem* **2012**, *7* (9), 1678–1690.
- (20) Hochgürtel, M.; Lehn, J. M. Dynamic Combinatorial Diversity in Drug

- Discovery. *Fragm. Approaches Drug Discov.* **2006**, *34*, 341–364.
- (21) Katritzky, A. R.; Tala, S. R.; Abo-Dya, N. E.; Gyanda, K.; El-Gendy, B. E.-D. M.; Abdel-Samii, Z. K.; Steel, P. J. Selective Synthesis and Structural Elucidation of S -Acyl- and N -Acylcysteines. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (18), 7165–7167.
- (22) Katritzky, A. R.; Zhang, Y.; Singh, S. K. Efficient Conversion of Carboxylic Acids into N -Acylbenzotriazoles . *Synthesis (Stuttg)*. **2003**, No. 18, 2795–2798.
- (23) Rohde, H.; Schmalisch, J.; Harpaz, Z.; Diezmann, F.; Seitz, O. Ascorbate as an Alternative to Thiol Additives in Native Chemical Ligation. *ChemBioChem* **2011**, *12* (9), 1396–1400.
- (24) Poole, L. B. The Basics of Thiols and Cysteines in Redox Biology and Chemistry. *Free Radic Biol Med* **2015**, 148–157.
- (25) Sakamoto, K.; Tsuda, S.; Mochizuki, M.; Nohara, Y.; Nishio, H.; Yoshiya, T. Imidazole-Aided Native Chemical Ligation: Imidazole as a One-Pot Desulfurization-Amenable Non-Thiol-Type Alternative to 4-Mercaptophenylacetic Acid. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (50), 17940–17944.

CHAPITRE II : STRATÉGIE D'ANALYSE DES LIBRAIRIES GÉNÉRÉES

Sommaire

| | |
|--|------------|
| Liste de figures..... | 117 |
| Liste de schémas | 118 |
| Liste de tableaux..... | 118 |
| 1. Analyse des bibliothèques par chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC) | 119 |
| 1.1. Synthèse d'un nouveau TAG-UV et application en DCC..... | 121 |
| 1.2. Conclusion | 127 |
| 2. Analyse des peptides par spectrométrie de masse | 127 |
| 2.1. Spectrométrie de masse en tandem pour la caractérisation de peptides cycliques .. | 131 |
| 2.2. Ouverture régiosélective du squelette peptidique cyclique..... | 135 |
| 2.2.1. <i>Stratégies utilisées précédemment.....</i> | <i>135</i> |
| 2.2.2. <i>Linéarisation par hydrolyse à la trypsine</i> | <i>136</i> |
| 2.2.3. <i>Linéarisation par l'effet dit « ornithine ».....</i> | <i>143</i> |
| 2.3. Conclusion | 150 |
| 3. Discussion..... | 150 |
| Références | 154 |

Liste de figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 - Chromatogramme obtenu entre 1a et 4(W) (10eq). | 120 |
| Figure 2 - TAG-UV utilisés précédemment au laboratoire. | 120 |
| Figure 3 - Synthèse du 4-(DAPA). | 121 |
| Figure 4 - Structure des peptides 1b (à gauche) et 3c (à droite) à pH physiologique. | 122 |
| Figure 5 - Chromatogrammes obtenus après purification à 220, 280 et 415nm (en haut) et spectre UV (en bas) de 1b . | 123 |
| Figure 6 - Chromatogrammes obtenus pour des temps de réaction de 2h à 8h, à 415 nm, pour les bibliothèques générées avec 3c et 4(W) . | 126 |
| Figure 7 - Espèces générées au moment de l'irradiation laser dans la source d'ions MALDI. | 128 |
| Figure 8 - Exemple du clivage homolytique expliquant la formation de l'espèce $[M+H-H]^{+\bullet}$. | 129 |
| Figure 9 - Trajet d'un ion M^+ en mode réflecteur et en mode linéaire. | 130 |
| Figure 10 - Spectres de masse MALDI-TOF obtenus pour l'espèce 3a trifonctionnalisée par le BBLeu 4(L) en mode réflecteur positif (A, en haut) et en mode linéaire positif (B, en bas). | 130 |
| Figure 11 - Nomenclature des ions fragments issu d'une séquence peptidique protonée. ¹⁰⁻¹² | 132 |
| Figure 12 - Spectres ESI MS/MS, CID (N_2), ions positifs, énergie de fragmentation entre $2,8 \cdot 10^5$ et $3,3 \cdot 10^5$, obtenus après fragmentation des ions cycliques doublement chargés à m/z 669,8 observés à $t_r = 5,6$ min (en haut) et à $t_r = 5,8$ min (en bas). | 134 |
| Figure 13 - Exemple de spectre de masses MALDI-TOF, mode réflecteur ions positifs, matrice : acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) obtenus avant (en haut) et après linéarisation (en bas) pour le pic à $t_r = 5,1$ min. | 139 |
| Figure 14 - Spectre MALDI MS/MS, CID (N_2) du peptide parent linéarisé par la trypsine à m/z 1300,6 à $t_r = 5,1$ min. | 140 |
| Figure 15 - Spectres de masse MALDI-TOF obtenus pour le pic à $t_r = 5,6$ min. | 142 |
| Figure 16 - Structure des peptides 2c et 3d contenant une ornithine en position 4. | 144 |
| Figure 17 - Spectres ESI MS/MS, CID (N_2), ions positifs, énergie de fragmentation entre 11 et 14, obtenus pour les ions parents $[M+2H]^{2+}$ à m/z 648,31 correspondant aux peptides isomères à $t_r = 6,6$ min (en haut) et $t_r = 7$ min (en bas). | 146 |
| Figure 18 - Chromatogramme obtenu pour la bibliothèque issue de 3d , BB 4(A) et 4(L) . | 147 |
| Figure 19 - Représentation schématique des structures possibles du peptides 3d fonctionnalisés par un adduit leucine et 3 adduits alanine. | 148 |
| Figure 20 - Spectres ESI MS/MS, CID (N_2), ions positifs, énergie de fragmentation entre $2,2 \cdot 10^4$ et $2,7 \cdot 10^4$, des ions parents $[M+2H]^{2+}$ à m/z 679,8, obtenus pour les pics correspondant aux espèces types 3d(A) ₃ (L) ₁ à partir des chromatogrammes TIC. | 149 |
| Figure 21 - Séquence du scaffold optimisé. | 152 |

Liste de schémas

| | |
|--|-----|
| Schéma 1 – Première fragmentation du peptide 2(A)³(L)⁶ résultant en différentes séquences linéaires de même masse. | 133 |
| Schéma 2 – Schéma de la digestion séquence dépendante par la trypsine. | 137 |
| Schéma 3 – Schémas réactionnels des hydrolyses à la trypsine des peptides 2a(L)⁶ et 2a(L)³(A)⁶ cycliques. | 138 |
| Schéma 4 – Schémas réactionnels des hydrolyses à la trypsine des peptides 2a(A)³(L)⁶ et 2a(L)³(A)⁶ cycliques. | 141 |
| Schéma 5 – Cyclisation du groupement ornithine en phase gazeuse. | 143 |
| Schéma 6 – Peptides 2c(A)³(L)⁸ et 2c(A)³(L)⁸ avant et après linéarisation. | 145 |

Liste de tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 - Résultats obtenus après transthioestérification entre les peptides 1a et 1b et différents BBs. | 125 |
| Tableau 2 - Résultats obtenus après transthioestérification entre le peptide 3c et différents BB. | 126 |
| Tableau 3 - Tableau récapitulatif des données obtenues à l'équilibre pour la réaction entre 3d , 4(A) et 4(L) . | 147 |

Un des verrous, lié à l'utilisation de la DCC, ou plus généralement, de la chimie combinatoire est l'analyse des bibliothèques générées. Plus la taille de celle-ci augmente et plus les chances de découvertes de ligands affins sont importantes. Cependant ceci s'accompagne bien sûr également d'une complexification de l'attribution des signaux analytiques associés à chaque membre du mélange complexe. En principe, il n'est pas nécessaire de caractériser scrupuleusement tous les membres, seulement ceux révélés par l'étape d'amplification comme ayant une affinité avec la cible envisagée. Par exemple Ludlow et al. génère une librairie dynamique de 9000 composés théoriques, exploitant l'échange thiol/disulfure, criblés contre l'éphédrine, un agent sympathomimétique. Malgré une co-élution importante de ces composés lors de l'étape de séparation en chromatographie liquide (LC), ils observent sans difficulté l'amplification de deux composés identifiés et caractérisés en LC-MS et LC-MS/MS.¹

Dans le but de vérifier dans un premier temps la pertinence de nos bibliothèques comme outil de criblage pour des cibles biologiques, nous avons préparé des bibliothèques simples constituées d'un nombre limité de peptides et mis au point une méthode analytique pour leur caractérisation.

1. Analyse des bibliothèques par chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC)

Comme énoncé lors du Chapitre I, une sonde spectroscopique a été introduite dans le peptide de manière à suivre les réactions par UV-visible. Dans un premier temps, le tryptophane a été utilisé puisque qu'il absorbe à 280 nm.

Cependant, ce choix est loin d'être satisfaisant puisque les BB portant des groupements aromatiques tels que le Trp, la Tyr ou la Phe (**4(W)**, **4(Y)** et **4(F)**) absorbent fortement à cette longueur d'onde, ce qui a pour conséquence de complexifier les chromatogrammes et de diminuer la sensibilité de détection des signaux correspondant aux peptides, lorsqu'un grand excès de BB est utilisé (Figure 1).

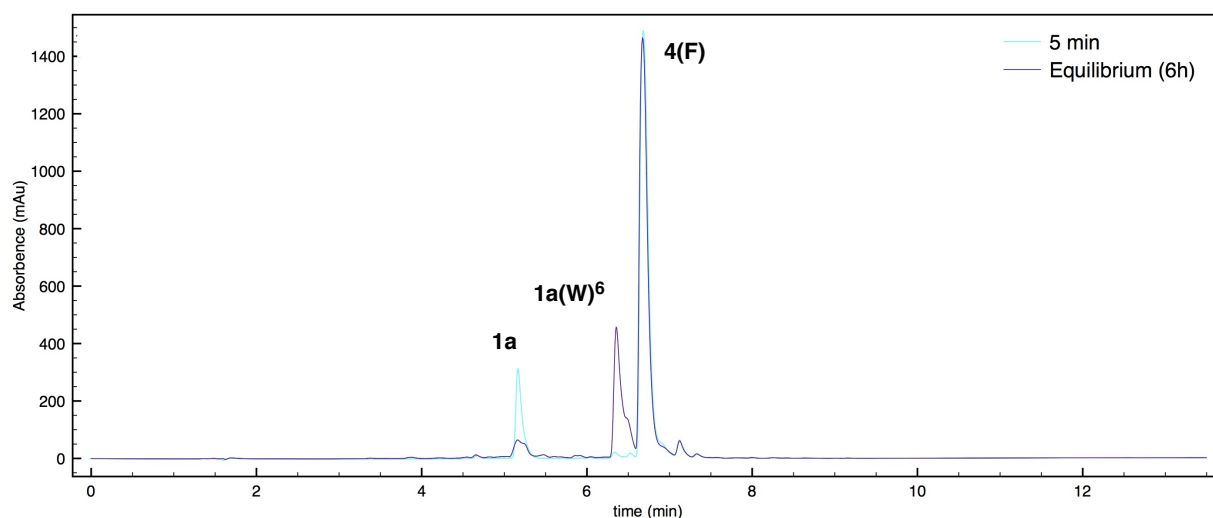


Figure 1 – Chromatogramme obtenu entre 1a et 4(W) (10eq).

Dans le but de s'affranchir de ces signaux et détecter uniquement les espèces peptidiques lors de l'analyse des mélanges, un nouveau TAG-UV possédant une longueur d'onde d'absorption différente des entités impliquées dans les bibliothèques a été introduit. Outre sa longueur d'onde d'absorption spécifique, le chromophore doit être orthogonal à la réaction de DCC et stable lors de l'analyse par spectrométrie de masse, ce qui limite le choix. Par exemple, des études réalisées auparavant au laboratoire (Thèse Benjamin Zagiel) ont montré que le choix des sondes UV était important et devait être considéré en regard de la technique de caractérisation utilisée pour les bibliothèques. Le motif *para*-nitro aniline de la sonde Glu(pNa) (Figure 2), absorbant à 250 nm, est instable en spectrométrie de masse MALDI-TOF. De même, le Lys(2-naphtoyl) se révèle inutilisable pour cette stratégie. En effet, un décalage de sa bande d'absorption, initialement attendue autour de 330 nm, entraîne la diminution de son coefficient d'extinction molaire et donc une diminution de la sensibilité de détection. De plus, il confère aux peptides un caractère hydrophobe qui altère leur solubilité.

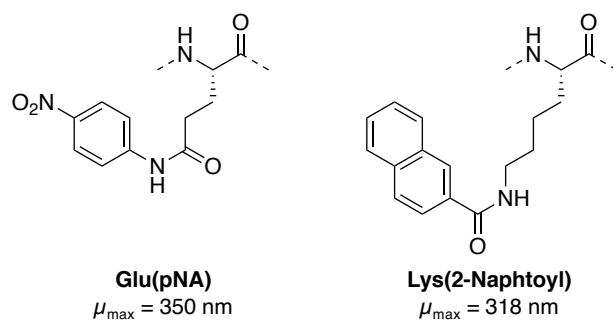


Figure 2 – TAG-UV utilisés précédemment au laboratoire.

Le motif 4-(*N,N*-diméthylamino)-phtalimidoalanine ou 4-(DAPA), développé par le groupe de Barbara Imperiali, semble un bon candidat puisqu'il absorbe à 421 nm.^{2,3}

1.1. Synthèse d'un nouveau TAG-UV et application en DCC

L'acide aminé porteur de cette sonde utilisable en SPSS a ainsi été préparé suivant la synthèse décrite (Figure 3).⁴

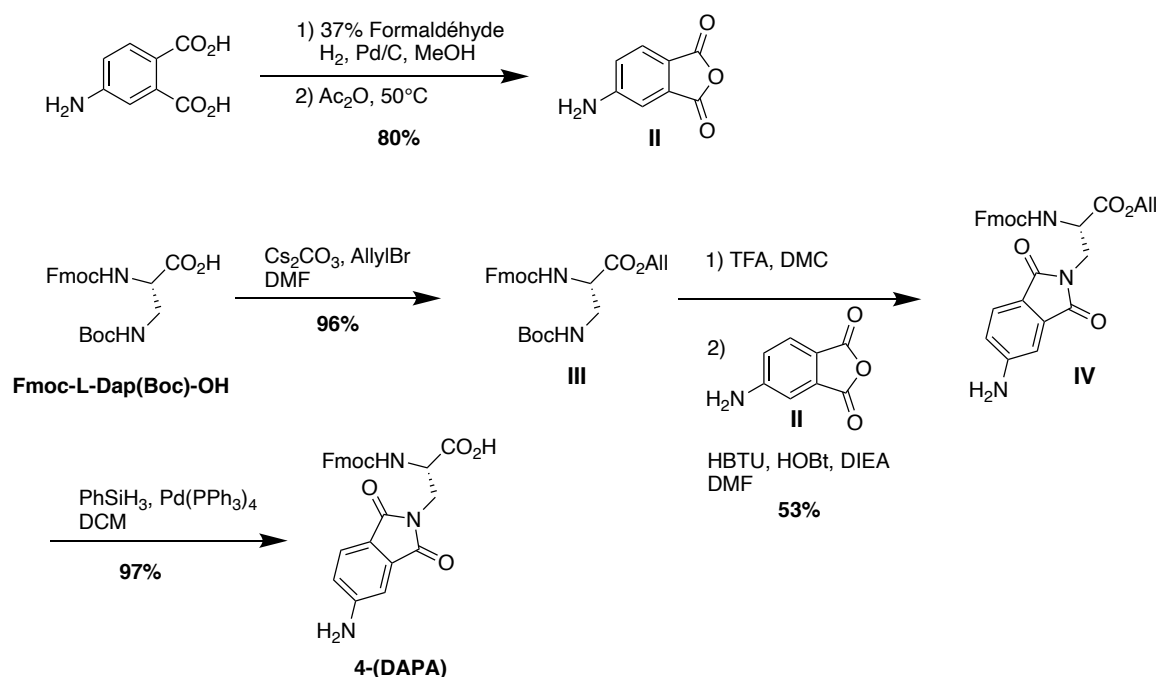


Figure 3 – Synthèse du 4-(DAPA).

Dans un premier temps, l'acide 4-aminophtalique commercial subit une amination réductrice suivie d'une déshydratation en présence d'anhydride acétique. L'anhydride **II** est ainsi obtenu avec un rendement de 80%. Parallèlement, la fonction acide du Fmoc-L-Dap(Boc)-OH est protégée sous forme d'ester d'allyle donnant accès au composé **III**. Le groupement Boc de ce dernier est alors clivé en présence de TFA libérant ainsi l'amine qui peut être couplée avec le composé **II** en présence de HBTU et HOBT. Le 4-(DAPA) est finalement obtenu par déprotection du groupement allyl du composé **IV** par le phenylsilane catalysé par le palladium tetrakis triphenylphosphine.

Le bloc 4-(DAPA) ainsi obtenu a pu directement être incorporé en synthèse peptidique sur support solide en utilisant du HAUT comme agent de couplage suivant le même schéma de synthèse que précédemment. Cependant, ce chromophore étant sensible aux additions nucléophiles, la pipéridine est remplacée par le DBU lors des étapes de déprotection après son insertion dans la séquence.

De cette manière, deux nouveaux peptides ont été synthétisés : **1b** et **3c** (Figure 4).

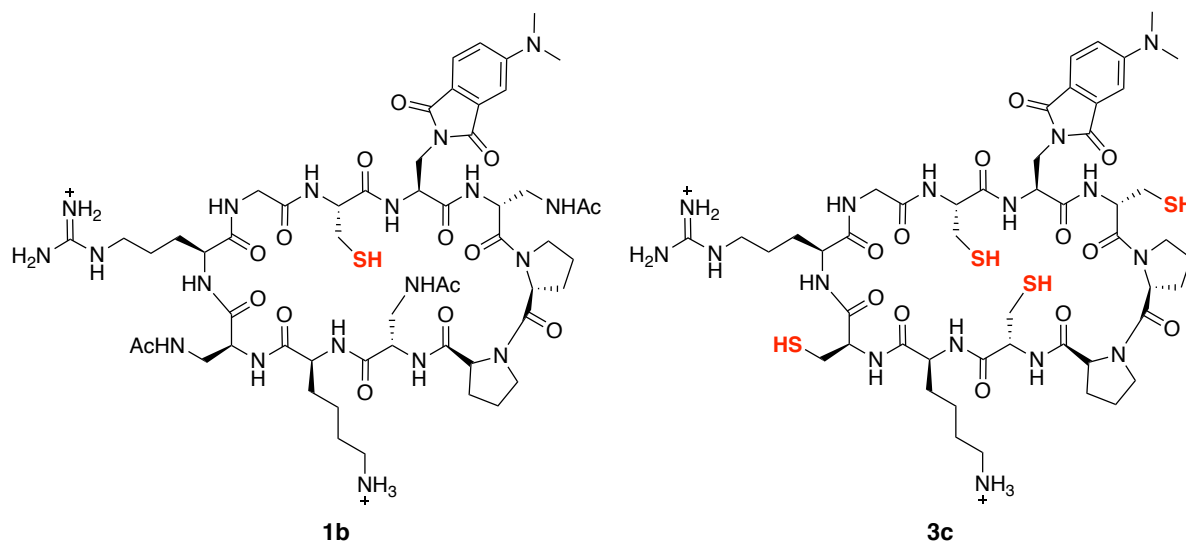


Figure 4 – Structure des peptides **1b** (à gauche) et **3c** (à droite) à pH physiologique.

Afin de vérifier les propriétés optiques du nouveau TAG-UV lorsqu'il est incorporé dans un peptide, un chromatogramme à trois longueurs d'onde (220, 280 et 415 nm) et un spectre UV du peptide **1b** ont été effectués après purification du peptide par HPLC préparative (Figure 5).

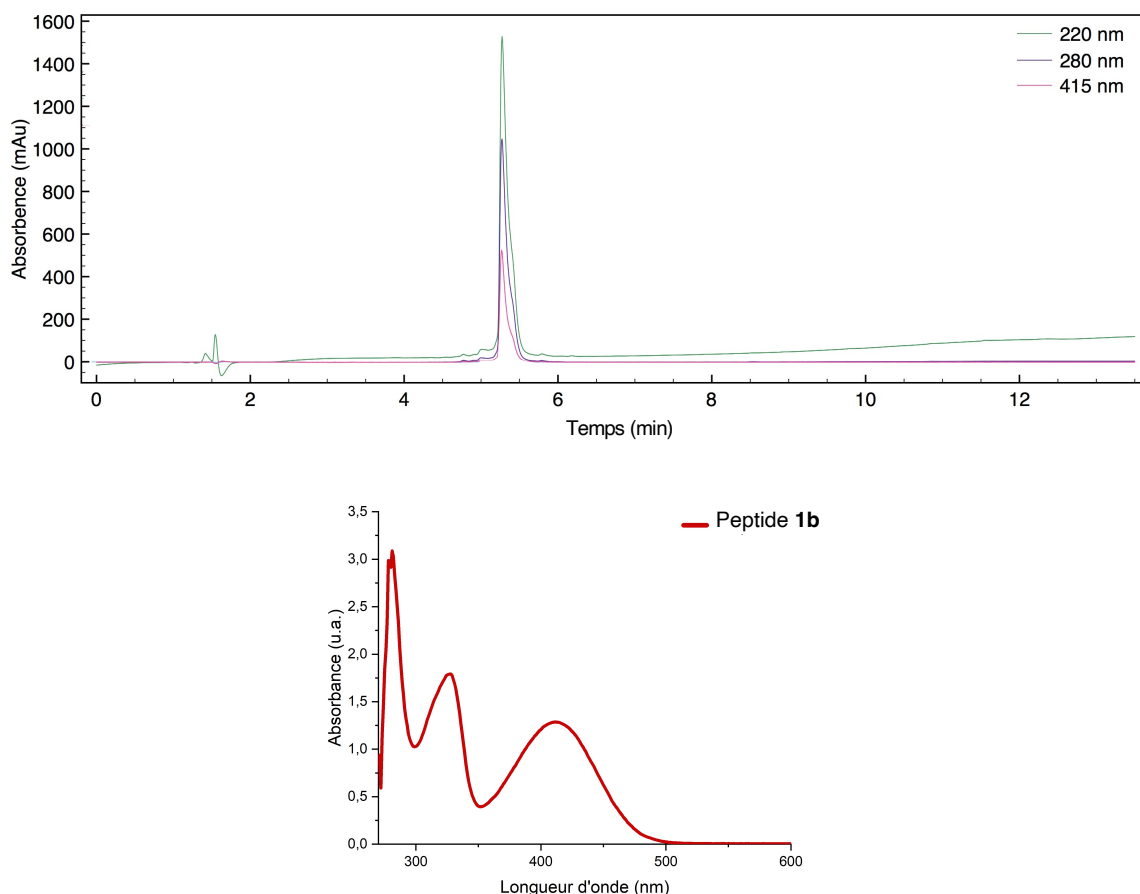


Figure 5 – Chromatogrammes obtenus après purification à 220, 280 et 415nm (en haut) et spectre UV (en bas) de **1b**.

Le spectre UV obtenu pour ce dernier présente bien les mêmes bandes d'absorption caractéristiques que celles décrites par Imperiali *et al.* L'absorbance à 415 nm, assez éloignée de celles des chaînes latérales des acides aminés aromatiques, est suffisamment intense pour permettre une bonne détection des composés aux concentrations considérées et donc l'exploitation de cette sonde pour la stratégie de DCC semble appropriée. De plus, après analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des peptides, aucune fragmentation du chromophore n'est observée. Ce chromophore peut donc être exploité pour la caractérisation UV et par spectrométrie de masse, des bibliothèques.

La réaction d'échange thiol/thioester a ensuite été testée avec le peptide **1b** (1mM) dans les mêmes conditions que précédemment en présence de 5 équivalents de BB. Après 3h de réaction, le mélange est neutralisé puis injecté en HPLC. Les différents pics présents sur le chromatogramme ont pu être identifiés après collecte et analyse MALDI-TOF.

Dans tous les cas, un produit unique est formé comme attendu puisque le peptide possède une cystéine unique. L'avantage de l'utilisation de cette sonde peut être appréciée sur la réaction réalisée avec le BBTrp. Alors qu'à 280 nm le signal correspondant au BB très largement majoritaire ne permet qu'une détection très limitée des espèces peptidiques, celui à 415 nm permet de s'affranchir des signaux de ses derniers rendant les spectres UV beaucoup moins complexes à analyser.

Les K' de chacune des réactions ont été calculées et sont similaires à celles obtenues avec le peptide **1a** contenant le Trp en position 7 (Tableau 1). Cela montre que la sonde, située sur la face opposée aux thiols dans la structure 3D du peptide, comme prédit, n'a pas d'influence sur la réaction.

Tableau 1 – Résultats obtenus après transthiostérisation entre les peptides **1a** et **1b** et différents BB.

| BB | Time | % Produit à l'équilibre | K' (1b(X)) | K' (1a(X)) |
|-----------|-------------|--|-------------------|-------------------|
| 4(G) | 3h | 1a(G)⁶ (85%) 1b(G)⁶ (83%) | 1 | 1.2 ± 0.1 |
| 4(A) | 3h | 1a(A)⁶ (76%) 1b(A)⁶ (69%) | 0.4 | 0.5 ± 0.1 |
| 4(Ai) | 24h | 1a(Ai)⁶ (85%) 1b(Ai)⁶ (81%) | 0.8 | 1.5 ± 0.1 |
| 4(hA) | 3h | 1a(hA)⁶ (85%) 1b(hA)⁶ (78%) | 0.7 | 1.2 ± 0.3 |
| 4(V) | 24h | 1a(V)⁶ (88%) 1b(V)⁶ (82%) | 0.9 | 0.7 ± 0.2 |
| 4(L) | 3h | 1a(L)⁶ (78%) 1b(L)⁶ (84%) | 1 | 1 ± 0.4 |
| 4(tL) | 72h | 1a(tL)⁶ (26%) 1b(tL)⁶ (56%) | 0.2 | Non atteint |
| 4(pG) | 3h | 1a(pG)⁶ (66%) 1b(pG)⁶ (78%) | 0.7 | 0.4 ± 0.1 |
| 4(F) | 3h | 1a(F)⁶ (81%) 1b(F)⁶ (80%) | 0.5 | 0.9 ± 0.2 |
| 4(W) | 3h | 1a(W)⁶ (69%) 1b(W)⁶ (83%) | 1 | 1.2 ± 0.1 |
| 4(K) | 3h | 1a(K)⁶ (85%) 1b(K)⁶ (66%) | 0.3 | 1.1 ± 0.2 |
| 4(R) | 3h | 1a(R)⁶ (ND*) 1b(R)⁶ (55%) | 0.1 | ND* |
| 4(D) | 3h | 1a(D)⁶ (ND*) 1b(D)⁶ (ND*) | ND* | ND* |
| 4(E) | 3h | 1a(E)⁶ (83%) 1b(E)⁶ (83%) | 0.7 | 1.2 ± 0.8 |

ND* = non déterminé car superposition du signal HPLC du peptide libre et du peptide fonctionnalisé.

Différentes librairies ont été générées à partir du peptide **3c** avec un seul BB. Après 8h de réaction, les différentes espèces peptidiques portant 1,2,3 ou 5 fonctions thioesters sont observés dans des proportions variables en fonction de la quantité de BB utilisée (Figure 6).

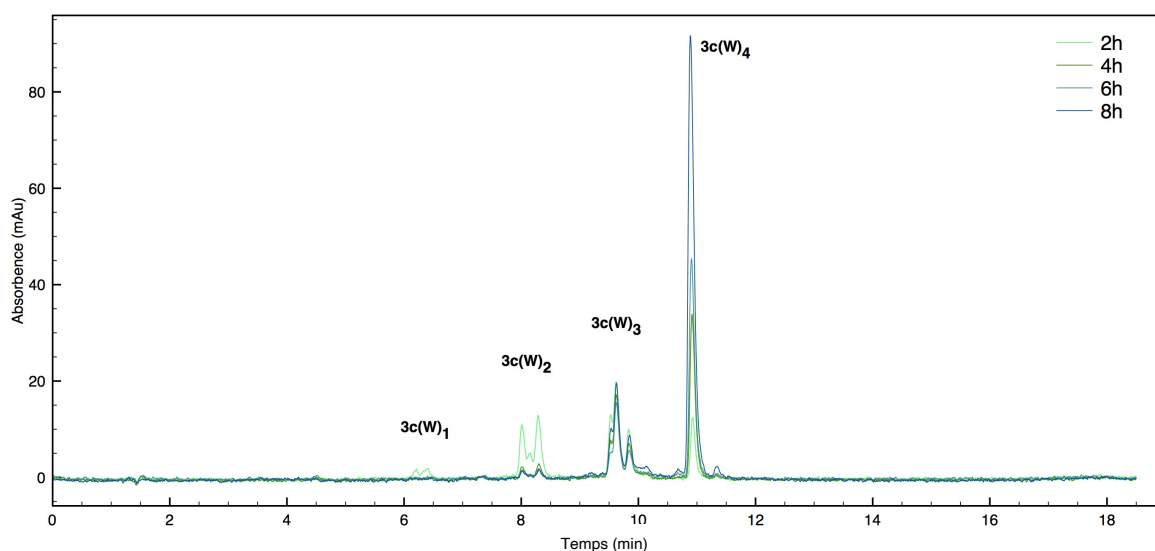


Figure 6 – Chromatogrammes obtenus pour des temps de réaction de 2h à 8h, à 415 nm, pour les bibliothèques générées avec **3c** et **4(W)**.

Pour la bibliothèque générée avec BB **4(W)**, la détection à 415nm est très appréciable puisque le signal très intense de celui-ci à 280 nm n'aurait pas permis la bonne détection des autres espèces.

Tableau 2 – Résultats obtenus après transthioestérification entre le peptide **3c** et différents BB.

| BB | Ratio | pH | Temps | % Produit à l'équilibre |
|------|-------|-----|-------|---|
| | | | | 3c(L) ₂ (3%) |
| 4(L) | 1:40 | 7,5 | 8h | 3c(L) ₃ (45%) 3c(L) ₄ (51%) |
| | | | | 3c(W) ₂ (3%) |
| 4(W) | 1:40 | 7,5 | 8h | 3c(W) ₃ (25%) 3c(W) ₄ (72%) |
| | | | | 3c(K) ₁ (18%) |
| 4(K) | 1:40 | 7,5 | 8h | 3c(K) ₂ (50%) 3c(K) ₃ + 3c(K) ₄ (32%) |

1.2. Conclusion

L'incorporation de la sonde 4-(DAPA) dans les nouveaux peptides synthétisés **1b** et **3c** permet de s'affranchir des signaux des BB lors de l'analyse HPLC des bibliothèques. De plus, ce nouveau TAG-UV n'altère pas l'équilibre de la réaction puisque des constantes d'équilibres K' similaires ont été obtenues avec **1a** et **1b**. Ce TAG-UV s'est aussi révélé stable aux conditions d'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF puisqu'aucune fragmentation n'a été observée.

2. Analyse des peptides par spectrométrie de masse

Les expériences réalisées dans le chapitre précédent ont été analysées par couplage « off-line » entre l'HPLC et la spectrométrie de masse MALDI-TOF sur la plateforme de spectrométrie de masse de SU et en collaboration avec le Dr. Emmanuelle Sachon du Laboratoire des Biomolécules (LBM). Le détecteur UV couplé à l'HPLC permet de suivre la séparation des composés dans le temps, de les collecter puis de les analyser par MALDI-TOF MS sans concentration des fractions par lyophilisation. Cette technique de spectrométrie de masse permet de produire des ions de peptide stables principalement monochargés. Dans la source d'ions, au moment de l'irradiation laser du co-cristal matrice/analyte, de nombreuses espèces sont générées, des ions positifs ou négatifs, généralement monochargés, $[M-H]^-$ ou $[M+H]^+$, mais aussi se cationiser par une ion sodium $[M+Na]^+$ ou potassium $[M+K]^+$ ainsi que des radicaux cations, des radicaux et des électrons (Figure 7).

En mode d'ionisation positif seuls les ions positifs sont accélérés et détectés. Dans tous les cas, on mesure le rapport masse-sur-charge (m/z) des espèces présentes en solution. Les peptides ont généralement tendance à se protoner mais en fonction de leur séquence, on peut observer des cationisation par les ions sodium ou potassium plus ou moins importantes. En effet, la protonation ne peut se produire que si des fonctions protonables sont présentes dans le peptide.

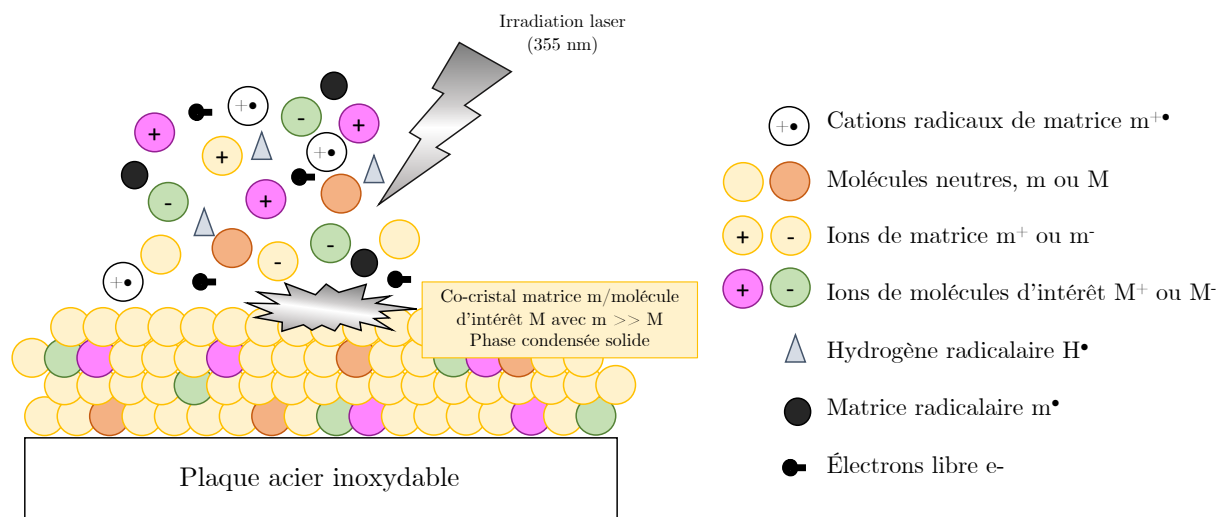


Figure 7 – Espèces générées au moment de l'irradiation laser dans la source d'ions MALDI.

De manière générale, les liens thioesters se sont révélés stables aux conditions d'ionisation MALDI et les différents peptides fonctionnalisés présents dans les bibliothèques dynamiques générées ont pu être identifiés en comparant leur rapport m/z expérimental au rapport m/z théorique des produits possibles calculé en amont. Certains composés ont néanmoins présenté des comportements inattendus. Les spectres de masse obtenus pour les peptides fonctionnalisés avec BBArg présentent des ions de masse aberrante et inexplicée en MALDI-TOF. Une analyse par ESI-MS (pour *electrospray ionisation*) permet en revanche l'identification du produit, laissant supposer que l'ionisation MALDI, moins douce, n'est pas adaptée et provoque la fragmentation des produits fonctionnalisés par BBArg directement dans la source d'ions. Des processus de fragmentation source ont également été observés pour les produits possédant à la fois des cystéines libres et des fonctions thioester ($\mathbf{3a(X)^1}$, $\mathbf{3a(X)^2}$, $\mathbf{3a(X)^3}$). Dans le cas du peptide $\mathbf{3a(L)^{3,6,8}}$ qui présente une cystéine libre en position 1, l'ion protoné correspondant $[M+H]^+$, attendu à m/z 1428,66 est observé en MALDI-TOF en mode réflecteur positif, à m/z 1427,66. A nouveau ce comportement est spécifique à l'analyse MALDI-TOF et n'est pas observé en ESI-MS qui permet d'observer les ions doublement chargés $[M+2H]^{2+}$ au m/z attendu.

Ce phénomène pourrait être expliqué par la formation en solution d'un pont disulfure intermoléculaire entre deux peptides $\mathbf{3a(L)^{3,6,8}}$ du fait de la présence d'une cystéine libre dans la séquence. L'ion correspondant monoprotoné $[2M-2H+H]^+$, produit en phase gazeuse pourrait

être suffisamment instable pour subir un clivage homolytique du pont S-S directement dans la source d'ions.

Un tel clivage pourrait être induit par la présence de radicaux hydrogène H^\bullet ou de radicaux issus de la matrice m^\bullet produits lors de l'irradiation de l'échantillon par le laser UV dans le plumeau de matière libéré en phase gazeuse au moment de l'étape d'ablation/ionisation. La présence de tels radicaux a en effet été observée en spectrométrie de masse MALDI.⁵ Ce clivage homolytique conduirait alors à un monomère neutre et un monomère radical cation $[M+H-H]^{+\bullet}$ à m/z 1427,66 (Figure 8).

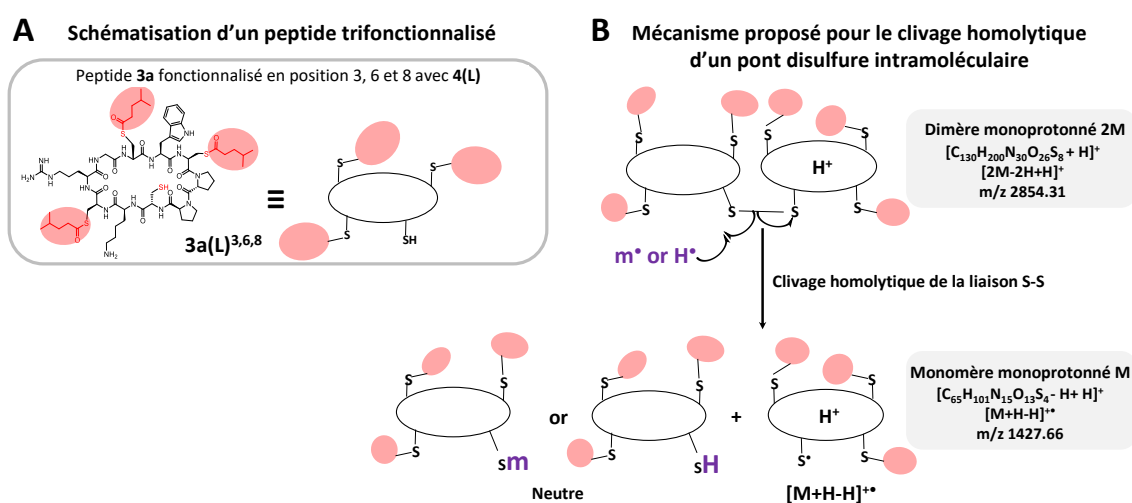


Figure 8 – Exemple du clivage homolytique expliquant la formation de l'espèce $[M+H-H]^{+\bullet}$.

A : Schématisation du peptide **3a(L)^{3,6,8}**, les bulles rouges représentent le BB lié à la cystéine fonctionnalisée. B : Mécanisme proposé pour le clivage homolytique.

M = monomère. H^\bullet : radical hydrogène, m^\bullet radical issu de la matrice MALDI utilisée.

En général, le clivage d'un pont disulfure est décrit lors des analyses effectuées en spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) dans lesquelles les ions sont activés pour être fragmentés.⁶ Dans ces expériences, l'ion radical cation a pu être observé.

Afin de vérifier cette hypothèse, l'analyse a été répétée en mode linéaire positif (**Figure 10**). Dans ce mode, le détecteur est placé à une distance beaucoup plus courte de la source d'ions qu'en mode réflecteur (**Figure 9**).

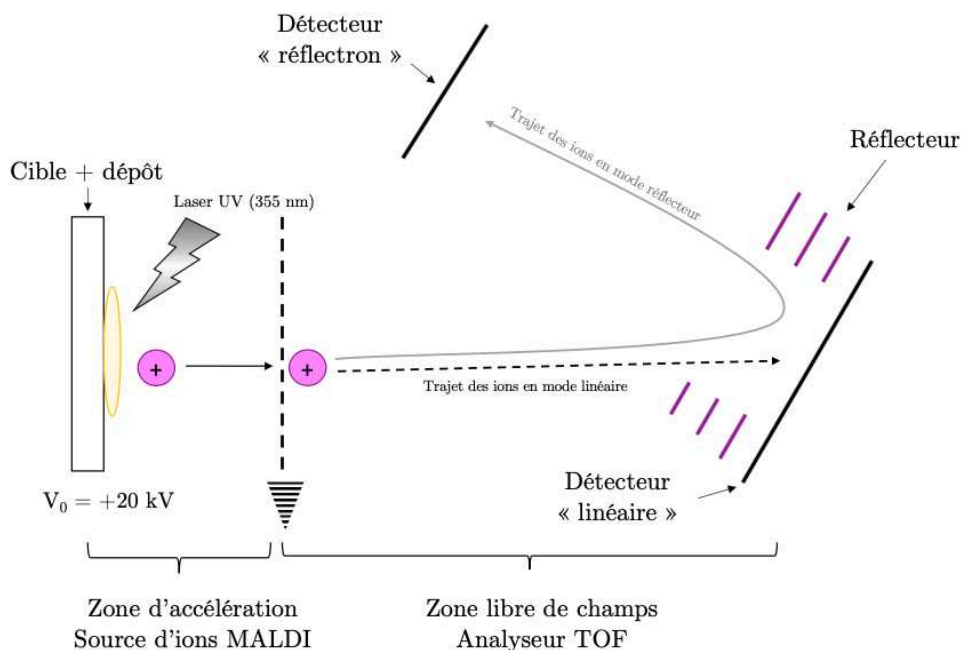


Figure 9 – Trajet d'un ion M^+ en mode réflecteur et en mode linéaire.

Ainsi, le temps de vol (TOF ou time of flight) d'un ion est plus court en mode linéaire qu'en mode réflecteur soit $TOF_{linéaire} \ll TOF_{réflecteur}$. De ce fait, les espèces ioniques dont la durée de vie τ est faible peuvent être détectés en mode linéaire alors qu'ils ne le seront pas forcément en mode réflecteur ($TOF_{linéaire} \leq \tau \ll TOF_{réflecteur}$).

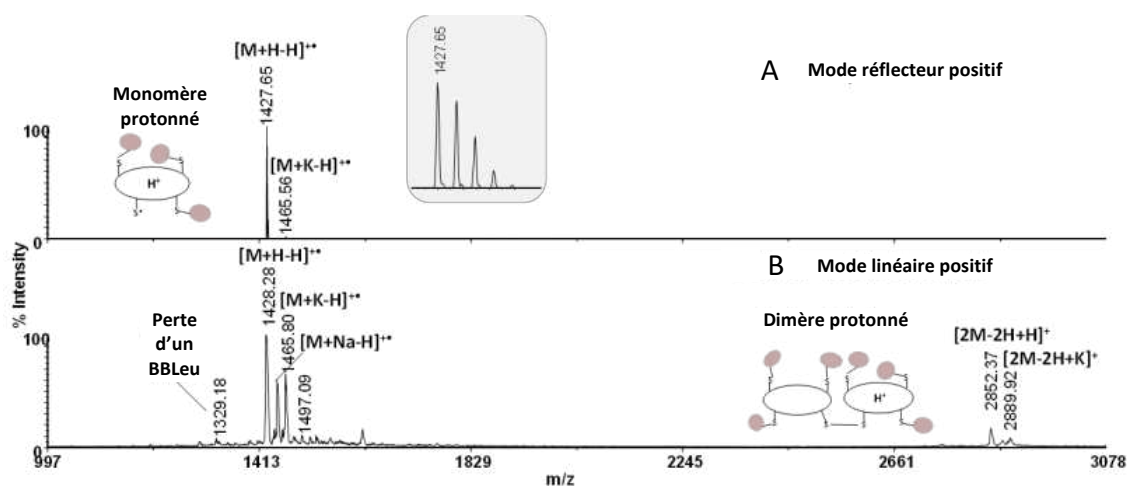


Figure 10 – Spectres de masse MALDI-TOF obtenus pour l'espèce **3a** trifonctionnalisée par le BBLeu **4(L)** en mode réflecteur positif (A, en haut) et en mode linéaire positif (B, en bas). M = monomère, $2M$ = dimère contenant un pont disulfure. Les cystéines fonctionnalisées sont représentées par des boules rouges.

Dans le cas du peptide **3a(L)**^{3,6,8}, le dimère protoné n'est pas assez stable pour être observé en mode réflecteur positif mais est observé sur le spectre en mode linéaire positif (Figure 10). Cela corrobore l'hypothèse du clivage homolytique présenté plus haut : un dimère $[2M+2H-H]^+$ (m/z 2852,37) est présent en solution par formation d'un pont disulfure intermoléculaire. Suite à une fragmentation homolytique de ce pont disulfure impliquant un radical H^\bullet ou m^\bullet généré lors du processus d'ionisation MALDI, deux espèces sont formées dont le radical cation $[M+H-H]^{+\bullet}$ observé à $m/z = 1427,66$.

2.1. Spectrométrie de masse en tandem pour la caractérisation de peptides cycliques

De manière générale, la spectrométrie de masse MALDI ou ESI a permis de caractériser les composés et d'identifier leur structure dans le cas des peptides portant un seul site de thioestérification. En revanche, lorsque 2 cystéines fonctionnalisables sont présentes, des isomères de position sont être formés lors des échanges thiol/thioester. Ces isomères possèdent les mêmes chaînes latérales mais à des positions différentes. Il est donc impossible de les distinguer en MALDI-MS puisque leur rapport m/z est identique. Le véritable défi analytique imposé par l'approche développée lors de ce projet est de pouvoir caractériser ces isomères de positions. Afin de résoudre ce problème, l'emploi de la spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS est une solution de choix.

Le développement de cette technique dans les années 1980 permet de séquencer des ions, et en particulier des ions de peptides de manière efficace.^{7,8} L'analyse MS/MS d'un peptide linéaire permet, après son ionisation, la fragmentation de son squelette peptidique.⁹ La nomenclature des ions fragments issus d'une séquence peptidique est rappelée ci-dessous.¹⁰ Cette fragmentation peut être induite de différentes façons, en excitant les ions par collision avec un gaz (CID, collision induced dissociation) ou par capture ou transfert d'électrons (ECD ou ETD pour electron capture dissociation ou electron transfert dissociation). Les ions b et y correspondant la fragmentation de la liaison peptidique entre le CO et le NH sont obtenus par CID majoritairement tandis que les ions c et z correspondant à la fragmentation de la liaison NH-C α sont obtenus par les techniques de fragmentation impliquant les électrons. Quelle que

soit la technique de fragmentation, généralement, chaque molécule de peptide se fragmente au niveau d'une seule de ses liaisons peptidiques. On obtient alors une population de peptides fragmentés à différents endroits, ce qui permet de remonter à la séquence en acides aminés. Malheureusement toutes les liaisons peptidiques ne sont pas équivalentes et en fonction des séquences peptidiques, certaines peuvent se fragmenter plus facilement que d'autres, rendant l'analyse des données de MS/MS souvent difficile, parfois impossible. Multiplier les techniques d'ionisation peut se révéler intéressant pour avoir des fragments différents et pouvoir reconstituer les séquences.

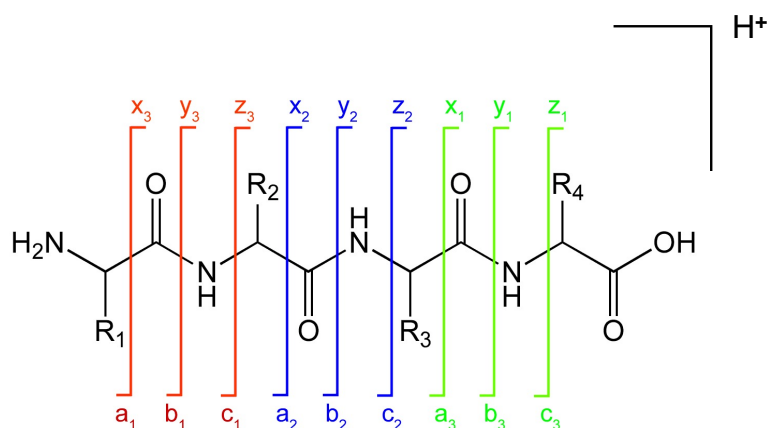


Figure 11 – Nomenclature des ions fragments issu d'une séquence peptidique protonée.¹⁰⁻¹²

La fragmentation des peptides cycliques est plus complexe et l'analyse des spectres générés est bien plus difficile. En effet, la première fragmentation conduit à la linéarisation du peptide. Celle-ci peut avoir lieu sur n'importe quelle liaison peptidique conduisant à une population de peptides linéaires isomères de séquences différentes (Schéma 1). Pour avoir des informations de séquence, il faut alors avoir une énergie interne suffisante pour qu'une deuxième fragmentation du squelette peptidique puisse avoir lieu. L'analyse MS/MS d'un peptide cyclique conduit donc à de multiples schémas de fragmentation possibles rendant l'interprétation du spectre résultant très compliquée.

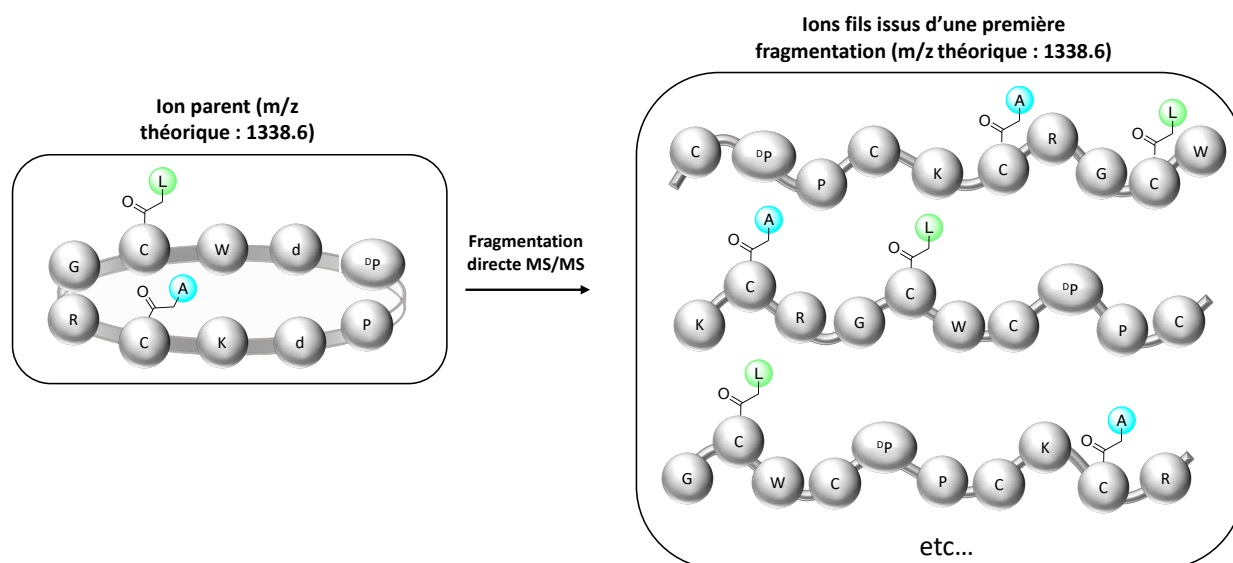


Schéma 1 – Première fragmentation du peptide $2(\text{A})^3(\text{L})^6$ résultant en différentes séquences linéaires de même masse.

Par exemple, la réaction du peptide **2a** avec les 2 BB **4(L)** et **4(A)** vue précédemment conduit entre autres à deux isomères de positions $2(\text{A})^3(\text{L})^6$ et $2(\text{L})^3(\text{A})^6$. Ces deux composés cycliques ont été fragmentés par MS/MS et les spectres ci-dessous présentent un nombre important d'ions fragment. Le peptide **2a** possédant 10 acides aminés est susceptible de se fragmenter à chaque liaison peptidique. Ces 10 sites de fragmentation attendus pour chacun des isomères conduisent théoriquement à l'obtention de 10 peptides isomères, de séquences différentes. Ces peptides isomères peuvent se fragmenter de manière consécutive s'ils ont encore suffisamment d'énergie interne. Pour chacun de ses fragments, la masse théorique de chaque ion a été calculée. La détection de pics diagnostiques de chacune des séquences a pu être réalisée et permis l'identification de chacun des isomères (Figure 12). En effet, les ions ayant pour m/z 671,35 ; 711,39 ; 740,4 et 837,44 ont été identifiés comme ions diagnostiques du peptide $2\mathbf{a}(\text{L})^3(\text{A})^6$ et permettent donc d'attribuer le pic à $t_r = 5,6$ min. Les ions visibles sur le spectre obtenu pour le pic à $t_r = 5,8$ min, à savoir m/z 698,37 et 795,39 ont également été identifiés comme ions diagnostiques de l'isomère $2\mathbf{a}(\text{A})^3(\text{L})^6$.

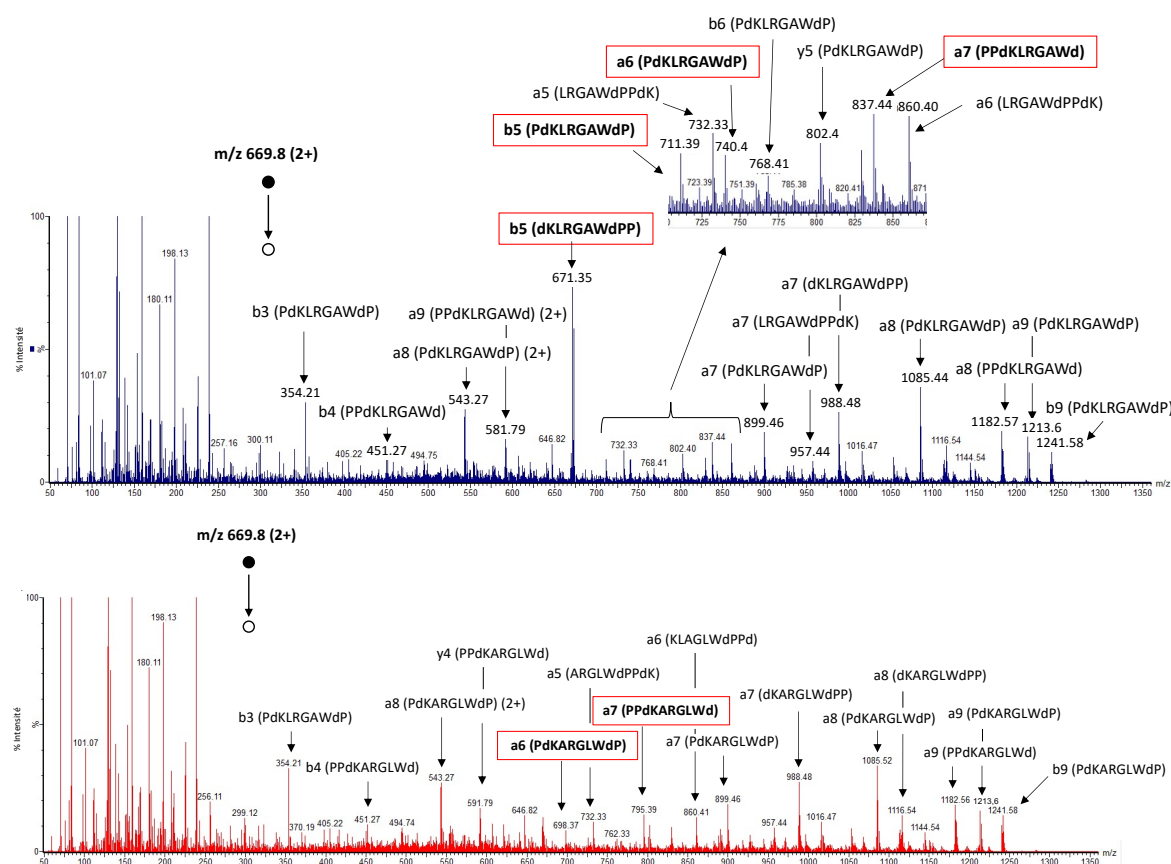


Figure 12 – Spectres ESI MS/MS, CID (N₂), ions positifs, énergie de fragmentation entre 2,8.10⁵ et 3,3.10⁵, obtenus après fragmentation des ions cycliques doublement chargés à m/z 669,8 observés à t_r = 5,6 min (en haut) et à t_r = 5,8 min (en bas).

Les ions diagnostiques des deux isomères sont encadrés en rouge et en gras, les séquences peptidiques des ions parents correspondant à chaque ion fragment sont entre parenthèse. A = C(SOEt), L = C(SOCH₂iBu) et d =Dap(Ac).

Il est à noter que la très grande majorité des ions observés sur le spectre MS/MS de **2a(L)³(A)⁶** sont issus d'une première fragmentation régio-sélective du peptide en N-terminal des résidus proline. Ce phénomène est connu et appelé « l'effet proline ». De nombreux groupes ont essayé de comprendre le mécanisme et même si des divergences demeurent quant au mécanisme mis en jeu lors de cette fragmentation, un consensus existe sur l'influence de l'amide secondaire de la proline, dont la basicité est accrue.¹³⁻¹⁶ L'encombrement stérique au niveau de cette liaison peptidique du fait du cycle de la proline est aussi probablement impliqué dans cet effet. L'ionisation de cette fonction amide est donc favorisée et conduit à une fragmentation facilitée en N-terminal des prolines du fait de la protonation de l'azote de la fonction amide secondaire.

Bien que l'analyse MS/MS des peptides a permis l'identification des isomères **2a(L)³(A)⁶** et **2a(A)³(L)⁶** dans les fractions t_r = 5,6 min (en haut) et à t_r = 5,8 min (en bas), respectivement,

cela représente un travail fastidieux. Lorsque le nombre de cystéines fonctionnalisables augmente à la surface du peptide, le nombre d'isomères possibles augmente encore et cette stratégie semble difficile à appliquer.

Dans le but de faciliter cette caractérisation, nous avons entrepris de mettre au point une méthode de linéarisation du peptide avant sa fragmentation MS/MS.

2.2. Ouverture régiosélective du squelette peptidique cyclique

2.2.1. Stratégies utilisées précédemment

Plusieurs stratégies sont décrites dans la littérature comme l'ouverture chimique au bromure de cyanogène (CNBr), spécifique des résidus méthionine¹⁷ ou l'introduction d'une liaison peptidique sensible aux rayonnements UV.¹⁸

Plusieurs stratégies de linéarisation ont été explorées préalablement au laboratoire (Thèse Benjamin Zagiel). La première consistait à ouvrir le peptide par ISD (In Source Decay) permettant la fragmentation radicalaire rapide du peptide après le tir laser du MALDI. Les ions correspondant aux peptides cycliques ouverts peuvent être alors sélectionnés et fragmentés par CID classique. Cette ouverture par ISD peut en théorie se produire n'importe où dans la séquence mais des études ont montré qu'elle a lieu préférentiellement au niveau de résidus cystéine ou proline.^{19,20} Cette fragmentation par ISD semblait appropriée à la linéarisation des peptides étudiés ici puisque porteurs de résidus cystéine et proline dans leur séquence. Des essais ont donc été effectués et une linéarisation des peptides cycliques a été obtenue. En revanche, le taux de conversion peptide cyclique/peptide linéaire (environ 10%) n'a pas permis d'isoler un ion parent linéaire pur. Les spectres MS/MS résultants se sont avérés complexes, mélangeant ions parents linéaires et ions parents cycliques. De ce fait, cette stratégie n'est pas utilisable pour la linéarisation des peptides en vue de leur fragmentation, dans le contexte de notre bibliothèque.

La seconde piste explorée proposait une ouverture chimie du peptide à l'aide de CNBr. L'étape de linéarisation a donc lieu avant l'analyse en spectrométrie de masse. Cette stratégie semblait appropriée puisqu'elle permet d'ouvrir sélectivement le peptide au niveau d'un résidu

méthionine. Ce résidu avait été introduit dans la séquence du peptide à cet effet. Malgré l'obtention du peptide linéaire plusieurs facteurs (comme l'oxydation non contrôlée de la méthionine, le faible rendement d'ouverture et les risques liés à l'utilisation de CNBr) n'ont pas permis de retenir cette méthodologie pour l'ouverture des peptides cycliques.

Lors de ce projet, de nouvelles stratégies de linéarisation ont donc été étudiées.

2.2.2. Linéarisation par hydrolyse à la trypsine

Le Laboratoire des Biomolécules jouit d'une expertise en protéomique. Cette technique permet l'identification et la caractérisation de protéines après digestion enzymatique, généralement à la trypsine, de ces protéines (stratégie Bottom-up). L'identification est basée sur la comparaison des m/z des peptides digérés obtenus avec les peptides issus de la digestion virtuelle des protéines des banques de données par la même enzyme. La trypsine, est une endopeptidase qui hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques du côté *C*-terminal d'un résidu basique tel que la lysine ou l'arginine en milieu aqueux à 37°C et à pH 7,4. Il nous a donc semblé judicieux d'utiliser cette hydrolyse à la trypsine pour l'ouverture enzymatique spécifique des peptides cycliques en introduisant dans la structure peptidique un résidu Arg. Le peptide linéaire obtenu possède alors une masse correspondant à la masse du peptide cyclique + H₂O et le résidu en *C*-terminal est le résidu Arg. Le rendement de cette réaction d'ouverture du cycle peut donc être facilement suivi en observant l'apparition d'un ion à m/z +18 comparativement au m/z du peptide cyclique. Cette méthodologie semble donc très appropriée à la problématique de caractérisation des peptides cycliques.

Des expériences préliminaires ont été réalisées au laboratoire (Thèse Benjamin Zagiel) notamment pour optimiser les conditions d'utilisation de la trypsine pour permettre l'ouverture du peptide cyclique contraint tout en conservant les fonctions thioesters. Dans un premier temps, il a été montré que l'efficacité d'ouverture à la trypsine dépendait de la position du résidu Arg dans le peptide (Schéma 2). En effet, celle-ci n'a pas lieu lorsque l'arginine est située sur l'un des brins β de l'épingle à cheveux ; en revanche, lorsqu'elle est située dans la boucle plus flexible, l'hydrolyse s'opère.

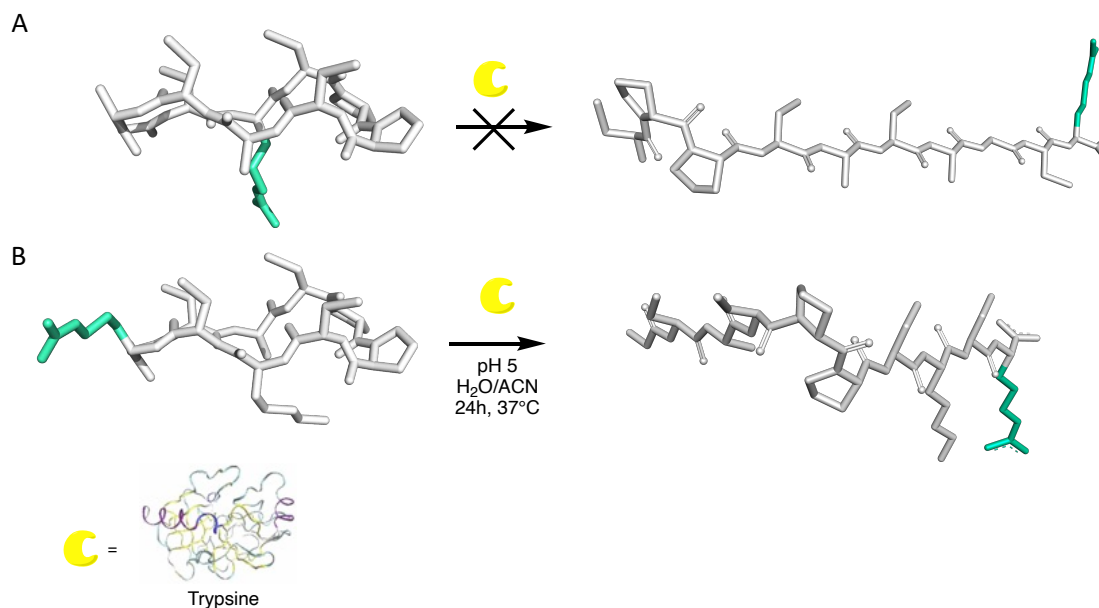


Schéma 2 – Schéma de la digestion séquence dépendante par la trypsine.

Le paramètre le plus crucial au succès de cette stratégie est le choix du pH utilisé pour la réaction d'hydrolyse. La trypsine a une activité optimale à pH légèrement basique. Sachant qu'au-dessus de pH 7 l'échange thiol/thioester peut de nouveau opérer et conduire au ré-équilibre des produits contenant plusieurs cystéines libres ou simplement à l'hydrolyse sans ré-équilibre, ce qui se traduit par une perte des fonctionnalisations et fausse l'analyse. Un compromis doit donc être trouvé de manière à éviter cet échange/perte de thioester pendant la linéarisation et à avoir une activité de la trypsine acceptable. Les réactions de linéarisation sont donc effectuées à pH 5,5 dans l'eau, sans tampon. L'activité de l'enzyme, bien que fortement réduite à ce pH, permet d'obtenir une conversion suffisante pour permettre une fragmentation MS/MS sur le peptide linéaire, après 24h de réaction. Cependant, en fonction des séquences, les peptides cycliques restent plus ou moins solubles dans 100% d'eau. Il a donc été nécessaire d'ajouter de l'acétonitrile (ACN), solvant organique compatible avec l'analyse par spectrométrie de masse. Ces conditions ne sont pas compatibles pour autant avec une activité optimale de la trypsine qui se dénature en solvant organique. Nous avons ainsi optimisé les quantités d'ACN à ajouter et sommes arrivés à un compromis de 2,5%.

La réaction de linéarisation a été étudiée sur les deux isomères générés lors de la réaction du peptide **2a** avec le BB **4(L)**, soit **2a(L)³** et **2a(L)⁶** (Schéma 3). La réaction est effectuée dans l'eau (pH 5,5) en présence de 2,5% d'ACN permettant d'assurer la solubilité des peptides. Les

2 signaux HPLC correspondant à ces deux peptides ($t_r = 5,1$ et $5,7$) ont été séparément collectés et traités par la trypsine à 37°C pendant 24h.

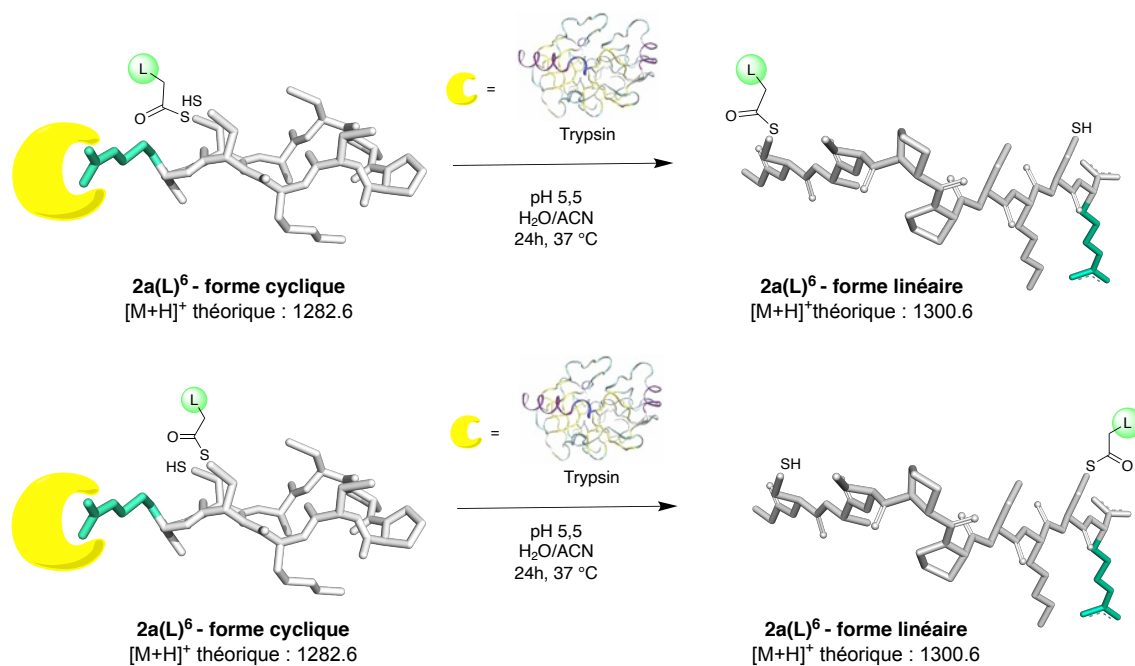


Schéma 3 – Schémas réactionnels des hydrolyses à la trypsine des peptides $2a(L)^6$ et $2a(L)^3$ cycliques.

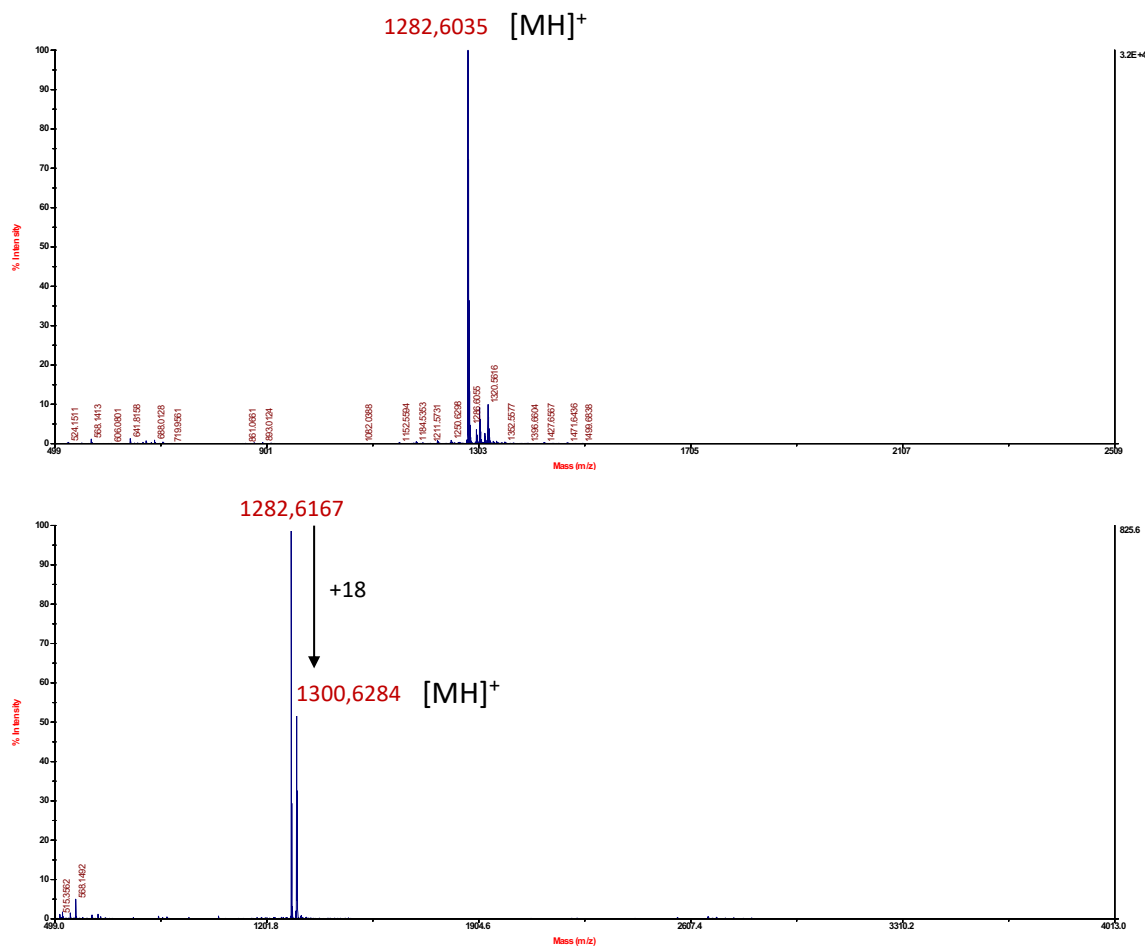


Figure 13 – Exemple de spectre de masses MALDI-TOF, mode réflecteur ions positifs, matrice : acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) obtenus avant (en haut) et après linéarisation (en bas) pour le pic à $t_r = 5,1$ min.

L'ouverture du peptide est obtenue dans ces conditions, comme en témoigne la présence des pics correspondant à $[MH]^+$ forme cyclique + 18 (m/z 1300,63) correspondant (Figure 13). Les ions parents (m/z 1300,63) sont sélectionnés puis fragmentés dans une cellule de collision avec du gaz N_2 (CID) en spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF (Figure 14).

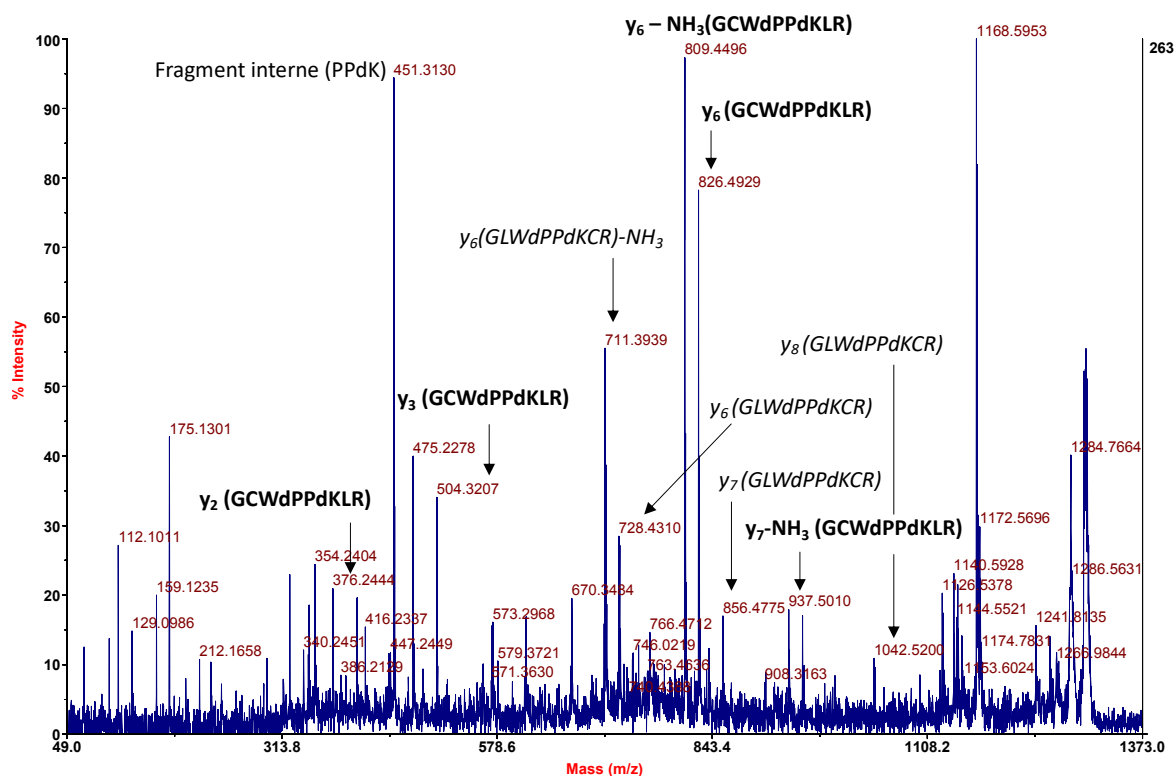


Figure 14 – Spectre MALDI MS/MS, CID (N₂) du peptide parent linéarisé par la trypsine à m/z 1300,6 à t_r = 5,1 min.

En gras sont représentés les ions de la séquence GCWdPPdKLR **2a(L)**⁶ et en italique ceux de la séquence GLWdPPdKCR *2a(L)*³ avec L = C(SOCH₂iBu) et d = Dap(Ac).

Dans ce cas la présence d'un unique ion parent linéaire conduit à un spectre MS/MS beaucoup plus simple à analyser (Figure 14). Là encore, les ions correspondant à une fragmentation en *N*-terminal des prolines sont plus intenses. L'ion m/z 451,31 correspond à ce qu'on appelle un fragment interne résultant d'une double fragmentation. Ce type de fragmentation est fréquent quand il y a des prolines dans les séquences peptidiques. Les fragmentations ont eu lieu en *N*-terminal de la ^DPro9 et en *C*-terminal de la Lys11. Les ions y₆-NH₃ et y₆ (m/z 809,44 et 826,49) correspondent à la fragmentation de la chaîne peptidique GCWdPPdKLR entre les deux prolines.

Cependant, les spectres obtenus révèlent la présence d'ions diagnostiques des deux isomères sur les deux spectres. Cela indique la présence des deux peptides dans chacun des échantillons analysés. La séparation HPLC ayant été efficace, une hypothèse est qu'un échange a eu lieu entre le thioester et le thiol libre pendant la digestion à la trypsine.

Afin de vérifier cette hypothèse, la même expérience a été faite sur les peptides $2a(A)^3(L)^6$ et $2a(L)^3(A)^6$, à partir du peptide **2a** et fonctionnalisé par les BB 4(L) et 4(A), ne présentant pas de cystéines libres (Schéma 4).

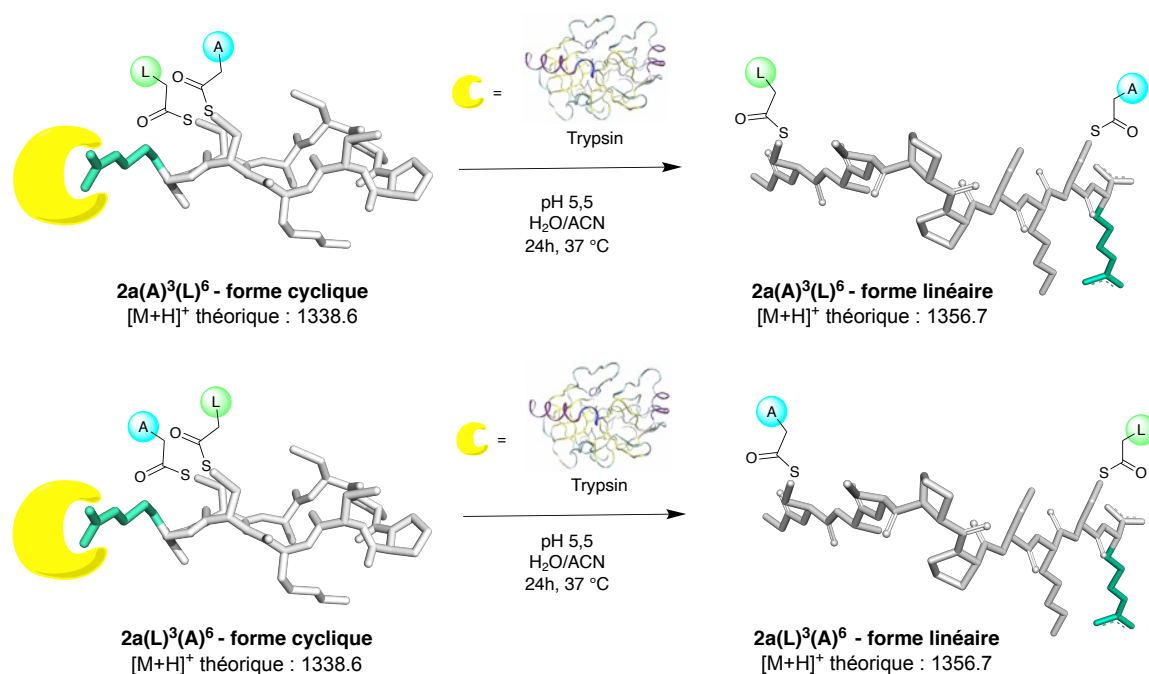


Schéma 4 – Schémas réactionnels des hydrolyses à la trypsine des peptides $2a(A)^3(L)^6$ et $2a(L)^3(A)^6$ cycliques.

Les pics HPLC correspondant donc à ces deux isomères ont été collectés et linéarisés par hydrolyse à la trypsine dans les mêmes conditions qu'énoncées précédemment (Figure 15).

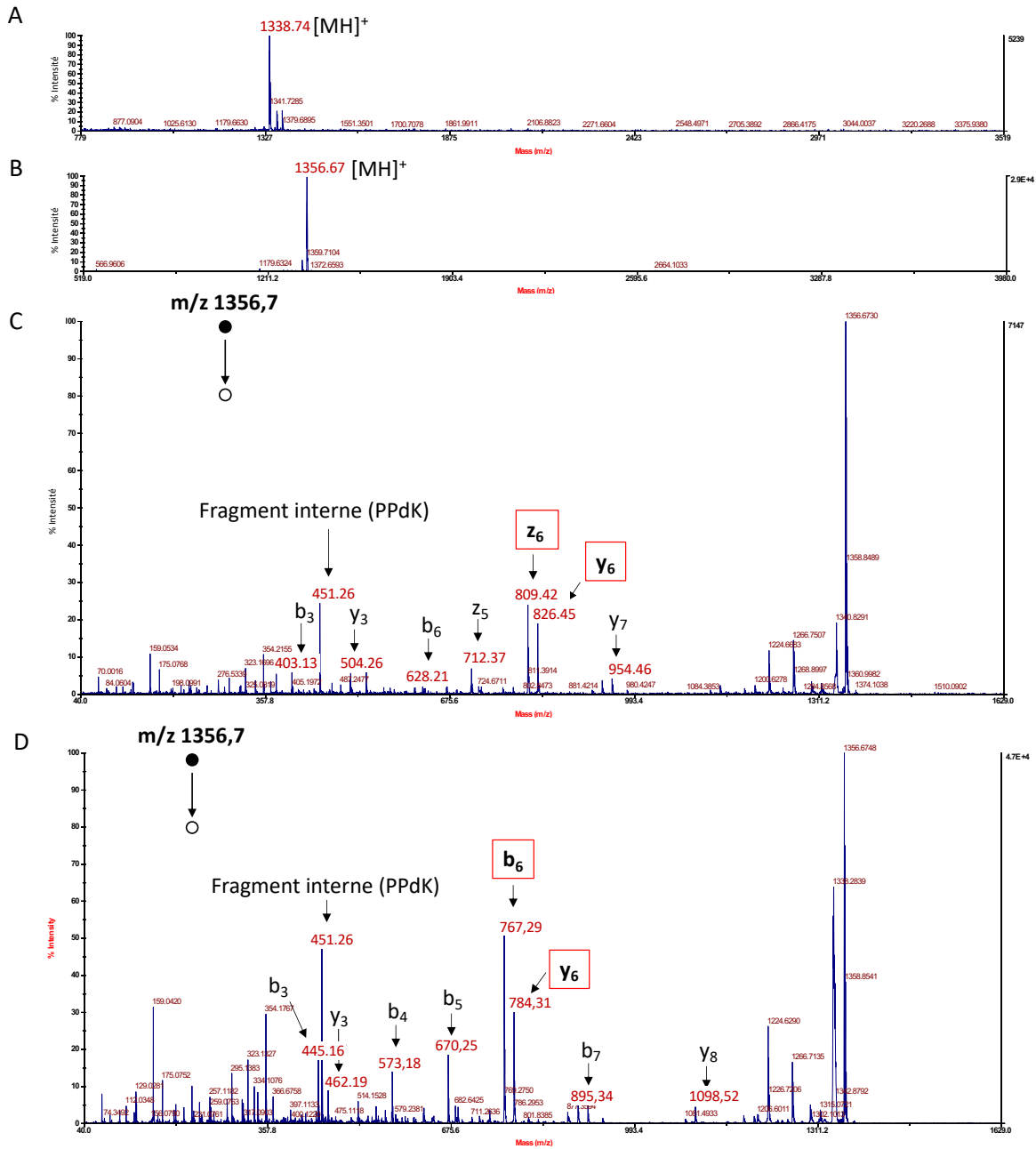


Figure 15 – Spectres de masse MALDI-TOF obtenus pour le pic à $t_r = 5,6$ min.

A : avant linéarisation à la trypsiine, mode réflecteur, ions positifs, matrice HCCA, B : après linéarisation, mode réflecteur, ions positifs, matrice HCCA, C : spectre MALDI-TOF/TOF, CID(N₂) de l'ion parent à m/z 1356,7 à $t_r = 5,6$ min, D : spectre MALDI-TOF/TOF, CID(N₂) de l'ion parent à m/z 1356,7 pour le pic à $t_r = 5,8$ min.

Les ions diagnostiques permettant de différencier les deux isomères du peptide sont en gras et encadrés en rouge ; d=Dap(Ac).

Là encore, les spectres de masse MALDI effectués avant et après addition de trypsiine présentent une différence de 18 unités de masse confirmant la linéarisation du peptide par hydrolyse, avec cette fois une conversion totale. Après fragmentation de chacun des isomères linéaires, la plupart des ions du spectre de MS/MS ont été attribués. Les ions diagnostiques

de chaque isomère sont observés sur chacun des spectres, il n'y a pas de mélange. On peut donc conclure que dans ce cas, aucun échange thiol/thioester n'a eu lieu. Si un échange est observé, alors il doit avoir lieu en solution, à pH 5,5, pendant l'hydrolyse trypsique.

2.2.3. Linéarisation par l'effet dit « ornithine »

Une autre stratégie régio-sélective, d'ouverture de peptides cycliques a été étudiée. Il s'agit de la linéarisation grâce à l'effet dit « ornithine », observé en phase gazeuse, en MS/MS comme décrit ci-dessous. L'ornithine est un acide aminé homologue de la lysine avec un méthylène de moins sur la chaîne latérale. Cet effet peut être rapproché de l'effet proline décrit précédemment, qui aurait probablement pu être utilisé dans notre stratégie s'il n'y en avait eu qu'une dans le cycle.

Il a été montré pendant la dernière décennie que l'introduction d'un résidu ornithine dans une séquence peptidique, promeut un clivage régio-sélectif de la chaîne carbonée principale en phase gazeuse. En effet, après ionisation en ESI, une protonation de l'atome d'azote de la liaison amide en C-ter de l'ornithine se produit par activation collisionnelle (CID) ou par activation par photodissociation UV (UVPD). Une cyclisation par transamidation de l'amine γ de la chaîne latérale de l'ornithine sur le carbonyle du squelette se produit conduisant à la rupture de la chaîne peptidique (Schéma 5).²¹⁻²⁴ Pour observer l'ion linéarisé chargé, il faut que l'ion parent sélectionné en MS/MS soit au minimum chargé deux fois. C'est la raison pour laquelle il faut travailler avec une source d'ions ESI qui permet de produire des ions multichargés contrairement à la source MALDI qui ne permet d'obtenir que des ions monochargés $[M+H]^+$.

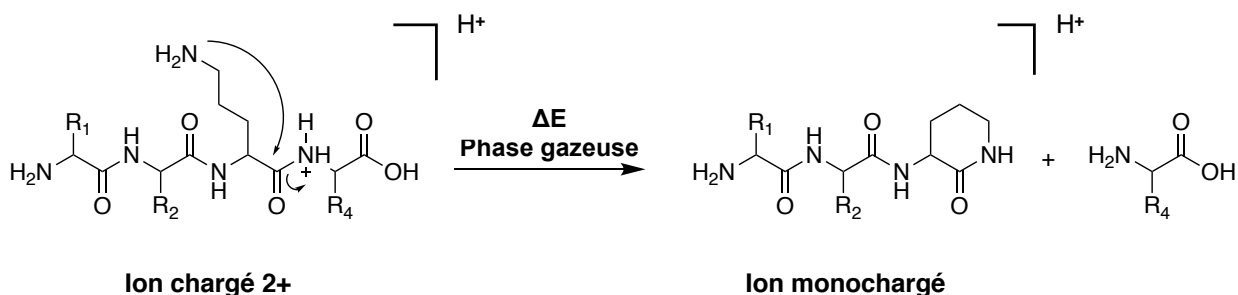


Schéma 5 – Cyclisation du groupement ornithine en phase gazeuse.

Cette stratégie est particulièrement intéressante puisque, contrairement à l'utilisation de la trypsine, elle ne nécessite pas d'étape supplémentaire en amont de l'analyse ESI-MS/MS.

Afin d'étudier cette nouvelle voie de linéarisation, deux peptides **2c** et **3d** (Figure 16) ont été synthétisés suivant la stratégie de synthèse présentée auparavant.

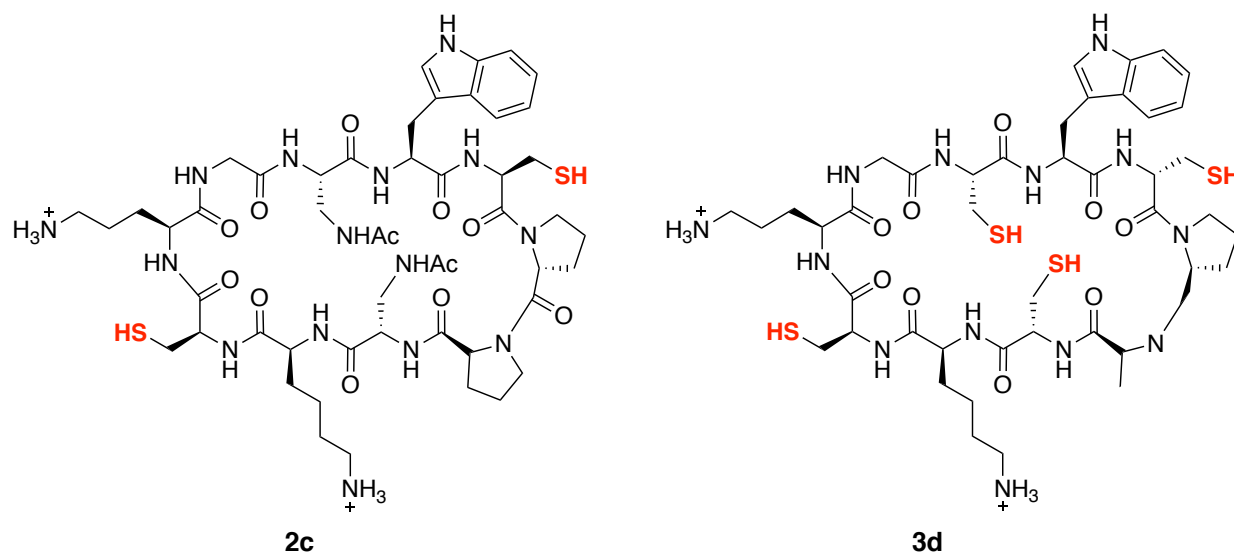


Figure 16 – Structure des peptides **2c** et **3d** contenant une ornithine en position 4.

La réaction de **2c** (1mM) avec les BB **4(A)** et **4(L)** (20 eq chacun) conduit à la formation des différents adduits mono ou difonctionnalisés. Les deux pics HPLC correspondant aux isomères **2c(L)³(A)⁸** ou **2c(A)³(L)⁸** ont donc été analysés en ESI-MS/MS afin d'exploiter l'effet ornithine pour la linéarisation (Schéma 6).

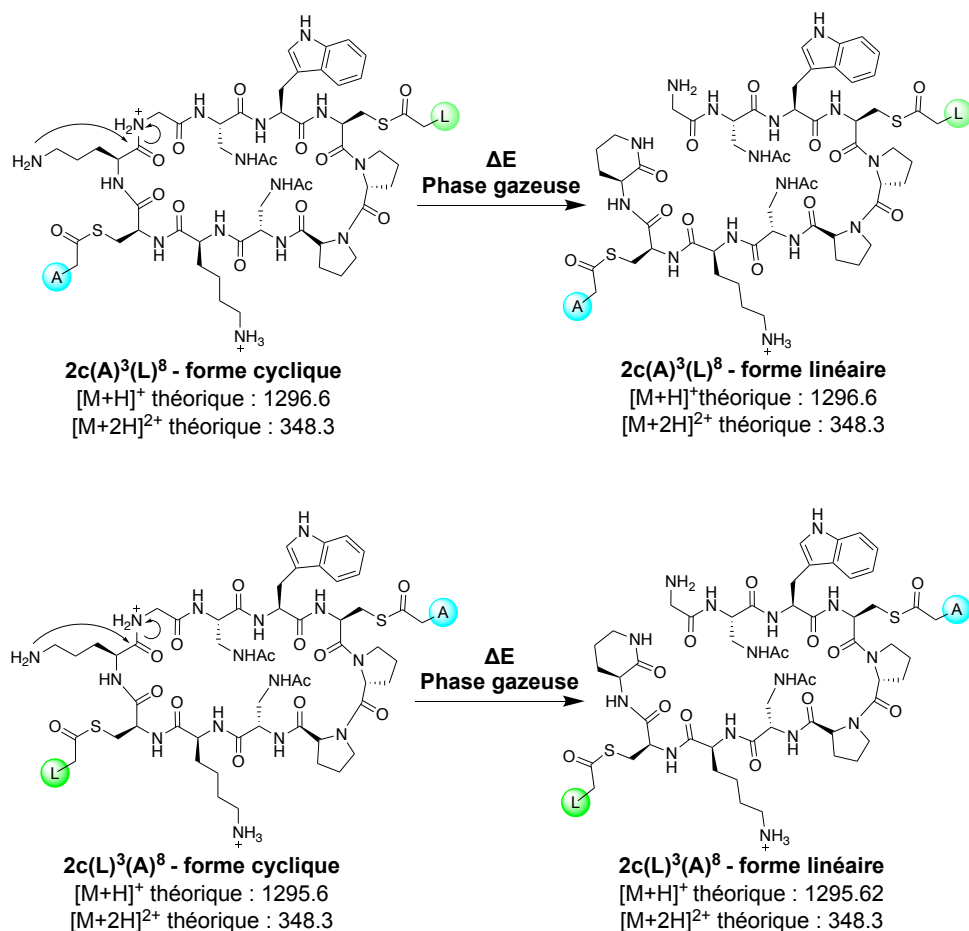


Schéma 6 – Peptides **2c(A)³(L)⁸** et **2c(L)³(A)⁸** avant et après linéarisation.

L'analyse des spectres MS/MS montre bien la présence de différents ions appartenant à un seul schéma de fragmentation, ce qui confirme bien l'ouverture régio-sélective du cycle en phase gazeuse en C-terminal du résidu ornithine ainsi que l'absence de transthioestérification en phase gazeuse (Figure 17).

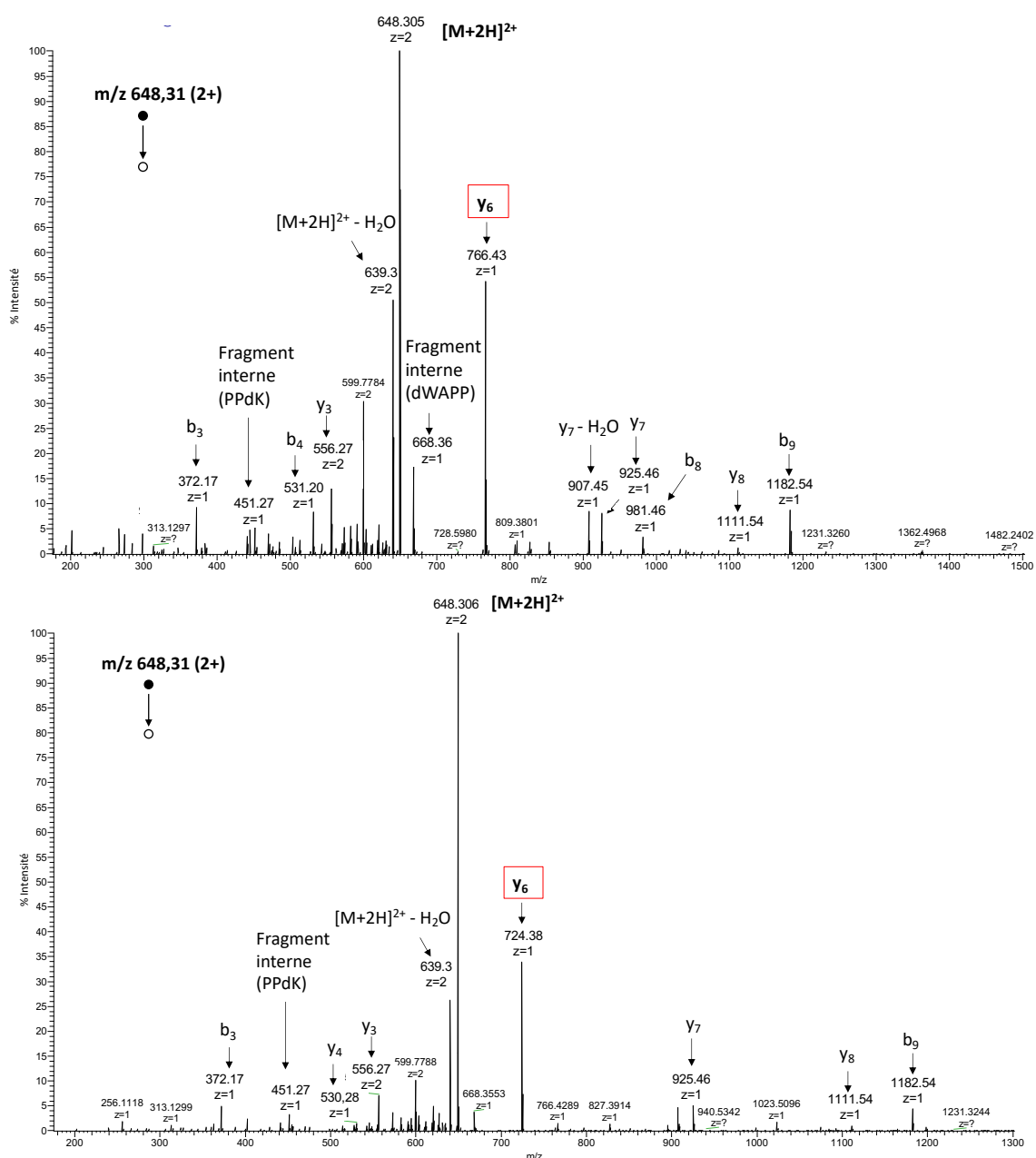


Figure 17 – Spectres ESI MS/MS, CID (N₂), ions positifs, énergie de fragmentation entre 11 et 14, obtenus pour les ions parents [M+2H]²⁺ à m/z 648,31 correspondant aux peptides isomères à t_r = 6,6 min (en haut) et t_r = 7 min (en bas).

La grande majorité des ions ont pu facilement être identifiés ce qui a permis l'attribution des pics. Le pic à t_r = 6,6 min et à t_r = 7 min ont pu être distingués grâce à l'ion y₆ et correspondent respectivement aux peptides **2c(A)³(L)⁸**, et **2c(L)³(A)⁸**. L'ion 2+ à m/z 599,7 correspond aux peptides ayant tous deux perdu la fonctionnalisation par la leucine.

De même la réaction de **3d** (1 mM) avec les BBs **4(A)** et **4(L)** (20 équivalents chacun) conduit à la formation de différents adduits portant différentes combinaisons de chaînes latérales Ala et Leu (Figure 18 et Tableau 3).

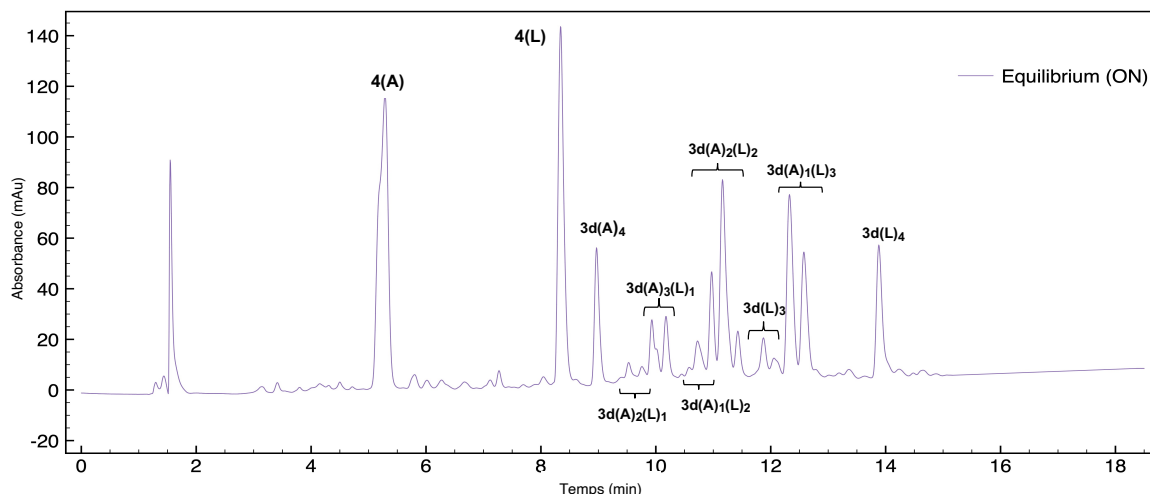


Figure 18 – Chromatogramme obtenu pour la bibliothèque issue de **3d**, BB **4(A)** et **4(L)**.

Tableau 3 – Tableau récapitulatif des données obtenues à l'équilibre pour la réaction entre **3d**, **4(A)** et **4(L)**.

| t_r (min) | % Aire du pic | MALDI-MS/ ESI-MS | Peptides | Formule brut, Masse molaire théorique (g.mol ⁻¹) |
|-------------|---------------|---------------------------|--|---|
| 8.9 min | 13% | [M+H] ⁺ 1316.5 | 3d(A) ^{1,3,6,8} | C ₅₈ H ₈₅ N ₁₃ O ₁₄ S ₄ 1315.5 |
| 9.5 min | 2% | [M+H] ⁺ 1302.6 | 3d(A) ^{1,3(L)6} , 3d(A) ^{1,3(L)8} , 3d(A) ^{1,6(L)3} , 3d(A) ^{1,6(L)8} , 3d(A) ^{1,8(L)3} , 3d(A) ^{1,8(L)6} , 3d(A) ^{1,8(L)6} , 3d(A) ^{3,6(L)1} , | C ₅₈ H ₈₇ N ₁₃ O ₁₃ S ₄ 1301.5 |
| 9.7 min | | | 3d(A) ^{3,6(L)8} , 3d(A) ^{3,8(L)1} , 3d(A) ^{3,8(L)6} , 3d(A) ^{6,8(L)1} , 3d(A) ^{6,8(L)3} | |
| 9.9 min | 10% | [M+H] ⁺ 1358.6 | 3d(A) ^{3,6,8(L)1} , 3d(A) ^{1,6,8(L)3} , 3d(A) ^{1,3,8(L)6} , | C ₆₁ H ₉₁ N ₁₃ O ₁₄ S ₄ 1357.6 |
| 10.1 min | | | 3d(A) ^{1,3,6(L)8} | |
| 10.6 min | 3% | [M+H] ⁺ 1344.4 | 3d(A) ^{1(L)3,6} , 3d(A) ^{1(L)3,8} , 3d(A) ^{1(L)6,8} , 3d(A) ^{3(L)1,6} , | C ₆₁ H ₉₃ N ₁₃ O ₁₃ S ₄ 1343.6 |
| 10.7 min | | | 3d(A) ^{3(L)1,8} , 3d(A) ^{3(L)6,8} , 3d(A) ^{6(L)1,3} , 3d(A) ^{6(L)1,8} , 3d(A) ^{6(L)3,8} , 3d(A) ^{8(L)1,3} , 3d(A) ^{8(L)1,6} , 3d(A) ^{8(L)3,6} | |
| 11 min | 29% | [M+H] ⁺ 1400.3 | 3d(A) ^{1,3(L)6,8} , 3d(A) ^{1,6(L)3,8} , 3d(A) ^{1,8(L)3,6} , | C ₆₄ H ₉₇ N ₁₃ O ₁₄ S ₄ 1399.6 |
| 11.1 min | | | 3d(A) ^{3,6(L)1,8} , 3d(A) ^{3,8(L)1,6} , 3d(A) ^{6,8(L)1,6} | |
| 11.5 min | 4% | [M+H] ⁺ 1386.6 | 3d(L) ^{1,3,6} , 3d(L) ^{1,3,8} , 3d(L) ^{1,6,8} , 3d(L) ^{3,6,8} | C ₆₄ H ₉₉ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ 1385.6 |
| 11.9 min | | | | |
| 12.3 min | 27% | [M+H] ⁺ 1442.7 | 3d(A) ^{1(L)3,6,8} , 3d(A) ^{3(L)1,6,8} , | C ₆₇ H ₁₀₃ N ₁₃ O ₁₄ S ₄ 1441.7 |
| 12.6 min | | | 3d(A) ^{6(L)1,3,8} , 3d(A) ^{8(L)1,3,6} | |
| 13,5 min | 12% | [M+H] ⁺ 1484.4 | 3d(L) ^{1,3,6,8} | C ₇₀ H ₁₀₉ N ₁₃ O ₁₄ S ₄ 1483.7 |

* Éluant : H₂O/ACN, 0,1% TFA, 5 à 100% ACN, 15 minutes.

Après les analyses préliminaires MALDI, qui nous ont permis de connaître les espèces potentielles en présence, en se basant uniquement sur les valeurs des m/z observés en MALDI-

MS, une étude ESI-MS/MS a été effectuée afin de distinguer les différents isomères des peptides $3d(A)_3(L)_1$ (Figure 19). Tous les ions y et b ainsi que les pertes de neutre classiques à partir de ces ions (perte de NH_3 ou perte d' H_2O) ou les fragmentations internes dues à la présence des résidus Pro dans les séquences ont été envisagés et leur m/z ont été calculés dans un fichier Excel. Comme attendu, la plupart des ions sont identiques et ne permettent pas de différencier les isomères. Seuls certains ions sont caractéristiques de chacune des espèces nous ont servi à l'identification des isomères présents dans les différentes fractions HPLC.

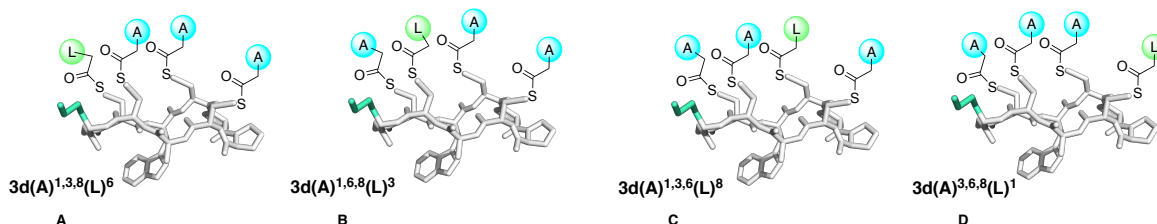


Figure 19 – Représentation schématique des structures possibles du peptides $3d$ fonctionnalisés par un adduit leucine et 3 adduits alanine.

Les trois pics du chromatogramme ont été fragmentés en ESI-MS/MS (Figure 20) et présentent de nombreux ions dont la majorité a pu être identifié et sont communs aux 3 spectres. Certains ions correspondent à la perte d'un des adduits par lequel il a été fonctionnalisé.

Néanmoins, trois ions diagnostiques permettant d'identifier les isomères ont pu être identifiés :

- L'ion y_3 à m/z 444,26 caractéristique de l'isomère B est présent uniquement sur le spectre correspondant au signal à $t_r = 9,9$ min et permet donc d'attribuer ce pic au peptide $3d(A)^{1,6,8}(L)^3$.
- L'ion y_7-H_2O à m/z 896,37 caractéristique de l'isomère A n'est présent que sur le spectre correspondant au signal à $t_r = 10$ min et permet donc d'attribuer ce pic peptide $3d(A)^{1,3,8}(L)^6$.
- L'ion du fragment interne DPPPLK à m/z 524,29 caractéristique de l'isomère D n'est présent que sur le spectre correspondant au signal à $t_r = 10,1$ min et permet donc d'attribuer ce pic au peptide $3d(A)^{3,6,8}(L)^1$.

En revanche, aucun spectre MS/MS ne présente d'ions diagnostiques de l'isomère C, $3d(A)^{1,3,6}(L)^8$.

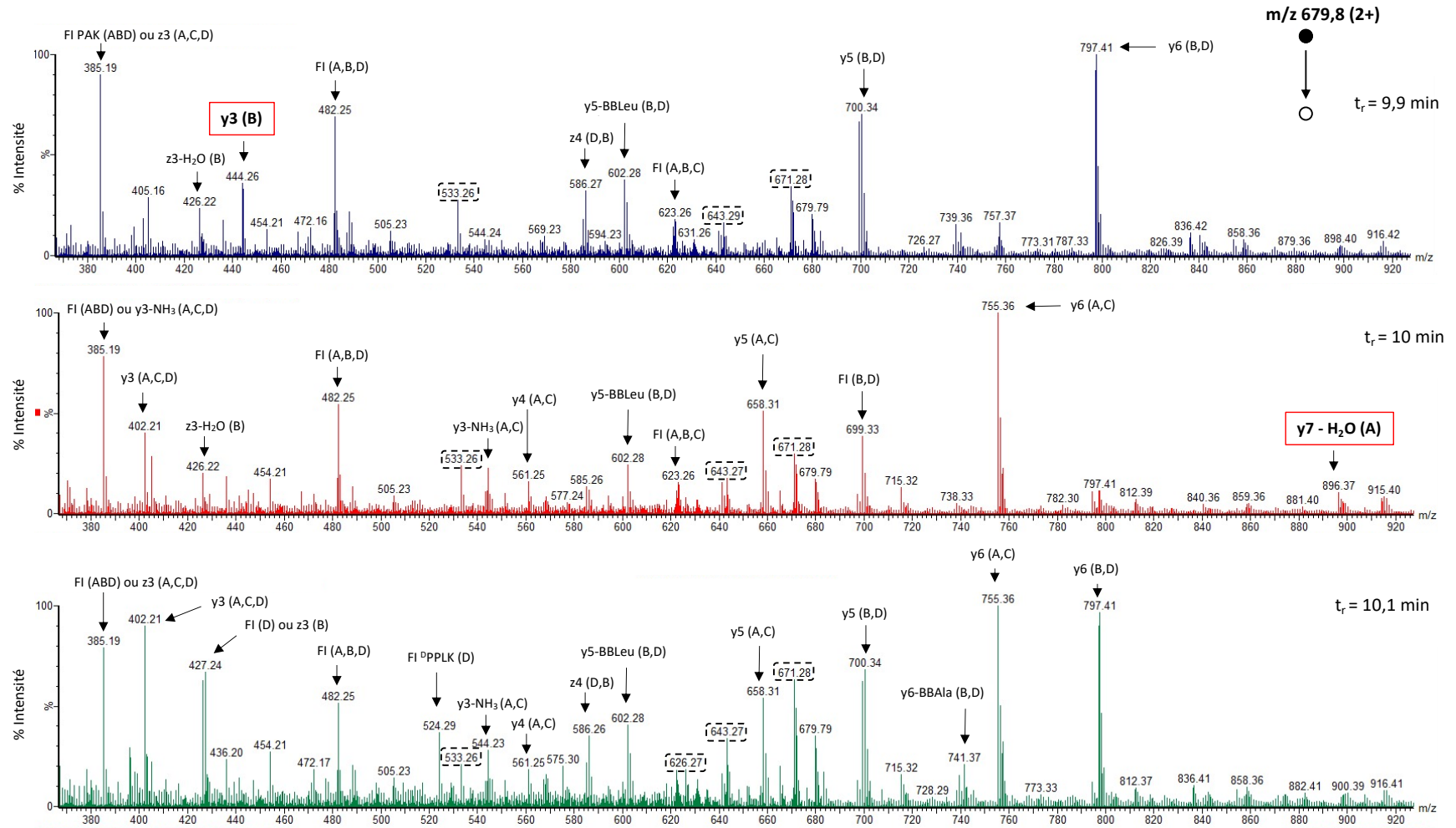


Figure 20 - Spectres ESI MS/MS, CID (N₂), ions positifs, énergie de fragmentation entre 2,2.10⁴ et 2,7.10⁴, des ions parents [M+2H]²⁺ à m/z 679,8, obtenus pour les pics correspondant aux espèces types **3d(A)₃(L)₁** à partir des chromatogrammes TIC.

En gras encadrés en rouge = ions diagnostiques, -BBLeu = perte de la chaîne latérale mimant la leucine, -BBAla = perte de la chaîne latérale mimant l- alanine, FI = fragment interne, A B C et D = voir Figure 19, encadrés en pointillés = ions doublement chargés.

2.3. Conclusion

L'analyse des bibliothèques de peptides cycliques est un point clé et nous avons été confrontés à de nombreuses difficultés. La première stratégie testée utilisant la trypsine pour hydrolyser de façon régio-sélective les peptides cycliques en amont de l'analyse MS et MS/MS s'avère efficace pour les peptides peracétylés mais dans le cas où une cystéine reste libre sur le peptide, un échange thiol/thioester intramoléculaire peut se produire durant la digestion et fausser l'analyse. La stratégie qui nous semble la plus adaptée est donc d'introduire un résidu ornithine dans les séquences peptidiques et d'utiliser « l'effet ornithine » observé en ESI-MS/MS pour, en une seule étape en phase gazeuse, ouvrir le peptide cyclique de façon régio-sélective en C-terminal de l'ornithine et le fragmenter pour caractériser sa séquence et donc la nature des chaînes greffées aux positions fonctionnalisables (cystéines libres). Nous avons trouvé des conditions pour la fragmentation CID qui nous permettent d'observer des ions diagnostiques des isomères malgré la fragilité des liaisons thioesters qui sont parfois perdues lors de l'analyse. Cependant, l'analyse manuelle reste fastidieuse et longue et nécessiterait une automatisation envisageable mais non encore réalisée, pour être utilisée en routine. La linéarisation des peptides cycliques préalablement à cette analyse est donc incontournable et a permis d'identifier les différents isomères de position issue de bibliothèque plus ou moins complexe.

3. Discussion

Ce deuxième chapitre s'est intéressé aux différentes stratégies mises en place afin d'analyser les bibliothèques combinatoires dynamiques générées. Même si la caractérisation complète d'une bibliothèque combinatoire n'est pas forcément un prérequis pour la découverte de molécules bioactives, la mise au point d'une stratégie d'analyse applicable en routine pour détecter et caractériser les composés représente le défi majeur dans le développement de cette stratégie.

La méthode de choix pour le suivi des réactions et la détection des membres de la bibliothèque est l'analyse HPLC. Les peptides développés au départ et présentés dans le contexte du chapitre précédent sont porteurs d'un tryptophane utilisé comme TAG-UV, absorbant à 280 nm. Ce chromophore n'étant pas orthogonal à tous les BBs, une nouvelle sonde a été synthétisée : le 4-(DAPA). Les propriétés UV de cette dernière, avec une longueur d'onde spécifique à 415 nm, permettent de s'affranchir des signaux des BBs et de ne détecter que les espèces peptidiques.

Cela facilite la lecture des chromatogrammes obtenus puisque les signaux détectés ne sont plus masqués par les signaux des BB utilisés en excès. Nous avons montré dans ce chapitre que l'utilisation d'un TAG-UV le 4-(DAPA) permet ainsi de simplifier fortement les profils HPLC des mélanges et d'augmenter la sensibilité de la détection des peptides. Cette sonde possède également des propriétés de fluorescence qui pourraient être exploitées pour augmenter encore d'avantage cette sensibilité.

En ce qui concerne l'identification des séquences, nous avons pu montrer tout d'abord que la spectrométrie de masse MALDI permet d'observer les fonctions thioester stables pour la plupart des BB. Dans le cas de la chaîne Arg, il n'a pas été possible de détecter les peptides fonctionnalisés. Des ions de m/z non identifiés ont été observés, faisant penser à une réactivité non contrôlée dans la source d'ions. En revanche, une analyse par ESI a permis l'identification des peptides fonctionnalisés par l'arginine.

Le point crucial qui a été étudié est la caractérisation des isomères de position lors de l'utilisation de peptides porteurs de plusieurs cystéines. En effet, ces peptides isomères ne peuvent être distingués en MS. L'analyse de ces derniers en spectrométrie de masse en tandem MS/MS a donc été envisagée et donne accès à leur séquence primaire permettant de les caractériser. Dans un premier temps, la fragmentation MS/MS directe du peptide cyclique a été envisagée et bien que possible, cette stratégie ne peut être appliquée en routine. Le nombre trop élevé de structures linéarisées puis fragmentées rend l'analyse des spectres trop difficile du fait du nombre de fragments trop important. Dans un deuxième temps, nous avons mis au point des conditions de digestion enzymatique à la trypsine, compatibles avec le maintien des liaisons thioester, pour la linéarisation des peptides cycliques en amont de l'analyse MALDI-TOF MS et de la fragmentation MS/MS. L'analyse des spectres obtenus a permis de différencier des isomères de position sur un peptide portant 2 cystéines et fonctionnalisés par un adduit Ala et un adduit Leu. En revanche, lorsqu'un thiol est présent sur le peptide analysé, un échange thiol/disulfure a lieu durant l'analyse, probablement pendant la digestion. Enfin, une autre voie de linéarisation basée sur « l'effet ornithine » a été envisagée. Ce résidu capable de cycliser en phase gazeuse en mode MS/MS, est facilement incorporable en synthèse peptidique et permet d'ouvrir le peptide sans recourir à une étape préliminaire de digestion enzymatique. Après synthèse de nouveaux peptides porteurs de plusieurs cystéines libres et

introduction dans des bibliothèques dynamiques de complexité variable ; cette stratégie, applicable en routine, a finalement permis l'identification de plusieurs isomères de positions.

A l'issue de ce chapitre, la séquence de la plateforme peptidique a été optimisée. L'arginine initialement présente a été remplacée par une ornithine, permettant la linéarisation du peptide en phase gazeuse, en mode MS/MS, et le 4-(DAPA) a été introduit à la place du tryptophane afin de s'affranchir des signaux des BBs. Un nouveau *scaffold* optimisé, combinant ces différents motifs est en cours de synthèse (Figure 21) (Master 2, Éléonore Tacke, 2021).

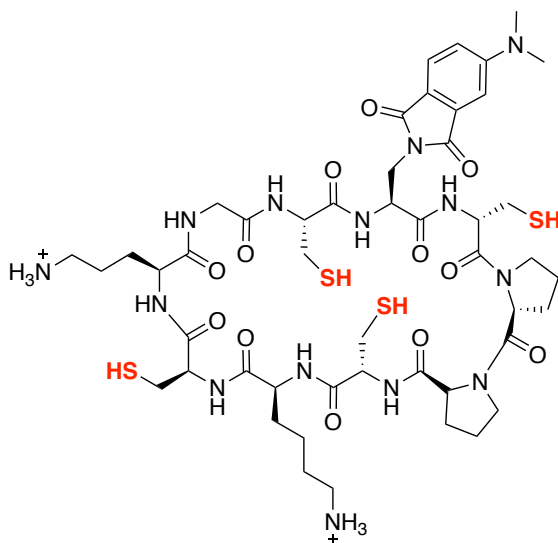


Figure 21 – Séquence du *scaffold* optimisé.

Basé sur ces considérations, un second *scaffold* possédant cette fois-ci une structure hélicoïdale stabilisé par des agrafes entre les résidus i et $i+4$ a également été préparé. Ces deux *scaffolds* représentent les structures secondaires les plus communes trouvées dans les domaines d'interaction des protéines et peuvent maintenant être utilisés pour la génération de DCL et le criblage vis-à-vis de cibles biologiques. Ils sont actuellement utilisés pour l'identification d'inhibiteurs d'interaction protéine-protéine (Thèse Lei Ren à partir d'octobre 2021) ainsi que pour l'identification de combinaisons de chaînes latérales hydrophobes (Trp) et cationiques (Arg) induisant une interaction avec les glycosaminoglycanes pour la conception de peptides pénétrants des cellules (ANR glycotarget, porteur Sandrine Sagan).

Il est à noter malgré tout qu'en absence d'une résolution complète de la structure de l'ensemble des membres d'une bibliothèque, il est tout de même possible d'exploiter ces bibliothèques pour l'identification de molécules hits par des méthodes de déconvolution. L'utilisation de techniques

plus performantes, en particulier pour l'amélioration de la séparation en amont de l'analyse MS est envisagée. En particulier, des études exploitant l'électrophorèse capillaire couplée à la MS sont en cours, en collaboration avec le Dr. Claudia Muracciole Bich (IBMM, Montpellier).

Les conditions d'analyse développées lors de ce travail sont maintenant applicables en routine et ont permis de finaliser la première partie de la stratégie de chimie combinatoire dynamique développée lors de ce projet de thèse. Le troisième et dernier chapitre de ce travail s'intéresse à l'application de cette stratégie à la l'identification d'inhibiteurs sélectifs de protéase à sérine.

Références

- (1) Ludlow, R. F.; Otto, S. Two-Vial, LC-MS Identification of Ephedrine Receptors from a Solution-Phase Dynamic Combinatorial Library of over 9000 Components. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (37), 12218–12219.
- (2) Vázquez, M. E.; Rothman, D. M.; Imperiali, B. A New Environment-Sensitive Fluorescent Amino Acid for Fmoc-Based Solid Phase Peptide Synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2* (14), 1965–1966.
- (3) Imperiali, B.; Sainlos, M. Tools for Investigating Peptide-Protein Interactions: Peptide Incorporation of Environment-Sensitive Fluorophores via on-Resin Derivatization. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (12), 3201–3209.
- (4) Imperiali, B.; Sainlos, M. Tools for Investigating Peptide-Protein Interactions: Peptide Incorporation of Environment-Sensitive Fluorophores through Spps-Based “building Block” Approach. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (12), 3210–3218.
- (5) Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F. Role of Photoionization and Photochemistry in Ionization Processes of Organic Molecules and Relevance for Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27* (4), 472–480.
- (6) Sohn, C. H.; Gao, J.; Thomas, D. A.; Kim, T. Y.; Goddard, W. A.; Beauchamp, J. L. Mechanisms and Energetics of Free Radical Initiated Disulfide Bond Cleavage in Model Peptides and Insulin by Mass Spectrometry. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (8), 4550–4560.
- (7) Yates, J. R. Mass Spectrometry and the Age of the Proteome. *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33* (1), 1–19.
- (8) Jonsson, A. P. Mass Spectrometry for Protein and Peptide Characterisation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58* (7), 868–884.
- (9) Paizs, B.; Suhal, S. Fragmentation Pathways of Protonated Peptides. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24* (4), 508–548.
- (10) Biemann, K. Nomenclature for Peptide Fragment Ions (Positive Ions). *Methods Enzymol.* **1990**, *193* (C), 886–887.
- (11) P. Roepstorff, J. F. Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11* (11), 601.
- (12) Biemann, K. Contributions of Mass Spectrometry to Peptide and Protein Structure. *Biol. Mass Spectrom.* **1988**, *16* (1–12), 99–111.
- (13) Vaisar, T.; Urban, J. Probing the Proline Effect in CID of Protonated Peptides [1]. *J.*

- Mass Spectrom.* **1996**, *31* (10), 1185–1187.
- (14) Schwartz, B. L.; Bursey, M. M. Some Proline Substituent Effects in the Tandem Mass Spectrum of Protonated Pentaalanine. *Biol. Mass Spectrom.* **1992**, *21* (2), 92–96.
- (15) Raulfs, M. D. M.; Brechi, L.; Bernier, M.; Hamdy, O. M.; Janiga, A.; Wysocki, V.; Poutsma, J. C. Investigations of the Mechanism of the “Proline Effect” in Tandem Mass Spectrometry Experiments: The “Pipecolic Acid Effect.” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *25* (10), 1705–1715.
- (16) Bleiholder, C.; Suhai, S.; Harrison, A. G.; Paizs, B. Towards Understanding the Tandem Mass Spectra of Protonated Oligopeptides. 2: The Proline Effect in Collision-Induced Dissociation of Protonated Ala-Ala-Xxx-Pro-Ala (Xxx = Ala, Ser, Leu, Val, Phe, and Trp). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22* (6), 1032–1039.
- (17) Liang, X.; Girard, A.; Biron, E. Practical Ring-Opening Strategy for the Sequence Determination of Cyclic Peptides from One-Bead-One-Compound Libraries. *ACS Comb. Sci.* **2013**, *15* (10), 535–540.
- (18) Liang, X.; Vézina-Dawod, S.; Bédard, F.; Porte, K.; Biron, E. One-Pot Photochemical Ring-Opening/Cleavage Approach for the Synthesis and Decoding of Cyclic Peptide Libraries. *Org. Lett.* **2016**, *18* (5), 1174–1177.
- (19) Savitski, M. M.; Kjeldsen, F.; Nielsen, M. L.; Zubarev, R. A. Hydrogen Rearrangement to and from Radical z Fragments in Electron Capture Dissociation of Peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18* (1), 113–120.
- (20) Asakawa, D.; Smargiasso, N.; Quinton, L.; De Pauw, E. Influences of Proline and Cysteine Residues on Fragment Yield in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization in-Source Decay Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *25* (6), 1040–1048.
- (21) O’Hair, R. A. J. The Role of Nucleophile-Electrophile Interactions in the Unimolecular and Bimolecular Gas-Phase Ion Chemistry of Peptides and Related Systems. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35* (12), 1377–1381.
- (22) McGee, W. M.; McLuckey, S. A. The Ornithine Effect in Peptide Cation Dissociation. *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48* (7), 856–861.
- (23) Crittenden, C. M.; Parker, W. R.; Jenner, Z. B.; Bruns, K. A.; Akin, L. D.; McGee, W. M.; Ciccimaro, E.; Brodbelt, J. S. Exploitation of the Ornithine Effect Enhances Characterization of Stapled and Cyclic Peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2016**, *27*

- (5), 856–863.
- (24) Crittenden, C. M.; Parker, W. R.; Jenner, Z. B.; Bruns, K. A.; Akin, L. D.; McGee, W. M.; Ciccimaro, E.; Brodbelt, J. S.; Foreman, D. J.; Lawler, J. T.; et al. Exploitation of the Ornithine Effect Enhances Characterization of Stapled and Cyclic Peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2019**, *27* (5), 856–863.

CHAPITRE III : AMPLIFICATION PAR LES PROTÉASES À SÉRINE

Sommaire

| | |
|--|------------|
| Liste de figures..... | 162 |
| Liste de schéma..... | 162 |
| Liste de tableaux..... | 163 |
| 1. Protéases à sérine et leurs inhibiteurs | 165 |
| 1.1. Les protéases à sérine | 165 |
| 1.2. Peptides et peptidomimétiques anti-inflammatoires | 169 |
| 1.2.1. Conception d'inhibiteurs peptidiques par miniaturisation de protéines | 169 |
| 1.2.2. Conception d'inhibiteurs peptidiques par utilisation de scaffold | 170 |
| 1.2.3. Conception d'inhibiteurs peptidiques par criblage aléatoire haut débit | 175 |
| 1.3. Conclusion | 175 |
| 2. Scaffold pour la conception de bibliothèques ciblant les protéases à sérine..... | 176 |
| 2.1. Conception d'un scaffold général pour le ciblage de protéases à sérine | 177 |
| 2.2. Validation du scaffold sur la plasmine | 179 |
| 2.2.1. Design d'inhibiteur de plasmine basée sur les scaffolds Xb et Xc | 179 |
| 2.2.2. Synthèse des peptides | 185 |
| 2.2.3. Étude du potentiel inhibiteur des peptides | 186 |
| 3. Application de la DCC à l'identification d'inhibiteurs de la plasmine | 190 |
| 3.1. Mise au point de la stratégie d'analyse des composés amplifiés..... | 190 |
| 3.2. Études préliminaires des nouveaux peptides en DCC..... | 193 |
| 3.3. Amplification par la plasmine..... | 196 |
| 4. Discussion et conclusion | 199 |
| Références | 203 |

Liste de figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1 - Nomenclature de Schechter et Berger. | 167 |
| Figure 2 - Structure de SFTI-1 et interactions cruciales avec la trypsine. | 171 |
| Figure 3 - Rôle des résidus de SFTI-1. ¹⁸ | 172 |
| Figure 4 - Agrafes et contraintes conformationnelles locales introduites pour stabiliser SFTI-1. ¹⁸ | 174 |
| Figure 5 - Scaffolds cyclotides optimisés pour l'inhibition de différentes protéases. ³⁸ | 174 |
| Figure 6 - Peptides développés par le groupe de Robinson. ⁴⁷ | 177 |
| Figure 7 - Structure des scaffolds Xa , Xb et Xc . | 178 |
| Figure 8 - Système d'activation du plasminogène. | 180 |
| Figure 9 - Peptide développé par Craik et al. et ses interactions avec la plasmine. ²⁷ | 181 |
| Figure 10 - Structure du peptide Ya et son interaction avec la plasmine. | 182 |
| Figure 11 - Interactions des résidus de Ya avec la plasmine et superposition avec SFTI-1. | 183 |
| Figure 12 - Structure et insertion dans la poche de la plasmine des peptides Yb(R) et Yc(R) . | 184 |
| Figure 13 - Comparaison des structures et interactions de Yb(R) ou SFTI avec la plasmine et structure de Yb . | 185 |
| Figure 14 - Évaluation du % d'inhibition des peptides Ya et Yb après criblage contre la plasmine. | 188 |
| Figure 15 - Quantification du pouvoir inhibiteur de Ya vis-à-vis de la plasmine. | 189 |
| Figure 16 - Profil de sélectivité du peptide Ya [100 µM] vis à vis de différentes protéases à sérine concurrentes ou impliquées dans des processus inflammatoires. | 190 |
| Figure 17 - Schéma résumant les approches comparatives et non comparatives permettant d'identifier le ou les composés amplifiés. ⁵⁷ | 191 |
| Figure 18 - Stratégie d'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique mise en place. | 192 |
| Figure 19 - Évolution des rapports $[Ya]/[Contrôle]$ en fonction des éluions. | 193 |
| Figure 20 - Chromatogrammes obtenus après 10h de réaction sur Yb avec 4(R) (en haut), 4(E) (au milieu) et 4(hR) (en bas). | 194 |
| Figure 21 - Chromatogramme obtenu après 10h de réaction entre Yb , 4(R) et 4(A) . | 196 |
| Figure 22 - Comparaison des pourcentages de produits présents dans chaque expérience. | 197 |
| Figure 23 - Comparaison des absorbances de BB présents en fonction des éluions dans le mélange contenant de la plasmine. | 198 |
| Figure 24 - Pourcentage de produits présents en fonction des éluions dans le mélange contenant de la plasmine. | 199 |

Liste de schéma

| | |
|--|-----|
| Schéma 1 - Mécanisme catalytique des protéases à sérine. ⁵ | 168 |
| Schéma 2 - Schéma de synthèse des peptides Ya et Yb . | 186 |

Liste de tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 - Classification et répartition des protéases à sérine d'après la base de données MEROPS. ¹ | 166 |
| Tableau 2 - Valeurs de K_i de KD1-Wild Type (KD1-WT) et KD1-L17R contre différentes protéines impliquées dans la coagulation. | 170 |
| Tableau 3 - Exemple de peptides inhibiteurs de protéase à sérine, analogues de SFTI-1 : séquences et constantes d'inhibition K_i . ¹⁸ | 173 |
| Tableau 4 - Exemples de peptides synthétisés et leur constante d'inhibition. ⁴⁷ | 178 |
| Tableau 5 - Tableau résumant les interactions entre P1, P1' et P2' s'établissant entre SFTI-1 et le peptidomimétique de Craik et al. ou entre SFTI-1 et le peptide développé lors de cette étude. | 183 |
| Tableau 6 - Activité de la plasmine dans les différents tampons utilisés. | 187 |
| Tableau 7 - Tableau récapitulatif des données obtenues pour les bibliothèques générées entre le peptide Yb et 4(R) , 4(E) ou 4(hR) . | 195 |
| Tableau 8 - Récapitulatif des données obtenues après 6h de réaction entre Yb , 4(R) et 4(A) (2,5 eq chacun). | 196 |

1. Protéases à sérine et leurs inhibiteurs

1.1. Les protéases à sérine

Les protéases, ou enzymes protéolytiques, catalysent l'hydrolyse de liaisons peptidiques entre deux acides aminés au sein d'un substrat protéique. Distribuées dans tous les règnes du vivant, elles assurent des rôles cruciaux pour l'homéostasie et l'intégrité cellulaire. Environ 2 à 4% des gènes humains codent pour des protéases, ce qui en fait l'un des plus grands groupes de protéines. En 1955, à l'occasion du Congrès International de Biochimie à Bruxelles, l'Union Internationale de Biochimie et Biologie Moléculaire (IUBMB) propose une nomenclature officielle des enzymes, la nomenclature EC (*Enzyme Commission*), de façon concomitante à la création de la Commission des Enzymes.

La nomenclature EC est basée sur le type de réaction catalysée et attribuée à chaque enzyme un nom générique de type EC x.x.x.x, à savoir les initiales « EC » pour « Enzyme Commission » suivie de quatre chiffres séparés par des points. Chaque chiffre précise une étape de la réaction catalysée par l'enzyme concernée. La famille des protéases, aussi appelées peptidases, comprend à la fois les exo- et endoprotéases. Les premières hydrolysent des liaisons peptidiques à l'extrémité N-terminale (aminopeptidases) ou C-terminale (carboxypeptidases) tandis que les secondes hydrolysent des liaisons peptidiques au sein de la chaîne polypeptidique, et plus précisément entre les groupements acides carboxyliques de l'acide aminé N et le groupement amine de l'acide aminé n+1.

Nous nous intéressons aux protéases à sérine qui sont d'importantes molécules de signalisation impliquées dans de nombreux processus physiologiques hautement contrôlés. La dérégulation de leur activité est souvent associée à des processus pathologiques variés allant des troubles cardiovasculaires et inflammatoires, au cancer et aux maladies neurodégénératives. Les protéases à sérine représentent environ un tiers des protéases. Elles sont distribuées chez les eucaryotes, les procaryotes, les archées et les virus. Les protéases à sérine régulent de grands processus physiologiques tels que la digestion, l'homéostasie, l'apoptose, la transduction du signal, la reproduction ou encore l'immunité. D'un point de vue structural, elles appartiennent à la famille S1 du clan PA dont le représentant est la chymotrypsine (classification MEROPS).

Le clan PA correspond aux endopeptidases possédant une sérine ou une cystéine nucléophile initiant l'activité catalytique, une triade catalytique respectant l'ordre His – Asp – Ser/Cys et un repliement suivant celui de la chymotrypsine A. Un clan est ensuite subdivisé en familles grâce à la comparaison des structures primaires. Chaque famille est identifiée par un code à une lettre et un chiffre, la lettre correspondant au type catalytique. Ainsi, la famille S1 correspond aux endoprotéases possédant une sérine nucléophile au sein de leur site actif et dont le repliement est similaire à celui de la chymotrypsine.^{1,2} Le tableau ci-après présente les différents clans de la famille des protéases à sérine. (Tableau 1).

Tableau 1 - Classification et répartition des protéases à sérine d'après la base de données MEROPS.¹

| Clan | Nombre de membres | Résidus catalytiques | Exemple | Distribution |
|-------------|--------------------------|-----------------------------|---|-------------------------|
| PA(S) | 301 | His-Asp-Ser | Chymotrypsine | B, An, Ar, C, Pl, V |
| SB | 91 | Asp-His-Ser | Subtilisine | B, An, Ar, C, Pl, Pr, V |
| SC | 64 | Ser-Asp-His | Carboxypeptidase Y | B, An, Ar, F, Pl, Pr |
| SK | 14 | Ser-His-Asp | Protéase Clp | B, An, Ar, C, Pl, Pr, V |
| SE | 16 | Ser-Lys | Carboxypeptidase A D-Ala-d-Ala | B, An, Ar, Pl |
| SF | 24 | Ser-Lys/His | Peptidase Signal I | B, An, Ar, C, Pl, V |
| SH | 7 | His-Ser-His | Assembline du Cytomégalovirus | V |
| SM | 7 | Ser-Lys | Protéase I du processing C-terminal | B, Ar, Pl |
| SN | 4 | Ser-His-Glu | Dipeptidase E | B, An |
| PB(S) | 4 | N-terminal Ser | Précurseur de la pénicilline-amidohydrolase | B, Ar, Pr |

B = Bactéries, An = Animaux, Ar = Archées, C = Champignons, Pl = Plantes, V = Virus

La description des interactions entre la protéase et son substrat suit une topologie linéaire établie par le modèle de Schechter et Berger en 1967. Dans ce modèle, la surface de la protéase est divisée en sous-sites S1-Sn et S1'-Sn' qui accommodent respectivement les résidus P1-Pn et P1'-Pn' du substrat protéique. La liaison peptidique P1-P1' est hydrolysée, P1 et P1' correspondant respectivement aux résidus situés en N-terminal et C-terminal de la liaison scissile. Les interactions supplémentaires qui s'établissent entre les résidus des positions Pn-Sn et Pn'-Sn' permettent à la fois de renforcer l'interaction entre l'enzyme et son substrat, mais aussi de définir la spécificité de la protéase (Figure 1).³

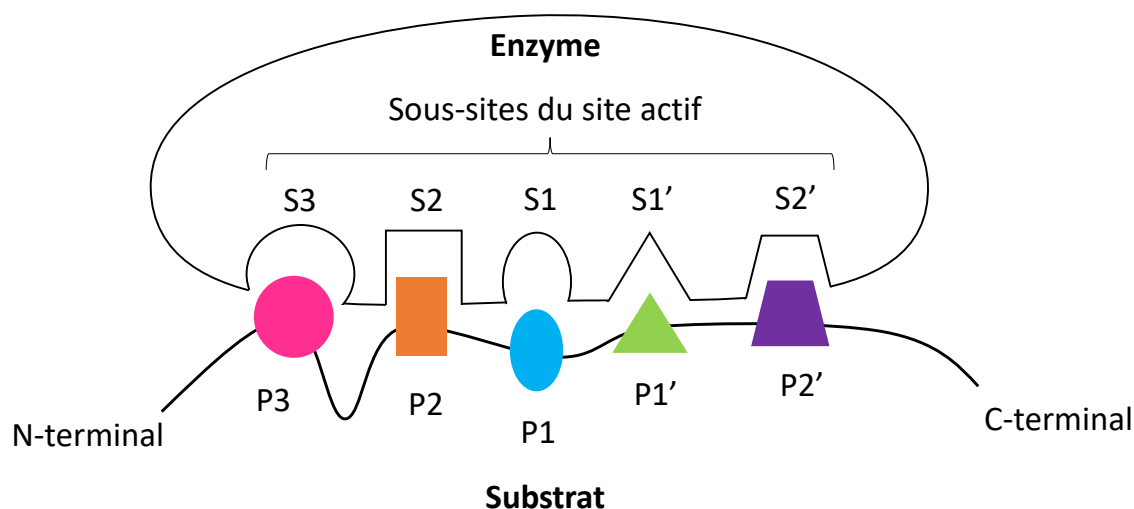


Figure 1 - Nomenclature de Schechter et Berger.

Les résidus du substrat (lettres P) sont parfaitement complémentaires des sous sites du site actif de l'enzyme (lettres S). Le site de clivage se situe entre les résidus P1 et P1' du substrat.

Le repliement des protéases à sérine du clan PA a pour modèle celui de la chymotrypsine. La structure tertiaire de la chymotrypsine est formée de 254 acides aminés organisés en deux tonneaux β , chacun composé de six brins β antiparallèles, et d'une hélice α . Chaque tonneau β est organisé d'un point de vue fonctionnel : une face est impliquée dans la catalyse tandis que l'autre assure la régulation de l'activité enzymatique. Le site actif de la chymotrypsine se situe à l'interface entre les deux tonneaux β . Il contient la triade catalytique caractéristique His57, Asp102, Ser195 caractéristique de ce clan. Cette dernière joue le rôle d'un relai de charge et permet la formation du trou oxianion essentiel à la protéolyse. Huit boucles de surface viennent décorer l'entrée du site actif. Elles participent à l'optimisation de l'activité catalytique en alignant les résidus His57 et Ser195 dans le même plan. La protéolyse est également facilitée par un réseau de liaisons hydrogène qui permet d'orienter les résidus de la triade catalytique au sein du site actif.⁴

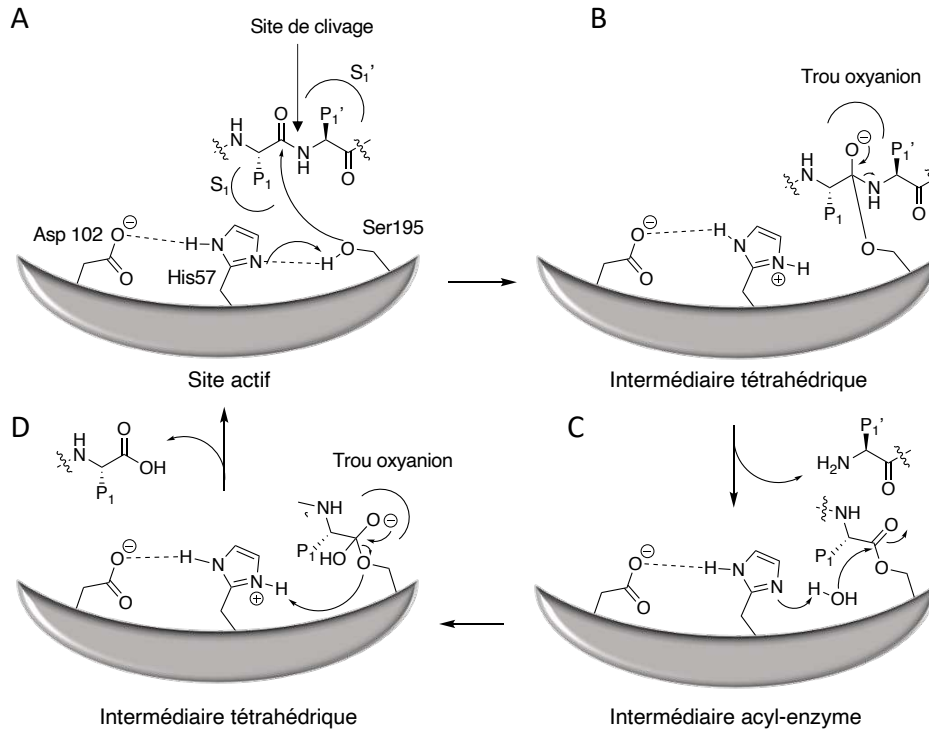


Schéma 1 - Mécanisme catalytique des protéases à sérine.⁵

A : Activation de la sérine catalytique et attaque nucléophile du carbonyle de la liaison scissile. B : Formation du premier intermédiaire tétraédrique stabilisé par le trou oxyanion. C : Acylation de la protéase et libération du fragment NH₂-R. D : Déacylation de la protéase, libération du fragment R'-COOH et retour à l'état conformationnel initial.

Leur rôle dans la réponse inflammatoire est central puisqu'elles sont responsables de la régulation des cytokines impliquées dans le système immunitaire et chimokines pro-inflammatoires. Elles promeuvent également l'activation de cascades de signalisation, clivent des récepteurs de surface et dégradent la matrice extracellulaire. De plus, elles sont impliquées dans la coagulation sanguine, processus indispensable à la cicatrisation des plaies.^{6,7} Il semble évident qu'une régulation anormale de ces protéases, combinant leur surexpression et un défaut de production ou mutations de leurs inhibiteurs endogènes, conduit à un phénomène inflammatoire exacerbé donnant naissance à de nombreuses pathologies incluant l'infection par le coronavirus-19.⁸ Ces enzymes sont donc des cibles thérapeutiques importantes, de premier plan en santé publique.⁷

Elles sont soumises à une régulation stricte afin d'assurer que leur activité s'opère uniquement dans un contexte approprié et dans une mesure limitée.⁹

Chez l'homme, le faible nombre d'inhibiteurs endogènes identifiés par rapport au nombre de protéases connues peut être expliqué par leur faible spécificité : l'inhibiteur d'une protéase cible

peut inhiber d'autres protéases.¹⁰ En effet, les cascades protéolytiques impliquent des protéases homologues possédant un mécanisme catalytique identique et une spécificité de substrat similaire.¹¹ Le développement d'inhibiteurs sélectifs est donc à la fois un véritable défi scientifique et la principale stratégie thérapeutique utilisée pour réguler l'activité de ces protéases.

Bien que les petites molécules organiques constituent un arsenal important des inhibiteurs de protéases, la conception d'inhibiteurs en se basant sur les peptides et les petites protéines représente une stratégie des plus pertinentes pour aboutir à une plus grande spécificité et une affinité nanomolaire ou subnanomolaire.⁵

1.2. Peptides et peptidomimétiques anti-inflammatoires

1.2.1. Conception d'inhibiteurs peptidiques par miniaturisation de protéines

Une des stratégies rapportées pour l'accès à des peptides inhibiteurs de protéases à sérine consiste à miniaturiser des inhibiteurs protéiques naturels. Par exemple l'équipe de Paul Bajaj, a développé un nouvel inhibiteur de la plasmine à partir du domaine d'interaction KD-1 de l'inhibiteur endogène TFPI (TFPI pour *tissue factor pathway inhibitor*), issu de la voie tissulaire. Celui-ci contient trois domaines d'interactions aux protéases. Le domaine KD-1 est impliqué dans l'inhibition de la trypsine, chymotrypsine, du facteur VIIa/TF, du facteurr XIa (FXIa), de la kallikreine plasmatique (pKLLK) et de la plasmine. Dans le but d'accéder à un inhibiteur sélectif de la plasmine, la mutation du résidu Leu17 en position P2' par un résidu Arg a été entreprise et a permis d'augmenter l'affinité de l'inhibiteur pour la plasmine avec un K_i de $0,9 \pm 0,1$ nM pour KD1-L17R et de $6 \pm 0,5$ nM pour KD1-WT. De plus, contrairement à KD1-WT, KD1-L17R ne montre aucune activité d'inhibition contre les autres protéases à sérine.¹² Les peptides obtenus par cette stratégie de miniaturisation restent cependant de taille relativement élevées et leurs application pour le développement d'agents thérapeutique complexe.

Tableau 2 - Valeurs de K_i de KD1-Wild Type (KD1-WT) et KD1-L17R contre différentes protéines impliquées dans la coagulation.

| Protéines | K_i KD1-L17R (nM) | K_i KD1-WT (nM) |
|---|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Kallikréine plasmatique | > 3000* | 25 ± 3 |
| Facteur Xia | > 3000* | 18 ± 2 |
| Facteur IIa | > 3000* | > 3000* |
| Activateur tissulaire du plasminogène (TPA) | > 3000* | > 3000* |
| Plasmine | 0,9 ± 0,1 | 6 ± 0,5 |

Les valeurs indiquées avec * représentent les valeurs limites de K_i , indiquant la non inhibition.

1.2.2. Conception d'inhibiteurs peptidiques par utilisation de scaffold

Inhibiteurs issus du tournesol (SFTI-1) et ses analogues

SFTI-1 (Sun Flower Trypsine Inhibitor 1) a été rapporté pour la première fois en 1999 comme un inhibiteur de la trypsine de bas poids moléculaire issu des graines de tournesol.¹³ Peu de temps après sa structure tridimensionnelle en complexe avec la trypsine bovine fut décrite.¹⁴ Il exerce son activité contre différentes protéases à sérine et représente actuellement l'inhibiteur peptidique naturel de la trypsine bovine le plus puissant ($K_i = 0,1$ nM).

La chaîne peptidique de SFTI-1 est formée par 14 acides aminés formant deux brins β antiparallèles connectés à leurs extrémités, résultant en un peptide cyclique. Un pont disulfure entre les cystéines Cys³ et Cys¹¹ divise le peptide en deux boucles : la boucle de liaison à l'enzyme contenant le site réactif formant un coude β centré sur Lys5-Ser6 et une boucle secondaire située à l'opposé. La séquence contient trois résidus Pro dont la Pro8 qui induit une conformation *cis* autour de la liaison peptidique avec le résidu Ile7 situé en N-ter, résultant en une structuration en épingle à cheveux β stabilisée par un réseau de liaisons hydrogènes intramoléculaires entre les CO des résidus Arg2 et Ile10 et les NH Phe12 et Thr14 respectivement.^{15,16} (Figure 2A). Cette structuration permet de présenter le pharmacophore situé dans la boucle dans une orientation permettant l'interaction avec le site catalytique de l'enzyme. Les résidus impliqués dans ce pharmacophore sont inclus dans le segment peptidique Arg2-Ile7 (positions P4 à P2'), la contribution la plus importante à cette reconnaissance est le résidu Lys5 (P1) dont la chaîne latérale se projette dans la poche S1 de l'enzyme établissant

des contacts spécifiques (directes ou à travers des molécules d'eau) avec les résidus Asp189, Ser190 et Gly219 de l'enzyme. Des contacts spécifiques additionnels entre Cys3/Gly216, Thr4/Gln192 et Ser214, Ile7/Phe41 et Tyr151 viennent stabiliser le complexe, (Figure 2B).

La boucle secondaire quant à elle participe très peu à la liaison avec la trypsine mais permet d'augmenter l'efficacité de l'interaction en stabilisant la structure de SFTI-1 dans sa globalité.¹⁵

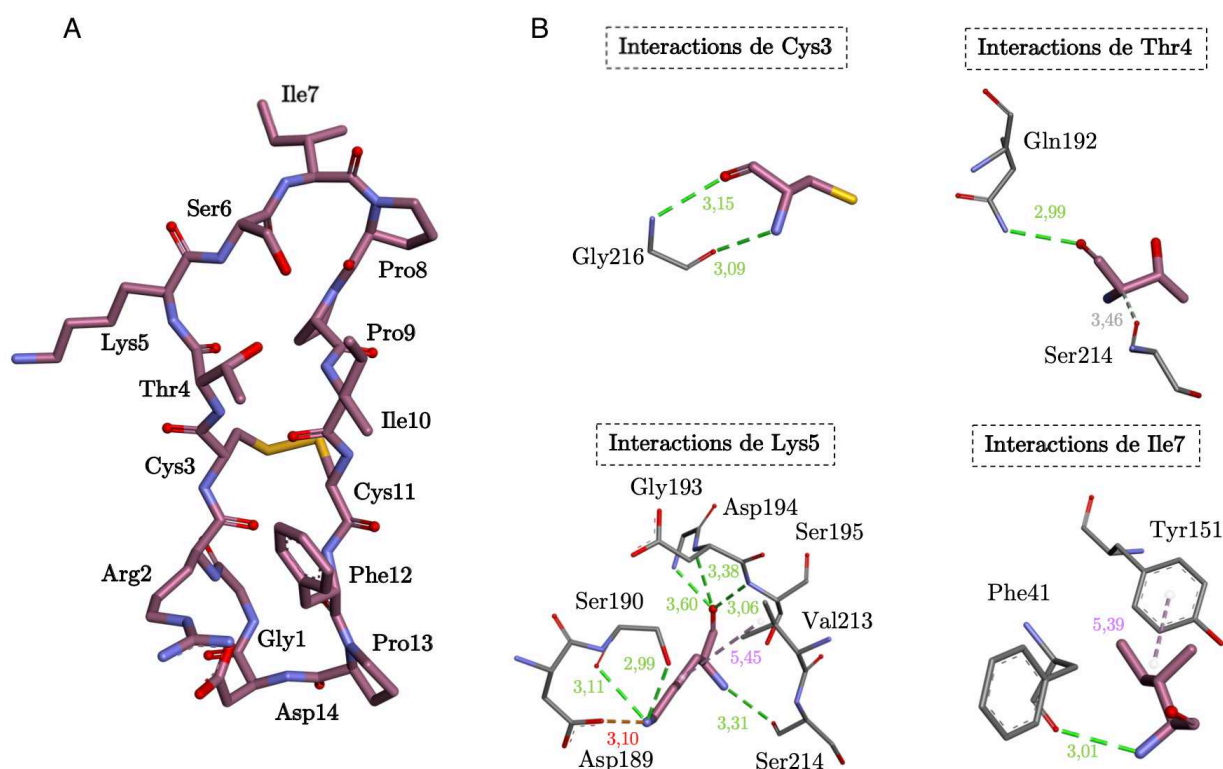


Figure 2 - Structure de SFTI-1 et interactions cruciales avec la trypsine.

A (PDB : 1SFI) : structure de SFTI-1. B (PDB : 1SFI) : interactions entre les résidus de SFTI-1 (en rose) et la trypsine (en gris). Les liaisons hydrogènes sont colorées en verts, les interactions hydrophobes en rose, les interactions électrostatiques en rouge, et les liaisons hydrogènes incluant un atome de carbone en gris.

De nombreux groupes se sont intéressés à l'exploitation de ce peptide comme scaffold pour le développement d'inhibiteurs pour les autres enzymes de la même famille. Ces études ont permis d'identifier les résidus Pro⁸ et Asp¹⁴ comme cruciaux pour la rigidité de la structure, l'un étant impliqué dans la liaison *cys* Ile⁷-Pro⁸, l'autre dans la stabilisation de la boucle secondaire.¹⁷ Les autres résidus peuvent en revanche être mutés sans affecter significativement la structure de l'inhibiteur (Figure 3).

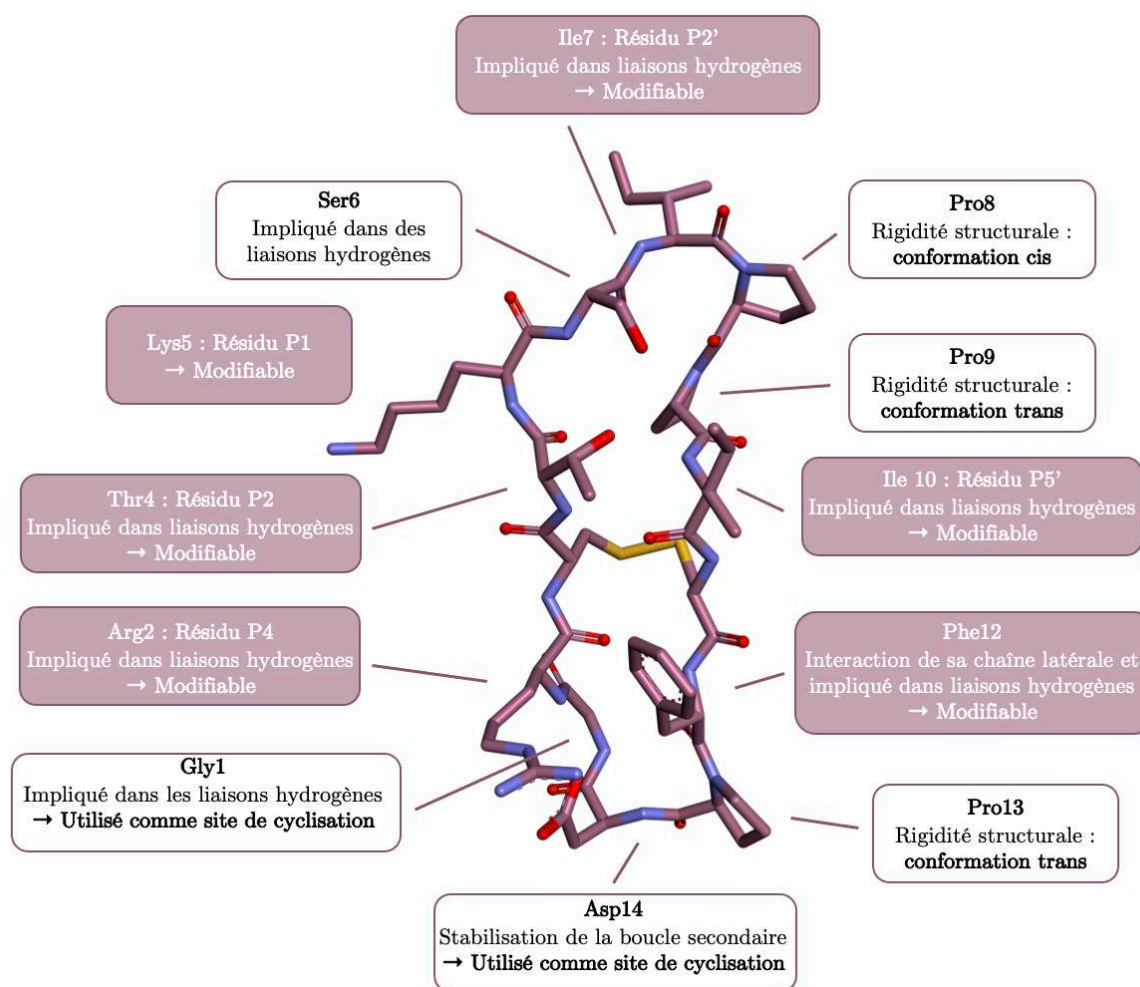


Figure 3 - Rôle des résidus de SFTI-1.¹⁸

Résidus encadrés : résidus structuraux sont modifiables et Ser, résidu P1' impliqué dans la reconnaissance de nombreuses protéases à sérine. Résidus colorés : résidus pouvant être muté pour diriger l'inhibition vers différentes protéases.

La mutation des autres résidus peut permettre de modifier la spécificité du ligand et de rediriger l'inhibition de SFTI-1 vers d'autres protéases. Elles peuvent être choisies de manière rationnelle et consiste à introduire une mutation ciblée dans la chaîne peptidique en fonction de la protéase choisie. Typiquement, la mutation de Lys⁵ par les résidus Phe ou Val, permet d'accéder à une spécificité chymotrypsique et d'obtenir des inhibiteurs puissants de la chymotrypsine ou de l'élastase respectivement.^{19,20} L'introduction de Arg en position 10 conduit à un inhibiteur de la matriptase, protéase impliquée dans de nombreux cancers.²¹ De la même manière, plusieurs points de mutation ont été introduit dans SFTI-1 menant par exemple à des inhibiteurs de la matriptase,²² et de la cathepsine G, impliquée dans l'inflammation chronique.²³ Cette stratégie a également été exploitée pour concevoir des inhibiteurs de la famille des kallikréines (KLK)²⁴, par exemple la kallirein-5 dérégulée dans les maladie de peau,²⁵ et plus récemment, grâce à la

nature des résidus P1-P4 identifiés comme préférentiels par la plasmine et la chymase, des inhibiteurs sélectifs de celle-ci ont été développés.^{26,27} En revanche, ces stratégies nécessitent des données sur la spécificités de substrats de chaque protéase ciblée afin de sélectionner les résidus introduits.

Par ailleurs, d'autres approches ont également été utilisées et consistent alors à générer des bibliothèques de peptides basés sur SFTI-1 et sur lesquels une ou plusieurs positions sont modifiées de manière aléatoire.^{28,29} Par exemple, Tian *et al*, mutent itérativement les positions P2, P2' et P4 obtiennent de potentiels inhibiteurs de la protéinase 3.³⁰ L'utilisation de criblages virtuels par des simulations de dynamique moléculaire est également décrite.¹⁸

Tableau 3 - Exemple de peptides inhibiteurs de protéase à sérine, analogues de SFTI-1 : séquences et constantes d'inhibition K_i .¹⁸

| Protéase inhibée | Séquence | Ki (nM) | Référence |
|-----------------------|---|---------|-----------|
| Trypsine | GRCTKSIPPICFPD (SFTI) | 0,1 | 10 |
| Chymotrypsin | GRCT F SIPPICFPD | 0,5 | 14 |
| Elastase leucocytaire | GRCT V SIPPICFPD | 71 | 15 |
| Matriptase | K RCTKSIPP R CHPD | 4 | 17 |
| KLK5 | GRCT R SIPP H CWPD | 51 | 18 |
| KLK7 | G K L F S N PPICFP N | 0,2 | 22 |
| Protéinase 3 | G Bip C YNva S YPPIC NPN | 6 | 21 |
| Chymase | GRC Q F S E PP E CFPD | 1,8 | 23 |
| Plasmine | GRC Y K S K PPICFPD | 0,05 | 24 |

Les résidus modifiés sont en gras. Abréviations : Bip : 4,4'-bisphenyl-L-alanine, 4F : phénylalanine substituée en position 4, Nva : norvaline.

Une des limites à l'utilisation de ce peptide comme agent thérapeutique est lié à la présence du pont disulfure peu stable *in vivo*, or la présence de celui-ci est cruciale à la structuration et à l'activité du peptide. C'est pourquoi différents analogues pour lesquels le lien disulfure est remplacé par d'autres agrafes, incluant le lien lactame,³¹ diselenide et dicarba³² ou encore triazole³³ ont été développés. De plus des contraintes conformationnelles locales permettant d'augmenter la stabilité conformationnelle du peptide et sa résistance protéolytique ont été introduites. Par exemple l'utilisation d'un triazole pour bloquer une conformation *cis* autour de la liaison amide entre les résidus Ile7-Pro8,³⁴ l'utilisation de glycine N-substituée aussi appelé peptoïdes³⁵ ou l'utilisation de motifs inducteurs du coude β .^{36,37}

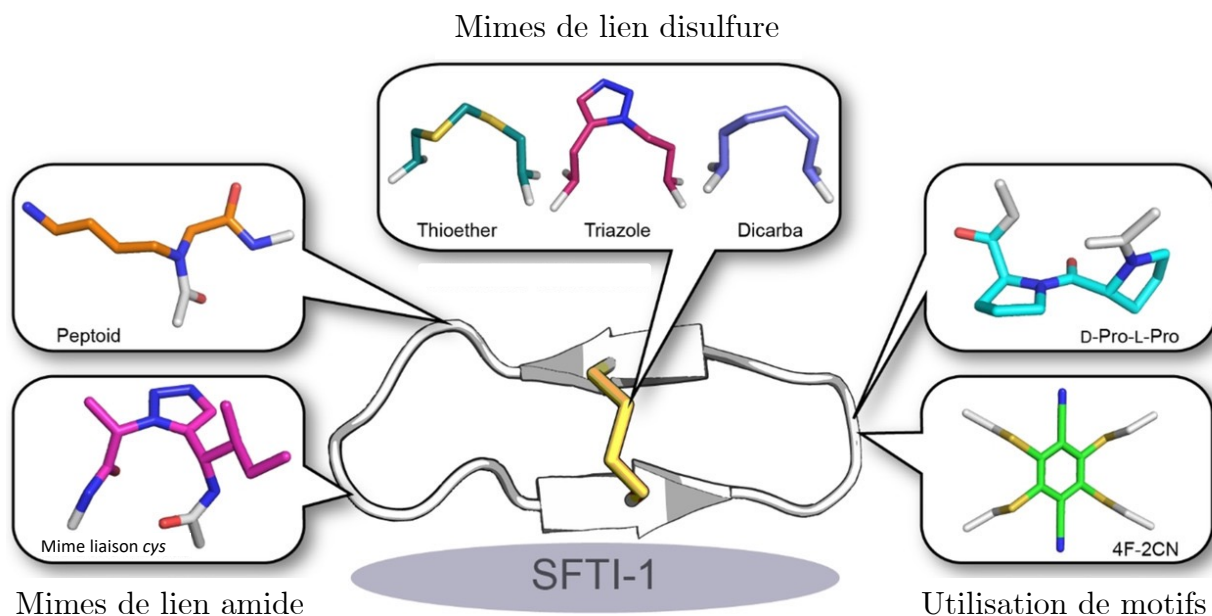


Figure 4 - Agrafes et contraintes conformationnelles locales introduites pour stabiliser SFTI-1.¹⁸

Les cyclotides

Les cyclotides sont une famille de mini protéines naturelles d'environ 30 acides aminés, issues de plantes, possédant un squelette cyclique et un arrangement noué de 3 ponts disulfure selon le motif « cystine knot ».³⁸

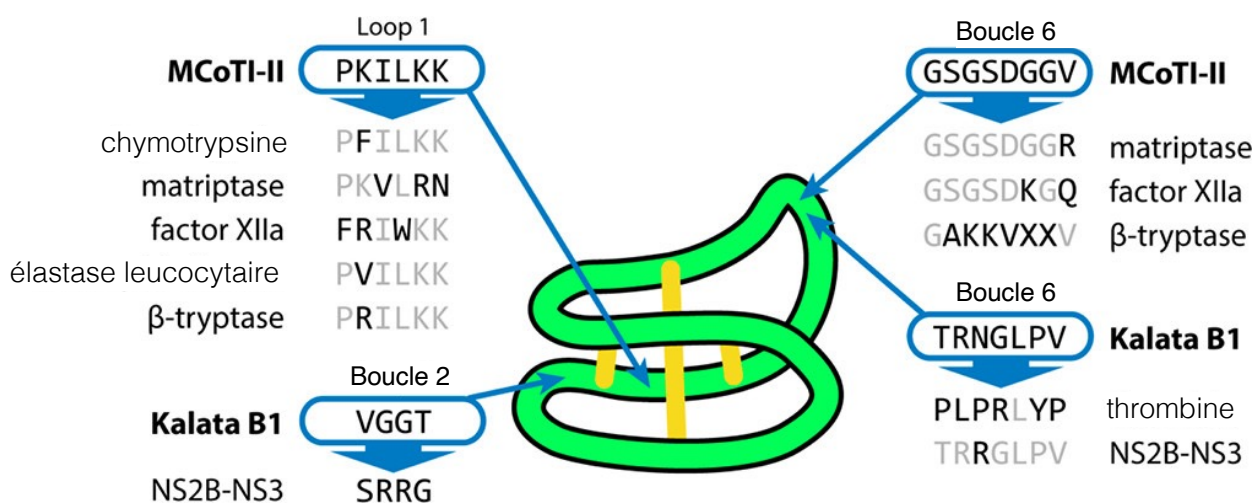


Figure 5 - Scaffolds cyclotides optimisés pour l'inhibition de différentes protéases.³⁸

Du fait de leur très grande stabilité conformationnelle et leur résistance à la protéolyse, ils représentent un *scaffold* intéressant pour le design de peptide bioactifs et en particulier d'inhibiteurs de protéase (Figure 5). Le greffage des chaînes latérales responsables de la reconnaissance de différentes protéases à sérine sur deux cyclotides, MCoTI-II et Kalata B1, a ainsi été décrit et conduit au développement d'inhibiteurs sélectifs du factor XIIa,³⁹ de la matriptase,²¹ de la β -tryptase et de l'élastase leucocytaire.⁴⁰ De plus des versions acycliques ont été développées et permis l'expression de bibliothèques de peptides à la surface de bactéries et de levures (technologie du *bacterial-* et *yeast-display*). Le criblage aléatoire haut débit de ces bibliothèques randomisées a permis l'identification l'inhibiteurs de la thrombine⁴¹ et de la matripase.⁴²

1.2.3. Conception d'inhibiteurs peptidiques par criblage aléatoire haut débit

Des inhibiteurs de protéase ont également été identifiés par des campagnes de criblage aléatoire à haut débit. Par exemple le groupe d'Andreasen, a utilisé le phage *display* pour la préparation de petits peptides cycliques de 10 résidus possédant un pont disulfure intrinsèque. Le criblage de cette bibliothèque vis à vis de la plasmine uPA (pour *urokinase-type plasminogen activateur*) chez la souris a conduit à l'identification du peptide mupain-1, un inhibiteur compétitif sélectif de la plasmine avec un K_i de 400 nM.⁴³ Ce peptide a ensuite été utilisé comme *scaffold* pour le rediriger vers une autre protéase, la kallikréine plasmatique humaine (hPK pour *human plasma kallikréin*). En se basant sur des études structurales des poches S3', S3 et S2 ils génèrent une petite chimiothèque en mutant 5 résidus de mupain-1 et identifient ainsi un peptide cyclique inhibiteur sélectif de hPK ($K_i = 14$ nM). En revanche, ce peptide conserve une affinité modérée pour d'autres enzymes telles que la KLK1 (K_i de 0,833 nM), FXIa (K_i de 6,63 μ M) et la plasmine (K_i 9,8 μ M). Ils proposent d'utiliser murpain-1 comme *scaffold* pour l'inhibition d'autres protéases, ses résidus 4 à 9 formant un contact direct avec l'enzyme, les autres étant principalement exposés au solvant.⁴⁴

1.3. Conclusion

En dépit des grandes avancées scientifiques ces dernières années, le nombre d'inhibiteurs développés de protéases à sérine reste très faible. Ces enzymes ayant des structures particulièrement proches, un manque de sélectivité est régulièrement observé.^{11,45} Les

inhibiteurs peptidiques les plus performants sont des peptides cycliques, le plus souvent obtenus à partir de *scaffold*, tel que SFTI-1 ou les cyclotides MCoTI-II et kalabata, sur lequel les éléments de reconnaissance de chacune des protéases à sérine sont greffés pour obtenir des ligands sélectifs. Les peptides correspondants sont préparés par synthèse chimique en parallèle. Pour un criblage plus large, des versions acycliques compatibles avec les techniques « display » sont utilisées pour l'identification de nouvelles séquences sélectives, qui sont ensuite transposées dans les séquences cycliques plus affines. Le développement d'une voie d'accès directe à des bibliothèques plus larges de peptides cycliques basées sur ces *scaffold* permettrait d'accéder plus rapidement et efficacement à des ligands sélectifs de chacune des enzymes. Par ailleurs les peptides en question présentent tous un inconvénient majeur qui limite leur développement en tant qu'agent thérapeutique, lié à la présence d'un ou plusieurs ponts disulfures peu stable *in vivo*, et qui représente un prérequis à la structuration et à l'activité des peptides. C'est pourquoi différents analogues pour lesquels le pont disulfure est remplacé par des liens plus robustes ont été développés. Néanmoins l'utilisation de ces nouveaux *scaffolds* nécessite de pouvoir accéder facilement à des bibliothèques, cela reste difficile et requiert un travail de synthèse chimique considérable.

L'objectif de ce travail est d'utiliser la stratégie de chimie combinatoire dynamique développée au LBM pour la préparation de bibliothèques de peptides qui permettraient l'identification de nouveaux inhibiteurs peptidiques cycliques de protéase à sérine.^{11,46} Pour permettre cela une collaboration entre le LBM et le groupe du Professeur Chahrazade El Amri (Institut de Biologie Paris Seine, SU), spécialiste de ces protéases à sérine et de leurs implications dans les phénomènes de l'inflammation a vu le jour et c'est dans ce contexte qu'un financement a été obtenu pour la réalisation de cette thèse.

2. Scaffold pour la conception de bibliothèques ciblant les protéases à sérine

Pour la conception de bibliothèques dynamiques de peptides comme inhibiteurs potentiels de protéases à sérine, nous avons choisi de baser notre *design* sur la structure générale du SFTI-1, et plus particulièrement sur une version plus stable conformationnellement et métaboliquement, exempt de pont disulfure. Dans un premier temps, en s'inspirant de la littérature un *scaffold* général qui pourrait permettre de cibler un grand nombre de protéases

a été conçu. Afin de valider ce *design*, les éléments de reconnaissance de la plasmine y ont été greffées, aidés par des études de modélisation moléculaire. La séquence ainsi obtenue a été préparée et testée vis à vis de la plasmine. Ce peptide a servi de modèle pour la mise au point de l'étape d'amplification dans la stratégie de chimie combinatoire dynamique. Des scaffolds portant une, 3 ou 4 cystéines pouvant réagir dans les processus réversibles ont été préparés et les premières études de DCC réalisées seront présentées.

2.1. Conception d'un scaffold général pour le ciblage de protéases à sérine

Le groupe de Robinson a développé des analogues de SFTI-1 dans lesquels un motif ^DPro-^LPro inducteur de coude β est incorporé dans la boucle opposée à celle du pharmacophore, afin de stabiliser la structure en β -hairpin, tout en maintenant l'activité inhibitrice.⁴⁷ Les peptides A et B comportant respectivement 11 et 7 résidus incluant pour le premier la séquence Arg1-Phe11 de SFTI-1 et pour le second la séquence Thr3-Ile7, ainsi que le motif ^DPro-^LPro ont été préparés. La structure en β hairpin de ces peptides a été confirmée par des études RMN. Leur activité inhibitrice vis-à-vis de la trypsine est maintenue avec des K_i de 103 et 11 nM respectivement pour A et B. La sélectivité vis-à-vis de la trypsine *vs.* chymotrypsine a également été vérifiée. Le remplacement du résidu Lys en position P1 par un résidu aromatique permet de rediriger l'inhibition vers la chymotrypsine, ils démontrent ainsi l'intérêt de leur stratégie pour la conception d'inhibiteurs sélectifs de protéase à sérine. L'utilisation de ce *scaffold* pour le développement d'inhibiteurs pour d'autres protéases à sérine n'a cependant jamais été décrite (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

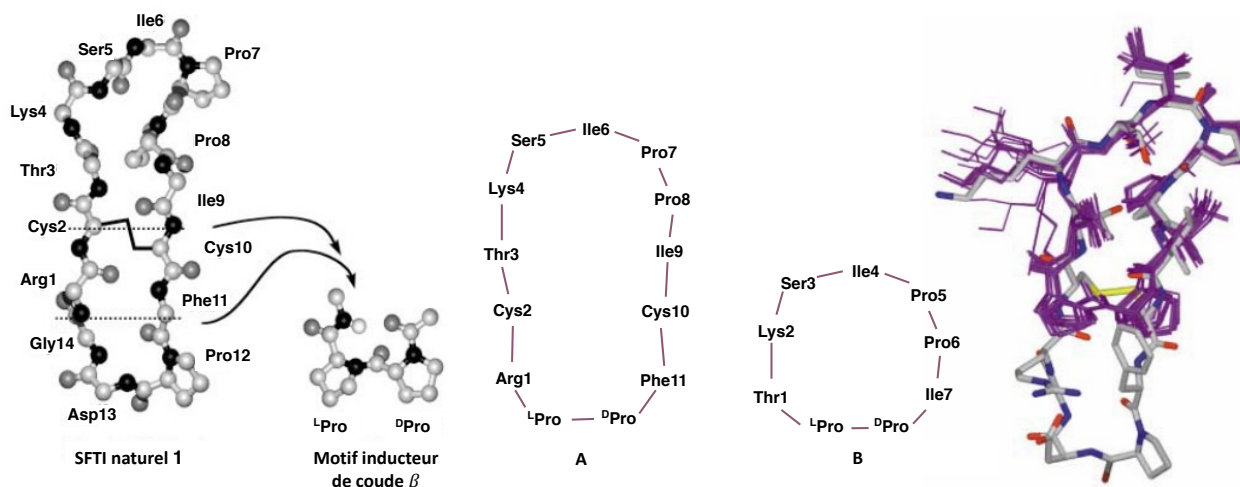


Figure 6 - Peptides développés par le groupe de Robinson.⁴⁷

De gauche à droite : structure de SFTI-1 et motif ^DPro-^LPro introduit, structure du peptidomime à 11 résidus, structure du peptidomime à 11 résidus, superposition des structures du peptide à 7 résidus obtenues par RMN (en violet) avec SFTI-1 (en gris)

Tableau 4 - Exemples de peptides synthétisés et leur constante d'inhibition.⁴⁷

| Séquences | K _i Trypsine (nM) | K _i Chymotrypsine (nM) |
|----------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| GRCTKIPPICFPD (SFTI) | 13 ± 5 | 2 300 ± 100 |
| RCTKSIPPICF | 11 ± 3 | 6 600 ± 240 |
| TKSIPPI | 103 ± 7 | > 100 000 |
| TWSIPPI | > 25 000 | 1 400 ± 150 |

Nous avons choisi d'utiliser ces peptides pour la conception de deux nouveaux *scaffolds* **Xa** et **Xb** basés respectivement sur les séquences des peptides A et B (Figure 7).

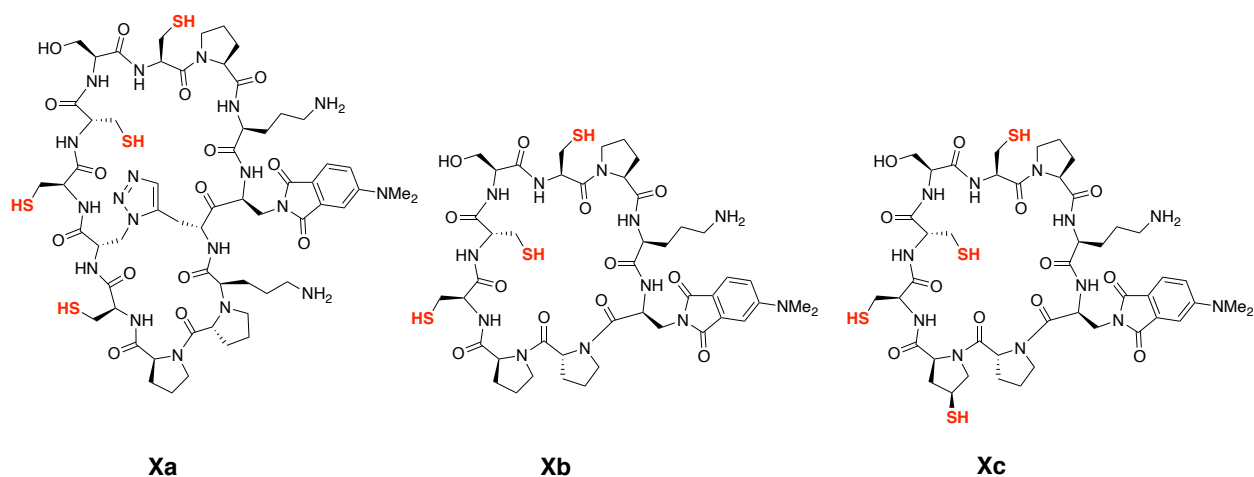


Figure 7 - Structure des *scaffolds* **Xa**, **Xb** et **Xc**.

Dans les deux cas les résidus impliqués dans la stabilité conformationnelle sont maintenus, à savoir le motif le ^DPro-^LPro inducteur de coude β ainsi que la Pro8 permettant d'induire une géométrie *cis* autour de la liaison amide situé du côté *N*-terminal. Dans le cas du peptide **Xa**, le lien disulfure, incompatible avec notre stratégie DCC, a été remplacé par un lien 1,5-triazole, inspiré des travaux récents de Craik *et al.*³³ Sur ces deux *scaffolds* plusieurs résidus cystéines sont introduits dans les positions clés impliquées dans l'interaction avec l'enzyme, les positions 1, 3, 4, et 6 pour le *scaffold* **Xa** et les positions 1, 2 et 4 pour le *scaffold* **Xb**. Les fonctions thiols de ces cystéines seront exploitées dans des réactions d'échange thiol/thioester pour la génération de bibliothèques dynamiques. Le *scaffold* **Xa** est *à priori* plus prometteur puisque de par sa taille

plus élevée, il devrait être capable d'établir d'avantage d'interactions avec la cible et conduire à de meilleures affinités et sélectivités. Cependant il requiert également des efforts synthétiques supplémentaires liés au remplacement du lien disulfure par un lien plus robuste. Afin de pallier l'absence de chaîne latérale dans la boucle opposée au pharmacophore qui pourrait établir des interactions secondaires stabilisantes avec l'enzyme, l'introduction d'une fonction thiol additionnelle sur le cycle pyrrolidinique de la proline en position 8 a également été envisagée (*scaffold Xc*). Dans tous les cas, des résidus ornithine permettant la linéarisation des séquences en vue de leur caractérisation par spectrométrie MS-MS ont été introduits (en position en position 8 et 12 pour le peptide **Xa** et en position 6 pour les peptides **Xb** et **Xc**, ainsi qu'une sonde Dap(4-DAPA) (respectivement en position 9 et 7)).

2.2. Validation du scaffold sur la plasmine

2.2.1. Design d'inhibiteur de plasmine basée sur les scaffolds Xb et Xc

Avant de s'engager dans la génération de bibliothèques dynamiques, nous avons cherché à valider ces *scaffolds* par greffage rationnel des motifs de reconnaissance d'une protéase à sérine, la plasmine, enzyme d'intérêt thérapeutique reconnu.

Le plasminogène (Plg) est une glycoprotéine plasmatique de 92 Da présente à une concentration de 2 μM dans le plasma. Il est formé d'une seule chaîne comprenant 7 domaines. Le domaine N-ter appelé Pap (pour *Pan-apple domain*) maintient le Plg pré-activé dans une conformation globulaire fermée. Les 5 domaines homologues appelés *kringle domain* (KR), larges boucles stabilisées par 3 ponts disulfures, sont responsables de la liaison du Plg aux résidus lysines et arginines de sa cible et le domaine protéase à sérine (SP) contient la triade catalytique.

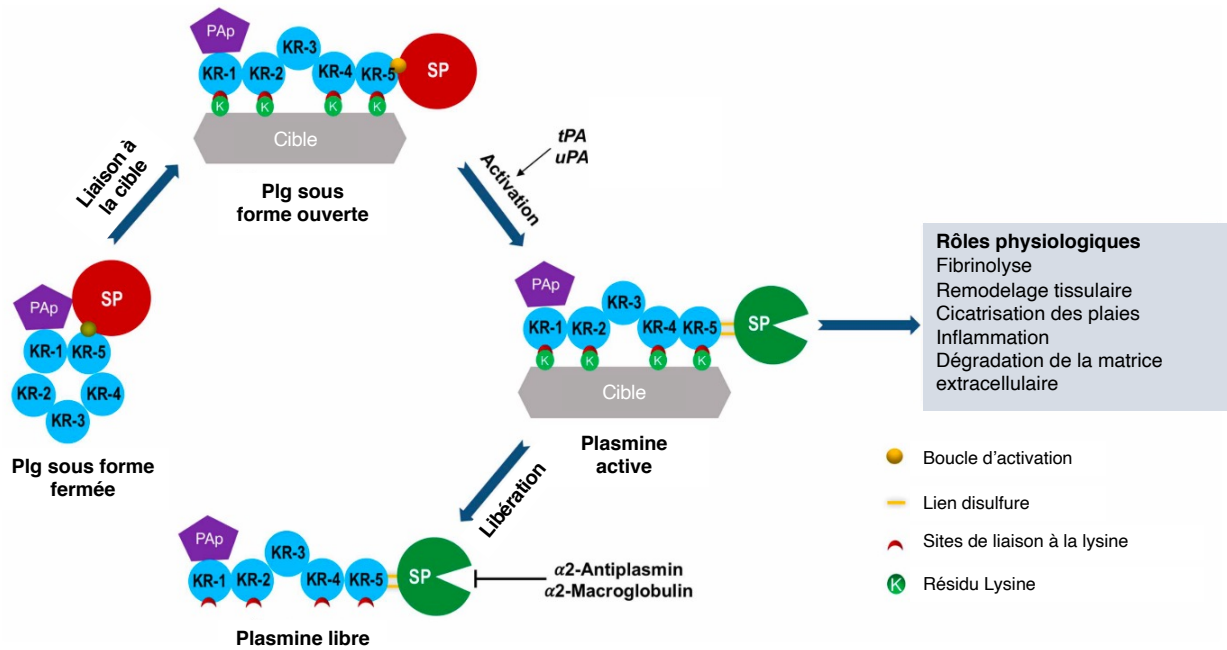


Figure 8 - Système d'activation du plasminogène.

L'activation du Plg nécessite son immobilisation à la surface de ses partenaires incluant les caillots de fibrine et les récepteurs cellulaires de surface (Figure 8). Cette immobilisation conduit à un changement conformationnel du Plg résultant en l'exposition de sa boucle d'activation située entre les domaines KR5 et SP. Cette boucle est alors clivée par les activateurs du plasminogène, le tPA (pour *tissue plasminogen activator*) et l'uPA (pour *uninary plasminogen activator*), permettant la formation d'un site catalytique fonctionnel. La plasmine ainsi activée hydrolyse une grande variété de substrat en C-ter de résidus Lys ou Arg et est régulée principalement par deux inhibiteurs physiologiques l' $\alpha 2$ antiplasmine et l' $\alpha 2$ macroglobuline.⁴⁸

Le rôle de la plasmine dans la fibrinolyse, processus physiologique permettant la dissolution de caillots sanguins composés de fibrines,⁴⁹ a été mis en lumière en 1946.⁵⁰ Il est aujourd'hui admis que cette protéase à sérine joue également un rôle majeur dans les phénomènes inflammatoires et immunitaires. En effet, une douzaine de récepteurs du plasminogène ont été décrits et sont exprimés à la surface de nombreuses cellules immunitaires.⁵¹ La plasmine générée à la surface de ces récepteurs sert de signal pour l'activation de l'inflammation et de la réponse immunitaire.⁵² Elle joue par exemple un rôle dans l'activation directe des monocytes⁵³ et indirecte des neutrophiles⁵⁴ et la migration des macrophages impliquant la production de cytokines.⁵⁵

L'utilisation de SFTI-1 comme *scaffold* pour la conception rationnelle d'inhibiteurs peptidiques puissants et sélectifs de la plasmine par greffage de ces éléments de reconnaissance a été récemment décrit par David J. Craik & al.²⁷ En partant de la séquence du SFTI-1, ils identifient pour chaque position P1, P2, P4 et P2' le résidu permettant la plus grande affinité et sélectivité pour l'enzyme. En premier lieu, ils montrent que le résidu Lys est privilégié en position P1 par comparaison avec un résidu arginine. Concernant la position P2, il semblerait qu'un résidu Tyr augmente considérablement l'affinité du peptide par établissement d'une interaction π avec His603 de la plasmine. Néanmoins, ces changements ne permettent pas d'augmenter drastiquement la sélectivité du peptide puisqu'il inhibe également entre autres l'élastase leucocytaire, la cathepsine G, et la kallikréine plasmatique avec des IC_{50} de l'ordre du micromolaire. En se basant sur une étude précédente ils montrent que l'incorporation d'une Lys en position P2' permettant de former des ponts salins avec Glu623 de la poche S2' de la plasmine favorise cette sélectivité.²⁸ Pour finir, en ce qui concerne le résidu P4, la plasmine montre une grande préférence pour une arginine, ce dernier formant une interaction π -cation avec le cycle pyrrole de Trp761 (Figure 9).⁵⁶

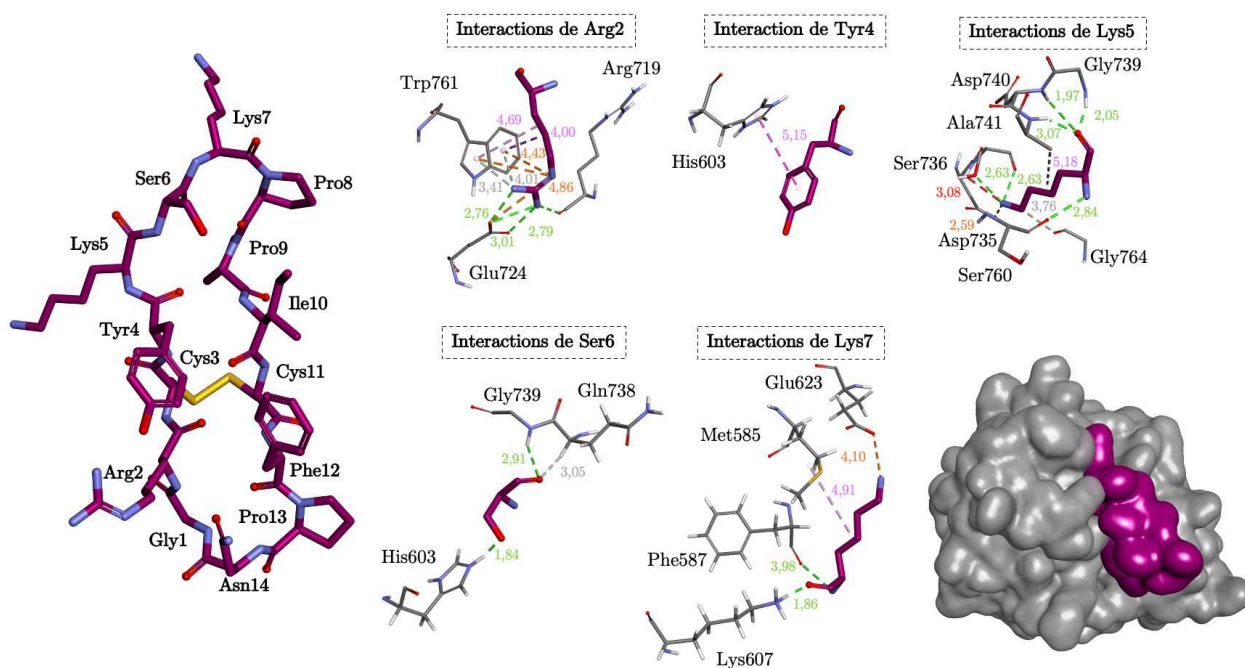


Figure 9 - Peptide développé par Craik et al. et ses interactions avec la plasmine.²⁷ De gauche à droite : structure du peptide optimisé (PDB : 6D36), interactions clés des résidus P3 à P2' du peptide (en bordeaux) avec la plasmine (en gris). En bas à droite : représentation du peptide (en bordeaux) dans la poche de la plasmine (en gris). Les liaisons hydrogènes sont colorées en verts, les interactions hydrophobes en rose, les interactions électrostatiques en rouge, les ponts salins en orange et les liaisons hydrogènes incluant un atome de carbone en gris.

Le peptide GRCYKSKPPICFPD, incluant un pont disulfure entre les chaînes latérales des deux résidus cystéine, possède une très bonne activité inhibitrice sur la plasmine avec une CI_{50} de $0,051 \pm 0,007$ nM, et une excellente sélectivité (CI_{50} de 160 ± 10 nM pour la trypsine et supérieur à 20 000 pour toutes les autres protéases à sérine). Ce peptide est donc l'inhibiteur de la plasmine le plus puissant et sélectif jamais conçu à ce jour.²⁷

En s'inspirant de ces travaux le peptide **Ya** basé sur la structure du scaffold **Xb** a été conçu, incorporant les résidus cruciaux pour l'interaction avec la plasmine à savoir un résidu Lys en position P1 et P2' et un résidu Tyr en position P2. Des études de modélisation moléculaire réalisées par le Dr Nicolas Pietrancosta au LBM ont été menées et permettent d'observer une bonne superposition du peptide **Ya** avec SFTI-1 dans la poche de la plasmine (Figure 10).

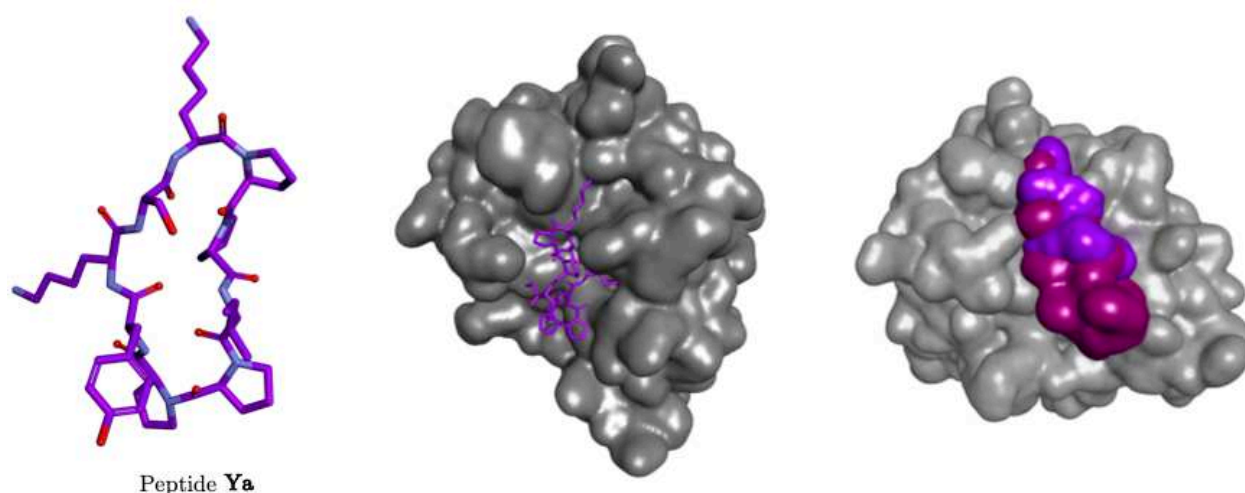


Figure 10 - Structure du peptide **Ya** et son interaction avec la plasmine.

De gauche à droite : structure du peptide **Ya**, modélisation de son interaction avec la plasmine, superposition de **Ya** et de SFTI-1 dans la poche de la plasmine.

Les interactions qu'il forme notamment via ses résidus P1, P1' et P2 sont similaires à celles formée par le peptidomimétiques de Craik et al. (Figure 11 et Tableau 5). De plus, le résidu Pro2 impliqué dans le motif $^D\text{Pro}-^L\text{Pro}$ participerait également à l'interaction en formant notamment des liaisons hydrophobes avec Leu763 et hydrogènes avec Trp761 et Gly762.

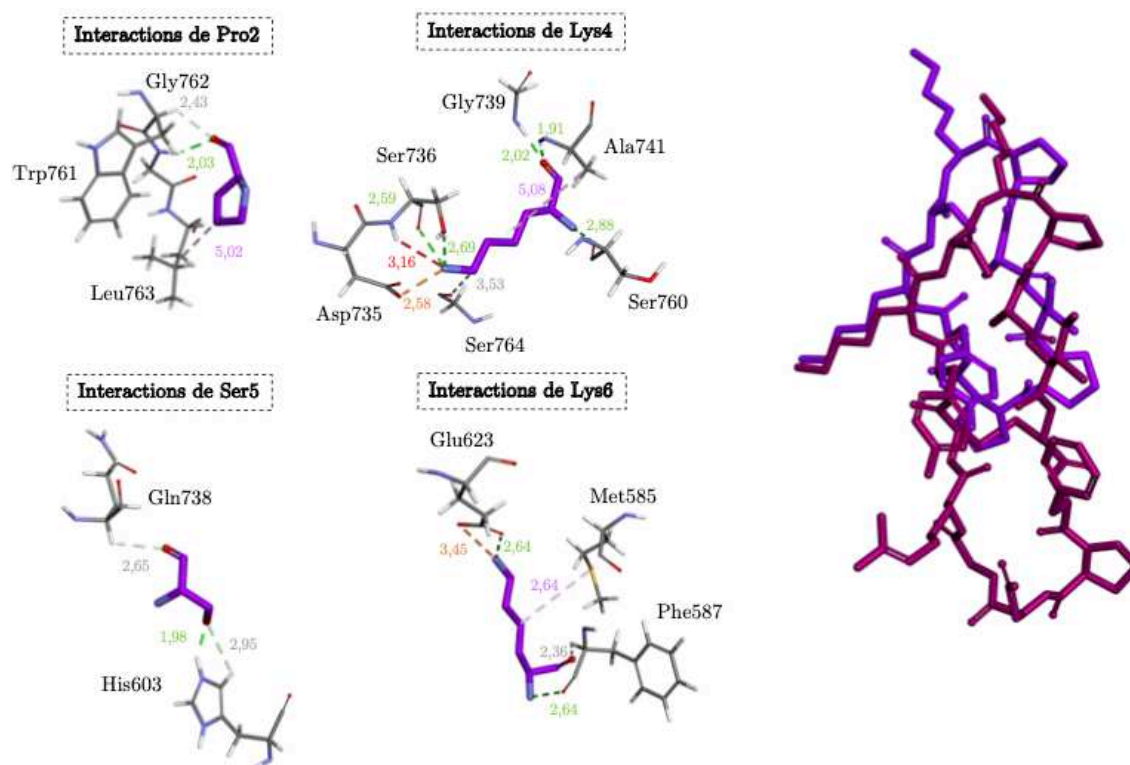


Figure 11 - Interactions des résidus de **Ya** avec la plasmine et superposition avec SFTI-1. Les liaisons hydrogènes sont colorées en verts, les interactions hydrophobes en rose, les interactions électrostatiques en rouge, les ponts salins en orange et les liaisons hydrogènes incluant un atome de carbone en gris.

Tableau 5 - Tableau résumant les interactions entre P1, P1' et P2' s'établissant entre SFTI-1 et le peptidomimétique de Craik *et al.* ou entre SFTI-1 et le peptide développé lors de cette étude.

| Interactions peptidomimé SFTI-plasmine | | Interactions peptide développé-plasmine | |
|--|--|---|---|
| Résidus SFTI muté | Résidus plasmine | Résidus peptide développé | Résidus plasmine |
| Lys5 | Gly739, Asp740, Ala741 Ser736, Asp735, Ser760, Gly764 | Lys4 | Gly739, Ala741, Ser736, Asp735, Ser764, Ser760 |
| Ser6 | Gly739, Gln738, His603 | Ser5 | Gln738, His603 |
| Lys7 | Glu623, Met585, Phe587, Lys607 | Lys6 | Glu623, Met585, Phe587 |

En revanche, dû à la taille réduite du peptide, les interactions stabilisantes du résidu Arg en position P4 avec l'enzyme ne peuvent être établies dans ce peptide. Elles pourraient néanmoins être restaurées par introduction d'une chaîne latérale sur le cycle pyrrolidine de la Pro⁸. Pour le vérifier, de nouvelles études de modélisation ont été effectuées, à partir du *scaffold Ya* incluant une fonction thiol additionnel en position 4 de la proline. L'influence de la présence

d'un groupement acyle portant la chaîne latérale de l'arginine sur l'interaction du peptide avec l'enzyme a été étudiée. Les deux stéréoisomères obtenus à partir de la (S) 4-mercaptoproline (peptide **Yb**) et la (R) 4-mercaptoproline (peptide **Yc**) ont été évalués.

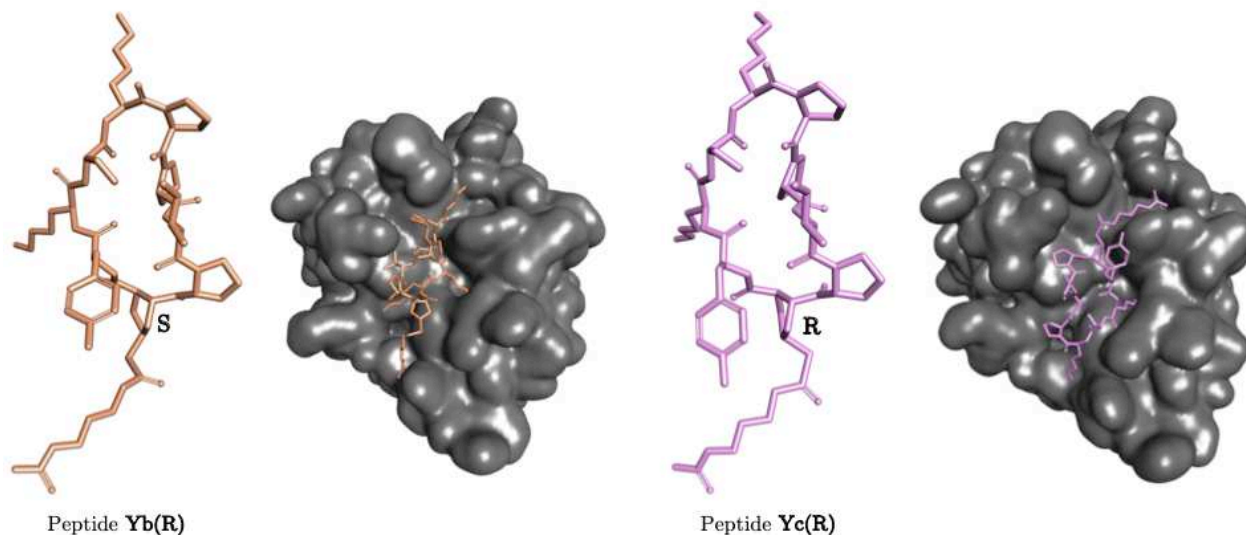


Figure 12 - Structure et insertion dans la poche de la plasmine des peptides **Yb(R)** et **Yc(R)**.

Le peptide **Yb(R)** s'insère dans la plasmine avec la même orientation que le peptide **Ya** contrairement au peptide **Yc(R)** qui est orienté à l'opposé (Figure 12). La superposition du peptide **Yb** avec SFTI-1 indique que la chaîne latérale Arg issu de la fonctionnalisation du peptide se projette dans la même direction que celle de Arg2. De plus, de nombreuses interactions s'établissent entre la plasmine et **Yb(R)**, combinant les interactions s'effectuant avec le cycle pyrrolidine et la chaîne latérale de Arg (Figure 13).

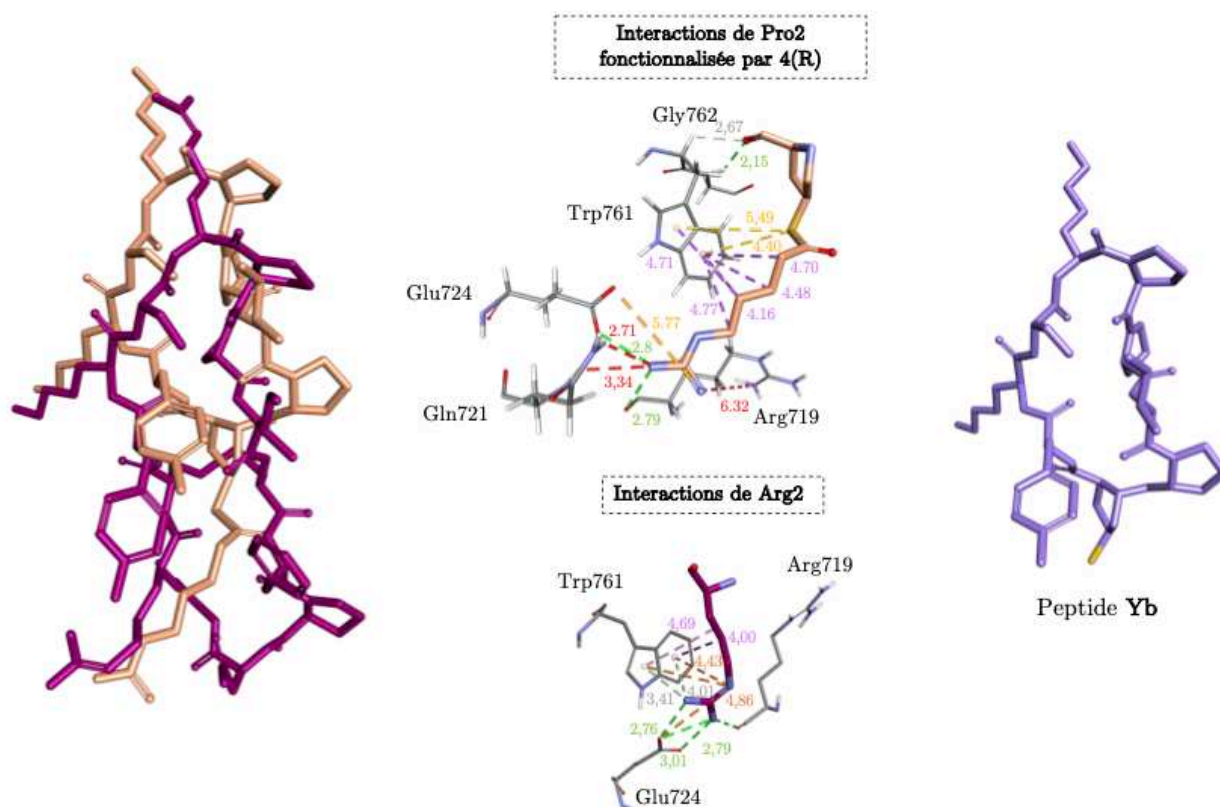


Figure 13 - Comparaison des structures et interactions de **Yb(R)** ou SFTI avec la plasmine et structure de **Yb**.

De gauche à droite : superposition de **Yb(R)** et SFTI-1, comparaison des interactions entre Pro2 fonctionnalisée par **4(R)** et la plasmine et Arg2 et la plasmine, structure du peptide **Yb**.

Les liaisons hydrogènes sont colorées en verts, les interactions hydrophobes en rose, les interactions électrostatiques en rouge, les ponts salins en orange et les liaisons hydrogènes incluant un atome de carbone en gris.

2.2.2. Synthèse des peptides

Les peptides **Ya** et **Yb** ont été synthétisés suivant la même stratégie que celle décrite dans le Chapitre I (Schéma 2). Afin d'éviter les problèmes d'épimérisation qui pourraient survenir lors de la cyclisation après activation de la fonction acide *C*-terminale, nous avons choisi d'effectuer cette cyclisation entre les deux prolines ^DPro7 et ^LPro8. Après greffage du résidu ^DPro sur une résine chlorure de 2-chlorotrityle, les séquences linéaires ont été obtenues par stratégie Fmoc/*t*Bu. Pour le peptide **Yb**, le résidu Fmoc-L-Pro(4-STrt)-OH (2S,4S) commercial a été introduit en *N*-ter. Après traitement au HFIPA, la cyclisation tête à queue des peptides linéaires est réalisée. Les chaînes latérales sont déprotégées par un mélange contenant du TFA et différents *scavengers* (TIS, H₂O et EDT) puis les peptides sont purifiés par HPLC préparative.

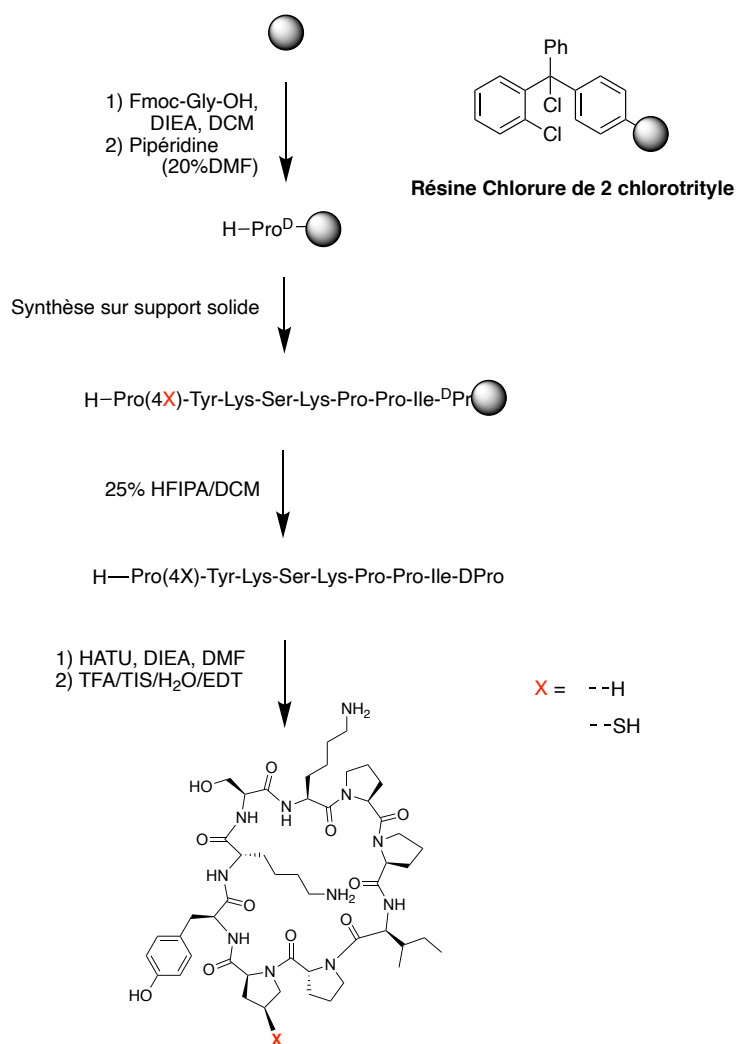


Schéma 2 - Schéma de synthèse des peptides **Ya** et **Yb**.

2.2.3. Étude du potentiel inhibiteur des peptides

L'activité enzymatique est caractérisée par les valeurs de vitesses initiales V_i (exprimées en exprimée en RFU.min⁻¹) définies par l'équation de Michaelis-Menten :

$$V_i = V_{max} \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Où :

- V_{max} = vitesse obtenue lorsque l'enzyme est saturée en substrat.
- $[S]$ = concentration en substrat, dans le cas de la plasmine il s'agit de Boc-QAR-AMC.
- K_m = la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est à la moitié de la vitesse initiale maximale.

Expérimentalement, la V_i est obtenue par le tracé en fonction du temps de l'intensité de fluorescence (exprimée en unité arbitraire RFU) du groupement 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC), libérée suite à l'hydrolyse du substrat par l'enzyme.

Préalablement à l'étude du potentiel inhibiteur des peptides peptide **Ya** et **Yb**, l'activité de la plasmine est contrôlée dans son tampon d'activité usuel et dans le tampon utilisé pour les réactions de transthoestérification en DCC (Tableau 6).

Tableau 6 - Activité de la plasmine dans les différents tampons utilisés.

| Nom | Composition | V_i (RFU.min⁻¹) |
|----------------------|--|--|
| Tampon classique | KH ₂ PO ₄ 10 mM, Na ₃ PO ₄ 70 mM, Lysine 100 mM, Brij-35 0,05% pH 7,5 | 114,1 |
| Tampon DCC | KH ₂ PO ₄ 60mM, Na ₂ HPO ₄ 40 mM, TCEP 10 mM, TWEEN-20 1% | 6,1 |
| Tampon DCC sans TCEP | KH ₂ PO ₄ 60mM, Na ₂ HPO ₄ 40 mM, TWEEN-20 1% | 161 |

D'après les résultats obtenus, la plasmine ne conserve pas son activité dans le tampon DCC contenant du TCEP, réduisant les ponts disulfures intrinsèques responsable de la structuration des domaines KR de la plasmine. Les expériences en présence d'enzyme ont donc été conduites en absence de TCEP.

Après incubation de la plasmine en présence des peptides **Ya** et **Yb** à différentes concentrations dans le tampon de DCC sans TCEP, les pourcentages d'inhibition peuvent être calculés :

$$\% inhibition = \left(1 - \left(\frac{V_0}{V_i} \right) \right) * 100$$

Où V_0 est considéré comme 100% de l'activité enzymatique.

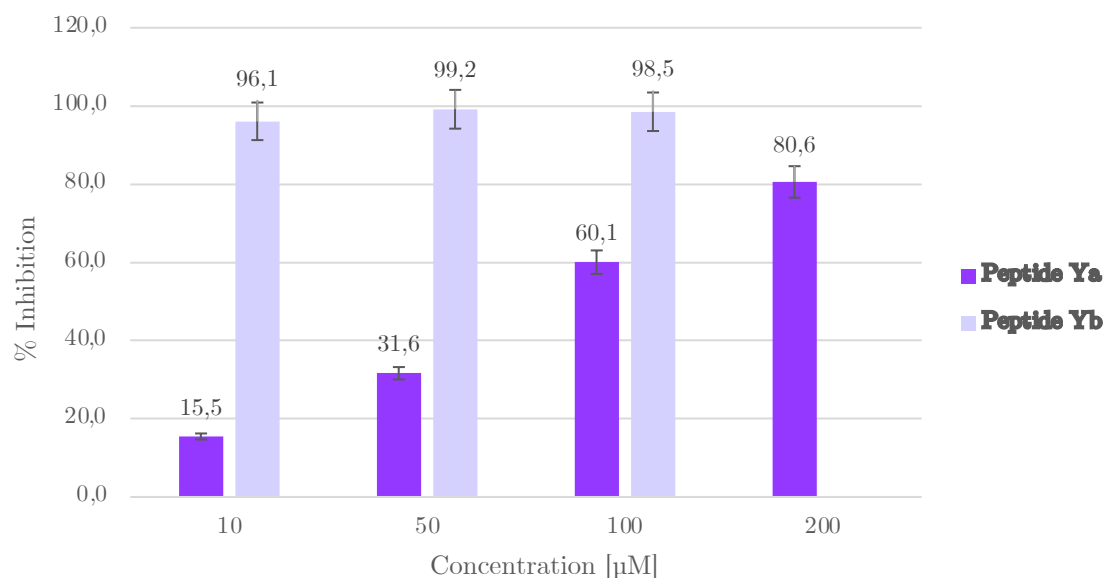


Figure 14 - Évaluation du % d'inhibition des peptides **Ya** et **Yb** après criblage contre la plasmine.

Chaque peptide est pré-incubé pendant 15min à 37°C avec la plasmine (6,6 nM) dans le tampon DCC sans TCEP. La réaction est déclenchée par ajout de substrat Boc-QAR-AMC [100 µM] fluorogène. Un contrôle négatif servant de référence pour le calcul des pourcentages a été utilisé. Chaque expérience a été réalisée en duplicata.

Le critère de sélection retenu dans nos conditions correspond à une inhibition d'au moins 50% de la plasmine pour une concentration en peptide de 100 µM. Les peptides **Ya** et **Yb** sont donc considérés comme inhibiteurs de la plasmine (Figure 14).

L'activité réduite du peptide **Ya** par rapport à celle du peptide **Yb** pourrait être liée à la présence de la cystéine libre de **Yb**, capable de former un lien disulfure avec les résidus cystéines de la plasmine expliquant les pourcentages élevés d'inhibition obtenus. Une autre explication pourrait être liée à la présence d'une impureté dans le peptide **Ya**. En effet, bien que les données analytiques obtenues pour ce peptide (analyse HPLC et MS) ne soient pas en faveur de cette hypothèse, l'absorbance de ce peptide à 280 nm bien plus importante que celle attendue pour cette structure. Afin de vérifier cette hypothèse la resynthèse du composé dans des conditions différentes est en cours de réalisation.

La quantification du pouvoir inhibiteur de **Ya** a été réalisée par la détermination de son IC₅₀. Cette dernière définit la concentration en composé menant à une diminution de 50% de l'activité de l'enzyme étudiée. La plasmine est alors pré-incubée avec des concentrations

croissantes de **Ya** pendant 15min et le pourcentage d'inhibition obtenu pour chaque concentration permet de déterminer un IC_{50} approximatif de 49 μM par le tracé de la courbe $f([\mathbf{Ya}]) = \% \text{ inhibition}$ (Figure 15).

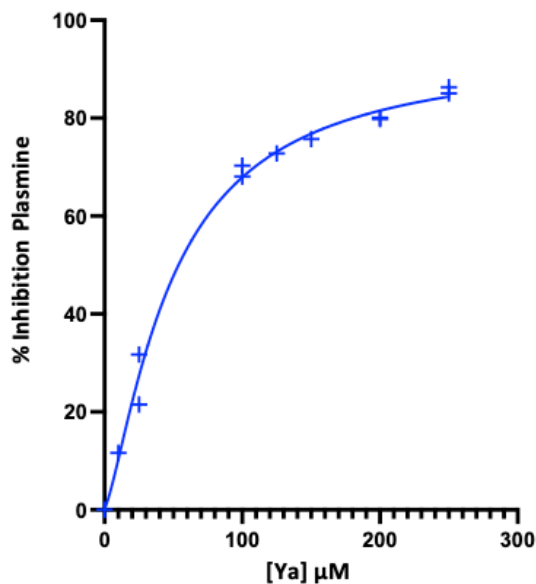


Figure 15 - Quantification du pouvoir inhibiteur de **Ya** vis-à-vis de la plasmine.

Le peptide **Ya**, à différentes concentrations, est pré-incubé pendant 15min à 37°C avec la plasmine (6,6 nM) dans le tampon DCC sans TCEP. La réaction est déclenchée par ajout de substrat Boc-QAR-AMC [100 μM] fluorogène. Un contrôle négatif servant de référence pour le calcul des pourcentages a été utilisé. L'expérience a été réalisée en duplicata.

Après avoir vérifié que l'activité de chaque enzyme est conservée dans le tampon de DCC sans TCEP, le profil de sélectivité de **Ya** a été initiée sur différentes protéases à sérine concurrentes, impliquées à différents niveaux dans les processus inflammatoires (Figure 16).

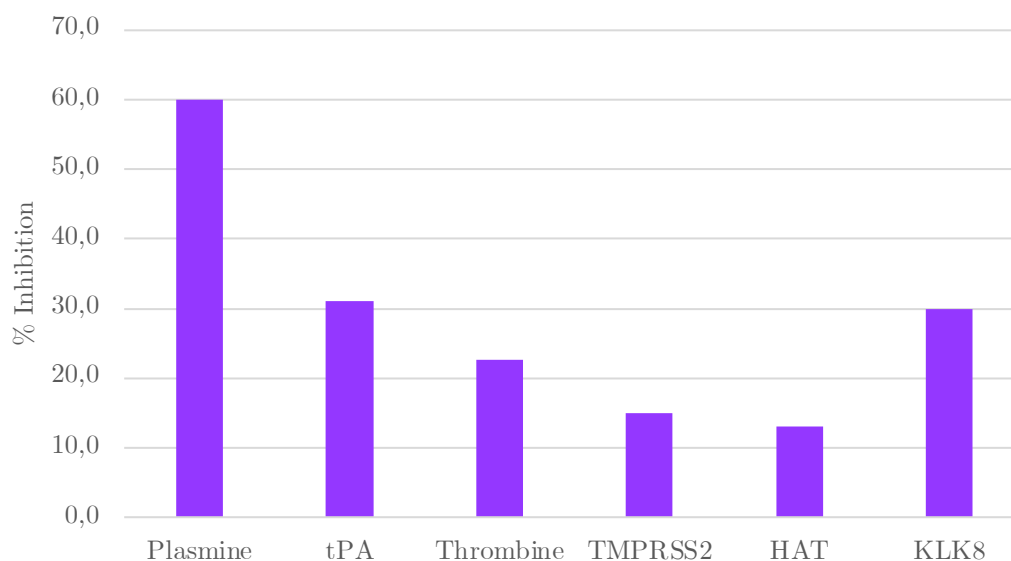


Figure 16 - Profil de sélectivité du peptide **Ya** [100 μ M] vis à vis de différentes protéases à sérine concurrentes ou impliquées dans des processus inflammatoires.

Le peptide **Ya** [100 μ M] est pré-incubé à pendant 15min à 37°C ou 25°C avec les différentes enzymes dans le tampon DCC sans TCEP. La réaction est déclenchée par ajout du substrat fluorogène spécifique de chaque enzyme. Un contrôle négatif servant de référence pour le calcul des pourcentages a été utilisé. Chaque expérience a été réalisée en duplicata.

Bien qu'une sélectivité vis à vis de la plasmine soit observée, celle-ci reste très relative et pourrait être améliorée par l'introduction d'une chaîne latérale sur la fonction thiol portée par la proline en position 8. Pour le vérifier, des bibliothèques dynamiques ont alors été générées à partir du peptide **Yb**.

3. Application de la DCC à l'identification d'inhibiteurs de la plasmine

3.1. Mise au point de la stratégie d'analyse des composés amplifiés

De manière générale, deux stratégies peuvent être utilisées pour la mise en évidence de l'amplification d'un ou plusieurs membres d'une bibliothèque dynamique en présence d'une cible biologique : l'approche comparative et l'approche non comparative (Figure 17).

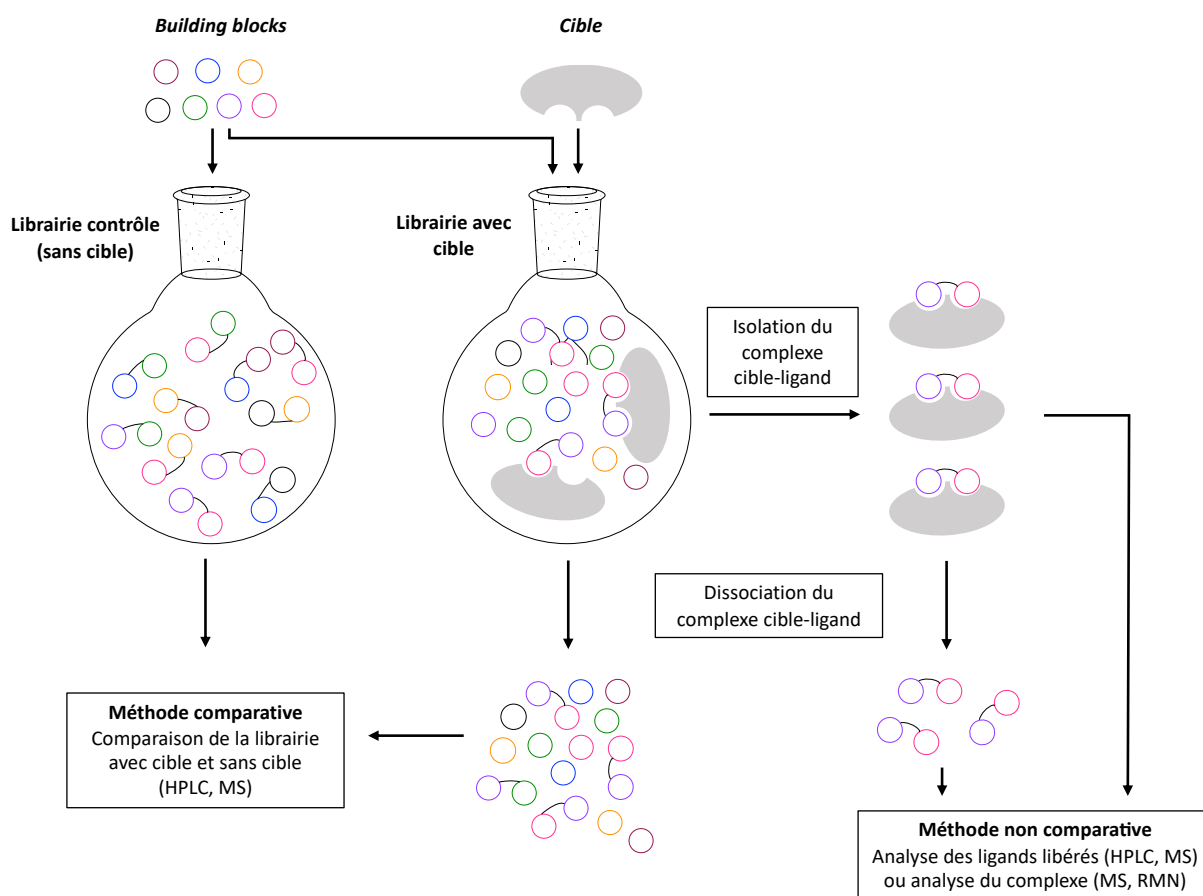


Figure 17 - Schéma résumant les approches comparatives et non comparatives permettant d'identifier le ou les composés amplifiés.⁵⁷

L'approche comparative consiste à comparer par une méthode analytique, le plus souvent la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC), la composition de la librairie obtenue en absence et en présence de la cible. La librairie ne contenant pas de matériel biologique sert alors d'expérience contrôle ou de blanc. Une fois à l'équilibre, cette librairie est gelée cinétiquement et analysée. La librairie contenant la cible est également gelée et le complexe cible-ligand est dissocié avant d'être analysé de la même manière que la librairie contrôle. Généralement, cette dissociation est provoquée par déplacement du ligand par un ligand compétiteur ou par modification des conditions réactionnelles de manière à les rendre dénaturantes. L'amplification est alors observable en comparant les pourcentages de chacun des composés dans les deux librairies.⁵⁸ Cette méthode est en générale simple à mettre en oeuvre. Néanmoins elle requiert une résolution complète des signaux analytiques associés à chacun des composés et n'est possible que sur des librairies de taille modérée.

L'approche non comparative ne fait pas appel à une librairie contrôle ; seule la librairie en présence de cible biologique est générée. L'analyse de la librairie nécessite alors d'isoler les complexes RL des ligands non liés préalablement à l'analyse afin que seul les composés liés à la cible soient détectés, par exemple par filtration centrifuge⁵⁹ ou chromatographie d'exclusion stérique.⁶⁰ Le complexe ainsi séparé peut être directement analysé en conditions non dénaturantes, par exemple par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou par spectrométrie de masse. Il est aussi possible de dissocier le complexe et d'identifier ensuite le ou les composés qui étaient liés à la cible, par HPLC par exemple.

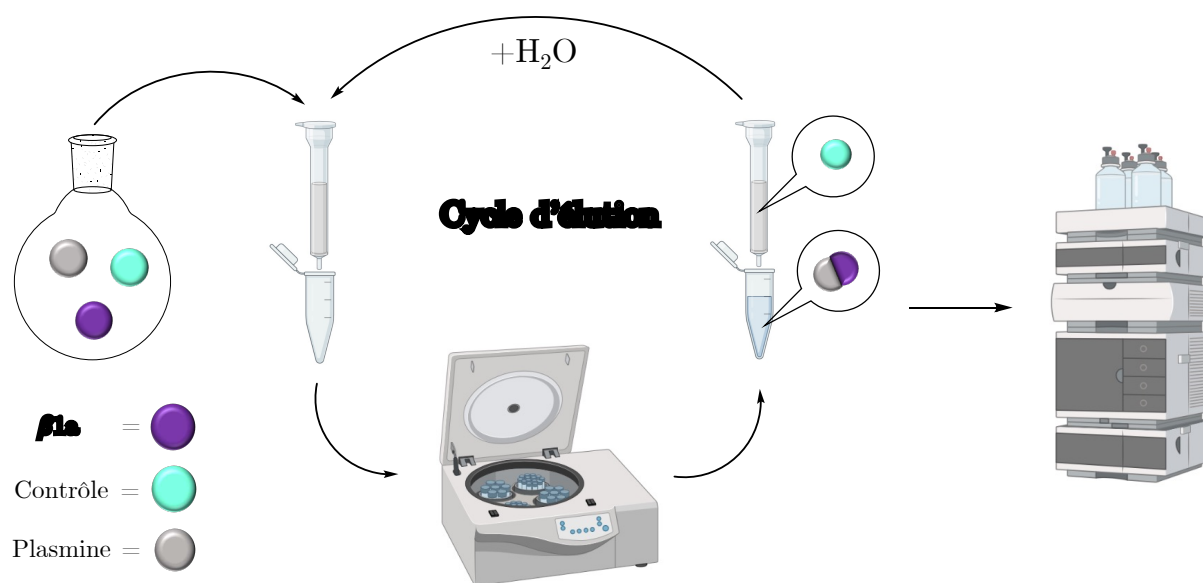


Figure 18 - Stratégie d'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique mise en place.

Les librairies dynamiques générées à partir du peptide **Yb** étant de faible taille (1 seul thiol présent sur le *scaffold*) la méthode comparative pourra être utilisée. Néanmoins, en vue de l'application aux scaffolds **Xb** et **Xc** porteurs de diverse fonctions réactives en DCC et qui conduiraient à des librairies bien plus larges, un protocole pour l'analyse par la méthode non comparative a également été mis au point. Pour cela nous avons décidé d'exploiter les propriétés de la chromatographie d'exclusion stérique. Celle-ci est basée sur la différence de taille entre les composés à séparer : les composés liés à la cible formant un complexe de haut poids moléculaire ne seront pas retenus par les pores du gel d'exclusion et seront donc élués en premier. Pour valider cette approche, le peptide **Ya** est mélangé avec un peptide contrôle non inhibiteur, dans les mêmes proportions, en présence de plasmine (1%). Après incubation à 37°C, le mélange est déposé sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique puis centrifugé. Les aliquots récupérés après chaque centrifugation sont analysés par HPLC. Une expérience

contrôle en l'absence de plasmine est conduite en parallèle. Au total, 4 cycles d'élu-tion sont effectués (Figure 18).

La loi de Beer Lambert a permis de calculer les rapports $[Y_a]/[Contrôle]$ de chaque élu-tion à partir des absorbances obtenues par HPLC (Figure 19).

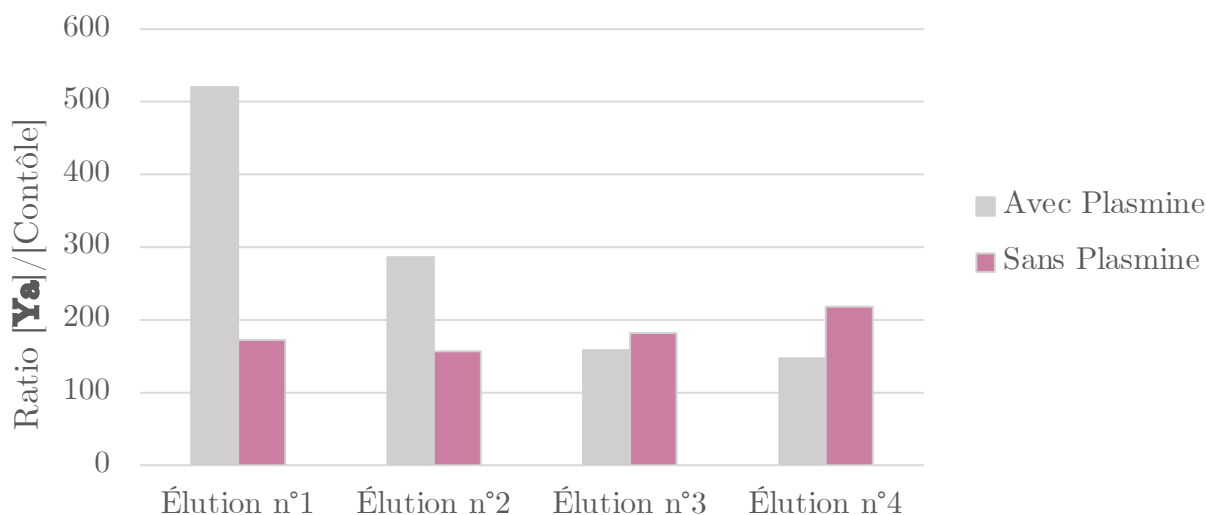


Figure 19 - Évolution des rapports $[Y_a]/[Contrôle]$ en fonction des élu-tions.

En présence de plasmine, les rapports $[Y_a]/[Contrôle]$ décroissent pour devenir similaires aux rapports obtenus en absence de plasmine, qui sont quant à eux, constants au fil des élu-tions. La concentration de peptide **Ya** est donc plus importante que celle du peptide contrôle dans les 2 premiers aliquots. Le gel d'exclusion stérique retenant les molécules/complexes dont le poids moléculaire est inférieur à 3000 g.mol^{-1} , le complexe **Ya**-plasmine formé n'a pas été retenu par la colonne contrairement au peptide contrôle. Cela valide l'utilisation de cette stratégie pour séparer le complexe peptide-enzyme formé lors d'une potentielle amplification par la plasmine.

3.2. Études préliminaires des nouveaux peptides en DCC

Dans un premier temps, la réactivité du peptide **Yb** vis-à-vis de différents BB (**4(R)**, **4(E)**, **4(hR)** (5eq)) a été vérifiée, dans les conditions décrites dans le Chapitre I (Figure 20).

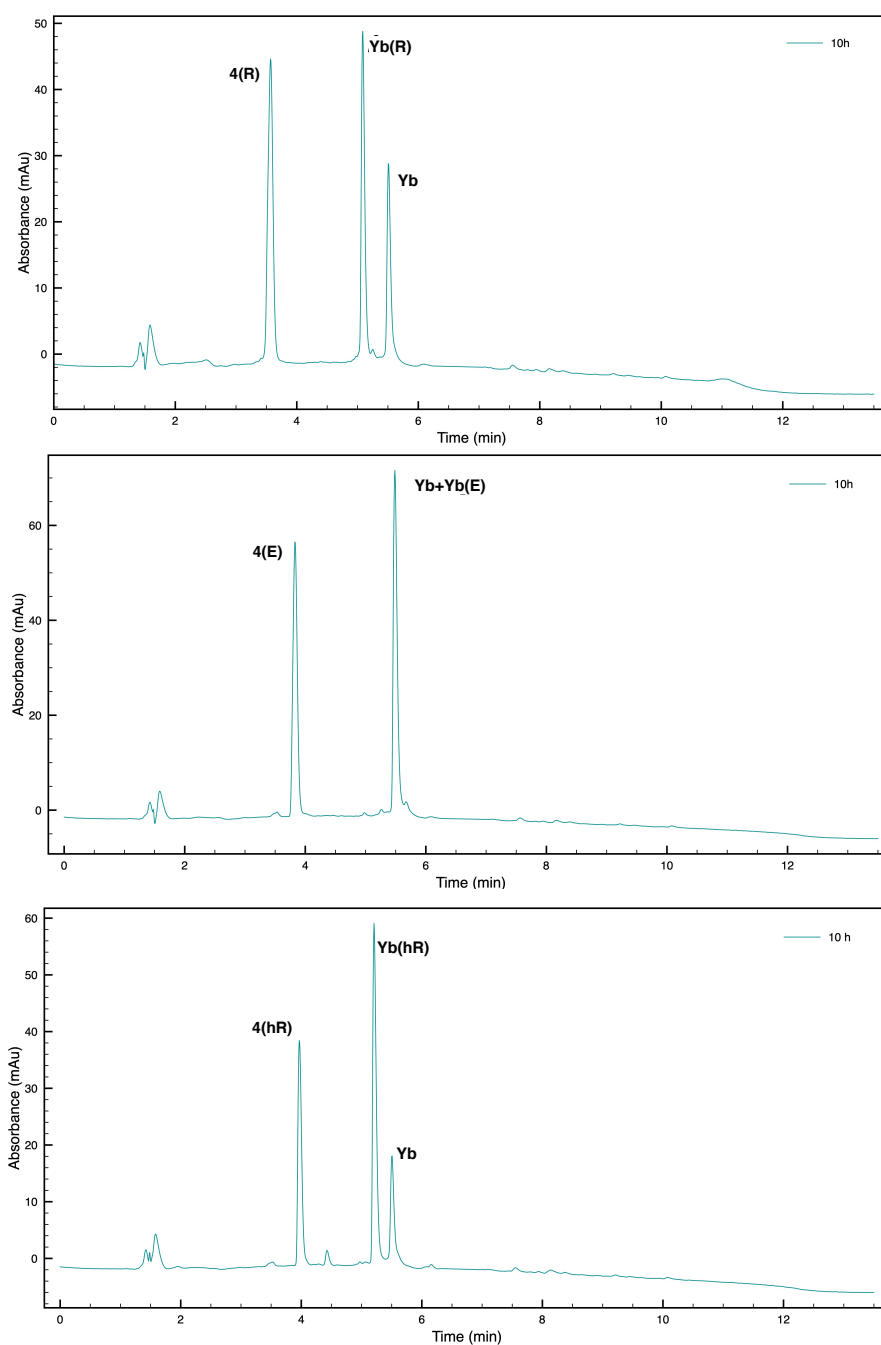


Figure 20 - Chromatogrammes obtenus après 10h de réaction sur **Yb** avec **4(R)** (en haut), **4(E)** (au milieu) et **4(hR)** (en bas).

Dans chaque cas, la formation d'un produit unique correspondant au thioester est observée et les constantes d'équilibre K' de chaque réaction sont satisfaisantes. Il est à noter que contrairement aux précédents peptides fonctionnalisés par **4(R)**, **Yb(R)** ne se fragmente pas en MALDI.

Tableau 7 - Tableau récapitulatif des données obtenues pour les bibliothèques générées entre le peptide **Yb** et **4(R)**, **4(E)** ou **4(hR)**.

| BB | t_r (min)* | MALDI-MS | Peptides | Formule moléculaire, m/z calculée | K' |
|--------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------|---|-----------|
| 4(R) | 5,1 | [M+H] ⁺ 1181,8 | Yb(R) (61%) | C ₅₆ H ₈₈ N ₁₄ O ₁₂ S MW = 1180.64 | 0,1 |
| 4(E) | 5,5 | [M+H] ⁺ 1154,8 | Yb(E) (ND**) | C ₅₅ H ₈₃ N ₁₁ O ₁₄ S MW = 1153.58 | ND** |
| 4(hR) | 5,2 | [M+H] ⁺ 1195,8 | Yb(hR) (75%) | C ₅₇ H ₉₀ N ₁₄ O ₁₂ S MW = 1194.66 | 0,5 |

* Éluant : H₂O/ACN, 0,1% TFA, 5 à 100% ACN, 10 minutes.

** Superposition du signal HPLC correspondant au peptide libre et au peptide fonctionnalisé. (ND = non déterminé).

Une bibliothèque mixte a ensuite été générée à partir du peptide **Yb**, **4(R)** et **4(A)**. Ces BB ont été choisis car d'après les études de modélisation moléculaire réalisées précédemment, le peptide **Yb(R)**, pourrait former des interactions favorables avec la plasmine, ce qui n'est pas le cas de **Yb(A)** et devrait donc être amplifié en présence de l'enzyme. Dans l'optique d'ajouter l'enzyme dans le milieu réactionnel, cette bibliothèque a cette fois été générée en absence de TCEP, l'enzyme étant sensible à la présence de réducteur.

Après 6h de réaction, les produits attendus sont bien présents dans le mélange (Figure 21 et Tableau 8). Dû à l'absence de TCEP, le peptide oxydé, nommée **2Yb**, est également formé en faible proportion. La formation de ponts disulfures étant elle-même réversible dans les conditions de la réaction, la présence de ce composé n'est pas un frein au contrôle thermodynamique de la bibliothèque.

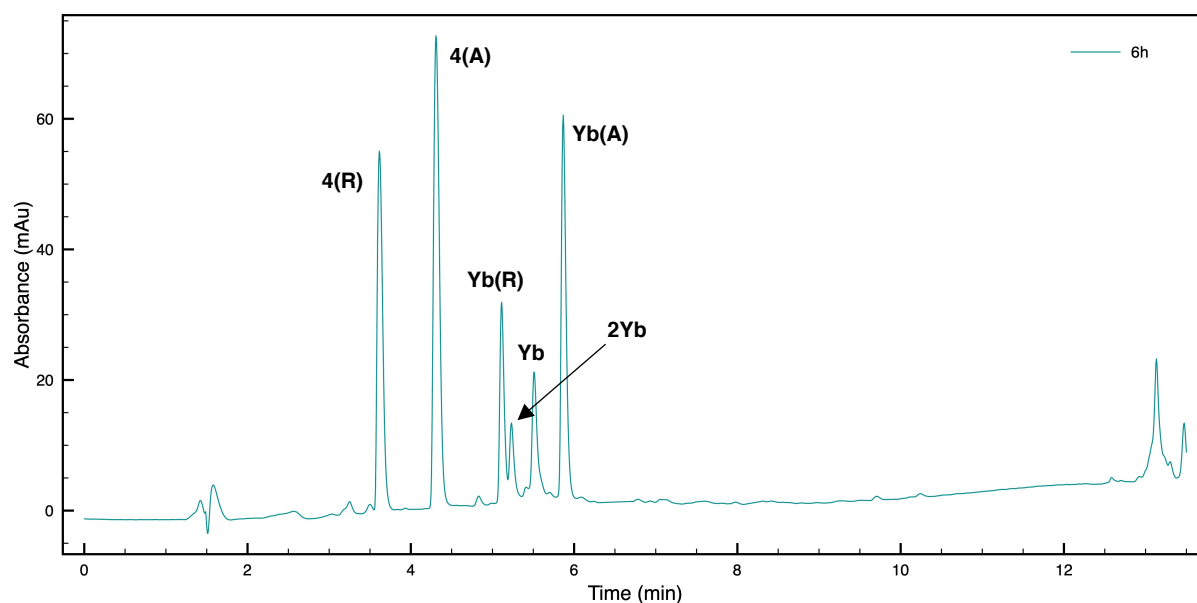


Figure 21 - Chromatogramme obtenu après 10h de réaction entre **Yb**, **4(R)** et **4(A)**.

Tableau 8 - Récapitulatif des données obtenues après 6h de réaction entre **Yb**, **4(R)** et **4(A)** (2,5 eq chacun).

| t_r (min)* | % Aire du pic | MALDI-MS | Peptides | Formule moléculaire, m/z calculée |
|--------------|---------------|--------------------|--------------|---|
| 5,12 | 24% | $[M+H]^+$ 1181,7 | Yb(R) | $C_{56}H_{88}N_{14}O_{12}S$ MW = 1180,64 |
| 5,24 | 9% | $[M+H]^+$ 2077,6** | 2Yb | $C_{100}H_{152}N_{22}O_{22}S_2$ MW = 2077,09 |
| 5,52 | 16% | $[M+H]^+$ 1040,6 | Yb | $C_{50}H_{77}N_{11}O_{11}S$ MW = 1039,55 |
| 5,88 | 51% | $[M+H]^+$ 1096,6 | Yb(A) | $C_{53}H_{81}N_{11}O_{12}S$ MW = 1095,58 |

* Éluant : H₂O/ACN, 0,1% TFA, 5 à 100% ACN, 10 minutes.

** Obtenu en mode linéaire.

3.3.

3.4. Amplification par la plasmine

Finalement, deux librairies ont été générées à partir de **Yb** (0,5 mM), **4(R)** et **4(A)** (2,5 équivalents chacun). Dans l'une d'entre elle, la plasmine (0,13 % par rapport au peptide) y est ajoutée directement, tandis que l'autre, sans ajout de plasmine, sert d'expérience contrôle.

Après 4h de réaction, un échantillon du milieu réactionnel est neutralisé et les librairies sont analysées par HPLC. Afin d'être comparées, les concentrations des produits **Yb(R)** et **Yb(A)** de chaque librairie ont été calculées à partir des %HPLC et normalisées par rapport au produit présentant l'absorbance la plus importante dans l'expérience contrôle (Figure 22).

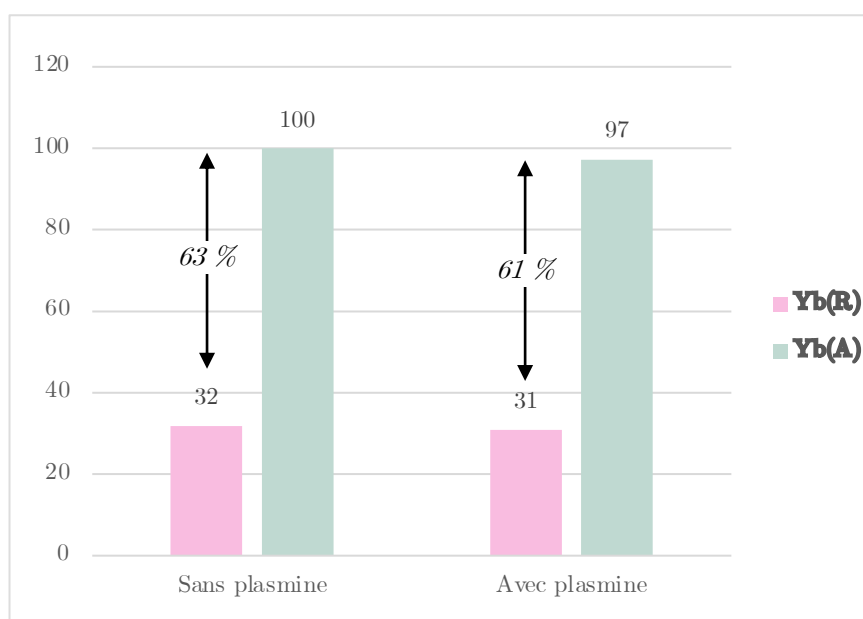


Figure 22 - Comparaison des pourcentages de produits présents dans chaque expérience. La différence de proportion entre les deux produits est indiquée en italique.

De manière générale, **Yb(A)** paraît majoritaire dans la librairie. En revanche, par comparaison avec la librairie contrôle, la différence de concentration de **Yb(A)** semble être plus importante (100% à 97%) que la différence de concentration de **Yb(R)** (32% à 31%) lorsque la plasmine est introduite dans le milieu laissant penser que le peptide fonctionnalisé par un adduit arginine a été légèrement amplifié.

Une approche non comparative est effectuée sur la librairie contenant de la plasmine. Après 3 éluions sur gel d'exclusion stérique selon la procédure explicitée plus haut, les filtrats sont neutralisés et analysés par HPLC.

Cette expérience a permis d'observer l'apparition progressive des BB au fil des éluitions, ils sont donc retenus par la colonne d'exclusion stérique et ce qui témoigne bien de son utilisé vis-à-vis de la séparation des petites molécules (Figure 23).

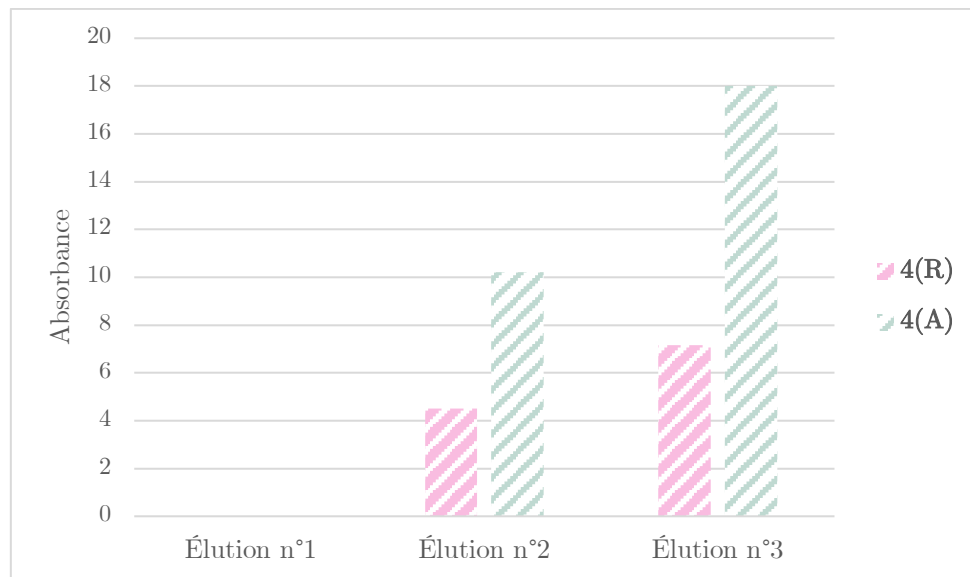


Figure 23 - Comparaison des absorbances de BB présents en fonction des éluitions dans le mélange contenant de la plasmine.

Comme dans l'approche comparative, les concentrations de chaque produit ont été calculées et normalisées (Figure 24). La concentration de chaque produit diminue au dur et à mesure des éluitions.

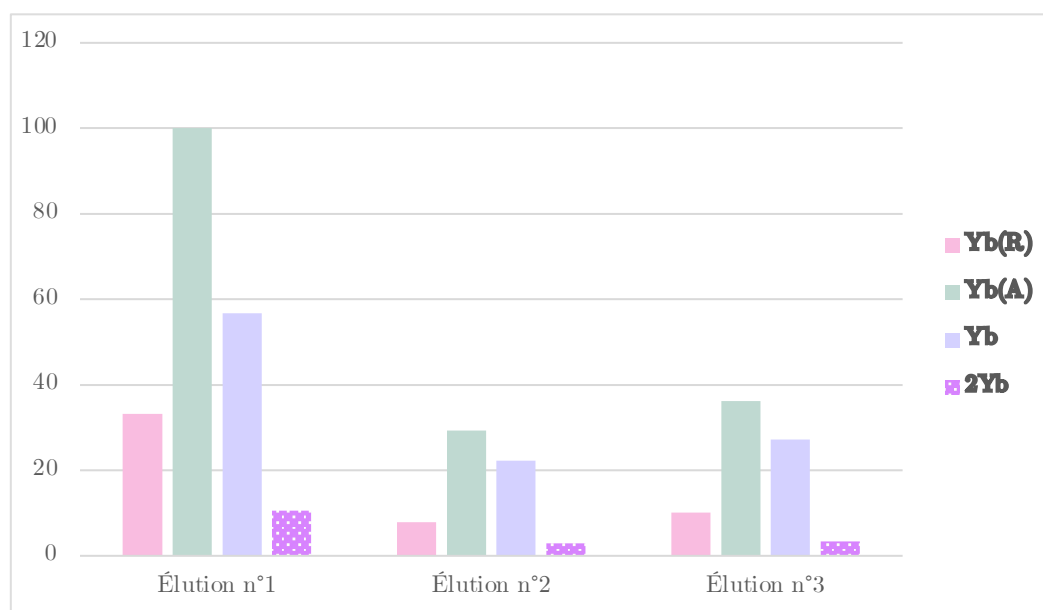


Figure 24 - Pourcentage de produits présents en fonction des éluions dans le mélange contenant de la plasmine.

Contrairement aux BB, toutes les espèces peptidiques contenues dans la librairie sont présentes dans la première élution. Cela signifierait que la plasmine a formé un complexe avec chacune de ces espèces or au vu de la concentration très faible d'enzyme utilisée (660 nM) cette hypothèse n'est pas envisageable. Les peptides non complexés à la plasmine n'étant donc pas retenu par le gel, il n'est pas possible de conclure sur une possible amplification par cette approche.

4. Discussion et conclusion

Dans ce chapitre, de nouveaux *scaffold* adaptés à l'identification d'inhibiteurs de protéases à sérine ont été conçus et préparés en vue de leur utilisation en chimie combinatoire dynamique.

Les *scaffolds* synthétisés dans le chapitre I de ce manuscrit portant les cystéines fonctionnalisables sur les brins étendus ne nous ont pas permis d'aboutir à de bons candidats.

Inspiré des travaux de Craik²⁷ et de Robinson⁴⁷, un nouveau peptide **Ya** mimant SFTI-1, porteur du motif ^DPro-^LPro, a été conçu. Des études de modélisation moléculaire ont permis d'étudier son interaction avec la plasmine et la comparer avec celle de SFTI-1. Dans le but de mimer l'interaction entre Arg2 (P4) et la plasmine, un groupement thiol a été inséré sur la

^LPro afin d'être fonctionnalisé par chimie combinatoire dynamique. L'analyse par modélisation moléculaire effectuée sur ce nouveau *scaffold* **Yb** a permis de consolider la stratégie puisqu'un adduit Arg établit un plus grand nombre d'interaction avec la plasmine que le résidu P4 originel. Ces deux peptides, ainsi que le peptide le peptide **Xc** portant 3 cystéines en position P2', P1, P2, ainsi que qu'un thiol sur la proline, permettant d'étendre à la stratégie à d'autres protéases à sérine, ont été synthétisés ou sont en cours de synthèse.

L'inhibition de la plasmine par les peptides **Ya** et **Yb** a ensuite été étudiée après avoir vérifié que l'activité de la plasmine était conservée dans le tampon utilisé en DCC. Des études sont en cours afin d'étudier le caractère réversible de l'inhibition engendrée par **Yb**. Ce dernier possédant un thiol doit possiblement former une interaction covalente avec la plasmine via un résidu cystéine, situés plus ou moins loin du site actif. Des études complémentaires de modélisation pourraient également permettre d'affirmer cette hypothèse. Le peptide **Ya**, quant à lui, est caractérisé par une IC₅₀ d'environ 49 µM pour la plasmine. Son mécanisme d'inhibition reste à être précisé.

Les approches comparatives et non comparatives utilisées pour analyser les bibliothèques générées à l'issue de l'amplification ont été décrites. Le peptide **Ya** a en outre permis de mettre au point une stratégie pour la séparation du complexe enzyme/ligand formé du reste de la bibliothèque et ainsi faciliter l'analyse.

Notre choix s'est porté sur la chromatographie d'exclusion stérique avec un gel permettant de retenir les composés dont la masse molaire est inférieure à 3000 g.mol⁻¹.

Cependant, malgré la caractérisation du peptide **Ya** par spectrométrie de masse et son caractère inhibiteur, un doute subsiste sur sa séquence et/ou sa pureté. Le peptide **Ya** présente un signal HPLC anormalement intense à 280 nm ne pouvant pas uniquement être attribué groupement aromatique du résidu tyrosine du peptide. De plus, le peptide **Yb** possède un temps de rétention bien supérieur dans le même éluant ($t_r(\mathbf{Ya}) = 3$ min, $t_r(\mathbf{Yb}) = 5,2$ min). Les séquences linéaires des peptides **Ya** et **Yb** ne différant que par le remplacement de la ^LPro par la (S) 4-mercaptoproline en *N*-ter, la même résine a été utilisée pour assembler leur séquence en synthèse peptidique et a été divisée en deux avant d'ajouter le dernier résidu. Nous supposons donc

qu'une anomalie s'est produite au moment du clivage, de la cyclisation, ou de la déprotection du peptide. Cette anomalie de synthèse s'est reproduite lors d'une seconde campagne de synthèse. Des contrôles sont en cours pour en identifier les causes.

Après des études préliminaires sur le *scaffold* **Yb** en DCC, une première amplification a été réalisée en ajoutant une faible quantité de plasmine (660nM) dans le mélange. Le choix des BB s'est porté sur BBAla et BBArg, choix guidé par les analyses par modélisation moléculaire favorable au composé issu de la fonctionnalisation par **4(R)**. Une librairie contrôle a également été générée et l'influence de la plasmine sur la composition des librairies a été analysée par approche comparative. Même si, les produits **Yb(R)** et **Yb(A)** sont présents dans des proportions similaires dans les deux librairies, le produit **Yb(R)** semble être présent de manière préférentielle dans la librairie avec la plasmine. En ce qui concerne l'approche non comparative, l'expérience réalisée ne permet pas de conclure sur une amplification à cause de la non rétention des peptides par le gel d'exclusion stérique. Cela peut être due à la saturation du gel par les BB.

Plusieurs ajustements doivent être réalisés pour valider l'ensemble des résultats obtenus :

- La concentration de plasmine doit être moduler pour mieux appréhender les conditions de l'amplification, idéalement autour de 20 μ M.
- La concentration majoritaire du produit **Yb(A)** laisse supposer que la concentration de **4(A)** dans le mélange est supérieure à celle de **4(R)**. Le nombre d'équivalent de BBArg doit donc être ajusté pour équilibrer la librairie.
- Afin de comparer les concentrations de produit quel que soit l'approche utilisée, un étalon interne à une concentration connue sera ajouté avant chaque injection HPLC.
- Pour l'approche non comparative, la séparation sur gel doit être optimisée : soit en utilisant une quantité de gel plus importante pour pas qu'il ne soit saturé par en BB, soit en fractionnant d'avantage les éluats à la sortie de la colonne d'exclusion.

En tenant compte de ces différents points d'optimisation, de nouvelles amplifications seront réalisées prochainement avec le peptide **Yb** dans le but d'identifier un ou des inhibiteur.s sélectif.s et puissant.s de la plasmine. Ce ou ces inhibiteurs optimisés pourront être ensuite évalués sur des modèles cellulaires de l'inflammation. Ce travail préalable d'optimisation

permettra de proposer en parallèle une stratégie généralisable à d'autres protéases à sérine avec le peptide **Xc**.

Références

- (1) Page, M. J.; Di Cera, E. Serine Peptidases: Classification, Structure and Function. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65* (7–8), 1220–1236.
- (2) Hedstrom, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (12), 4501–4524.
- (3) Schechter, I.; Berger, A. On the Size of the Active Site in Proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27* (2), 157–162.
- (4) Hedstrom, L. An Overview of Serine Proteases. *Curr. Protoc. protein Sci.* **2001**, *26* (1), 21–10.
- (5) Masurier, N.; Arama, D. P.; El Amri, C.; Lisowski, V. Inhibitors of Kallikrein-Related Peptidases: An Overview. *Med. Res. Rev.* **2018**, *38* (2), 655–683.
- (6) Manček-Keber, M. Inflammation-Mediating Proteases: Structure, Function in (Patho) Physiology and Inhibition. *Protein Pept. Lett.* **2014**, *21* (12), 1209–1229.
- (7) Abbenante, G.; Fairlie, D. Protease Inhibitors in the Clinic. *Med. Chem. (Los. Angeles)*. **2006**, *1* (1), 71–104.
- (8) Coccheri, S. COVID-19: The Crucial Role of Blood Coagulation and Fibrinolysis. *Intern. Emerg. Med.* **2020**, *15* (8), 1369–1373.
- (9) Ramachandran, R.; Altier, C.; Oikonomopoulou, K.; Hollenberg, M. D. Proteinases, Their Extracellular Targets, and Inflammatory Signaling. *Pharmacol. Rev.* **2016**, *68* (4), 1110–1142.
- (10) Turk, B. Targeting Proteases: Successes, Failures and Future Prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (9), 785–799.
- (11) Drag, M.; Salvesen, G. S. Emerging Principles in Protease-Based Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (9), 690.
- (12) Bajaj, M. S.; Ogueli, G. I.; Kumar, Y.; Vadivel, K.; Lawson, G.; Shanker, S.; Schmidt, A. E.; Bajaj, S. P. Engineering Kunitz Domain 1 (KD1) of Human Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 to Selectively Inhibit Fibrinolysis: Properties of KD1-L17R Variant. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (6), 4329–4340.
- (13) Konarev, A. V., Anisimova, I. N., Gavrilova, V. A. & Shewry, P. R. Polymorphism of Inhibitors of Hydrolytic Enzymes Present in Cereal and Sunflower Seeds. In *Genetics and Breeding for Crop quality and Resistance*; Kluwer Academic Publishers, 1999; pp 135–144.

- (14) Luckett, S.; Garcia, R. S.; Barker, J. J.; Konarev, A. V.; Shewry, P. R.; Clarke, A. R.; Brady, R. L. High-Resolution Structure of a Potent, Cyclic Proteinase Inhibitor from Sunflower Seeds. *J. Mol. Biol.* **1999**, *290* (2), 525–533.
- (15) Korsinczky, M. L. J.; Schirra, H. J.; Rosengren, K. J.; West, J.; Condie, B. A.; Otvos, L.; Anderson, M. A.; Craik, D. J. Solution Structures by ¹H NMR of the Novel Cyclic Trypsin Inhibitor SFTI-1 from Sunflower Seeds and an Acyclic Permutant. *J. Mol. Biol.* **2001**, *311* (3), 579–591.
- (16) Korsinczky, M.; Schirra, H.; Craik, D. Sunflower Trypsin Inhibitor-1. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2005**, *5* (5), 351–364.
- (17) Daly, N. L.; Chen, Y. K.; Foley, F. M.; Bansal, P. S.; Bharathi, R.; Clark, R. J.; Sommerhoff, C. P.; Craik, D. J. The Absolute Structural Requirement for a Proline in the P3'-Position of Bowman-Birk Protease Inhibitors Is Surmounted in the Minimized SFTI-1 Scaffold. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (33), 23668–23675.
- (18) de Veer, S. J.; White, A. M.; Craik, D. J. Sunflower Trypsin Inhibitor-1 (SFTI-1): Sowing Seeds in the Fields of Chemistry and Biology. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2021**, *60* (15), 8050–8071.
- (19) Zablotna, E.; Jaśkiewicz, A.; Łęgowska, A.; Miecznikowska, H.; Lesner, A.; Rolka, K. Design of Serine Proteinase Inhibitors by Combinatorial Chemistry Using Trypsin Inhibitor SFTI-1 as a Starting Structure. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13* (11), 749–755.
- (20) Zablotna, E.; Kret, A.; Jaśkiewicz, A.; Olma, A.; Leplawy, M. T.; Rolka, K. Introduction of α -Hydroxymethylamino Acid Residues in Substrate Specificity P1 Position of Trypsin Inhibitor SFTI-1 from Sunflower Seeds Retains Its Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *340* (3), 823–828.
- (21) Quimbar, P.; Malik, U.; Sommerhoff, C. P.; Kaas, Q.; Chan, L. Y.; Huang, Y. H.; Grundhuber, M.; Dunse, K.; Craik, D. J.; Anderson, M. A.; et al. High-Affinity Cyclic Peptide Matriptase Inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (19), 13885–13896.
- (22) Fittler, H.; Avrutina, O.; Glotzbach, B.; Empting, M.; Kolmar, H. Combinatorial Tuning of Peptidic Drug Candidates: High-Affinity Matriptase Inhibitors through Incremental Structure-Guided Optimization. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (11), 1848–1857.
- (23) Łęgowska, A.; Dębowski, D.; Lesner, A.; Wysocka, M.; Rolka, K. Selection of Peptomeric Inhibitors of Bovine α -Chymotrypsin and Cathepsin G Based on Trypsin Inhibitor SFTI-1 Using a Combinatorial Chemistry Approach. *Mol. Divers.* **2010**, *14* (1), 51–58.

- (24) de Veer, S. J.; Furio, L.; Swedberg, J. E.; Munro, C. A.; Brattsand, M.; Clements, J. A.; Hovnanian, A.; Harris, J. M. Selective Substrates and Inhibitors for Kallikrein-Related Peptidase 7 (KLK7) Shed Light on KLK Proteolytic Activity in the Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* **2017**, *137* (2), 430–439.
- (25) Chen, W.; Kinsler, V. A.; Macmillan, D.; Di, W.-L. Tissue Kallikrein Inhibitors Based on the Sunflower Trypsin Inhibitor Scaffold—A Potential Therapeutic Intervention for Skin Diseases. *PLoS One* **2016**, *11* (11), e0166268.
- (26) Li, C. Y.; Yap, K.; Swedberg, J. E.; Craik, D. J.; De Veer, S. J. Binding Loop Substitutions in the Cyclic Peptide SFTI-1 Generate Potent and Selective Chymase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (2), 816–826.
- (27) Swedberg, J. E.; Wu, G.; Mahatmanto, T.; Durek, T.; Caradoc-Davies, T. T.; Whisstock, J. C.; Law, R. H. P.; Craik, D. J. Highly Potent and Selective Plasmin Inhibitors Based on the Sunflower Trypsin Inhibitor-1 Scaffold Attenuate Fibrinolysis in Plasma. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (2), 552–560.
- (28) De Veer, S. J.; Wang, C. K.; Harris, J. M.; Craik, D. J.; Swedberg, J. E. Improving the Selectivity of Engineered Protease Inhibitors: Optimizing the P2 Prime Residue Using a Versatile Cyclic Peptide Library. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (20), 8257–8268.
- (29) Swedberg, J. E.; Li, C. Y.; De Veer, S. J.; Wang, C. K.; Craik, D. J. Design of Potent and Selective Cathepsin G Inhibitors Based on the Sunflower Trypsin Inhibitor-1 Scaffold. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (2), 658–667.
- (30) Tian, S.; Swedberg, J. E.; Li, C. Y.; Craik, D. J.; De Veer, S. J. Iterative Optimization of the Cyclic Peptide Sfti-1 Yields Potent Inhibitors of Neutrophil Proteinase 3. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10* (8), 1234–1239.
- (31) Legowska, A.; Bulak, E.; Jaskiewicz, A.; Maluch, I.; Sieracki, M.; Wysocka, M.; Lesner, A.; Rolka, K. Analogues of Trypsin Inhibitor SFTI-1 with Disulfide Bridge Substituted by Various Length of Carbonyl Bridges. *Protein Pept. Lett.* **2010**, *17* (10), 1223–1227.
- (32) Jiang, S.; Li, P.; Lee, S. L.; Cheng, Y. L.; Long, Y. Q.; Johnson, M. D.; Dickson, R. B.; Roller, P. P. Design and Synthesis of Redox Stable Analogues of Sunflower Trypsin Inhibitors (SFTI-1) on Solid Support, Potent Inhibitors of Matriptase. *Org. Lett.* **2007**, *9* (1), 9–12.
- (33) White, A. M.; de Veer, S. J.; Wu, G.; Harvey, P. J.; Yap, K.; King, G. J.; Swedberg, J. E.; Wang, C. K.; Law, R. H. P.; Durek, T.; et al. Application and Structural Analysis

- of Triazole-Bridged Disulfide Mimetics in Cyclic Peptides. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**, *59* (28), 11273–11277.
- (34) Tischler, M.; Nasu, D.; Empting, M.; Schmelz, S.; Heinz, D. W.; Rottmann, P.; Kolmar, H.; Buntkowsky, G.; Tietze, D.; Avrutina, O. Braces for the Peptide Backbone: Insights into Structure-Activity Relationships of Protease Inhibitor Mimics with Locked Amide Conformations. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51* (15), 3708–3712.
- (35) Stawikowski, M.; Stawikowska, R.; Jaśkiewicz, A.; Zabłotna, E.; Rolka, K. Examples of Peptide-Peptoid Hybrid Serine Protease Inhibitors Based on the Trypsin Inhibitor SFTI-1 with Complete Protease Resistance at the P1-P1' Reactive Site. *ChemBioChem* **2005**, *6* (6), 1057–1061.
- (36) Descours, A.; Moehle, K.; Renard, A.; Robinson, J. A. A New Family of β -Hairpin Mimetics Based on a Trypsin Inhibitor from Sunflower Seeds. *ChemBioChem* **2002**, *3* (4), 318.
- (37) Liu, W.; Zheng, Y.; Kong, X.; Heinis, C.; Zhao, Y.; Wu, C. Precisely Regulated and Efficient Locking of Linear Peptides into Stable Multicyclic Topologies through a One-Pot Reaction. *Angew. Chemie* **2017**, *129* (16), 4529–4534.
- (38) De Veer, S. J.; Weidmann, J.; Craik, D. J. Cyclotides as Tools in Chemical Biology. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (7), 1557–1565.
- (39) Swedberg, J. E.; Mahatmanto, T.; Abdul Ghani, H.; De Veer, S. J.; Schroeder, C. I.; Harris, J. M.; Craik, D. J. Substrate-Guided Design of Selective FXIIa Inhibitors Based on the Plant-Derived *Momordica Cochinchinensis* Trypsin Inhibitor-II (MCoTI-II) Scaffold. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (15), 7287–7292.
- (40) Thongyoo, P.; Bonomelli, C.; Leatherbarrow, R. J.; Tate, E. W. Potent Inhibitors of β -Trypsin and Human Leukocyte Elastase Based on the MCoTI-II Scaffold. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (20), 6197–6200.
- (41) Getz, J. A.; Rice, J. J.; Daugherty, P. S. Protease-Resistant Peptide Ligands from a Knottin Scaffold Library. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (8), 837–844.
- (42) Glotzbach, B.; Reinwarth, M.; Weber, N.; Fabritz, S.; Tomaszowski, M.; Fittler, H.; Christmann, A.; Avrutina, O.; Kolmar, H. Combinatorial Optimization of Cystine-Knot Peptides towards High-Affinity Inhibitors of Human Matriptase-1. *PLoS One* **2013**, *8* (10), 18–20.
- (43) Andersen, L. M.; Wind, T.; Hansen, H. D.; Andreasen, P. A. A Cyclic Peptidyllic

- Inhibitor of Murine Urokinase-Type Plasminogen Activator: Changing Species Specificity by Substitution of a Single Residue. *Biochem. J.* **2008**, *412* (3), 447–457.
- (44) Xu, P.; Xu, M.; Jiang, L.; Yang, Q.; Luo, Z.; Dauter, Z.; Huang, M.; Andreasen, P. A. Design of Specific Serine Protease Inhibitors Based on a Versatile Peptide Scaffold: Conversion of a Urokinase Inhibitor to a Plasma Kallikrein Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (22), 8868–8876.
- (45) Kasperkiewicz, P.; Poreba, M.; Groborz, K.; Drag, M. Emerging Challenges in the Design of Selective Substrates, Inhibitors and Activity-Based Probes for Indistinguishable Proteases. *FEBS J.* **2017**, *284* (10), 1518–1539.
- (46) Bachovchin, D. A.; Cravatt, B. F. The Pharmacological Landscape and Therapeutic Potential of Serine Hydrolases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11* (1), 52–68.
- (47) Descours, A.; Moehle, K.; Renard, A.; Robinson, J. A. A New Family of β -Hairpin Mimetics Based on a Trypsin Inhibitor from Sunflower Seeds. *ChemBioChem* **2002**, *3* (4), 318–323.
- (48) Wu, G.; Quek, A. J.; Caradoc-Davies, T. T.; Ekkel, S. M.; Mazzitelli, B.; Whisstock, J. C.; Law, R. H. P. Structural Studies of Plasmin Inhibition. *Biochem. Soc. Trans.* **2019**, *47* (2), 541–557.
- (49) Fourrier, F. Fibrinolyse et Fibrinogénolyse En Réanimation. *Réanimation* **2002**, 341–348.
- (50) Macfarlane, R. G.; Pilling, J. Observations on Fibrinolysis: Plasminogen, Plasmin and Antiplasmin. **1945**, No. 1943, 562–565.
- (51) Miles, L.; Parmer, R. Plasminogen Receptors: The First Quarter Century. *Semin. Thromb. Hemost.* **2013**, *39* (4), 329–337.
- (52) Medcalf, R. L.; Keragala, C. B. Fibrinolysis: A Primordial System Linked to the Immune Response. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (7).
- (53) Syrovets, T.; Jendrach, M.; Rohwedder, A.; Schüle, A.; Simmet, T. Plasmin-Induced Expression of Cytokines and Tissue Factor in Human Monocytes Involves AP-1 and IKK β -Mediated NF-KB Activation. *Blood* **2001**, *97* (12), 3941–3950.
- (54) Uhl, B.; Zuchriegel, G.; Pühr-Westerheide, D.; Praetner, M.; Rehberg, M.; Fabritius, M.; Hessenauer, M.; Holzer, M.; Khandoga, A.; Fürst, R.; et al. Tissue Plasminogen Activator Promotes Postischemic Neutrophil Recruitment via Its Proteolytic and Nonproteolytic Properties. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34* (7), 1495–1504.

- (55) Silva, L. M.; Lum, A. G.; Tran, C.; Shaw, M. W.; Gao, Z.; Flick, M. J.; Moutsopoulos, N. M.; Bugge, T. H.; Mullins, E. S. Plasmin-Mediated Fibrinolysis Enables Macrophage Migration in a Murine Model of Inflammation. *Blood* **2019**, *134* (3), 291–303.
- (56) Swedberg, J. E.; Harris, J. M. Plasmin Substrate Binding Site Cooperativity Guides the Design of Potent Peptide Aldehyde Inhibitors. *Biochemistry* **2011**, *50* (39), 8454–8462.
- (57) Frei, P.; Hevey, R.; Ernst, B. Dynamic Combinatorial Chemistry: A New Methodology Comes of Age. *Chem. - A Eur. J.* **2019**, *25* (1), 60–73.
- (58) Hartman, A. M.; Gierse, R. M.; Hirsch, A. K. H. Protein-Templated Dynamic Combinatorial Chemistry: Brief Overview and Experimental Protocol. *European J. Org. Chem.* **2019**, *2019* (22), 3581–3590.
- (59) Milanesi, L.; Hunter, C. A.; Sedelnikova, S. E.; Waltho, J. P. Amplification of Bifunctional Ligands for Calmodulin from a Dynamic Combinatorial Library. *Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12* (4), 1081–1087.
- (60) Yang, Z.; Fang, Z.; He, W.; Wang, Z.; Gan, H.; Tian, Q.; Guo, K. Identification of Inhibitors for Vascular Endothelial Growth Factor Receptor by Using Dynamic Combinatorial Chemistry. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (7), 1671–1674.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les peptides combinent l'avantage de la spécificité d'action de molécules biologiques plus larges tout en conservant des propriétés pharmacocinétiques proches des peptides molécules. Réputés entre autres pour leur grande flexibilité et leur faible biodisponibilité, de grand progrès ont été réalisés afin de compenser les faiblesses des peptides naturels et moduler leur propriété pharmacologique. De nombreuses approches, basées sur la conception rationnelle ou le criblage aléatoire haut débit de chimiothèques, ont été développées afin de concevoir des peptidomimes capables d'interférer avec les processus biologiques. La conception rationnelle de mimes consiste à identifier les interactions clés entre un ligand et son récepteur pour créer une structure 3D capables de projeter les chaînes latérales impliquées dans ces interactions. Bien que les peptidomimes bioactifs conçu de manière rationnel soient nombreux, cette stratégie nécessite des données structurales précise de la cible et donne généralement accès à un premier *hit* d'affinité modérée devant être optimisé par des cycles de synthèse/criblage long et couteux. Le criblage au débit de chimiothèques permet d'accéder très rapidement à des séquences de bonnes affinités et efficacités pour une cible donnée grâce au criblage systématique d'un large panel de peptides. Néanmoins, leurs propriétés pharmacologiques doivent être optimisées dans un second temps, l'utilisation de ces peptides n'étant généralement pas compatibles avec une utilisation *in vitro*. La chimie combinatoire dynamique s'est révélée être un outil précieux pour la découverte de molécules bioactives. La cible guidant la synthèse du produit pour lequel elle a plus d'affinité, elle réunit la synthèse et le criblage en une étape unique. Elle a été très peu exploitée dans le domaine des peptides.

Nous proposons une nouvelle stratégie combinant la conception rationnelle de peptides structurés et la dimension aléatoire de la chimie combinatoire dynamique pour la sélection de chaînes latérales à la surface des peptides. Cette méthode permet l'accès à de larges librairies de peptides de structure 3D définie, qui reste difficiles à obtenir par d'autres méthodes à l'heure actuelle. Elles représentent pourtant un outil indispensable pour l'identification de nouveaux peptides bioactifs comme candidats médicament ou outils moléculaires.

La première partie de ce travail de thèse a permis de mettre au point une réaction de transthioestérification réversible et robuste entre un *scaffold* structuré en β -hairpin porteur de groupements thiols, *via* des cystéines, et des blocs porteurs de chaînes latérales d'acides aminés. Avec un système simple, nous avons pu montrer que la réaction était conductible en conditions physiologiques et compatible avec toutes les chaînes latérales des aminoacides testés. Les valeurs similaires des K' obtenus pour les différentes réactions en fonction des blocs utilisés montrent que les constituants des bibliothèques générées sont bien iso-énergétiques. La vitesse de la réaction est quant à elle suffisante pour permettre la survie d'une cible biologique. Des expériences menées en parallèle par ajout successif de blocs ont permis d'établir la réversibilité du système. Les études menées sur les peptides portant 2 cystéines semblent tout d'abord montrer que les différentes positions des cystéines sur le *scaffold* ont peu d'influence l'une sur l'autre. La dimension combinatoire de la bibliothèque a finalement été étudiée sur une plateforme portant 4 cystéines et a permis de générer une bibliothèque de 81 espèces peptidiques théoriques. Une collaboration avec Hélène Berthoumieux et Laura Messio, chimistes théoriciennes au Laboratoire de Physique Théorique de la Matière Condensée de Sorbonne-Université, devraient prochainement permettre l'accès à un modèle prédictif permettant d'évaluer, pour un peptide portant 4 cystéines, les proportions théoriques des différents produits possible qui seraient présents dans la bibliothèque dynamique.

La mise au point d'une stratégie d'analyse applicable en routine pour détecter et caractériser les composés représente le défi majeur dans le développement de cette stratégie et a fait l'objet de la deuxième partie de ce projet de thèse. La méthode de choix pour le suivi des réactions et la détection des membres de la bibliothèque est l'analyse HPLC. Nous avons montré que l'utilisation d'un TAG-UV le 4-(DAPA) ($\lambda = 415$ nm) permet ainsi de simplifier fortement les profils HPLC des mélanges, en s'affranchissant des signaux des blocs et d'augmenter la sensibilité de la détection des peptides. Cette sonde possède également des propriétés de fluorescence qui pourraient être exploitées pour augmenter encore d'avantage cette sensibilité. En ce qui concerne l'identification des séquences, nous avons pu montrer tout d'abord que la spectrométrie de masse MALDI ou ESI permet d'observer les fonctions thioesters. Le point crucial qui a été étudié, avec le Dr Emmanuelle Sachon et en collaboration avec la plateforme MS3U, est la caractérisation des isomères de position lors de l'utilisation de peptides porteurs de plusieurs cystéines, non distinguables en MS. La

fragmentation MS/MS directe du peptide cyclique, bien que possible, est difficile à appliquer en routine du au nombre trop élevé de fragment générés complexifiant grandement l'analyse des spectres. Une linéarisation des peptides cycliques par digestion à la trypsine en amont de l'analyse MALDI-TOF MS et de la fragmentation MS/MS a été étudiée. Même si elle s'est avérée possible pour distinguer des isomères peracétylés, dans le cas où une cystéine reste libre sur le peptide, un échange thiol/thioester intramoléculaire peut se produire durant la digestion et fausser l'analyse. Une autre voie de linéarisation basée sur « l'effet ornithine » a été envisagée. Ce résidu capable de cycliser en phase gazeuse en mode MS/MS, est facilement incorporable en synthèse peptidique et permet d'ouvrir le peptide. Applicable en routine, cette stratégie a permis l'identification de plusieurs isomères de positions.

Pour finir, en collaboration avec le Dr. Claudia Muracciole Bich (IBMM, Montpellier), des études exploitant l'électrophorèse capillaire couplée à la MS sont en cours afin d'améliorer la séparation en amont de l'analyse MS.

L'objectif de ce travail de thèse était d'appliquer cette stratégie à l'identification d'inhibiteurs de protéases à sérine, impliquées dans de nombreux processus inflammatoire et dont la dérégulation l'activité est souvent associée à des processus pathologiques variés. Inspiré de l'inhibiteur naturel SFTI-1, de nouveaux *scaffolds* adaptés à cette application ont été conçus et développés en vue de leur utilisation en chimie combinatoire dynamique. Avant de s'engager dans la génération de bibliothèques dynamiques complexes et afin d'établir une preuve de concepts, ces *scaffolds* ont été adaptés par greffage rationnels des motifs de reconnaissance de la plasmine, enzyme impliquée dans la fibrinolyse mais jouant aussi un rôle majeur dans l'inflammation et la réponse immunitaire. Un peptide modèle **Ya** a donc été conçu et des études de modélisation moléculaire réalisées par le Dr Nicolas Pietrancosta au LBM ont été menées et permettent d'observer sa bonne superposition avec SFTI-1 dans la poche de la plasmine. Ce peptide, possédant une CI_{50} de 49 μ M pour la plasmine et une sélectivité relative vis-à-vis de celle-ci, a été utilisé pour mettre au point une stratégie d'analyse de composés amplifiés. Les expériences réalisées à cet effet ont montré que la chromatographie d'exclusion stérique est un outil exploitable pour l'isolation des complexes enzyme/ligand, formé lors d'une potentielle amplification. Dans le but de l'utiliser pour générer de petites bibliothèques, un groupement thiol a été introduit sur un résidu proline du peptide. Après des études préliminaires de chimie combinatoire dynamique, une première expérience

d'amplification a été réalisée en incorporant la plasmine dans la librairie. Bien qu'il ne nous ait pas été possible de conclure quant à l'amplification d'un des produits de la librairie dynamique générée, cette expérience a permis d'identifier les points à optimiser avant d'effectuer de nouvelles expériences avant de généraliser la stratégie à la découverte d'inhibiteurs d'autres protéases à sérine.

Pour finir, les différents travaux développés lors de ce projet ont conduit à l'optimisation de la structure du scaffold, par introduction de la sonde 4-(DAPA) pour le suivi des réactions et d'un résidu ornithine pour la caractérisation des séquences. L'implémentation de ces motifs dans des séquences possédant d'autres type de structures secondaires est maintenant en cours et permettrait d'appliquer la stratégie à un plus large panel de cible thérapeutiques. Par exemple, dans le cadre d'un projet plus général développé au LBM et portant sur la conception et l'étude des CPPs (Cell Penetrating Peptides), elle est actuellement exploitée pour l'identification de ligands sélectifs de glycosaminoglycane (GAGs) permettant l'adressage et le ciblage des cellules (ANR Glycotarget, 2020, portée par Sandrine Sagan). Par ailleurs, un nouveau *scaffold* possédant cette fois-ci une structure en hélice α stabilisée par des agrafes covalentes entre les résidus i et $i+4$ a été conçu. L'hélice α représentant la structure secondaire la plus communément trouvée sur les interfaces d'interaction protéine-protéine, ce scaffold sera utilisé pour la génération de DCL et le criblage vis-à-vis de tels complexes (Thèse Lei Ren à partir d'octobre 2021). Ces complexes centraux dans les processus biologiques ouvrent de perspectives nombreuses pour un ciblage thérapeutique et les peptides constituent généralement les meilleurs candidats pour un tel développement. Cette nouvelle stratégie pourrait donc se révéler particulièrement utile dans ce contexte.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Chemistry

1.1. General consideration

About compounds preparation:

All reagents and solvents were purchased from commercial suppliers and used without further purification. Flash chromatography was performed using silica gel Merck 60 with 0.040-0.063 μm on a Grace Reveleris X2TM apparatus. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed using silica gel Merck 60 on alumina, visualised by UV fluorescence at 254 nm and revealed with: phosphomolybdic acid (10% solution in absolute EtOH), bromocresol green (0.04% solution in absolute EtOH slightly alkalised with 0.1M aqueous NaOH), ninhydrine (0.3% in *n*-BuOH/ AcOH) or *p*-anisaldehyde.

About solid phase peptide synthesis:

2-Chlorotrityl chloride resin (100-200 mesh, loading 1.56 mmol/g) and 2-(1H-9-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) were purchased from *Iris Biotech GmbH* in peptide synthesis grade. 2-(1H-9-azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) was purchased from *Fluorochem* in peptide synthesis grade. Solvents were purchased from VWR in HPLC grade and used without further purification. Unless stated otherwise all the amino acids used for peptides synthesis were purchased from *Iris Biotech GmbH* as follow: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-^DPro-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH and Fmoc-L-Pro(4-STrt)-OH (2S,4S) from *Polypeptide Group*. The peptides were synthesized by manual SPPS in polypropylene manual disposable reactors with plunger and frit, pore size 25 μm , with removable PTFE luer stoppers, purchased from *Multisyntech GmbH*. Preparative scale purification of peptides was performed by reverse phase HPLC on a Waters systems consisted of a binary pump (Waters 1525) and a dual wavelength UV/Visible Absorbance detector (Waters 2487), piloted by Breeze softwares using the following columns: preparative *Macherey-Nagel Nucleodur* (RP C18, 250 x 16 mm, 5 μm , 300 Å) from *AIT*. The pure fractions were gathered according to their purity, partly concentrated under vacuum and freeze-dried using an Alpha 2/4 from Bioblock Scientific to get the expected peptide as a powder.

About product characterisation:

NMR spectra were recorded on Bruker Avance III nanobay 300 MHz or 400 MHz spectrometers. Proton chemical shifts are reported in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane (TMS). Coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz). Carbon chemical shifts are reported in parts per million (ppm) with reference to internal solvent CDCl₃ (77.0 ppm) or CD₃OD (49.00 ppm). Multiplicities are abbreviated as follows: singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), quintuplet (quint), multiplet (m) and broad (br). High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained on a Finnigan MAT 95 instrument and are given as experimental (found) and theoretical (calcd). Analytical RP-HPLC were performed on a Dionex system consisting in an analytical automated LC system (Ultimate 3000) equipped with an autosampler, a pump block composed of two ternary gradient pumps and a dual wavelength detector, piloted by a Chromeleon software. The analysis were performed on a *Proto 200* (RP C18, 100 x 4.6 mm, 3 μm, 200 Å) from *Higgins-Analytical Inc.* using as eluent A, H₂O containing 0.1% of TFA and as eluent B, CH₃CN containing 0.1% of TFA, at a flow rate of 1 mL/min. UV detection was done at 220, 280 nm, 350 nm or 415 nm. Peptides were characterized by MALDI-TOF MS (DE-Pro, PerSeptive Biosystems) in positive ion reflector mode using the CHCA matrix. Peptide molecular weights were determined for the free amine and not for the TFA salts. ESI MS and MS/MS analysis were performed on a Synapt G2-S instrument equipped with UPLC (Waters Corporation, UK). For the separation, a gradient with H₂O containing 0.1% of TFA as eluent A and CH₃CN containing 0.1% of TFA as eluent B was applied, from 20% B to 55% B in 13 minutes at a flow rate of 0.5 mL/min on a C18 column (Kinetec EVO, 10x21mm, 2.6μm). UV detection was done at 220 and 280 nm. For the MS/MS experiments, the m/z ion, always the doubly charge compound [MH₂]²⁺, was selected and submitted to collision energy (CE) ramp between 25 and 55. MassLynx software was used for data acquisition and processing. Optical rotations were determined at 20°C on a JASCO P-2000 polarimeter equipped with a 10 cm path length cell.

About molecular docking studies

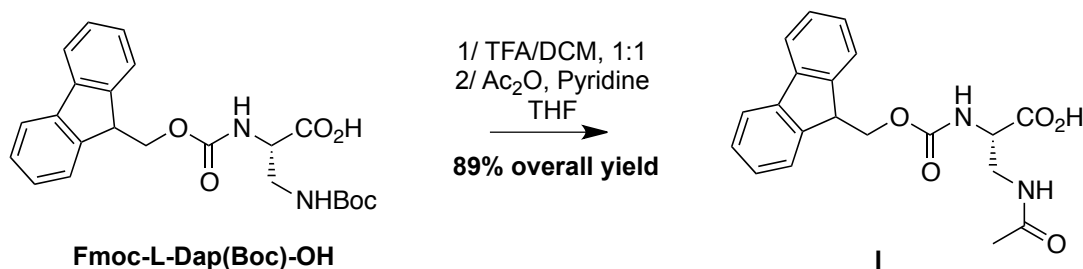
Full models for SFTI-1, **Ya**, **Yb**, **Yb(R)**, **Yc(R)** and trypsin or plasmin were generated by the automated comparative modeling tool MODELER 9.0 (Fiser and Sali, 2003) (DS Modeling 4.5;

Accelrys, San Diego, CA) as described previously (Pietrancosta et al, 2012). Models were generated by using the coordinates of a mutant of the Crystal structure of Cormorant (*Phalacrocorax carbo*) trypsin (pdb code: 1SFI) and pasmin (pdb code: 6D36) as templates for peptide-enzyme. The structural quality of the models was assessed according to the MODELER probability density functions as well as Profiles-3D analysis (DS Modeling 4.5). Loops were refined using MODELER. The final selected model was used for docking. The protein-protein docking experiment was performed using protein docking (ZDOCK) module (Chen et al, 2003) (DS Modeling 4.5). Docking was performed without constraints or specific residue selection for trypsin or plasmin-peptide homology models. The obtained poses (2000 per run) were refined using RDOCK module (Li et al, 2003) (DS Modeling 4.5) as previously described (De Gois et al, 2015). All poses were regrouped in several clusters (energy/number/position based) and most significant clusters were selected for interaction studies.

Most of the figures in the introduction were made on biorender website, Discovery Studio docking or Pymol software.

1.2. Peptide Scaffold Synthesis

Fmoc-L-Dap(Ac)-OH I¹

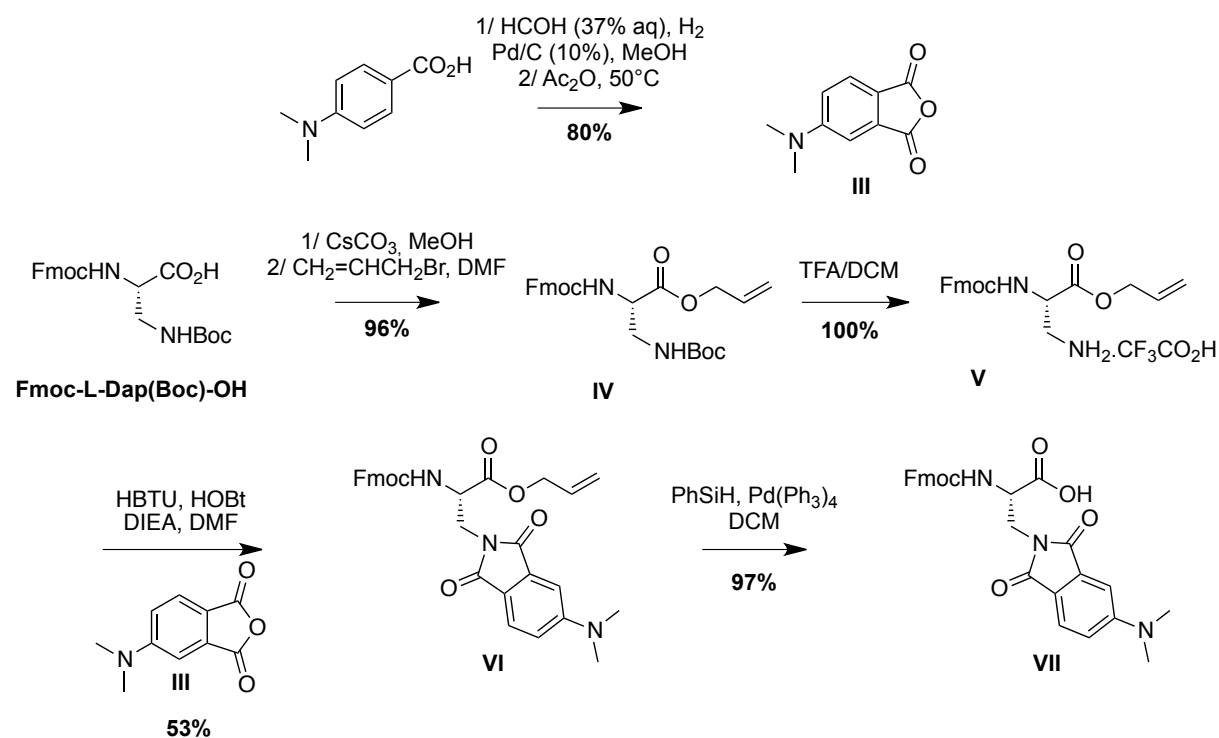


Fmoc-L-Dap(Boc)-OH (5.0 g, 11.72 mmol) was dissolved in a 1:1 DCM/TFA mixture (100 mL). The solution was stirred at room temperature for 2 hours. Volatiles were removed under reduced pressure to afford Fmoc-L-Dap(NH₂.TFA)-OH in quantitative yield which was used in the next step without further purification. Fmoc-L-Dap(NH₂.TFA)-OH (5.16 g, 11.7 mmol) was suspended in THF (58.5 mL). A solution of pyridine (2.83 mL, 35.1 mmol, 3 eq.) and acetic

¹ Machon, U. ; Buchold, C. ; Stempka, M. ; Schirmeister, T. ; Gelhaus, C. ; Leippe, M. ; Gut, J. ; Rosenthal, P. J. ; Kisker, C. ; Leyh, M. ; Schmuck, C. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5662.

anhydride (1.66 mL, 17.6 mmol, 1.5 eq.) in THF (19.5 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 4 hour. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was redissolved in EtOAc (200 mL) and washed successively with 1M aqueous NaHSO₄ (50 mL), H₂O (50 mL) and brine (50 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and filtered before the solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was lyophilized to afford Fmoc-L-Dap(Ac)-OH I as an off-white solid in 89 % yield which was used in SPPS without further purification. ¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃): δ 7.89 (br, 2H, NH), 7.70 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.53 (m, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.24 (m, 2H), 4.35 (m, 3H), 4.13 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.64 (br, 2H), 1.93(s, 3H). ¹³C-NMR (75 MHz; CDCl₃): δ 173.5 (C_{IV}), 172.8 (C_{IV}), 156.8 (C_{IV}), 143.8 (C_{IV}), 143.7 (C_{IV}) 141.4 (C_{IV}), 141.3 (C_{IV}), 127.9 (CH), 127.2 (CH), 125.2 (CH), 120.1 (CH), 67.5 (CH₂), 54.5 (CH), 47.1 (CH), 41.6 (CH₂), 22.7 (CH₃).

Fmoc-L-Dap(4-DAPA)-OH² VII



4-dimethylaminophthalic anhydride III: 4-aminophthalic acid (500 mg, 2.76 mmol) was suspended in MeOH (150 mL). A 37 % aqueous solution of formaldehyde (15 mL) and Pd/C 10 % (200

² Vazquez, M. E.; Rothman, D. M.; Imperiali, B. **2004**, 2 (14), 1965–1966.

mg) were added. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 3 hours, then filtered through a celite pad. The solvent was removed under reduced pressure. The solid was suspended in acetic anhydride (50 mL) and stirred at 50 °C overnight in a round-bottom flask equipped with a water-cooled condenser. The solvent was removed under reduced pressure. The yellow solid was purified by silica gel column chromatography (DCM) to afford the desired product **III** as a yellow solid in 80 % yield. **¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃):** δ 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 3.16 (s, 6H). **¹³C-NMR (75 MHz; CDCl₃):** δ 164.4 (C_{IV}), 163.1 (C_{IV}), 155.4 (C_{IV}), 134.2 (C_{IV}), 127.1 (C_{IV}), 117.3 (CH), 115.8 (CH), 106.5 (CH), 40.7 (CH₃).

Fmoc-L-Dap(Boc)-OAll IV: Fmoc-L-Dap(Boc)-OH (1.0 g, 2.34 mmol) was dissolved in MeOH (33 mL). Cesium carbonate (380 mg, 1.17 mmol, 0.5 eq.) was added. The mixture was stirred at room temperature for 30 min. then the solvent was removed under reduced pressure to dryness. The solid was redissolved in dry DMF (67 mL) and allyl bromide (622 μL, 7.19 mmol, 3.1 eq.) was added. The mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 1 hour. The reaction mixture was poured in 300 mL of a 2 % NaHCO₃ aqueous solution and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were dried over MgSO₄ then filtered before the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH; 99:1) to afford **IV** as a white solid in 96 % yield. **¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃):** δ 7.73 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.59 (br, 2H), 7.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.27 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 6.29 (br, 1H), 5.89 (ddt, *J* = 17.2, 10.4, 5.6 Hz, 1H), 5.31 (d, *J* = 17.2 Hz, 2H), 5.22 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 4.39 (m, 3H), 4.20 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.57 (br, 2H), 1.43 (s, 9H). **¹³C-NMR (75 MHz; CDCl₃):** δ 170.2 (C_{IV}), 162.6 (C_{IV}), 156.4 (C_{IV}), 143.7 (C_{IV}), 141.2 (C_{IV}), 131.5 (CH), 127.6 (CH), 127.0 (CH), 125.1 (CH), 119.9 (CH), 118.8 (CH₂) 79.7 (C_{IV}), 67.1 (CH₂), 66.2 (CH₂), 55.1 (CH), 47.0 (CH₂), 42.0 (CH), 28.2 (CH₃).

Fmoc-L-Dap(4-DAPA)-OAll VI: Compound **IV** (1.05 g, 2.46 mmol) was dissolved in dry DCM (20 mL) and the solution was cooled to 0 °C. TFA (20 mL) was added slowly and the mixture was stirred for 30 minutes at 0°C then 1 hour at room temperature. The solvent was removed under pressure to dryness. The residue was dissolved in dry DMF (30 mL). DIEA (10 mL, excess) and 4-dimethylaminophthalic anhydride (518 mg, 2.71 mmol, 1.1 eq.) were added. The mixture was stirred overnight at room temperature. A solution of HBTU/HOBt (0.2 M each)

in dry DMF (10 mL) was added and the mixture was stirred for 2 more hours at room temperature. 5 mL of the aforementioned solution were added and the mixture was stirred for an additional hour at room temperature. The reaction mixture was poured in 500 mL of a 5 % NaHCO₃ aqueous solution and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were dried over MgSO₄ and filtered before the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (Cyclohexane/EtOAc, 7:3) to afford **VI** as a yellow solid in 53 % yield. ¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃): δ 7.73 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.62-7.55 (m, 3H), 7.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.32-7.27 (m, 2H), 7.03 (dd, *J* = 9.5, 2.3 Hz, 1H), 6.79-6.72 (m, 1H), 6.00-5.87 (m, 2H), 5.38-5.23 (m, 2H), 4.76-4.61 (m, 3H), 4.37 (dd, *J* = 10.0, 6.7 Hz, 1H), 3.05 (s, 6H). ¹³C-NMR (75 MHz; CDCl₃): δ 169.8 (C_{IV}), 169.2 (C_{IV}), 168.6 (C_{IV}), 155.9 (C_{IV}), 154.5 (C_{IV}), 143.8 (C_{IV}), 141.2 (C_{IV}), 134.5 (CH), 131.5 (C_{IV}), 127.7 (CH), 127.1 (CH), 125.5 (CH), 119.9 (CH), 119.2 (CH₂), 117.1 (CH), 114.9 (CH), 67.5 (CH₂), 66.7 (CH₂), 53.8 (CH), 47.2 (CH₂), 40.5 (CH), 38.7 (CH₃).

Fmoc-L-Dap(4-DAPA)-OH VII : Compound **VI** (700 mg, 1.30 mmol) was dissolved in dry DCM (30 mL). Phenylsilane (4.8 mL, 39 mmol, 30 eq.) and Pd(PPh₃)₄ (60 mg, 0.052 mmol, 0.04 eq, ~ 10 w %) were added. The mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 1 hour. The reaction mixture was directly loaded onto a silica gel column chromatography and purified (DCM/MeOH; 95:5) to afford the desired product **VII** as a yellow solid in 97 % yield. ¹H-NMR (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ 7.85 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.38 (td, *J* = 7.4, 3.8 Hz, 2H), 7.28 (dt, *J* = 12.7, 6.6 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 4.23-4.13 (m, 2H), 3.97-3.85 (m, 3H), 3.73 (dd, *J* = 13.7, 10.4 Hz, 1H), 2.93 (s, 6H). ¹³C-NMR (75 MHz; DMSO): δ 168.4 (C_{IV}), 167.9 (C_{IV}), 155.7 (C_{IV}), 153.9 (C_{IV}), 144.1 (C_{IV}), 143.5 (C_{IV}), 140.6 (C_{IV}), 140.5 (C_{IV}), 134.3 (C_{IV}), 127.5 (CH), 127.1 (CH), 127.0 (CH), 125.4 (CH), 125.0 (CH), 124.2 (CH), 120.0 (CH), 114.6 (CH), 105.0 (CH), 65.6 (CH₂), 62.1 (CH₂), 53.9 (CH), 46.6 (CH), 39.9 (CH₃).

General Procedure for Peptides Synthesis

Manual Loading of the first amino acid on 2-Chlorotrityl chloride resin

2-Chlorotrityl chloride resin (1.0 g, 1.6 mmol) was swollen with DCM for 30 min. and a solution of the Fmoc-protected amino acid (0.8 mmol, 0.5 eq.) and DIEA (348 μL, 2 mmol) in DCM (10 mL) was added. The suspension was shaken at room temperature for 3 hours then washed

with a mixture of DCM/MeOH/DIEA (17:2:1, 3 times), DCM (3 times), DMF (3 times), DCM (3 times), and MeOH (3 times) then dried under vacuum. The determination of the amino acid loading was achieved by calculating the ratio between the quantity of amino acid used in millimoles and the mass of dried resin in grams. The loading of the resin was approximately of 0.5 mmol/g.

Manual Solid Phase Peptide Synthesis

The amino acid chain elongation was performed manually starting from 0.25 mmol of resin. The resin was first swollen in DCM for 30 min. and washed with DMF (3 times). The *N*-terminal Fmoc groups was removed by treatment with a 20 % solution of piperidine in DMF. Followed by draining and washing with DMF (3 times). Standard *N*-Fmoc protected amino acids (1.0 mmol, 4 eq.) and HBTU (360 mg, 0.95 mmol, 3.8 eq.) were dissolved in 7 mL of DMF and DIPEA (348 μ L, 2 mmol, 8 eq.) was added. The activated amino acid was then transferred to the resin and couplings were performed for 30 minutes with shaking. For homemade residues, 2 eq. of amino acids (0.5 mmol) and 1.9 eq. HBTU (180 mg, 0.48 mmol) were used and couplings were performed for 60 minutes. For Fmoc-L-Dap(4-DAPA)-OH, HBTU was replaced by HATU (185 mg, 0.48 mmol). After draining and washing with DMF (3 times), completion of the coupling reaction was assessed by a colorimetric test (Kaiser or Chloranil or TNBS). In the case of a positive test, showing incomplete coupling, the coupling was repeated and the colorimetric test performed once more afterwards. The cycle was repeated as many times as required to obtain the desired sequence assembled on the resin. The resin was finally washed 3 times with DMF, DCM and MeOH then dried under vacuum.

Cleavage of the Protected Peptide Fragment from the resin

The linear side chains protected peptide was cleaved from the resin by treatment with a 25 % solution of HFIPA in DCM once for 1 hour and once again for 30 min. The resin was washed with DCM (3 times). The cleavage solutions and rinsing solutions were gathered and the solvents were removed under reduced pressure.

Macrolactamization

The residue obtained from the cleavage step was dissolved in about 300 mL of DMF. HATU (91 mg, 0.24 mmol, 0.95 eq.) and DIPEA (580 μ L, 3.4 mmol, 14 eq.) were added. The mixture

was stirred overnight at room temperature under argon atmosphere. The DMF was removed under reduced pressure to dryness.

Deprotection of Peptides

The residue from the macrolactamization step was treated with about 7 mL of a mixture of TFA/H₂O/TIS/EDT (94:2.5:1:2.5) and stirred at room temperature for 3 hours under argon atmosphere. Volatiles were removed under reduced pressure. The deprotected peptide was precipitated by dropwise addition of the dark oily residue to cooled Et₂O and centrifugation at 8500 rpm for 5 min. The Et₂O was removed and the same operation was repeated twice. The crude product was dissolved in a H₂O/ACN/TFA (90/10/0.1) mixture and lyophilized prior to purification by RP-HPLC. The collected fractions were combined and lyophilized to afford the peptide as a powder.

1a: *cyclo*(CWDap(Ac)^DPPDap(Ac)ADap(Ac)RG)

1a was obtained from the linear sequence CWDap(Ac)^DPPDap(Ac)ADap(Ac)RG according to the general procedure after purification by preparative RP-HPLC (H₂O/MeCN, 0.1 % TFA, 10 to 20 % MeCN in 30 minutes at a flow rate of 20 mL/min) in 14% yield. **Analytical RP-HPLC** (H₂O/MeCN, 0.1 % TFA, 5 to 100 % MeCN in 10 minutes): $t_r = 5.2$ min, 98 % purity. **MALDI-MS**: m/z calculated for C₅₀H₇₃N₁₇O₁₃S 1151.5, Obs. [M+H]⁺ 1152.2; [M+Na]⁺ 1174.2; [M+K]⁺ 1190.2.

1b: *cyclo*(CDap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPPDap(Ac)ACRG)

1b was obtained according to the general procedure after purification by preparative RP-HPLC (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 15 to 25 % MeCN in 30 minutes at a flow rate of 14 mL/min) in 6% yield. **Analytical RP-HPLC** (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN in 10 minutes): $t_r = 5.3$ min, 99 % purity. **MALDI-MS**: m/z calculated for C₅₂H₇₅N₁₈O₁₅S 1223.5, Obs. [MH⁺] 1225.3; [MH⁺-Na] 1247.3; [MH⁺-K] 1263.3.

2a: *cyclo*(CW Dap(Ac)^DPP Dap(Ac)KCRG)

2a was obtained from the linear sequence CWDap(Ac)^DPPDap(Ac)KCRG according to the general procedure after purification by preparative RP-HPLC (H₂O/MeCN, 0.1 % TFA, 10 to 20 % MeCN in 30 minutes at a flow rate of 14 mL/min) in 14% yield. **Analytical RP-HPLC**

(H₂O/MeCN, 0.1 % TFA, 20 to 40 % MeCN in 10 minutes): $t_r = 3.96$ min, 98 % purity. **MALDI-MS**: m/z calculated for C₅₁H₇₇N₁₇O₁₂S₂ 1183.5, Obs. [M+H]⁺ 1184,6; [M+Na]⁺ 1206,6; [M+K]⁺ 1222.6. (spectrum Annex 2)

2b: *cyclo*(Dap(Ac)W C^DPP Dap(Ac)KCRG)

2b was obtained from the linear sequence Dap(Ac)WC^DPPDap(Ac)KCRG according to the general procedure after purification by preparative RP-HPLC (H₂O/MeCN, 0.1 % TFA, 10 to 20 % MeCN in 30 minutes at a flow rate of 14 mL/min) in 14% yield. **Analytical RP-HPLC** (H₂O/MeCN, 0.1 % TFA, 20 to 40 % MeCN in 10 minutes): $t_r = 4.9$ min, 98 % purity. **MALDI-MS**: m/z calculated for C₅₁H₇₇N₁₇O₁₂S₂ 1183.5, Obs. [M+H]⁺ 1184,4; [M+Na]⁺ 1206,4; [M+K]⁺ 1222.3.

2c: *cyclo*(Dap(Ac)W C^DPP Dap(Ac)KCOrnG)

2c was obtained from the linear sequence Dap(Ac)WC^DPPDap(Ac)KCRG according to the general procedure after purification by preparative RP-HPLC (H₂O/MeCN, 0.1 % TFA, 10 to 35 % MeCN in 30 minutes at a flow rate of 14 mL/min) in 10% yield. **Analytical RP-HPLC** (H₂O/MeCN, 0.1 % TFA, 5 to 100 % MeCN in 10 minutes): $t_r = 5$ min, 99 % purity. **MALDI-MS**: m/z calculated for C₅₀H₇₅N₁₅O₁₂S₂ 1141.5, Obs. [M+H]⁺ 1142,3

3b: *cyclo*(CWC^DPPCKCRG)

3b was obtained from the linear sequence CWC^DPPCKCRG according to the general procedure after purification by preparative RP-HPLC (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 15 to 50 % MeCN in 30 minutes at a flow rate of 14 mL/min) in 19% yield. **Analytical RP-HPLC** (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN in 10 minutes): $t_r = 5.9$ min, 98 % purity. **MALDI-MS**: m/z calculated for C₄₇H₇₁N₁₅O₁₀S₄ 1133.4, Obs. [M+H]⁺ 1134,4; [M+Na]⁺ 1156,4; [M+K]⁺ 1172,4.

3c: *cyclo*(CDap(4-DAPA)C^DPPCKCRG)

3c was obtained according to the general procedure after purification by preparative RP-HPLC (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 15 to 45 % MeCN in 30 minutes at a flow rate of 14 mL/min) in 8% yield. **Analytical RP-HPLC** (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 20 to 50 % MeCN in 10 minutes): $t_r =$

7.0 min, 99 % purity. **MALDI-MS:** m/z calculated for C₄₉H₇₄N₁₆O₁₂S₄ [MH⁺] Calc. 1207.46, Obs. 1207.70.

3d: *cyclo*(CWC^DPPCKCOrnG)

3d was obtained according to the general procedure after purification by preparative RP-HPLC (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 15 to 45 % MeCN in 30 minutes at a flow rate of 14 mL/min) in 11% yield. **Analytical RP-HPLC** (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN in 10 minutes): t_r = 5.4 min, 99 % purity. **MALDI-MS:** m/z calculated for C₄₆H₆₉N₁₃O₁₀S₄ [MH⁺] Calc. 1091.4, Obs. 1092.3.

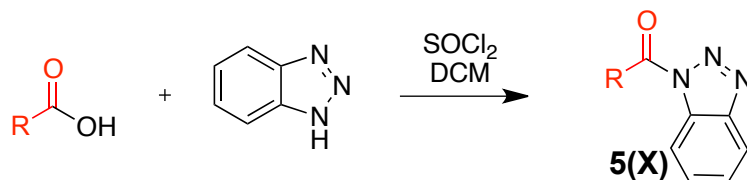
Ya: *cyclo*(^DPIPPKSKYP)

Ya was obtained according to the general procedure after purification by preparative RP-HPLC (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 1 to 5 % MeCN in 30 minutes at a flow rate of 14 mL/min) in 10% yield. **Analytical RP-HPLC** (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN in 10 minutes): t_r = 3,5 min, 99 % purity. **MALDI-MS:** m/z calculated for C₅₀H₇₇N₁₁O₁₁ [MH⁺] Calc. 1007,6, [M+2H]²⁺ Obs. 504.8

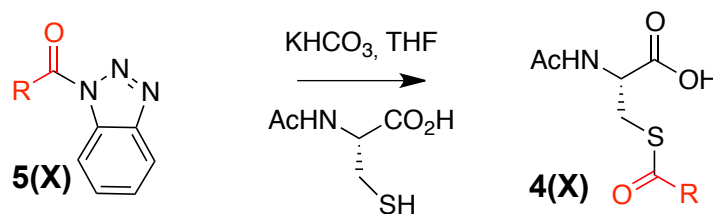
Yb: *cyclo*(^DPIPPKSKYP)

Yb was obtained according to the general procedure after purification by preparative RP-HPLC (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 15 to 45 % MeCN in 30 minutes at a flow rate of 14 mL/min) in 6% yield. **Analytical RP-HPLC** (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN in 10 minutes): t_r = 5.5 min, 99 % purity. **MALDI-MS:** m/z calculated for C₅₀H₇₇N₁₁O₁₁S [MH⁺] Calc. 1039.5, Obs. 1040.6.

1.3. Building Blocks Synthesis

General Procedure A for the preparation of the *N*-acylbenzotriazole intermediates **5(X)**

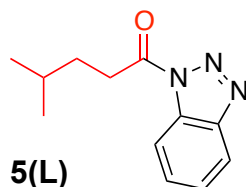
To a solution of 1H-Benzotriazole (4 eq) in DCM (1.25 mL/mmol) was added SOCl₂ (1.1-1.3 eq) at room temperature with stirring. After 30 minutes, the desired carboxylic acid substrate (1.0 eq) was added in one portion and stirring was continued until complete transformation of the carboxylic acid according to TLC monitoring. The white precipitate was filtered off and washed with DCM. The combined organic layer was washed with an aqueous solution of NaOH (1M), dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was washed with pentane and used in the next step without further purification.

General Procedure B for the preparation of *N*-Acetyl-Cysteine thioesters from acylbenzotriazole **5(X)**

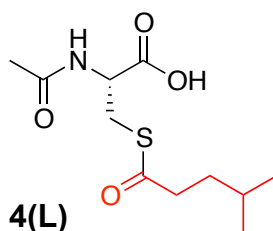
To a solution of *N*-acylbenzotriazole **5(X)** (1.0 eq) in THF (3.33 mL/mmol) were added KHCO₃ (1.1-1.3 eq) and *N*-Acetyl-L-Cysteine (1.0 eq). The mixture was stirred at room temperature until complete transformation of the *N*-Acetyl-Cysteine according to TLC monitoring. For the thermostable substrates, heating until refluxing THF was performed to speed up the reaction rate. The solvent was removed under reduced pressure; the residue was dissolved in water. The mixture was cooled to 0°C and acidified to pH 2 with aqueous HCl 1M. The aqueous phase was then extracted with DCM. The combined organic phases were dried over MgSO₄ and the

solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel.

BB Leucine 4(L)

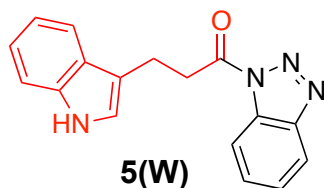


1-(1*H*-benzo[1,2,3]triazol-1-yl)-4-methylpentan-1-one 5(L): **5(L)** was obtained as a white solid in quantitative yield according to the general procedure A, starting from 4-methylvaleric acid (1.3 mL, 10 mmol). **¹H-NMR (300MHz, CDCl₃):** δ 8.27 (dt, $J = 8.1, 0.9$, 1H), 8.09 (dt, $J = 8.1, 1.2$, 1H), 7.62 (ddd, $J = 8.1, 7.1, 0.9$, 1H), 7.48 (ddd, $J = 8.1, 7.1, 1.2$, 1H), 3.41 (m, 2H), 1.74-1.83 (m, 3H), 0.99 (d, $J = 4.2$, 6H); **¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃):** δ 172.7 (C_{IV}), 146.1 (C_{IV}), 131.0 (C_{IV}), 130.2 (CH), 125.9 (CH), 120.0 (CH), 114.3 (CH), 33.5 (CH₂), 33.1 (CH₂), 27.7 (CH), 22.1 (CH₃).

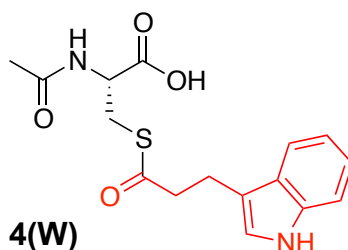


(*R*)-2-acetamido-3-((4-methylpentanoyl)thio)propanoic acid 4L: Treatment of **5L** (651 mg, 3 mmol) according to the general procedure B lead after purification by flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH/AcOH, 97:3:0.2) to **4L** in 53 % yield. **¹H-NMR (300MHz, CD₃OD):** δ 4.58 (dd, $J = 8.1, 4.7$, 1H), 3.51 (dd, $J = 13.9, 4.7$, 1H), 3.14 (dd, $J = 13.9, 8.1$, 1H), 2.59 (m, 2H), 1.96 (s, 3H), 1.53-1.57 (m, 3H), 0.90 (d, $J = 6.6$, 6H); **¹³C-NMR (75MHz, CD₃OD):** δ 200.0 (C_{IV}), 173.2 (C_{IV}), 173.0 (C_{IV}), 53.3 (CH), 42.8 (CH₂), 35.5 (CH₂), 31.1 (CH₂), 28.7 (CH), 22.6 (CH₃), 22.3 (CH₃); **RP-HPLC** (H₂O/MeCN, 0.1 % TFA, 5 to 100 % MeCN in 10 minutes): $t_r = 6.8$ minutes, >99 % purity; **HRMS:** m/z calculated for C₁₁H₁₉NNaO₄S [M+Na]⁺ Calc. m/z 284.0927 Obs. m/z 284.0929; $[\alpha]_D^{20} -19.3$ g⁻¹. mL. dm⁻¹ (c 10, MeOH).

BB Trpytophane 4(W)



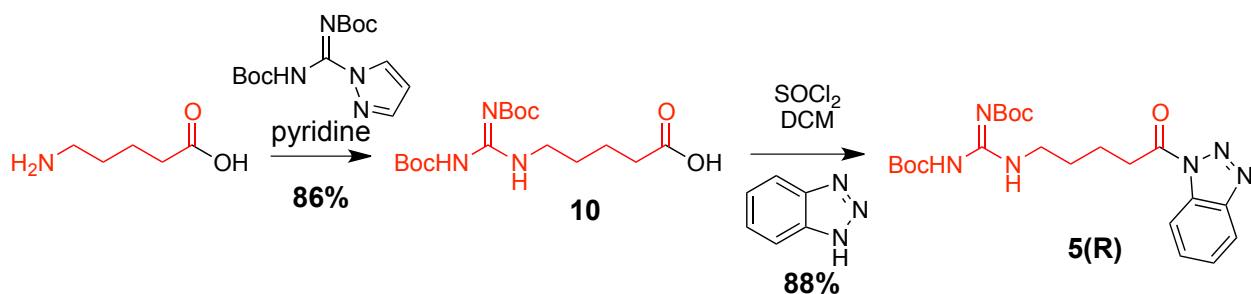
1-(1*H*-benz[1,2,3]triazol-1-yl)-3-(1*H*-indol-3-yl)propan-1-on³ 5(W): 3-indole propionic acid (1.89 g, 10 mmol) was treated according to general procedure A to give **5(W)** as a dark yellow solid in quantitative yield. **¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃)**: δ 8.31 (dt, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H), 8.12 (dt, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H), 8.03 (br, 1H), 7.70 (ddt, *J* = 7.8, 1.3, 0.7 Hz, 1H), 7.65 (ddd, *J* = 8.3, 7.2, 0.9 Hz, 1H), 7.50 (ddd, *J* = 8.3, 7.2, 0.9 Hz, 1H), 7.36 (dt, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H), 7.21 (ddd, *J* = 8.0, 7.0, 1.0 Hz, 1H), 7.17-7.12 (m, 2H), 3.85 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.41 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H); **¹³C-NMR (75 MHz; CDCl₃)**: δ 172.2 (C_{IV}), 146.3 (C_{IV}), 136.4 (C_{IV}), 131.2 (C_{IV}), 130.5 (C_{IV}), 127.2 (CH), 126.2 (CH), 122.3 (CH), 121.9 (CH), 120.2 (CH), 119.6 (CH), 118.8 (CH), 114.6 (C_{IV}), 114.4 (CH), 111.3 (CH), 36.4 (CH₂), 20.2 (CH₂).



(*R*)-3-((3-(1*H*-indol-3-yl)propanoyl)thio)-2-acetamidopropanoic acid 4(W): Treatment of **5(W)** (870 mg, 3 mmol) according to the general procedure B leads after purification by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc/AcOH, 20:80:0.5) to **4(W)** as a light orange solid in 94 % yield. **¹H-NMR (300 MHz; CD₃OD)**: δ 7.48 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.11-6.98 (m, 3H), 4.61 (dd, *J* = 8.0, 4.6 Hz, 1H), 3.51 (dd, *J* = 13.9, 4.6 Hz, 1H), 3.15 (dd, *J* = 13.9, 8.0 Hz, 1H), 3.06 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.90 (s, 3H); **¹³C-NMR (75 MHz; CD₃OD)**: δ 198.6 (C_{IV}), 171.9 (C_{IV}), 136.7 (C_{IV}), 127.0 (C_{IV}), 121.8 (CH), 121.0 (CH), 118.3 (CH), 117.7 (CH), 112.9 (CH), 110.9 (C_{IV}), 52.3 (CH), 44.3 (CH₂), 29.9 (CH₂), 21.0 (CH₂), 20.9 (CH₃); **RP-HPLC**: (H₂O/MeCN, 0.1 % TFA, 5 to 100 % MeCN in 10 minutes): *t_r* = 7.9 min, 99 % purity; **HRMS**: *m/z* calculated for C₁₆H₁₈N₂NaO₄S [M+Na]⁺ Calc. *m/z* 357.0879 Obs. *m/z* 357.0880; [α]_D²⁰ -13.4 g⁻¹. mL. dm⁻¹ (c 10, MeOH).

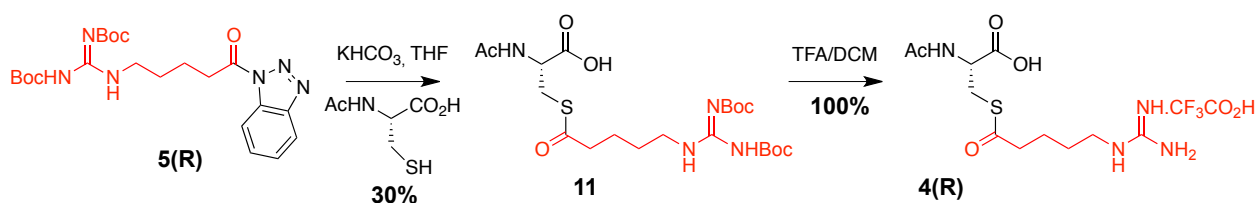
BB Arginine 4(R)

³ Katritzky, A. R.; Khelashvili, L.; Munawar, M. A. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9171.



5-(2,3-bis(*tert*-butoxycarbonyl)guanidino)pentanoic acid⁴ 10: 5-aminopentanoic acid (1.57 g, 13 mmol) and *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamide (4.44 g, 14.3 mmol, 1.1 eq) were suspended in pyridine (40 mL). The mixture was stirred at room temperature for 2 days. NaOH 1M (60 mL) was added to the reaction mixture which was then stirred for 15 min. Aqueous phase was extracted with EtOAc (3x50 mL), acidified to pH 3 with aqueous 1M HCl then re-extracted with EtOAc (3x50 mL). The organic phase was dried over MgSO₄ and filtered before the solvent was removed under vacuum to give **10** as a white solid in 86% yield (4.02 g). ¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃): δ 8.34 (s, 1H), 3.42 (q, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.38 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.72-1.59 (m, 4H), 1.48 (s, 18H); ¹³C-NMR (75 MHz; CDCl₃): δ 178.7 (C_{IV}), 163.6 (C_{IV}), 156.3 (C_{IV}), 153.4 (C_{IV}), 83.2 (C_{IV}), 79.5 (C_{IV}), 40.6 (CH₂), 33.7 (CH₂), 28.6 (CH₂), 28.4 (CH₃), 28.2 (CH₃), 22.1 (CH₂).

1-(1*H*-benz[1,2,3]triazol-1-yl)-5-(2,3-bis(*tert*-butoxycarbonyl)guanidino)pentan-1-one 5(R): Compound **10** (3.65 g, 10 mmol) was treated according to general procedure A to give **5(R)** as a white solid in 79% yield. ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 8.29 (dt, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H), 8.12 (dt, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H), 7.66 (ddd, *J* = 8.3, 7.2, 0.9 Hz, 1H), 7.51 (ddd, *J* = 8.3, 7.2, 0.9 Hz, 1H), 3.55-3.47 (m, 4H), 2.02-1.94 (m, 2H), 1.84-1.75 (m, 2H), 1.50-1.48 (m, 18H); ¹³C-NMR (75 MHz; CDCl₃): δ 172.0 (C_{IV}), 163.5 (C_{IV}), 156.2 (C_{IV}), 153.2 (C_{IV}), 146.1 (C_{IV}), 131.0 (C_{IV}), 130.3 (CH), 126.0 (CH), 120.1(CH)₂, 114.3(CH), 83.0 (C_{IV}), 79.1(C_{IV}), 40.3 (CH₂), 35.0 (CH₂), 28.5 (CH₂), 28.2 (CH₂), 28.0 (CH₂), 21.5(CH₂). (spectra Annex 15)



⁴ Sundermann, T. R.; Benzin, C. V.; Dražić, T.; Klein, C. D. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *176*, 187.

(R)-15-acetamido-6-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2,2-dimethyl-4,12-dioxo-3-oxa-13-thia -5,7-diazahexadec-5-en-16-oic acid 4(R): Treatment of **5(R)** (1,38 g, 3 mmol) according to the general procedure B lead after purification by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc/AcOH, 20:80:0.5) to diBoc-protected derivative **11** partly deprotected (around 25% of Boc-cleavage). The mixture (580 mg, 1.15 mmol) was dissolved in DCM (7 mL) and treated with TFA (5 mL) at room temperature for 2h30. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in water and freeze-dried to afford the desired product **4(R)** as light yellow oil (30% overall yield). **¹H-NMR (300 MHz; CD₃OD)**: δ 4.60 (dd, *J* = 8.5, 4.7 Hz, 1H), 3.55 (dd, *J* = 13.9, 4.7 Hz, 1H), 3.18 (t, *J* = 13.7 Hz, 2H), 3.09 (dd, *J* = 13.9, 8.5 Hz, 1H), 2.65 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.97 (s, 3H), 1.77-1.56 (m, 4H); **¹³C-NMR (75 MHz; CD₃OD)**: δ 199.6 (C_{IV}), 173.3 (C_{IV}), 173.1 (C_{IV}), 157.2 (C_{IV}), 53.2 (CH), 43.9 (CH₂), 42.0 (CH₂), 31.3 (CH₂), 29.0 (CH₂), 23.6 (CH₂), 22.4 (CH₂); **RP-HPLC**: (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 40% MeCN in 10 minutes): *t_r* = 6.2 min, 99% purity; **HRMS**: *m/z* calculated for C₁₁H₂₁N₄O₄S [M+H]⁺ Calc. *m/z* 305.1278 Obs. *m/z* 305.1280; [α]_D²⁰ -18.7 g⁻¹. mL. dm⁻¹ (c 10, MeOH).

1.4. Dynamic Combinatorial Chemistry

Preparation of a 100 mM Phosphate Buffer, 10 mM TCEP, 1% TWEEN-20

In a 100 mL RBF containing a stir bar and 40 mL of water were added successively: 693 mg of Na₂HPO₄·12H₂O, 417 mg of KH₂PO₄ and 143 mg of TCEP. The pH was adjusted to 7, 7.3 or 7.5 with 1M NaOH solution, then 500 μL of TWEEN-20 were added and the volume was adjusted with distilled water at 50 mL before degazing the solution for 15 min.

Generation of the dynamic combinatorial library

BBs stock solutions of 50 mM and peptides stock solutions at 10 mM concentrations were prepared in one of the buffers described above.

The library was generated by mixing 10 μL of the peptide stock solution and the appropriate amount of BB stock solutions to reach the desired equivalency to the peptide. The volume is adjusted to 100 μL total with buffer to reach a 1 mM concentration of peptide.

The evolution of the mixture was monitored by collecting 20 μL of the mixture, diluted to 0.2 mM of peptide concentration with 80 μL of a quenching mixture (H₂O/MeCN/TFA; 50:50:0.1)

and finally analyzed by analytical RP-HPLC analysis. An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS or ESI-MS.

1a(F)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(COCH₂Bn)WDap(Ac)^DPP)

The reaction of peptide **1a** with 1, 5 or 10 equiv. of thioester **4(F)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 20 to 60 % MeCN, 15 minutes) and lead to an equilibrium in approximately 8h, 6h and 4h (K'=0,9±0,2). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1a(F)⁶** (t_r = 8.2 min) was obtained with respectively 25, 73 and 90% conversion at equilibrium. **MALDI-MS:** m/z calculated for C₅₉H₈₁N₁₇O₁₄S 1283.6, Obs. [M+H]⁺ 1284.3; [M+H]⁺-H₂O 1302.3; [M+Na]⁺ 1306.3; [M+H]⁺-MeOH 1316.3; [M+K]⁺ 1322.2; [M+Na]⁺-MeOH] 1338.2; [M+K]⁺-MeOH] 1354.2.

The reaction of peptide **1a** with 5 equiv. of thioester **4(F)** according to the general procedure at pH 7, 7.3 or 7.5 followed by RP-HPLC at 280 nm (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 20 to 60 % MeCN, 15 minutes) lead to peptide **1a(F)⁶** (t_r = 8.2 min) with around 90% conversion at equilibrium (K' ≈ 0.8) in respectively 4 and 2 h. The equilibrium was not reached at pH 7.

1a(A)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(COEt)WDap(Ac)^DPP)

Reaction of peptide **1a** with 1,5 and 10 equiv. of thioester **4(A)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1a(A)⁶** (t_r = 5.5 min) was obtained with a conversion of 43, 76 and 83% at equilibrium (24h or 3h, K'=0,5±0,1). **MALDI-MS:** m/z calculated for C₅₃H₇₇N₁₇O₁₄S 1207.6, Obs. [M+H]⁺ 1208.3; 3; [M+Na]⁺ 1230.3; [M+H]⁺-MeOH 1240.3; [M+K]⁺ 1246.3; [M+Na]⁺- MeOH] 1262.3.

1a(V)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(COCH₂iPr)WDap(Ac)^DPP)

Reaction of peptide **1a** with 1,5 and 10 equiv. of thioester **4(V)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1a(V)⁶** (t_r = 5.9 min) was obtained with a conversion of

81, 88 and 93% at equilibrium (24h or 3h, $K'=0,7\pm0,2$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{55}H_{81}N_{17}O_{14}S$ 1235.6, Obs. $[M+H]^+$ 1236.4; $[M+Na]^+$ 1258.4; $[M+K]^+$ 1274.4.

1a(L)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(COCH₂iBu)WDap(Ac)^DPP)

Reaction of peptide **1a** with 1,5 and 10 equiv of thioester **4(L)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1a(L)⁶** ($t_r = 6.2$ min) was obtained with a conversion of 54, 78 and 88% at equilibrium (24h or 3h, $K'=1\pm0,4$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{56}H_{83}N_{17}O_{14}S$ 1249.6, Obs. $[M+H]^+$ 1250.4; $[M+Na]^+$ 1272.3; $[M+K]^+$ 1288.3.

1a(Y)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO(CH₂)₂(4-OH-Ph))WDap(Ac)^DPP)

Reaction of peptide **1a** with 1, 5 and 10 equiv. of thioester **4(Y)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1(aY)⁶** ($t_r = 5.7$ min) was obtained with a conversion of 44, 86 and 89% at equilibrium (4h, $K'=0,9\pm0,1$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{59}H_{81}N_{17}O_{15}S$ 1299.6, Obs. $[M+H]^+$ 1300.2; $[M+Na]^+$ 1322.2; $[M+H]^+-MeOH$ 1332.2; $[M+K]^+$ 1338.1; $[M+Na]^+-MeOH$ 1354.1; $[M+K]^+-MeOH$ 1370.1.

1a(W)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO(CH₂)₂Ind)WDap(Ac)^DPP)

Reaction of peptide **1a** with 1, 5 and 10 equiv. of thioester **4(W)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1a(W)⁶** ($t_r = 6.3$ min) with a conversion of 53, 69 and 85% at equilibrium (4h or 5h, $K'=1,2\pm0,1$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{61}H_{82}N_{18}O_{14}S$ 1322.6, Obs. $[M+H]^+$ 1323.1; $[M+H]^+-H_2O$ 1341.2; $[M+Na]^+$ 1345.2; $[M+H]^+-MeOH$ 1355.1

1a(K)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO(CH₂)₅NH₂)WDap(Ac)^DPP)

Reaction of peptide **1a** with 10 equiv. of thioester **4(K)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1a(K)⁶** ($t_r = 5.1$ min) with a conversion of 49, 85 and 92% at

equilibrium (4h, $K'=1,1\pm 0,1$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{56}H_{84}N_{18}O_{14}S$ 1264.6, Obs. $[M+H]^+$ 1265.1; $[M+Na]^+$ 1287.1; $[M+H]^+-MeOH$ 1297.1; $[M+K]^+$ 1303.1.

1a(R)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO(CH₂)₄Gdm)WDap(Ac)^{DP}P)

Reaction of peptide **1a** with 10 equiv. of thioester **4(R)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. The conversion could not be determined because of an overlap between the signal of the thiol (**1**) and thioester **1a(R)⁶** peptides.

1a(E)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO(CH₂)₃CO₂H)WDap(Ac)^{DP}P)

Reaction of peptide **1a** with 1,5 and 10 equiv. of thioester **4(E)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1a(E)⁶** ($t_r = 5.3$ min) was obtained with a conversion of 53, 83 and 85% at equilibrium (4h, $K'=1,2\pm 0,8$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{55}H_{79}N_{17}O_{16}S$ 1265.6, Obs. $[M+H]^+$ 1266.6.

1a(G)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(COMe)WDap(Ac)^{DP}P)

Reaction of peptide **1a** with 1,5 and 10 equiv. of thioester **4(G)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 10 to 60 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1a(G)⁶** ($t_r = 5.8$ min) was obtained with a conversion of 55, 85 and 90% at equilibrium (4h, $K'=1,2\pm 0,8$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{52}H_{75}N_{17}O_{14}S$ 1193.5, Obs. $[M+H]^+$ 1194.6.

1a(Ai)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO*i*Pr)WDap(Ac)^{DP}P)

Reaction of peptide **1a** with 1,5 and 10 equiv. of thioester **4(Ai)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1a(Ai)⁶** ($t_r = 6.6$ min) was obtained with a conversion

of 60, 85 and 92% at equilibrium (24h, $K'=1,5\pm 0,1$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{54}H_{79}N_{17}O_{14}S$ 1221.6, Obs. $[M+H]^+$ 1222.7.

1a(hA)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(COPr)WDap(Ac)^{DP}

Reaction of peptide **1a** with 1,5 and 10 equiv. of thioester **4(hA)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time ($H_2O/MeCN$, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1a(hA)⁶** ($t_r = 5.3$ min) was obtained with a conversion of 55, 85 and 90% at equilibrium (4h, $K'=1,2\pm 0,3$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{54}H_{79}N_{17}O_{14}S$ 1221.6, Obs. $[M+H]^+$ 1222.8.

1a(tL)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(COCH₂tBu)WDap(Ac)^{DP}

Reaction of peptide **1a** with 1,5 and 10 equiv. of thioester **4(tL)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time ($H_2O/MeCN$, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1a(tL)⁶** ($t_r = 5.9$ min) was obtained with a conversion of <1%, 26 and 35% after 24h of reaction. The equilibrium was not reached. **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{56}H_{83}N_{17}O_{14}S$ 1249.6, Obs. $[M+H]^+$ 1250.6.

1a(pG)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(COCH₂Ph)WDap(Ac)^{DP}

Reaction of peptide **1a** with 1,5 and 10 equiv. of thioester **4(pG)** according to the general procedure at pH 7,5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time ($H_2O/MeCN$, 0.1%TFA, 10 to 60 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1a(pG)⁶** ($t_r = 7,3$ min) was obtained with a conversion of 42, 66 and 78% at equilibrium (4h, $K'=0,4\pm 0,1$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{58}H_{79}N_{17}O_{14}S$ 1269.6, Obs. $[M+H]^+$ 1270.7.

1b(G)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(COMe)Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^{PPP}

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(G)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time ($H_2O/MeCN$, 0.1%TFA, 10 to 70 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1b(G)⁶** ($t_r = 6$ min) was obtained with a conversion of 83% at

equilibrium (3h, $K' = 1$). **MALDI-MS**: m/z calculated for $C_{54}H_{78}N_{18}O_{16}S$ 1266.6, Obs. $[MH^+]$ 1267.3; $[MH^+-Na]$ 1289.3; $[MH^+-K]$ 1305.3.

1b(A)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(COEt)Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPPP)

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(A)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time ($H_2O/MeCN$, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1b(A)⁶** ($t_r = 5.3$ min) was obtained with a conversion of 69% at equilibrium. **MALDI-MS**: m/z calculated for $C_{55}H_{80}N_{18}O_{16}S$ 1280.6, Obs. $[MH^+]$ 1281.6; $[MH^+-Na]$ 1303.5.

1b(Ai)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO~~i~~Pr)Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPPP)

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(Ai)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time ($H_2O/MeCN$, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1b(Ai)⁶** ($t_r = 5.9$ min) was obtained with a conversion of 81% at equilibrium. **MALDI-MS**: m/z calculated for $C_{56}H_{82}N_{18}O_{16}S$ 1294.6, Obs. $[MH^+]$ 1295.7; $[MH^+-Na]$ 1317.5

1b(hA)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(COPr)Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPPP)

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(hA)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time ($H_2O/MeCN$, 0.1%TFA, 10 to 70 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1b(hA)⁶** ($t_r = 6.8$ min) was obtained with a conversion of 78% at equilibrium (3h, $K' = 0.7$). **MALDI-MS**: m/z calculated for $C_{56}H_{83}N_{18}O_{16}S$ 1294.6, Obs. $[MH^+]$ 1295.6; $[MH^+-Na]$ 1317.5; $[MH^+-K]$ 1333.7.

1b(V)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO~~i~~Bu)Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPPP)

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(V)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time ($H_2O/MeCN$, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1b(V)⁶** ($t_r = 6.1$ min) was obtained with a conversion of 82% at

equilibrium (24h, $K' = 0.9$). **MALDI-MS**: m/z calculated for $C_{57}H_{84}N_{18}O_{16}S$ 1308.6, Obs. $[MH^+]$ 1309.6; $[MH^+-Na]$ 1331.6; $[MH^+-K]$ 1347.6.

1b(L)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO(CH₂)₂iPr)Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPPP)

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(L)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 10 to 70 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1b(L)⁶** ($t_r = 7.7$ min) was obtained with a conversion of 84% at equilibrium (3h, $K' = 1$). **MALDI-MS**: m/z calculated for $C_{58}H_{86}N_{18}O_{16}S$ 1322.6, Obs. $[MH^+]$ 1323.5; $[MH^+-Na]$ 1345.5; $[MH^+-K]$ 1361.5.

1b(tL)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(COCH₂tBu)Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPPP)

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(tL)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1b(tL)⁶** ($t_r = 6.4$ min) was obtained with a conversion of 56% at equilibrium (72h, $K' = 0.2$). **MALDI-MS**: m/z calculated for $C_{58}H_{86}N_{18}O_{16}S$ 1322.6, Obs. $[MH^+]$ 1323.6; $[MH^+-Na]$ 1345.6; $[MH^+-K]$ 1361.6.

1b(pG)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(COCH₂Ph)Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPPP)

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(pG)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1b(pG)⁶** ($t_r = 6.3$ min) was obtained with a conversion of 78% at equilibrium (3h, $K' = 0.7$). **MALDI-MS**: m/z calculated for $C_{60}H_{82}N_{18}O_{16}S$ 1342.6, Obs. $[MH^+]$ 1342.6; $[MH^+-Na]$ 1364.6; $[MH^+-K]$ 1380.6.

1b(F)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO(CH₂)₂Ph)Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPPP)

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(F)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1b(F)⁶** ($t_r = 6.6$ min) was obtained with a conversion of 80% at

equilibrium (3h, $K' = 0.5$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{61}H_{84}N_{18}O_{16}S$ 1356.6, Obs. $[MH^+]$ 1357.6

1b(W)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO(CH₂)₂Ind)Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPPP)

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(W)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 10 to 70 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1b(W)⁶** ($t_r = 7.8$ min) was obtained with a conversion of 83% at equilibrium (3h, $K' = 1$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{63}H_{85}N_{19}O_{16}S$ 1395.6, Obs. $[MH^+]$ 1396.5; $[MH^+-Na]$ 1418.4; $[MH^+-K]$ 1434.4.

1b(K)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO(CH₂)₅NH₂)Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPPP)

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(K)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 10 to 70 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1b(K)⁶** ($t_r = 5.6$ min) was obtained with a conversion of 66% at equilibrium (3h, $K' = 0.3$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{58}H_{87}N_{19}O_{16}S$ 1337.6, Obs. $[MH^+]$ 1338.5; $[MH^+-Na]$ 1360.5; $[MH^+-K]$ 1376.4.

1b(R)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO(CH₂)₄Gdm)Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPPP)

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(R)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 10 to 70 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1b(R)⁶** ($t_r = 5.7$ min) was obtained with a conversion of 55% at equilibrium (3h, $K' = 0.1$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{58}H_{87}N_{21}O_{16}S$ 1365.6.

1b(D)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO(CH₂)₄CO₂H)Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPPP)

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(D)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 10 to 70 % MeCN, 10 minutes). A single HPLC peak ($t_r = 5.8$ min) was observed corresponding to a mixture of the thiol **1b** and thioester **1b(D)⁶** peptides, as confirmed by MALDI-MS analysis.

MALDI-MS: m/z calculated for C₅₆H₈₀N₁₈O₁₈S 1324.6, Obs. [MH⁺] 1225.3; [MH⁺-Na] 1247,3; [MH⁺-K] 1263.2.

1b(E)⁶: *cyclo*(Dap(Ac)ADap(Ac)RGC(CO(CH₂)₃CO₂H) Dap(4-DAPA)Dap(Ac)^DPP)

Reaction of peptide **1b** with 5 equiv. of thioester **4(E)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 10 to 70 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **1b(E)⁶** (t_r = 6 min) was obtained with a conversion of 83% at equilibrium (3h, K' = 0.7). **MALDI-MS:** m/z calculated for C₅₇H₈₂N₁₈O₁₈S 1338.6, Obs. [MH⁺] 1339.3; [MH⁺-Na] 1361.3.

Yb(R)⁶: *cyclo*(^DPPIPPKSKYP(CO(CH₂)₄Gdm))

Reaction of peptide **Yb** with 5 equiv. of thioester **4(R)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **Yb(R)⁶** (t_r = 5,1 min) was obtained with a conversion of 61% after 10h of reaction (K' = 0.1). **MALDI-MS:** m/z calculated for C₅₆H₈₈N₁₄O₁₂S 1180.6, Obs. [MH⁺] 1181,8.

Yb(E)⁶: *cyclo*(^DPPIPPKSKYP(CO(CH₂)₃CO₂H))

Reaction of peptide **Yb** with 5 equiv. of thioester **4(E)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS..The conversion could not be determined because of an overlap between the signal of the thiol (**1**) and thioester **1a(RE)⁶** peptides. **MALDI-MS:** m/z calculated for C₅₅H₈₃N₁₄O₁₅S 1153.6, Obs. [MH⁺] 1154,8.

Yb(hR)⁶: *cyclo*(^DPPIPPKSKYP(CO(CH₂)₅Gdm))

Reaction of peptide **Yb** with 5 equiv. of thioester **4(hR)** according to the general procedure at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). An analytical amount of each HPLC peak was collected and characterized by MALDI-MS. Peptide **Yb(hR)⁶** (t_r = 5,2 min) was obtained with a conversion of 75% after

10h of reaction ($K' = 0.5$). **MALDI-MS:** m/z calculated for $C_{57}H_{90}N_{14}O_{12}S$ 1194,7 Obs. $[MH^+]$ 1195,8.

Study of the thiol to thioester exchange with several thioester

Reaction of peptide **1a** with thioester **4(F)** (0,125 equiv.), **4(Y)** (0,125 equiv.), **4(K)** (5 equiv.), **4(E)** (0,125 equiv.), **4(A)** (0,125 equiv.), **4(hR)** (0,125 equiv.), **4(W)** (0,125 equiv.), **4(G)** (0,125 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5, was followed by RP-HPLC at 280 nm over time ($H_2O/MeCN$, 0.1%TFA, 10 to 60 % MeCN, 10 minutes), leading to a dynamic mixture of peptide **1a(K)⁶** ($t_r = 5.5$ min, 3%), **1a** ($t_r = 5.7$ min, 34%), **1a(hR)⁶** ($t_r = 5.8$ min) and **1a(G)⁶** ($t_r = 5.8$ min) coeluted and are present at 9%, **1a(E)⁶** ($t_r = 5.9$ min, 17%) **1a(A)⁶** ($t_r = 6.2$ min, 17%) **1a(Y)⁶** ($t_r = 6.7$ min, 5%), **1a(F)⁶** ($t_r = 7.8$ min, 1%) and **1a(W)⁶** ($t_r = 7.9$ min, 13%) at equilibrium.

Reaction of peptide **Yb** with thioester **4(R)** (2,5 equiv.) and **4(A)** (2,5 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5, was followed by RP-HPLC at 280 nm over time ($H_2O/MeCN$, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes), leading to a dynamic mixture of peptide **Yb(R)⁶** ($t_r = 5.1$ min, 24%), **2Yb** ($t_r = 5,24$ min, 9%), **Yb** ($t_r = 5,5$ min, 16%), **Ya(A)⁶** ($t_r = 5.8$ min, 51%) at equilibrium.

Study of the reaction reversibility through sequential addition of thioesters

Exp1: Reaction of peptide **1a** with 1 equiv. of thioester **4(F)**, **4(K)** and **4(A)** (1 equiv. each) according to the general procedure at pH 7.5 for 16h was followed by RP-HPLC at 280 nm over time ($H_2O/MeCN$, 0.1%TFA, 10 to 60 % MeCN, 10 minutes), leading to a dynamic mixture of peptide **1a(F)⁶** ($t_r = 7.8$ min, 25%), **1a(K)⁶** ($t_r = 5.5$ min, 15%), **1a** ($t_r = 5.7$ min, 27%) and **1a(A)⁶** ($t_r = 6.2$ min, 33%).

Exp 2: Reaction of peptide **1a** with 1 equiv. of thioester **4(F)** (1 equiv.) according to the general procedure at pH 7.5 for 3h was followed by RP-HPLC at 280 nm over time ($H_2O/MeCN$, 0.1%TFA, 10 to 60 % MeCN, 10 minutes), leading to a dynamic mixture of peptide **1a(F)⁶** (25%) and **1a** (27%). BB **4(K)** (1 equiv.) was then introduced leading after 16 additional hours to the formation of the new adduct **1a(K)⁶** (27%). Finally, the third building block after,

respectively **4(A)** (1 equiv.) was added, leading to a dynamic library containing all of the four peptides with: 34% of **1(A)**⁶, 29 % of **1a** (32%), 16% of **1(K)**⁶ and 23% of **1(F)**⁶.

Exp 2: Reaction of peptide **1a** with 1 equiv. of thioester **4(A)** (1 equiv.) according to the general procedure at pH 7.5 for 3h was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 10 to 60 % MeCN, 10 minutes), leading to a dynamic mixture of peptide **1a(A)**⁶ (34%) and **1a** (66%). BB **4(K)** (1 equiv.) was then introduced leading after 16 additional hours to the formation of the new adduct **1a(K)**⁶ (26%). Finally the third building block after, respectively **4(F)** (1 equiv.) was added, leading to a dynamic library containing all of the four peptides with: 29% of **1(A)**⁶, 33 % of **1a** (33%), 16% of **1(K)**⁶ and 23% of **1(F)**⁶.

Multiple thioester exchange

Reaction of peptide **2a** with thioester **4(F)**

Reaction of peptide **2a** with thioester **4(F)** (10 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 20 to 60 % MeCN, 10 minutes). Equilibrium was reached after 6,5h stirring at room temperature.

| t _r (min) | % Aire du peak | m/z (MALDI) | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|----------------------|----------------|---------------------------|--|---|
| 3.75 | 2% | [M+H] ⁺ 1184.7 | 2a | C ₅₁ H ₇₇ N ₁₇ O ₁₂ S ₂ 1183.5 |
| 6.78 | 3% | [M+H] ⁺ 1316.6 | 2a(F) ³ ou 2a(F) ⁶ | C ₆₀ H ₈₇ N ₈₅ O ₁₃ S ₂ 1315.57 |
| 7.62 | 4% | [M+H] ⁺ 1316.8 | 2a(F) ³ or 2a(F) ⁶ | C ₆₀ H ₈₇ N ₈₅ O ₁₃ S ₂ 1315.57 |
| 9.97 | 91% | [M+H] ⁺ 1448.6 | 2a(F) ^{3,6} | C ₆₉ H ₉₃ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ 1447.7 |

Table 1

Reaction of peptide **2a** with thioester **4(L)**

Reaction of peptide **2a** with thioester **4(L)** (2 or 10 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes or 10 to 60 % MeCN, 10 minutes). Equilibrium was reached after 4h stirring at room temperature.

Partie expérimentale

| t _r (min) | % peak Area | MALDI-MS* | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|----------------------|-------------|---------------------------|--|---|
| 4.81 | 3% | [M+H] ⁺ 1184.5 | 2a | C ₅₁ H ₇₇ N ₁₇ O ₁₂ S ₂ MW = 1183.5 |
| 5.1 | 8% | [M+H] ⁺ 1282.6 | 2a(L) ³ or 2a(L) ⁶ | C ₅₇ H ₈₇ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ MW = 1281.6 |
| 5.7 | 9% | [M+H] ⁺ 1282.6 | 2a(L) ³ or 2a(L) ⁶ | C ₅₇ H ₈₇ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ MW = 1281.6 |
| 6.4 | 80% | [M+H] ⁺ 1380.7 | 2a(L) ^{3,6} | C ₆₃ H ₉₇ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ MW = 1379.7 |

| Ratio peptide/4(X) | % peak area | | | |
|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 2a | 2a(L) ₁ | 2a(L) ₁ | 2a(L) ₂ |
| 1:2 | 2 | 5 | 5 | 88 |
| 1:10 | 1 | 2 | 1 | 96 |

Table 2

Reaction of peptide 2a with thioester 4(A)

Reaction of peptide **2a** with thioester **4(A)** (2,10 or 20 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 50 % MeCN, 10 minutes or 10 to 60 % MeCN, 10 minutes). Equilibrium was reached after 4h stirring at room temperature

| t _r (min) | % Pic Area | MALDI-MS* | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|----------------------|------------|---------------------------|--|---|
| 6.6 | 2% | [M+H] ⁺ 1184.6 | 2a | C ₅₁ H ₇₇ N ₁₇ O ₁₂ S ₂ MW = 1183.5 |
| 6.9 | 15% | [M+H] ⁺ 1240.7 | 2a(A) ³ or 2a(A) ⁶ | C ₅₄ H ₈₁ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ MW = 1239.6 |
| 7.1 | 13% | [M+H] ⁺ 1240.7 | 2a(A) ³ or 2a(A) ⁶ | C ₅₄ H ₈₁ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ MW = 1239.6 |
| 7.3 | 70% | [M+H] ⁺ 1296.9 | 2a(A) ^{3,6} | C ₅₇ H ₈₅ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ MW = 1295.6 |

| Ratio peptide/4(X) | % peak area | | | |
|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 2a | 2a(A) ₁ | 2a(A) ₁ | 2a(A) ₂ |
| 1:2 | 3 | 19 | 11 | 67 |
| 1:10 | 2 | 10 | 5 | 83 |
| 1:20 | 1 | 8 | 5 | 85 |

Table 3

Reaction of peptide 2a with thioesters 4(L) and 4(A)

Reaction of peptide **2a** with thioester **4(L)** (1, 5 or 10 equiv.) and thioester **4(A)** (1, 5 or 10 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes or 10 to 60 % MeCN, 10 minutes). Equilibrium was reached after 6.5h stirring at room temperature

| t _r (min) | % peak Area | MALDI-MS* | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|----------------------|-------------|---------------------------|---|--|
| 4.7 | 1% | [M+H] ⁺ 1184.6 | 2a | C ₅₁ H ₇₇ N ₁₇ O ₁₂ S ₂ MW = 1183.5 |
| 4.8 4.9 | 5%** | [M+H] ⁺ 1240.6 | 2a(A) ³ . 2a(A) ⁶ | C ₅₄ H ₈₁ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ MW = 1239.6 |
| 5.1 | 21% | [M+H] ⁺ 1296.6 | 2a(A) ^{3.6} | C ₅₇ H ₈₅ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ MW = 1295.6 |
| 5.3 | 2% | [M+H] ⁺ 1282.6 | 2a(L) ³ . 2a(L) ⁶ | C ₆₀ H ₉₁ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ MW = 1281.6 |
| 5.6 | 28% | [M+H] ⁺ 1338.8 | 2a(A) ⁶ (L) ³ | C ₇₁ H ₁₁₅ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ MW = 1337.6 |
| 5.8 | 19% | [M+H] ⁺ 1338.8 | 2a(A) ³ (L) ⁶ | C ₇₁ H ₁₁₅ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ MW = 1337.6 |
| 6.3 | 20%** | [M+H] ⁺ 1380.7 | 2a(L) ^{3.6} | C ₆₃ H ₉₇ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ MW = 1379.7 |

| Ratio peptide/4(X)/4(X) | % peak area | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---|---|
| | 2a | 2a(A) ₁ | 2a(A) ₁ | 2a(A) ₂ | 2a(L) ₁ | 2a(L) ₁ | 2a(L) ₂ | 2a(A) ³ (L) ⁶ or 2a(A) ⁶ (L) ³ | 2a(A) ⁶ (L) ³ Or 2a(A) ³ (L) ⁶ |
| 1:1:1 | 1 | 6 | 4 | 16 | 5 | 26 | | 16 | 23 |
| 1:5:5 | <1 | 3 | 2 | 17 | 2 | 29 | | 13 | 26 |
| 1:10:10 | <1 | 2 | 1 | 21 | 3 | 2 | 29 | 19 | 22 |

Table 4

Reaction of peptide **2b** with thioester **4(L)**

Reaction of peptide **2b** with thioester **4(L)** (10 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 10 to 60 % MeCN, 10 minutes). Equilibrium was reached after 6h stirring at room temperature

| t _r (min) | % peak Area | MALDI-MS* | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|----------------------|-------------|---------------------------|--|---|
| 6.08 | 5% | [M+H] ⁺ 1282.7 | 2b(L) ³ or 2b(L) ⁶ | C ₅₇ H ₈₇ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ MW = 1281.6 |
| 6.87 | 5% | [M+H] ⁺ 1282.7 | 2b(L) ³ or 2b(L) ⁶ | C ₅₇ H ₈₇ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ MW = 1281.6 |
| 8.37 | 90% | [M+H] ⁺ 1380.7 | 2b(L) ^{3.6} | C ₆₃ H ₉₇ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ MW = 1379.7 |

Table 5

Reaction of peptide 2b with thioester 4(A)

Reaction of peptide **2b** with thioester **4(A)** (2, 10 or 20 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 10 to 60 % MeCN, 10 minutes).

| t _r (min) | % peak Area | MALDI-MS* | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|----------------------|-------------|---------------------------|--|---|
| 7.5 | 7% | [M+H] ⁺ 1240.5 | 2b(A) ³ or 2b(A) ⁶ | C ₅₄ H ₈₁ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ MW = 1239.6 |
| 7.8 | 6% | [M+H] ⁺ 1240.5 | 2b(A) ³ or 2b(A) ⁶ | C ₅₄ H ₈₁ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ MW = 1239.6 |
| 8.3 | 87% | [M+H] ⁺ 1296.6 | 2b(A) ^{3,6} | C ₅₇ H ₈₅ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ MW = 1295.6 |

| Ratio peptide/4(X) | % peak area | | | |
|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 2b | 2b(A) ₁ | 2b(A) ₁ | 2b(A) ₂ |
| 1:2 | 3 | 15 | 13 | 69 |
| 1:10 | 1 | 8 | 6 | 86 |
| 1:20 | 2 | 7 | 5 | 86 |

Table 6

Reaction of peptide 2b with thioester 4(L) and thioester 4(A)

Reaction of peptide **2b** with thioester **4(L)** (1, 5 or 10 equiv.) and thioester **4(A)** (1, 5 or 10 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 20 to 60 % MeCN, 10 minutes). Equilibrium was reached after 6.5h stirring at room temperature.

| t_r (min) | % peak Area | MALDI-MS* | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|-------------|-------------|------------------------------|--|--|
| 4.2 | 3% | [M+H] ⁺ 1240.5 | 2b(A) ³ or 2b(A) ⁶ | C ₅₄ H ₈₁ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ MW = 1239.6 |
| 4.6 | 2% | [M+H] ⁺ 1240.5 | 2b(A) ³ or 2b(A) ⁶ | C ₅₄ H ₈₁ N ₁₇ O ₁₃ S ₂ MW = 1239.6 |
| 5.1 | 20% | [M+H] ⁺ 1296.7 | 2b(A) ^{3.6} | C ₅₇ H ₈₅ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ MW = 1295.6 |
| 5.7 | >2% | [M+H] ⁺ 1282.7 | 2b(L) ³ . 2b(L) ⁶ | C ₆₀ H ₉₁ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ MW = 1281.6 |
| 6.5 | 26% | [M+H] ⁺ 1338.7 | 2b(L) ³ (A) ⁶ | C ₇₁ H ₁₁₅ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ MW = 1337.6 |
| 6.9 | 20% | [M+H] ⁺ 1338.7 | 2b(A) ³ (L) ⁶ | C ₇₁ H ₁₁₅ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ MW = 1337.6 |
| 8.1 | 27% | [M+H] ⁺ 1380.7 | 2b(L) ^{3.6} | C ₆₃ H ₉₇ N ₁₇ O ₁₄ S ₂ MW = 1379.7 |

| Ratio peptide/4(X)/4(X) | % peak area | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---|---|
| | 2b | 2b(A) ₁ | 2b(A) ₁ | 2b(A) ₂ | 2b(L) ₁ | 2b(L) ₁ | 2b(L) ₂ | 2b(A) ³ (L) ⁶ or 2b(A) ⁶ (L) ³ | 2b(A) ⁶ (L) ³ Or 2b(A) ³ (L) ⁶ |
| 1:1:1 | 1 | 5 | 5 | 19 | 3 | 1 | 25 | 12 | 29 |
| 1:5:5 | <1 | 2 | 1 | 22 | 1 | 1 | 30 | 10 | 34 |
| 1:10:10 | <1 | 2 | 2 | 30 | 2 | 2 | 29 | 10 | 25 |

Table 7

Reaction of peptide **2c** with thioester **4(L)** and thioester **4(A)**

Reaction of peptide **2c** with thioester **4(L)** (20 equiv.) and thioester **4(A)** (20 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 20 to 60 % MeCN, 10 minutes). Equilibrium was reached after 6.5h stirring at room temperature.

| t_r (min) | % peak Area | MALDI-MS* | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|-------------|-------------|------------------------------|--|---|
| 4.5 | 2% | [M+H] ⁺ 1240.5 | 2c(A) ³ or 2c(A) ⁸ | C ₅₃ H ₇₉ N ₁₅ O ₁₃ S ₂ MW = 1197.5 |
| 4.9 | 2% | [M+H] ⁺ 1240.5 | 2c(A) ³ or 2c(A) ⁸ | C ₅₃ H ₇₉ N ₁₅ O ₁₃ S ₂ MW = 1197.5 |
| 5.4 | 21% | [M+H] ⁺ 1296.7 | 2c(A) ^{3.8} | C ₅₆ H ₈₃ N ₁₅ O ₁₄ S ₂ MW = 1253.6 |
| 5.8 | 2% | [M+H] ⁺ 1282.7 | 2c(L) ³ . 2c(L) ⁸ | C ₅₆ H ₈₅ N ₁₅ O ₁₃ S ₂ MW = 1239.6 |
| 6.6 | 15% | [M+H] ⁺ 1338.7 | 2c(A) ³ (L) ⁸ | C ₅₉ H ₈₉ N ₁₅ O ₁₄ S ₂ MW = 1295.6 |
| 6.7 | 10% | [M+H] ⁺ 1338.7 | 2c(L) ³ (A) ⁸ | C ₅₉ H ₈₉ N ₁₅ O ₁₄ S ₂ MW = 1295.6 |
| 7.2 | 48% | [M+H] ⁺ 1380.7 | 2c(L) ^{3.8} | C ₆₂ H ₉₅ N ₁₅ O ₁₄ S ₂ MW = 1337.6 |

Table 8

Reaction of peptide 3b with thioester 4(L)

Reaction of peptide **3b** with thioester **4(L)** (10 or 40 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 30 to 80 % MeCN, 15 minutes). Equilibrium was reached after 6h stirring at room temperature.

| t_r (min) | % peak Area | MALDI-MS/ ESI-MS* | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|--------------------------------|-------------|---|--|--|
| 6.2 min 6.4 min 6.7 min | <1%** | [M+2H] ²⁺ 616.7 ^b | 3b(L) ¹ . 3b(L) ³ . 3b(L) ⁶ . 3b(L) ⁸ | C ₅₃ H ₈₁ N ₁₅ O ₁₁ S ₄ MW = 1231.5 |
| 9.1 min 9.4 min | 3%** | [M+H] ⁺ 1329.8 ^a [M+2H] ²⁺ 665.8 ^b | 3b(L) ^{1.3} . 3b(L) ^{1.6} . 3b(L) ^{1.8} . 3b(L) ^{3.6} . 3b(L) ^{3.8} . 3b(L) ^{6.8} | C ₅₉ H ₉₁ N ₁₅ O ₁₂ S ₄ MW = 1329.6 |
| 12 min 12.2 min 12.5 min | 41%** | [M+H] ⁺ 1427.7 ^a [M+2H] ²⁺ 714.8 ^b | 3b(L) ^{1.3.6} . 3b(L) ^{1.3.8} . 3b(L) ^{1.6.8} . 3b(L) ^{3.6.8} | C ₆₅ H ₁₀₁ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ MW = 1427.7 |
| 15.4 min | 55% | [M+H] ⁺ 1525.4 ^a [M+2H] ²⁺ 763.8 ^b | 3b(L) ^{1.3.6.8} | C ₇₂ H ₁₁₅ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ MW = 1525.7 |

Table 9

Reaction of peptide 3b with thioester 4(A)

Reaction of peptide **3b** with thioester **4(A)** (40 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes).

| t _r (min) | % peak Area | ESI-MS* | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|----------------------|-------------|----------------------------|--|---|
| 5.8 | 0.6% | [M+H] ⁺ 1133.9 | 3b | C ₄₇ H ₇₁ N ₁₅ O ₁₀ S ₄ MW = 1133.4 |
| 6.1 6.2 | 10%** | [M+2H] ²⁺ 595.7 | 3b(A) ¹ . 3b(A) ³ . 3b(A) ⁶ . 3b(A) ⁸ | C ₅₀ H ₇₅ N ₁₅ O ₁₁ S ₄ MW = 1189.5 |
| 6.5 | 25%** | [M+2H] ²⁺ 623.7 | 3b(A) ^{1.3} . 3b(A) ^{1.6} . 3b(A) ^{1.8} . 3b(A) ^{3.6} . 3b(A) ^{3.8} . 3b(A) ^{6.8} | C ₅₃ H ₇₉ N ₁₅ O ₁₂ S ₄ MW = 1245.5 |
| 6.8 | 37%** | [M+2H] ²⁺ 651.7 | 3b(A) ^{1.3.6} . 3b(A) ^{1.3.8} . 3b(A) ^{1.6.8} . 3b(A) ^{3.6.8} | C ₅₆ H ₈₃ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ MW = 1301.5 |
| 7.1 | 27% | [M+2H] ²⁺ 679.7 | 3b(A) ^{1.3.6.8} | C ₅₉ H ₈₇ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ MW = 1357.5 |

Table 10

Reaction of peptide 3b with thioester 4(G)

Reaction of peptide **3b** with thioester **4(G)** (40 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 25 to 40 % MeCN, 15 minutes). Equilibrium was reached after 4h stirring at room temperature.

| t _r (min) | % peak Area | MALDI-MS | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|----------------------|-------------|--|--|--|
| 6 min | 2% | | 3b | |
| 8.3 min 9 min | 3% | [MH ⁺] 1176.5 | 3b(G) ¹ . 3b(G) ³ . 3b(G) ⁶ . 3b(G) ⁸ | C ₄₉ H ₇₃ N ₁₅ O ₁₁ S ₄ MW = 1175.5 |
| 9.3 min 9.8 min | 10% | [MH ⁺] 1218.5 [MH ⁺ -Na] 1240.5 [MH ⁺ -K] 1256.5 | 3b(G) ^{1.3} . 3b(G) ^{1.6} . 3b(G) ^{1.8} . 3b(G) ^{3.6} . 3b(G) ^{3.8} . 3b(G) ^{6.8} | C ₅₁ H ₇₅ N ₁₅ O ₁₂ S ₄ MW = 1217.5 |
| 10 min | 25% | [MH ⁺] 1260.4 [MH ⁺ - Na] 1282.3 | 3b(G) ^{1.3.6} . 3b(G) ^{1.3.8} . 3b(G) ^{1.6.8} . 3b(G) ^{3.6.8} | C ₅₃ H ₇₇ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ MW = 1259.5 |
| 10.9 min | 60% | [MH ⁺] 1302.5 | 3b(G) ^{1.3.6.8} | C ₅₅ H ₇₉ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ MW = 1301.5. |

Table 11

Reaction of peptide 3b with thioester 4(W)

Reaction of peptide **3b** with thioester **4(W)** (10 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 30 to 80 % MeCN, 15 minutes). Equilibrium was reached after 7h stirring at room temperature.

| t _r (min) | % peak Area | MALDI-MS | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|---------------------------------|-------------|---------------------------|---|--|
| 6.2 min 6.8 min | 15% | [MH ⁺] 1305.4 | 3b(W) ¹ . 3b(W) ³ . 3b(W) ⁶ . 3b(W) ⁸ | C ₅₈ H ₈₀ N ₁₆ O ₁₁ S ₄ MW = 1304.5 |
| 8.5 min 8.9 min | 13% | [MH ⁺] 1476.5 | 3b(W) ^{1.3} . 3b(W) ^{1.6} . 3b(W) ^{1.8} . 3b(W) ^{3.6} . 3b(W) ^{3.8} . 3b(W) ^{6.8} | C ₆₉ H ₈₉ N ₁₇ O ₁₂ S ₄ MW = 1475.6 |
| 9.9 min 10.1 min 10.3 min | 18% | [MH ⁺] 1647.4 | 3b(W) ^{1.3.6} . 3b(W) ^{1.3.8} . 3b(W) ^{1.6.8} . 3b(W) ^{3.6.8} | C ₈₀ H ₉₈ N ₁₈ O ₁₃ S ₄ M W = 1646.6 |
| 11.4 min | 54% | [MH ⁺] 1818.3 | 3b(W) ^{1.3.6.8} | C ₉₁ H ₁₀₇ N ₁₉ O ₁₄ S ₄ MW = 1817.7 |

*Table 12***Reaction of peptide 3b with thioester 4(L) and thioester 4(A)**

Reaction of peptide **3b** with thioester **4(L)** (20 equiv.) and **4(A)** (20 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 15 minutes).

| t_r (min) | % Peak area | m/z (MALDI/ESI) | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|-------------|-------------|---|---|---|
| 6.8 min | 2%** | [M+2H] ²⁺ 595.7 ^b | 3b(A) ¹ . 3b(A) ³ . 3b(A) ⁶ . 3b(A) ³ . | C ₅₀ H ₇₅ N ₁₅ O ₁₁ S ₄ 1189.5 |
| 7.4 min | 4%** | [M+2H] ²⁺ 623.7 ^b | 3b(A) ^{1,3} . 3b(A) ^{1,6} . 3b(A) ^{1,8} . 3b(A) ^{3,6} . 3b(A) ^{3,8} . 3b(A) ^{6,8} | C ₅₃ H ₇₉ N ₁₅ O ₁₂ S ₄ 1245.5 |
| 8 min | 0.3%** | [M+2H] ²⁺ 651.7 ^b | 3b(A) ^{1,3,6} . 3b(A) ^{1,3,8} . 3b(A) ^{1,6,8} . 3b(A) ^{3,6,8} | C ₅₆ H ₈₃ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ 1301.5 |
| 8.5 min | < 2%** | [M+2H] ²⁺ 679.7 ^b | 3b(A) ^{1,3,6,8} | C ₅₉ H ₈₇ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1357.5 |
| 8.5 min | < 2%** | [M+H] ⁺ 1288.6 ^a | 3b(A) ¹ (L) ³ . 3b(A) ¹ (L) ⁶ . 3b(A) ¹ (L) ⁸ . 3b(A) ³ (L) ⁶ . 3b(A) ³ (L) ⁸ . 3b(A) ⁶ (L) ⁸ . 3b(L) ¹ (A) ³ . 3b(L) ¹ (A) ⁶ . 3b(L) ¹ (A) ⁸ . 3b(L) ³ (A) ⁶ . 3b(L) ³ (A) ⁸ . 3b(L) ⁶ (A) ⁸ | C ₅₆ H ₈₅ N ₁₅ O ₁₂ S ₄ 1287.6 |
| 8.8 min | 5%** | [M+H] ⁺ 1344.6 ^a | 3b(A) ^{1,3} (L) ⁶ . 3b(A) ^{1,3} (L) ⁸ . 3b(A) ^{1,6} (L) ³ . 3b(A) ^{1,6} (L) ⁸ . 3b(A) ^{1,8} (L) ³ . 3b(A) ^{1,8} (L) ⁶ . 3b(A) ^{1,8} (L) ⁸ . 3b(A) ^{3,6} (L) ¹ . 3b(A) ^{3,6} (L) ⁸ . 3b(A) ^{3,8} (L) ¹ . 3b(A) ^{3,8} (L) ⁶ . 3b(A) ^{6,8} (L) ¹ . 3b(A) ^{6,8} (L) ³ | C ₅₉ H ₈₉ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ 1343.6 |
| 9.8 min | < 14%** | [M+2H] ²⁺ 700.8 ^b | 3b(A) ^{3,6,8} (L) ¹ . 3b(A) ^{1,6,8} (L) ³ . 3b(A) ^{1,3,8} (L) ⁶ . 3b(A) ^{1,3,6} (L) ⁸ | C ₆₂ H ₉₃ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1399.6 |
| 10 min | < 14%** | [M+2H] ²⁺ 665.8 ^b | 3b(L) ^{1,3} . 3b(L) ^{1,6} . 3b(L) ^{1,8} . 3b(L) ^{3,6} . 3b(L) ^{3,8} . 3b(L) ^{6,8} | C ₅₉ H ₉₁ N ₁₅ O ₁₂ S ₄ 1329.6 |
| 10.5 min | < 9%** | [M+H] ⁺ 1386.8 ^a | 3b(A) ¹ (L) ^{3,6} . 3b(A) ¹ (L) ^{3,8} . 3b(A) ¹ (L) ^{6,8} . 3b(A) ³ (L) ^{1,6} . 3b(A) ³ (L) ^{1,8} . 3b(A) ³ (L) ^{6,8} . 3b(A) ⁶ (L) ^{1,3} . 3b(A) ⁶ (L) ^{1,8} . 3b(A) ⁶ (L) ^{3,8} . 3b(A) ⁸ (L) ^{1,3} . 3b(A) ⁸ (L) ^{1,6} . 3b(A) ⁸ (L) ^{3,6} | C ₆₂ H ₉₅ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ 1385.6 |
| 10.8 min | > 20%** | [M+2H] ²⁺ 721.8 ^b | 3b(A) ^{1,3} (L) ^{6,8} . 3b(A) ^{1,6} (L) ^{3,8} . 3b(A) ^{1,8} (L) ^{3,6} . 3b(A) ^{3,6} (L) ^{1,8} . 3b(A) ^{3,8} (L) ^{1,6} . 3b(A) ^{6,8} (L) ^{1,6} | C ₆₅ H ₉₉ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1441.6 |
| 11 min | | | | |
| 11.1 min | | | | |
| 11.6 min | 13%** | [M+2H] ²⁺ 714.8 ^b | 3b(L) ^{1,3,6} . 3b(L) ^{1,3,8} . 3b(L) ^{1,6,8} . 3b(L) ^{3,6,8} | C ₆₅ H ₁₀₁ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ 1427.7 |
| 11.8 min | | | | |
| 12 min | 8%** | [M+2H] ²⁺ 742.5 ^b | 3b(A) ¹ (L) ^{3,6,8} . 3b(A) ³ (L) ^{1,6,8} . 3b(A) ⁶ (L) ^{1,3,8} . 3b(A) ⁸ (L) ^{1,3,6} | C ₆₈ H ₁₀₅ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1483.7 |
| 12.3 min | | | | |
| 13.5 min | 6% | [M+H] ⁺ 1525.8 ^a | 3b(L) ^{1,3,6,8} | C ₇₁ H ₁₁₁ N ₁₅ O ₁₄ S ₄ 1525.7 |

Table 13

Reaction of peptide 3c with thioester 4(L)

Reaction of peptide **3c** with thioester **4(L)** (10 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 30 to 80 % MeCN, 15 minutes). Equilibrium was reached after 8h stirring at room temperature.

| t_r (min) | % peak Area | MALDI-MS | Peptides | Molecular formula, Calculated MW |
|-------------------|-------------|---|--|--|
| 8.9 min 9.2 min | <1% | [MH ⁺] 1403.5 [MH ⁺ -Na] 1425.5 [MH ⁺ -K] 1441.5 | 3c(L) ^{1,3} , 3c(L) ^{1,6} , 3c(L) ^{1,8} , 3c(L) ^{3,6} , 3c(L) ^{3,8} , 3c(L) ^{6,8} | C ₆₁ H ₉₄ N ₁₆ O ₁₄ S ₄ MW = 1402.6 |
| 11.9 min 12.1 min | 45% | [MH ⁺] 1501.6 [MH ⁺ -Na] 1523.6 [MH ⁺ -K] 1539.5 | 3c(L) ^{1,3,6} , 3c(L) ^{1,3,8} , 3c(L) ^{1,6,8} , 3c(L) ^{3,6,8} | C ₆₈ H ₁₀₆ N ₁₆ O ₁₅ S ₄ MW = 1500.7 |
| 14.9 min | 51% | [MH ⁺] 1599.7 | 3c(L) ^{1,3,6,8} | C ₇₃ H ₁₁₄ N ₁₆ O ₁₆ S ₄ MW = 1598.7 |

Table 14

Reaction of peptide 3c with thioester 4(W)

Reaction of peptide **3c** with thioester **4(W)** (10 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 30 to 80 % MeCN, 15 minutes). Equilibrium was reached after 8h stirring at room temperature.

| t _r (min) | % peak Area | MALDI-MS | Peptides | Molecular formula, Calculated MW |
|-------------------------------|-------------|--|--|--|
| 8 min 8.2 min 8.3 min | 3% | [MH ⁺] 1549.1 [MH ⁺ -Na] 1571 [MH ⁺ -K] 1587 | 3c(W) ^{1,3} , 3c(W) ^{1,6} , 3c(W) ^{1,8} , 3c(W) ^{3,6} , 3c(W) ^{3,8} , 3c(W) ^{6,8} | C ₇₁ H ₉₂ N ₁₈ O ₁₄ S ₄ MW = 1548.6 |
| 9.5 min 9.6 min 9.8 min | 25% | [MH ⁺] 1720.2 [MH ⁺ -Na] 1743.2 [MH ⁺ -K] 1758.2 | 3c(W) ^{1,3,6} , 3c(W) ^{1,3,8} , 3c(W) ^{1,6,8} , 3c(W) ^{3,6,8} | C ₈₂ H ₁₀₁ N ₁₉ O ₁₅ S ₄ MW = 1719.7 |
| 10.9 min | 72% | [MH ⁺] 1891.3 | 3c(W) ^{1,3,6,8} | C ₉₃ H ₁₁₀ N ₂₀ O ₁₆ S ₄ MW = 1890.7 |

Table 15

Reaction of peptide 3c with thioester 4(K)

Reaction of peptide **3c** with thioester **4(K)** (10 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 415 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 20 to 30 % MeCN, 15 minutes). Equilibrium was reached after 8h stirring at room temperature.

| t _r (min) | % peak Area | MALDI-MS | Peptides | Molecular formula, Calculated MW |
|---|-------------|---------------------------|--|---|
| 5.2 min | 32% | [MH ⁺] 1658.8 | 3c(K) ^{1,3,6,8} | C ₇₃ H ₁₁₈ N ₂₀ O ₁₆ S ₄ MW = 1658.8 |
| 5.2 min 5.9 min 6.3 min 7.9 min | | [MH ⁺] 1546.1 | 3c(K) ^{1,3,6} , 3c(K) ^{1,3,8} , 3c(K) ^{1,6,8} , 3c(K) ^{3,6,8} | C ₆₇ H ₁₀₇ N ₁₉ O ₁₅ S ₄ MW = 1545.7 |
| 6.8 min 7.1 min 7.7 min 8.5 min 9.2 min 10.2 min | 50% | [MH ⁺] 1433.2 | 3c(K) ^{1,3} , 3c(K) ^{1,6} , 3c(K) ^{1,8} , 3c(K) ^{3,6} , 3c(K) ^{3,8} , 3c(K) ^{6,8} | C ₆₁ H ₉₆ N ₁₈ O ₁₄ S ₄ MW = 1432.6 |
| 9.7 min 11.1 min 11.5 min 12.3 min | 18% | [MH ⁺] 1320.3 | 3c(K) ¹ , 3c(K) ³ , 3c(K) ⁶ , 3c(K) ⁸ | C ₅₅ H ₈₅ N ₁₇ O ₁₃ S ₄ MW = 1319.5 |

Table 16

Reaction of peptide 3d with thioester 4(A) et 4(L)

Reaction of peptide **3d** with thioester **4(A)** (20 equiv.) and thioester **4(L)** (20 equiv.) according to the general procedure, at pH 7.5 was followed by RP-HPLC at 280 nm over time (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 15 minutes). Equilibrium was reached after 8h stirring at room temperature.

| t, (min) | % Peak area | MALDI-MS/ ESI-MS | Peptides | Molecular formula. Calculated MW |
|--------------------------------|-------------|---------------------------|--|---|
| 8.9 min | 13% | [M+H] ⁺ 1316.5 | 3d(A) ^{1.3.6.8} | C ₅₈ H ₈₅ N ₁₃ O ₁₄ S ₄ 1315.5 |
| 9.5 min 9.7 min | 2% | [M+H] ⁺ 1302.6 | 3d(A) ^{1.3} (L) ⁶ . 3d(A) ^{1.3} (L) ⁸ . 3d(A) ^{1.6} (L) ³ . 3d(A) ^{1.6} (L) ⁸ . 3d(A) ^{1.8} (L) ³ . 3d(A) ^{1.8} (L) ⁶ . 3d(A) ^{1.8} (L) ⁶ . 3d(A) ^{3.6} (L) ¹ . 3d(A) ^{3.6} (L) ⁸ . 3d(A) ^{3.8} (L) ¹ . 3d(A) ^{3.8} (L) ⁶ . 3d(A) ^{6.8} (L) ¹ . 3d(A) ^{6.8} (L) ³ | C ₅₈ H ₈₇ N ₁₃ O ₁₃ S ₄ 1301.5 |
| 9.9 min 10 min 10.1 min | 10% | [M+H] ⁺ 1358.6 | 3d(A) ^{3.6.8} (L) ¹ . 3d(A) ^{1.6.8} (L) ³ . 3d(A) ^{1.3.8} (L) ⁶ . 3d(A) ^{1.3.6} (L) ⁸ | C ₆₁ H ₉₁ N ₁₃ O ₁₄ S ₄ 1357.6 |
| 10.6 min 10.7 min | 3% | [M+H] ⁺ 1344.4 | 3d(A) ¹ (L) ^{3.6} . 3d(A) ¹ (L) ^{3.8} . 3d(A) ¹ (L) ^{6.8} . 3d(A) ³ (L) ^{1.6} . 3d(A) ³ (L) ^{1.8} . 3d(A) ³ (L) ^{6.8} . 3d(A) ⁶ (L) ^{1.3} . 3d(A) ⁶ (L) ^{1.8} . 3d(A) ⁶ (L) ^{3.8} . 3d(A) ⁸ (L) ^{1.3} . 3d(A) ⁸ (L) ^{1.6} . 3d(A) ⁸ (L) ^{3.6} | C ₆₁ H ₉₃ N ₁₃ O ₁₃ S ₄ 1343.6 |
| 11 min 11.1 min 11.5 min | 29% | [M+H] ⁺ 1400.3 | 3d(A) ^{1.3} (L) ^{6.8} . 3d(A) ^{1.6} (L) ^{3.8} . 3d(A) ^{1.8} (L) ^{3.6} . 3d(A) ^{3.6} (L) ^{1.8} . 3d(A) ^{3.8} (L) ^{1.6} . 3d(A) ^{6.8} (L) ^{1.6} | C ₆₄ H ₉₇ N ₁₃ O ₁₄ S ₄ 1399.6 |
| 11.9 min | 4% | [M+H] ⁺ 1386.6 | 3d(L) ^{1.3.6} . 3d(L) ^{1.3.8} . 3d(L) ^{1.6.8} . 3d(L) ^{3.6.8} | C ₆₄ H ₉₉ N ₁₅ O ₁₃ S ₄ 1385.6 |
| 12.3 min 12.6 min | 27% | [M+H] ⁺ 1442.7 | 3d(A) ¹ (L) ^{3.6.8} . 3d(A) ³ (L) ^{1.6.8} . 3d(A) ⁶ (L) ^{1.3.8} . 3d(A) ⁸ (L) ^{1.3.6} | C ₆₇ H ₁₀₃ N ₁₃ O ₁₄ S ₄ 1441.7 |
| 13.5 min | 12% | [M+H] ⁺ 1484.4 | 3d(L) ^{1.3.6.8} | C ₇₀ H ₁₀₉ N ₁₃ O ₁₄ S ₄ 1483.7 |

Table 17

2. Trypsin digestion

Fractions isolated from DCC experiment after analytical RP-HPLC and lyophilization were redissolved with 9 μ L ACN and 0 μ L H₂O. The walls of the Eppendorf tubes were carefully washed with this mixture and were stored at -4 °C. Trypsin digestion was performed by diluting 1 μ L with 1 μ L of trypsin solution (1 μ g/ μ L) to a final volume of 10 μ L. The digestion mixtures were incubated at 37 °C for 24h time before MALDI-MS analysis.

3. Enzymology experiments

Plasmin was purchased from Sigma-Aldrich[®] and thrombin, tPA, TMPRSS2 and HAT from R&D System[®]. All the enzyme were purchased in active and mature form. The stocks were stored at -20°C. Substrate Boc-QAR-AMC, Boc-VPR-AMC, Z-GGR-AMC were purchased from Bachem[®].

| Protease | Concentration | Usual buffer | AMC substrate | Concentration |
|------------------|----------------------|---|----------------------|----------------------|
| Plasmine | 6,6 nM | KH ₂ PO ₄ 10 mM, Na ₃ PO ₄ 70 mM, Lysine 100 mM, pH 7,5 | Boc-QAR-↓-AMC | 100 μM |
| tPA | 6,6 nM | Tris 50mM, TWEEN-20 0,01%, pH 8,5 | Boc-GGR-↓-AMC | 100 μM |
| Thrombine | 25 pM | Tris 50mM, CaCl ₂ 10 mM, NaCl 150 mM, Brij-35 0,05% pH 7,5 | Boc-VPR-↓-AMC | 100 μM |
| TMPRSS2 | 9,95 nM | Tris 50mM, NaCl 150, TWEEN-20 0,01%, pH 8 | Boc-QAR-↓-AMC | 200 μM |
| HAT | 5,19 pM | Tris 50mM, Brij-35 0,05% pH 9,5 | Boc-VPR-↓-AMC | 200 μM |
| KLK8 | 0,88 nM | Tris 50mM, Citrate 1M, Brij-35 0,05%, pH 7,4 | Boc-VPR-↓-AMC | 100 μM |

Table 18 - Optimal concentration for kinetic studies of serine proteases used.

Prior to compounds screening, the activity of each enzyme is controlled using a BMG Fluorostar microplate reader (black 96-well plate). The reaction between the protease and its fluorogenic substrate [100 μM] in the appropriate buffer (total reaction volume = 100 μl) is followed for 30 minutes at 37°C or 25°C (HAT, TMPRSS2) using the release of the fluorescent group AMC using the following wavelengths: $\lambda_{ex} = 360$ nm for the excitation and $\lambda_{em} = 460$ nm for the measurement of the emission.

Compounds **Ya** and **Yb** were screen using a BMG Fluorostar microplate reader (black 96-well plate). The protease is pre-incubated for 15 minutes at 37°C or 25°C (HAT, TMPRSS2) with each compound (10, 50, 100, 200 μM) or with a negative control (DMSO or water) in a total volume of 100 μl of the appropriate buffer. The reaction is activated by adding the appropriate fluorogenic substrate [100 μM] and the release of the AMC fluorescent group followed for 30 minutes at 37°C using the following wavelengths: $\lambda_{ex} = 360$ nm for the excitation and $\lambda_{em} = 460$ nm for the measurement of the emission. The percent inhibition is then calculated.

$$\% inhibition = \left(1 - \left(\frac{V_0}{V_i} \right) \right) * 100$$

Where V_0 is the initial rate of the negative control and V_i the initial rate in presence of **Ya** or **Yb**, calculated by the Biolise® software.

The concentration ranges of **Ya** were adjusted from 10 to 250 μ M to inhibitory potency. The inhibitory activity of **Ya** was expressed as IC_{50} (inhibitory concentration giving 50% of inhibition). The values were calculated by fitting the experimental data in the Kaleidagraph® software to:

$$\% inhibition = 100 * \left(1 - \frac{V_i}{V_0} \right) = 100 * \frac{[Ya]_0}{IC50 + [Ya]_0}$$

4. Amplification study

The plasmin activity has been controlled prior to the experiment.

In a reaction between Yb (0,5 mM), 4(R) and 4(A) (2,5 eq each) was added plasmin (660 nM) in the DCC buffer without TCEP (100 μ l total volume). The reaction is agitated during 4 hours at room temperature. A library without plasmin as a negative control has been also made.

After 4h of reaction, 20 μ l of reaction mixtures were neutralized with 80 μ l of H₂O/MeCN, 0.1%TFA and analysed with RP-HPLC at 280 nm (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes).

The remaining reaction mixture is added at the top of a gel exclusion column previously prepared as mentioned by the manufacturer. After a 4 minutes centrifugation at 1000 rpm, the 20 μ l of the filtrate is neutralized with 20 μ l of H₂O/MeCN, 0.1%TFA and analysed with RP-HPLC at 280 nm (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes).

To the top of the same column is added 50 μ l of H₂O and after a 4 minutes centrifugation at 1000 rpm, 20 μ l of the filtrate is analysed with RP-HPLC at 280 nm (H₂O/MeCN, 0.1%TFA, 5 to 100 % MeCN, 10 minutes). The same procedure is repeated again.

All the obtained data were plotted in excel software.

Conception d'inhibiteurs sélectifs de protéases à sérine, impliquées dans les processus inflammatoires, par chimie combinatoire dynamique sur des *scaffolds* peptidiques structurées.

L'identification de molécules hautement sélectives et de forte affinité représente l'objectif ultime de toute recherche thérapeutique. De nombreuses stratégies sont développées à cet effet allant de la conception rationnelle basée sur une connaissance fine du fonctionnement de la cible et la réactivité des composés candidats, les criblages aléatoires de chimiothèques qu'ils soient expérimentaux ou virtuels. Au-delà de ces approches établies en *drug discovery*, la chimie combinatoire dynamique (DCC) s'est révélée un outil puissant et émergent pour la découverte de nouveaux ligands combinant synthèse et criblage en une seule étape. Elle repose sur la réaction réversible entre différentes entités en conditions physiologiques. Il en résulte une bibliothèque combinatoire dynamique où toutes les combinaisons sont représentées et en équilibre les unes avec les autres. La reconnaissance moléculaire entre une cible biologique et un constituant de la librairie déplacera l'équilibre en faveur du ligand qui aura la plus grande affinité pour celle-ci. Ce travail de thèse propose donc d'exploiter la DCC pour la fonctionnalisation de *scaffolds* peptidiques par les chaînes latérales d'acides aminés. Ce manuscrit présente la mise au point de la méthodologie donnant accès à des bibliothèques combinatoires dynamiques de peptides structurés ainsi que la mise en place d'une méthode d'analyse robuste pour l'identification des composés générés. Enfin, la structure *scaffold* sélectionnée a été adaptée pour la sélection des inhibiteurs de la plasmine, protéase à sérine, impliquée dans de nombreuses pathologies à composante inflammatoire. Ces résultats offrent une nouvelle alternative innovante pour l'identification d'inhibiteurs sélectifs en posant les premières bases pour un développement et un élargissement de cette stratégie DCC à d'autres protéases à sérine.

Mots-clés : chimie combinatoire dynamique, peptidomimes, peptides cycliques, spectrométrie de masse, protéases à sérine, inflammation

Design of selective inhibitors of serine proteases, involved in inflammatory processes, by dynamic combinatorial chemistry on structured peptide scaffolds.

The identification of highly selective and high affinity molecules is the ultimate goal of any therapeutic research. Numerous strategies have been developed for this purpose, ranging from rational design based on detailed knowledge of the target functioning and the reactivity of candidate compounds, to random screening of chemical libraries, whether experimental or virtual. Beyond these established drug discovery approaches, dynamic combinatorial chemistry (DCC) has proven to be a powerful and emerging tool for the discovery of new ligands combining synthesis and screening in a single step. It is based on the reversible reaction between different entities under physiological conditions. This results in a dynamic combinatorial library where all combinations are represented and in equilibrium with each other. Molecular recognition between a biological target and a library component will shift the equilibrium in favor of the ligand that will have the greatest affinity for it. This thesis therefore proposes to exploit DCC for the functionalization of peptide scaffolds by amino acid side chains. This manuscript presents the development of the methodology giving access to dynamic combinatorial libraries of structured peptides as well as the establishment of a robust analytical method for the identification of the compounds generated. Finally, the selected scaffold structure was adapted for the selection of inhibitors of plasmin, a serine protease, involved in numerous pathologies with an inflammatory component. These results offer a new innovative alternative for the identification of selective inhibitors by laying the first foundations for the development and extension of this DCC strategy to other serine proteases.

Keywords: dynamic combinatorial chemistry, peptidomimes, cyclic peptides, mass spectrometry, serine proteases, inflammation