



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC)

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits
Environnement (RP2E)

Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire (LCPM)

FRE 3564

Thèse

Présentée par

Cheng DENG

En vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : Génie des Procédés et des Produits

Analyses conformationnelles de nouveaux systèmes organisés biomimétiques

Soutenue publiquement le 8 décembre 2014

Membres du jury:

Président du Jury: Pr. Nicolas BROSSE (LERMAB, NANCY)

Rapporteurs: Pr. Olivier LEQUIN UMR 7203, Université Pierre et
Marrie Curie, Paris

Pr. Christian DAMBLON Université de Liège, Belgique

Examineurs: Dr. Marie-Christine AVERLANT-PETIT (CR,
Directeur de thèse, LCPM, Nancy)

Dr. Guillaume PICKAERT (Co-directeur de thèse,
LCPM, Nancy)

Dr. Arnaud BONDON (CR, UMR6226, Université de
Rennes, Rennes)

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Alain DURAND pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire : laboratoire de chimie physique macromoléculaire, et permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, le docteur *Marie-Christine AVERLANT-PETIT*, pour la confiance que tu m'as témoigné tout au long de mon travail, pour tes conseils scientifiques et personnels. Tu m'as transmis ta rigueur scientifique ainsi que ta méthodologie qui me suivra durant toute ma carrière professionnelle. Tu as également été tout le temps disponible pour répondre à mes questions et tu as été d'une grande efficacité dans la correction de mes divers rapports. Sur tout travailler avec toi aura été un grand honneur et un grand plaisir.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement *Dr. Guillaume PICKAERT* mon Co-directeur de thèse, pour ses multiples conseils, pour le temps qu'il a dédié à la discussion de mes résultats.

Je suis très sensible à l'honneur que me font *Pr. Nicolas BROSSE le président du Jury, Professeur Olivier LEQUIN et Professeur Christian DAMBLON* d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, je les en remercie sincèrement. Je remercie aussi vivement Monsieur *Arnaud BONDON* qui a accepté d'examiner mon travail.

Un merci tout particulier au docteur *Baptiste LEGRAND* pour sa grande contribution à ce projet. Nous avons travaillé ensemble pendant ma première année de thèse. J'ai beaucoup apprécié travailler avec lui et je lui souhaite beaucoup de réussite pour la suite.

Je remercie également tous nos collaborateurs des équipes de *Muriel AMBLARD* et *Monique CALMES* et les équipes de *Ludovic MAILLARD* à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de Montpellier, la collaboration que nous avons menée ensemble aura été une belle réussite.

Un grand merci à docteur *Zhou ZHOU* avec qui j'ai eu le grand plaisir de travailler pendant une partie de ma thèse et qui m'a beaucoup apporté. Je le remercie pour sa grande motivation, pour sa gentillesse et pour sa bonne humeur.

Je remercie vivement *Emmanuel WENGER* du laboratoire de CRM2 pour son amitié et pour le rôle important qu'il a joué pendant ma thèse.

Enfin, mais de tout mon cœur, je remercie à ma chérie *Huili CUI DENG* pour sa tendresse, et mes deux beaux enfants *Victor* et *Emma* pour m'encourager.

Sommaire

LISTE DES ABRÉVIATIONS	3
Chapitre I : INTRODUCTION.....	5
I.1 Protéines et peptides	6
I.1.1 Classification des acides aminés	7
I.1.2 Structure des protéines	8
I.1.2.1 Structure primaire.....	9
I.1.2.2 Structure secondaire	10
I.1.2.2.1 Conformation du squelette peptidique : le plan peptidique et l'angle dièdre ω	11
I.1.2.2.3 Conformation des chaînes latérales.....	12
I.1.3 Les éléments de structure secondaire	12
I.2 Les foldamères pseudopeptidiques	22
I.2.1 Les β -peptides	24
I.2.2 Les γ -peptides	27
Chapitre II : Matériels et Méthodes	28
II.1 Introduction.....	28
II.2 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	31
II.2.1 Le couplage spin-spin et les constantes de couplage vicinal $3J$ (H,H)	31
II.2.2 Effet Overhauser Nucléaire (Effet NOE).....	32
II.2.3 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	33
II.3 La Diffraction des Rayons X (XRD)	35
II.4 La spectroscopie infrarouge (IR).....	36
II.5 Le Dichroïsme Circulaire (CD)	39
II.6 Le protocole de modélisation moléculaire.....	42
Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	44
III.1 Etude structurale du motif ABOC.....	44
III.1.1 Introduction	44
III.1.2 Les formules des oligomères	46
III.1.3 Synthèse des oligomères iPrCO-Ala-(S)-ABOC-Phe-OMe, Z-Ala-(<u>S</u>)-ABOC-Phe-NHiPr et Z-Ala- β -Ala-Phe-NHiPr	48
III.1.4 les structure des tripeptides iPrCO-Ala-(S)-ABOC-Phe-OMe, Z-Ala-(S)-ABOC-Phe-NHiPr et Z-Ala- β -Ala-Phe-NHiPr.....	49

III.1.5 Conclusions et perspectives.....	72
III.2 Etude structurale du motif thiazole	73
III.2.1 Introduction	73
III.2.2 Les formules des oligomères	74
III.2.3 Synthèse des acides γ -aminés-thiazole 6b, 2, 3a et 3b	76
III.2.4 Résultats et discussions	77
III.2.4.1 La structure de 6b (Fmoc- γ -Phe-OBn)	78
III.2.5 Conclusions et perspectives.....	96
III.3 Etude structurale du motif Aza	97
III.3.1 Introduction	97
III.3.2 Formules des oligomères étudiés.....	98
III.3.3 Synthèse des 2 :1-[α /aza]-oligomères linéaires 3a, 3b, 6a et 6b.....	101
III.3.4 Résultats et discussions	103
III.3.5 Conclusion.....	131
Conclusion	133
Annexe 1 : Tableaux de déplacements chimiques des peptides (ppm)	135
Annexe 2 : Articles publiés sur les résultats de la thèse	143

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : résidu acide aminé

AcOEt : acétate d'éthyle

ATR : Single Reflexion Attenuated Total Reflectance

Boc : *tert*-butyloxycarbonyl

Boc₂O : dicarbonate de di-*tert*-butyle

Bz : benzyle

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CD : Dichroïsme circulaire

COSY : CORection SpectroscopY

COSY-DFQ : CORection SpectroscopY-Double Quantum Filtered

DCC : dicyclohexylcarbodiimide

DEAD : diéthylazodicarboxylate

DIPEA : N,N'-diisopropyléthylamine

DMAP : 4,4-diméthylaminopyridine

DMF : N,N'-diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DRX : Diffraction des Rayons X

EDC : 1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)-carbodiimide

equiv. : équivalent

Et : Ethyle

Et₂O : éther diéthylique

EtOH : éthanol

Fmoc : 9-fluorénylméthylèneoxycarbonyl

HATU : *N*-[(diméthylamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5,*b*]pyridin-1-yl-méthylène]-*N*-méthylméthanaminium hexafluorophosphate *N*-oxyde

HBTU : *N*-[(1*H*-benzotriazole-1-yl)(diméthylamino)méthylène]-*N*-méthylmethanaminium hexafluorophosphate *N*-oxyde

HOBt : *N*-hydroxybenzotriazole

HOMO : plus Haute Orbitale Moléculaire Occupée
HRMS (ESI) : High Resolution Mass Spectrometry (ElectroSpray Ionization)
iBu : isobutyl
iPr : isopropyle
IR : infrarouge
Me : méthyle
MeOH : méthanol
NMM : *N*-méthylmorpholine
NOE : Nuclear Overhauser Effect
NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Ph : phényle
p-ether : éther de pétrole
Pht : phtalimide
Piv : pivaloyle
Rdt : rendement
R_f : rapport frontal
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD : Root Mean Square Deviation
ROESY : Rotation frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RT : room temperature
TA : température ambiante
TBTU : tétrafluoroborate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
tBu : *tert*-butyle
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
TLC : Thin Layer Chromatography
TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor
TOCSY : TOtally Correlated Spectroscopy
UV : ultraviolet
Z : benzyloxycarbonyle

Chapitre I : INTRODUCTION

Les peptides et protéines sont des éléments essentiels pour le bon fonctionnement de l'organisme qui possèdent des propriétés variées. Ils exercent des fonctions cruciales dans pratiquement tous les processus biologiques et contrôlent et régulent diverses fonctions physiologiques. La structure tridimensionnelle des peptides et protéines est importante pour les fonctions de la protéine ou du peptide. La formation des structures se compose de l'ensemble de structures secondaires stables telles que des hélices, des feuillets et des coudes. Depuis longtemps, les chimistes s'appliquent à synthétiser les oligomères pour mimer les propriétés structurales des protéines. Un nouveau domaine de recherche est créé par les chimistes : les foldamères. La conception d'oligomères non naturels avec des motifs de repliement prévisibles a rapidement augmenté au cours des quinze dernières années. De nombreux groupes de recherche se sont intéressés à ce domaine qui associe synthèse et études structurales.

Le sujet de cette thèse participe à ce travail ; il s'inscrit dans le domaine des études structurales de cette nouvelle génération d'oligomères, - les foldamères -, construits à partir de mimes pseudopeptidiques.

Dans le premier chapitre de ce rapport de thèse, je ferai tout d'abord un rappel des notions de base concernant les protéines et les structures relatives aux peptides, puis je parlerai des foldamères.

Dans le deuxième chapitre, je présenterai les principales méthodes spectroscopiques utilisées pour caractériser les structures des biomolécules en général, mais surtout des peptides et pseudopeptides. Pour étudier la structure en solution, j'ai choisi les méthodes suivantes : la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie infrarouge (IR) et le dichroïsme circulaire (CD). Les études structurales à l'état cristallin ont été réalisées grâce à des expériences de diffraction des rayons X (XRD).

Dans le troisième chapitre, je présenterai les résultats obtenus sur les trois familles d'oligomères étudiées.

Enfin, je terminerai par la présentation de trois articles publiés pendant ces trois années de thèse.

I.1 Protéines et peptides

Les protéines sont des macromolécules du vivant possédant des propriétés variées. Elles jouent le rôle de catalyseurs, de transporteurs, apportent un support mécanique ou une protection immunitaire, créent le mouvement, transmettent les influx nerveux et contrôlent la croissance et la différenciation.

Les protéines ont été découvertes en 1835 aux Pays-Bas par le chimiste organicien Gerardus Johannes Mulder (1802-1880). En 1957, la première organisation structurale de protéine a été mise en évidence par Kendrew, J.C. et ses collègues.¹

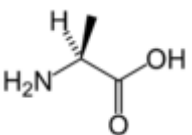
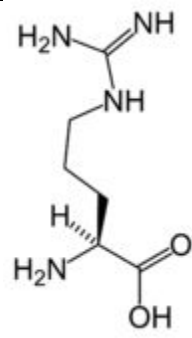
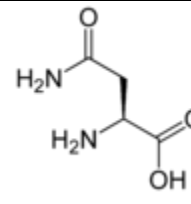
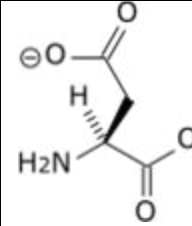
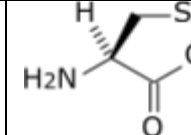
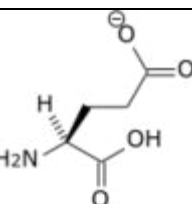
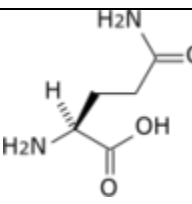
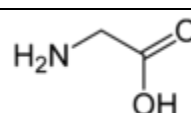
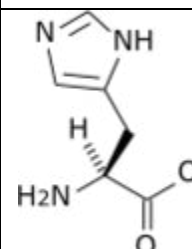
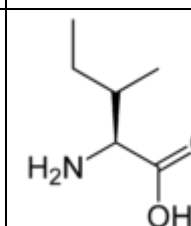
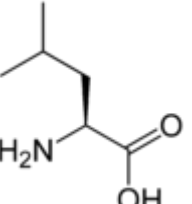
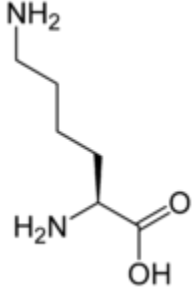
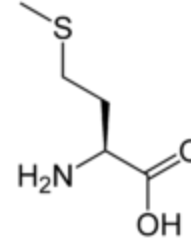
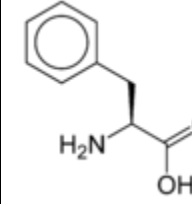
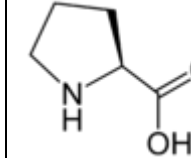
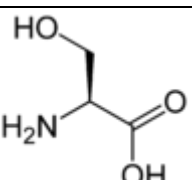
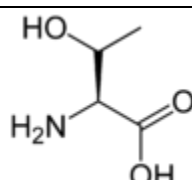
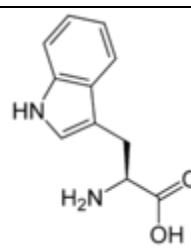
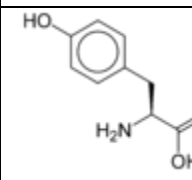
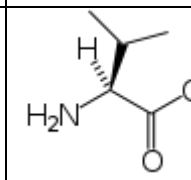
Une protéine est une macromolécule biologique composée d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques (chaîne polypeptidique). En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient au moins 100 acides aminés², et de peptide pour des assemblages de plus petites tailles.

Il existe plusieurs centaines d'acides aminés mais seulement 20 sont rencontrés couramment dans le monde vivant (Tableau I.1). Les acides aminés sont codés *in vivo* par le code génétique et parfois des modifications chimiques sont apportées *in cellulo*.

Tableau I.1 : Formule développée des vingt acides aminés naturels les plus courants.

¹ Kendrew, J. C. *et al.* A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature* **181**, 662–666 (1958).

² Petsko, Gregory A., and Dagmar Ringe. 2008. *Structure et fonction des protéines*. De Boeck Supérieur.

				
L-Alanine	L-Arginine	L-Asparagine	L-Aspartate	L-Cystéine
				
L-Glutamate	L-Glutamine	Glycine	L-Histidine	L-Isoleucine
				
L-Leucine	L-Lysine	L-Méthionine	L-Phénylalanine	L-Proline
				
L-Sérine	L-Thréonine	L-Tryptophane	L-Tyrosine	L-Valine

I.1.1 Classification des acides aminés

A part la glycine, les acides aminés naturels sont des acides L- α -aminés. Dans les publications, il existe de nombreuses façons de classer les acides aminés. La classification donnée par H. Gobin Khorana en six groupes principaux sur la base des caractéristiques chimiques générales de leurs chaînes latérales (groupes R) est la plus couramment utilisée (Tableau I.2).

Tableau I.2 : Classification des acides aminés en fonction des différentes chaînes latérales.

Acides aminés apolaires avec des chaînes latérales aliphatiques		Acides aminés polaires avec des chaînes latérales aliphatiques	
Nom	Abréviation	Nom	Abréviation
Glycine	Gly (G)	Sérine	Ser (S)
Alanine	Ala (A)	Thréonine	Thr (T)
Valine	Val (V)	Cystéine	Cys (C)
Leucine	Leu (L)	Méthionine	Met (M)
Isoleucine	Ile (I)	Asparagine	Asn (N)
Proline	Pro (P)	Glutamine	Gln (Q)
Acides aminés chargés avec des chaînes latérales aliphatiques		Acides aminés avec des chaînes latérales aromatiques	
Nom	Abréviation	Nom	Abréviation
Aspartique acide	Asp (D)	Histidine	His (H)
Glutamique acide	Glu (E)	Phénylalanine	Phe (F)
Lysine	Lys (K)	Tyrosine	Tyr (Y)
Arginine	Arg (R)	Tryptophane	Trp (W)

I.1.2 Structure des protéines

Les protéines sont des polymères linéaires d'acides aminés liés deux-à-deux, par une liaison amide entre le groupe α -carboxyle d'un aminoacide au groupe α -amine d'un autre aminoacide. Cette liaison est aussi appelée liaison peptidique.³ La formation d'un dipeptide à partir de deux aminoacides est accompagnée de la perte d'une molécule d'eau (Figure I.1).

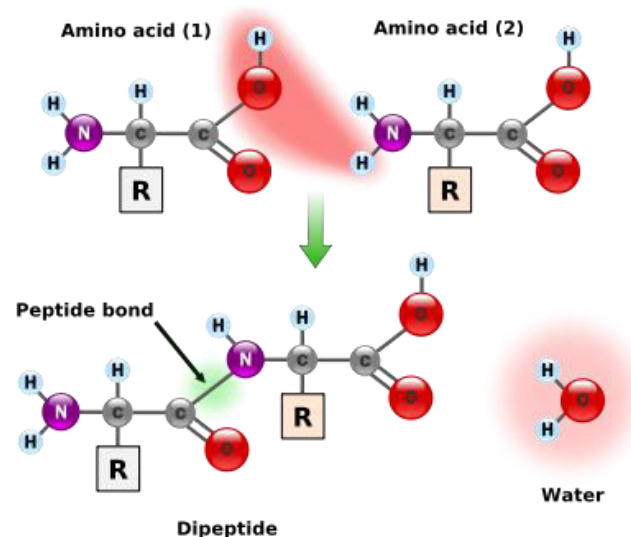


Figure I.1 : Représentation de la liaison peptidique³

En fonction des différentes interactions entre les acides aminés composant les protéines, on distingue 4 niveaux de structure : l'ordre dans lequel les acides aminés s'enchaînent est codé par le génome et constitue la structure primaire de la protéine. La protéine se replie sur elle-même pour former des structures secondaires. Le repliement global tridimensionnel constitue la structure tertiaire. Enfin, pour certaines, l'association de plusieurs sous-unités forme la structure quaternaire.

I.1.2.1 Structure primaire

De nombreux aminoacides sont unis par des liaisons peptidiques pour former une chaîne polypeptidique et chaque unité aminoacide d'un polypeptide est appelée résidu. Une chaîne peptique qui a une polarité en raison de ses différentes extrémités, commence par une extrémité N-terminale et se termine par une extrémité carboxylate libre, l'extrémité C-

³ Berg, Jeremy Mark. 2011. *Biochemistry*. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer. 7th revised international ed edition. New York: Palgrave MacMillan.

terminale. Un exemple est donné figure I.2 avec le pentapeptide Phe-Gly-Leu-Ala-Val, la Phénylalanine est le résidu N-terminal, la Valine est le résidu C-terminal, et le sens de lecture de la structure primaire va de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale³.

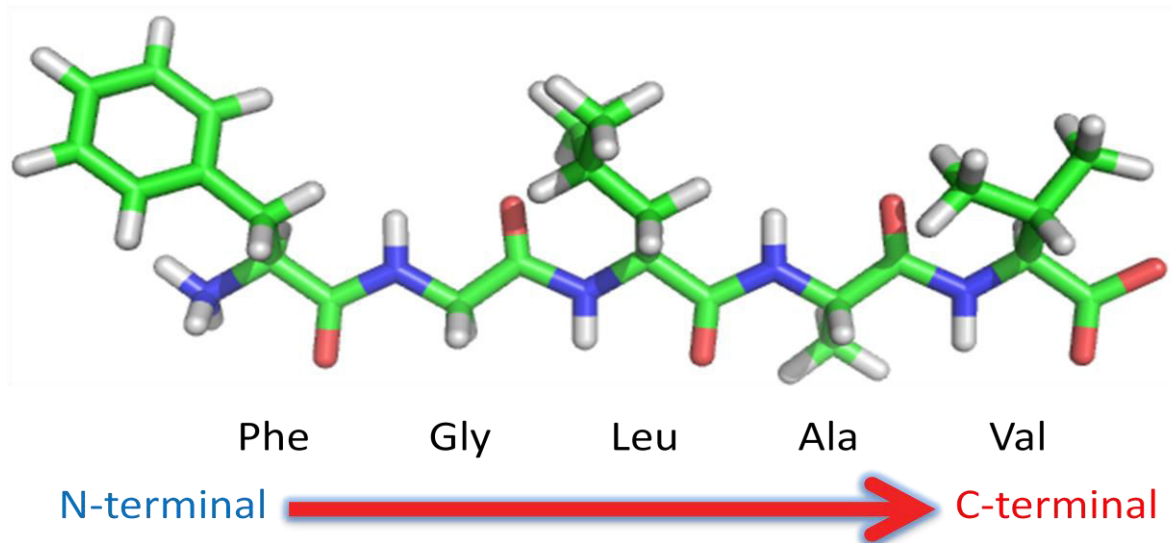


Figure I.2 : La structure primaire du pentapeptide H-Phe-Gly-Leu-Ala-Val-OH.

L'enchaînement des atomes $-(\text{NH}-\text{C}-\text{CO})_n-$ est appelé chaîne principale ou squelette peptidique. Le groupe R, substituant du carbone C est appelé chaîne latérale.

I.1.2.2 Structure secondaire

La structure secondaire de la protéine correspond à la conformation locale de la chaîne principale. La liaison hydrogène entre les groupements amide ($-\text{NH}$) et carbonyle ($-\text{CO}$) du squelette joue le rôle de maintien de la structure secondaire de la protéine. Les chaînes de la protéine ou du polypeptide peuvent se replier en structures régulières telles que les hélices, les feuillets et les coudes. Ces trois principales catégories de structures secondaires contribuent à la formation de la structure finale de la protéine.

Plusieurs méthodes expérimentales comme la résonance magnétique nucléaire, le dichroïsme circulaire et la spectroscopie infrarouge, permettent de déterminer la structure secondaire.

I.1.2.2.1 Conformation du squelette peptidique : le plan peptidique et l'angle dièdre ω

Plusieurs caractères sont importants pour l'examen de la géométrie de la chaîne principale des protéines. En raison de la délocalisation des électrons (Figure I.3.a), la liaison peptidique est essentiellement plane. L'angle dièdre qui la caractérise ω est donc voisin de 180° ou 0° (Figure I.3).

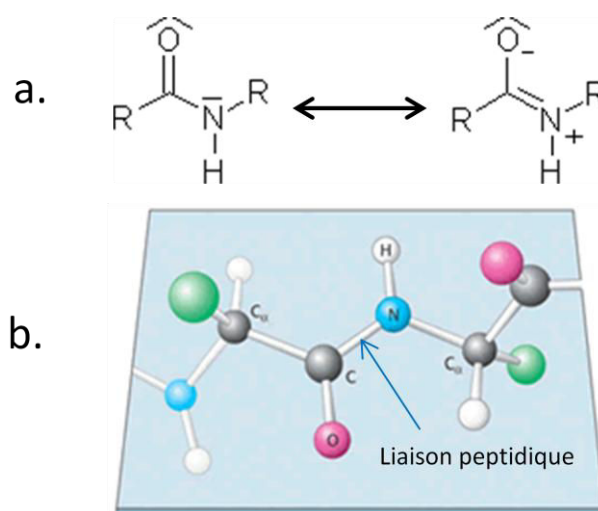


Figure I.3 : a) Structures résonantes de la liaison peptidique ; b) Le plan peptidique³

La nomenclature standard des angles dièdres du squelette du peptide est définie par la commission IUPAC-IUB⁴. Les trois angles dièdres principaux sont représentés dans la figure I.4. L'angle ϕ (phi) est défini comme l'angle de rotation autour de la liaison entre l'azote amide et l'atome de carbone C α . Il comporte les atomes du squelette CO-N-C α -CO. L'angle de rotation autour de la liaison entre l'atome C α et le groupe carbonyle est appelé ψ (psi), il comporte les atomes du squelette N-C α -CO-N. Enfin, l'angle de rotation autour de la liaison entre le groupe carbonyle et le groupe NH amide est appelé ω , comportant des atomes du squelette C α -CO-N-C α . Ainsi, ϕ contrôle la distance CO-CO, ψ contrôle la distance N-N, ω contrôle la distance C α -C α .

⁴ IUPAC-IUB commission on Biochemical Nomenclature. Biochemistry 2, 3471-3479 (1970).

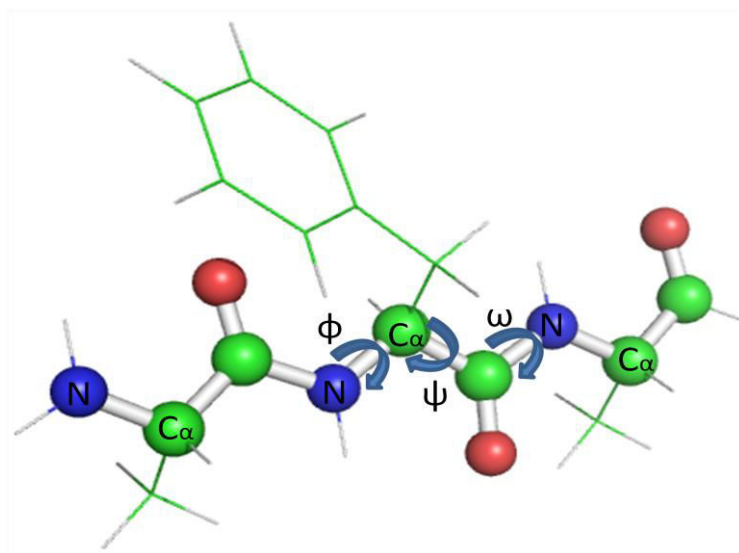


Figure I.4 : Définition des angles dièdres du squelette (Ex : Ala-Phe-Ala)

I.1.2.2.3 Conformation des chaînes latérales

Plusieurs angles dièdres définissent également les conformations des chaînes latérales : χ_1 autour de la liaison $C\alpha-C\beta$, χ_2 autour de la liaison $C\beta-C\gamma$ (ou -O, -S), χ_3 autour de la liaison $C\gamma-C\delta$, χ_4 autour de la liaison $C\delta-C\epsilon$. Tous ces angles varient par convention de -180° à 180° .

I.1.3 Les éléments de structure secondaire

Une chaîne de protéine ou peptide peut adopter différentes conformations caractérisées par les valeurs d'angles dièdres. Elle est stabilisée par des interactions entre des atomes non voisins et qui sont liés par des liaisons faibles, de type liaisons hydrogène par exemple, des interactions hydrophobes ou encore des ponts salins. Grâce à des techniques telles que la RMN, DRX, IR et dichroïsme circulaire, les différents motifs conformationnels mis en évidence sont les hélices, les feuillettes et les coudes.

a. Les hélices

Comme tous les éléments de structures secondaires les hélices sont stabilisées par des liaisons hydrogène. Elles sont caractérisées par les angles dièdres ϕ et ψ (Tableau I.3), le nombre du résidu par tour (n), le nombre d'atomes par unité d'hélice (X) et par son pas ($\text{\AA}$). Comme une hélice est chirale elle est différente de son image dans un miroir. On parle

d'hélice droite si le sens d'enroulement correspond à celui des doigts de la main droite, et d'un hélice gauche pour le sens inverse (Figure I.5). Dans la nature, on trouve majoritairement des hélices droites.

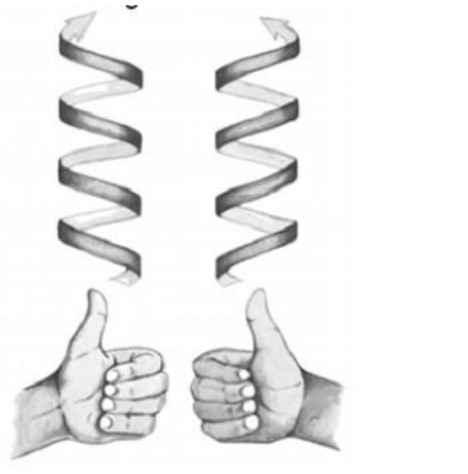


Figure I.5 : Représentation du sens d'enroulement de l'hélice⁵.

Plusieurs types d'hélice existent qui se différencient par le pas et le nombre de résidus par tour. Les plus courantes sont l'hélice- α ; l'hélice- 3_{10} ; l'hélice- π ; elles sont présentées dans la figure I.6. Les caractéristiques de ces hélices sont notées dans le tableau I.3.

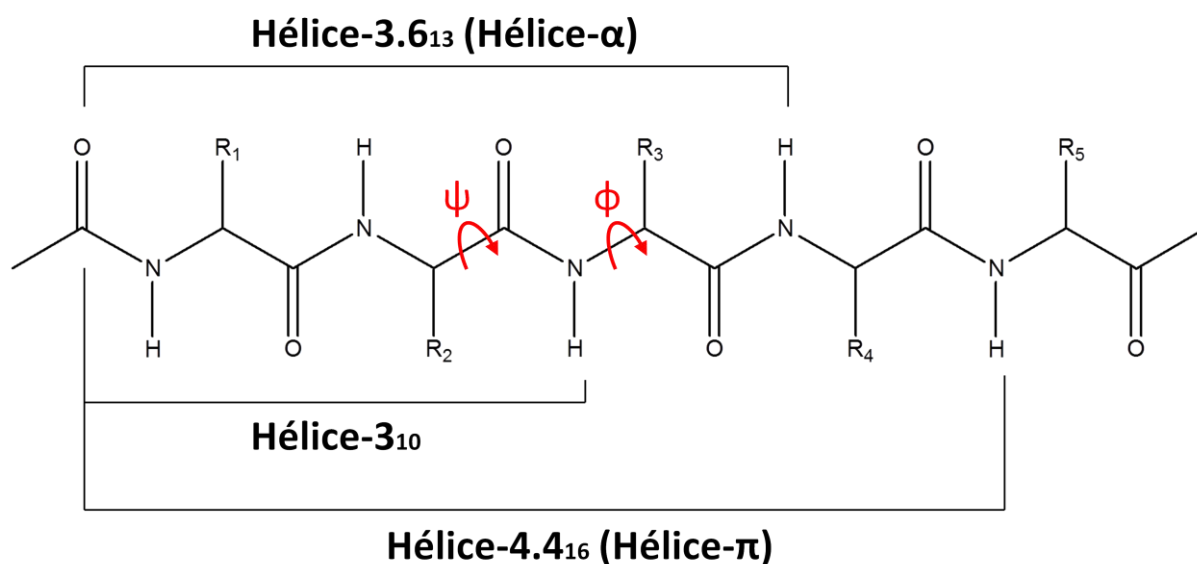


Figure I.6 : Représentation des différentes liaisons hydrogène caractéristiques des différentes hélices (hélice- α ; hélice- 3_{10} ; hélice- π)

⁵ <http://www.fiu.edu/~bch3033/Handouts/Lh4Ch04Prot.pdf>

Tableau I.3 : Les caractéristiques des différents types d'hélices

Type	ϕ (°)	ψ (°)	n	H (Å)	X (atomes)	Liaison H
Hélice- α	-57	-47	3.6	5.4	13	i+4→i
Hélice-3 ₁₀	-49	-26	3.0	6.0	10	i+3→i
Hélice- π	-57	-70	4.4	5.0	16	i+5→i

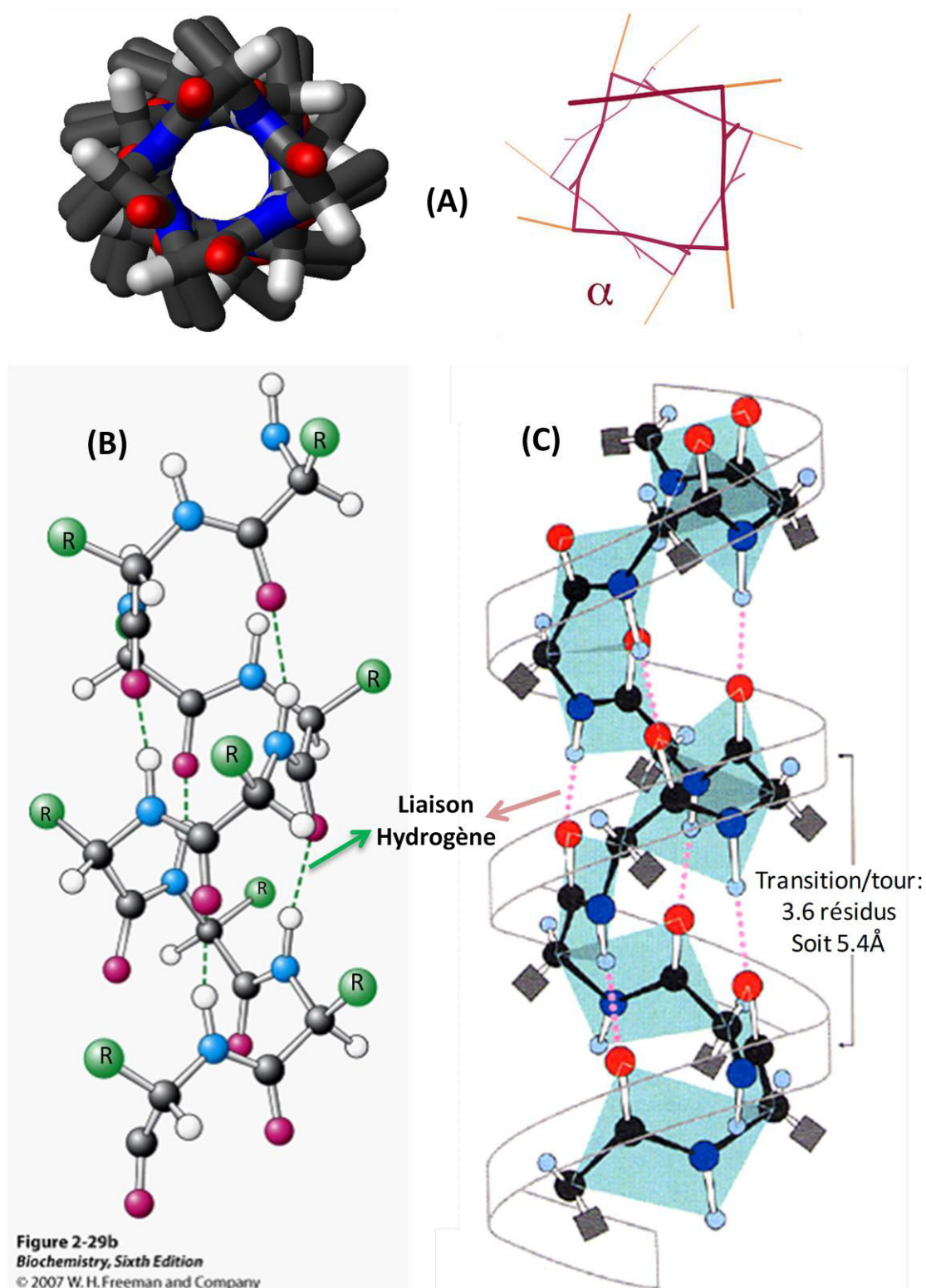


Figure I.7 : Structure de l'hélice α . (A) Vue par-dessus, quatre groupes sont dirigés et espacés d'environ 100° sur le cercle, ce qui correspond à 3.6 acides aminés par tour d'hélice. (B) Représentation d'un modèle éclaté qui décrit les liaisons hydrogène - pointillé vert - entre les groupes NH et CO, le squelette principal est montré en tiges épaisses. (C) Représentation sous forme de ruban montrant les 3.6 résidus par tour, et le pas d'hélice qui est de 5.4 Å.

Plusieurs méthodes spectroscopiques permettent de mettre en évidence les liaisons hydrogène. Par exemple, en spectroscopie infrarouge (FT-IR), plusieurs bandes caractéristiques sont observées. La valeur de vibrations de la bande amide I, qui correspond à la vibration d'élongation des carbonyles (CO) dans l'hélice- α est comprise entre 1650-1658 cm^{-1} , cette gamme peut être élargie à 1630-1670 cm^{-1} (Tableau I.4). Pour la bande amide II qui correspond aux vibrations d'élongation de déformation des NH (δ_{NH}) les valeurs sont comprises dans l'intervalle 1545-1548 cm^{-1} .

Tableau I.4 : Les différentes vibrations participant à la bande amide I d'hélice- α .⁶

Les différentes conditions	Exemple
Homo-polypeptique : la liaison H est plus forte, donc ν diminue	Poly-lysine on a : 1638 cm^{-1}
Taille du peptide : plus il est petit, plus la liaison H est faible, donc plus ν augmente	Plusieurs dizaines du résidu : 1653 cm^{-1} , mais quand on passe de 14 à 4 résidus, la valeur augmente de 1658 à 1668 cm^{-1}
Exposition à l'eau : ν augmente lorsque l'hélice est située dans une zone hydrophobe	L'hélice contacte l'eau : 1644 cm^{-1} L'hélice est peu entourée par l'eau : 1658 cm^{-1}
Cas des coil-coil	La valeur est 1630 cm^{-1}

Les hélices généralement observées dans les protéines sont de tailles différentes, allant de quatre résidus à plus de quarante. Cependant, plus généralement, elles contiennent une dizaine d'acides aminés (environ 3 tours). Si le polypeptide est trop court, il est difficile de former une structure en hélice- α stable en solution.

ii. L'hélice-3₁₀

L'hélice-3₁₀ est également une hélice droite. Elle est stabilisée par une liaison hydrogène, entre le groupement carbonyle (CO) d'un résidu i et le groupement amide (NH) du résidu $i+3$, formant un cycle de 10 atomes. Un tour d'hélice possède 3 résidus, donc l'angle de rotation Ω de ce type d'hélice est environ 120° pour chaque acide aminé (Figure I.8), le pas de l'hélice de 2.0 Å par résidu, Les angles dièdres ϕ et ψ de la chaîne principale sont respectivement d'environ -49° et -26°.

⁶ Rahmelow et al., Anal. Biochem., 1998, 257 (42), 1-11

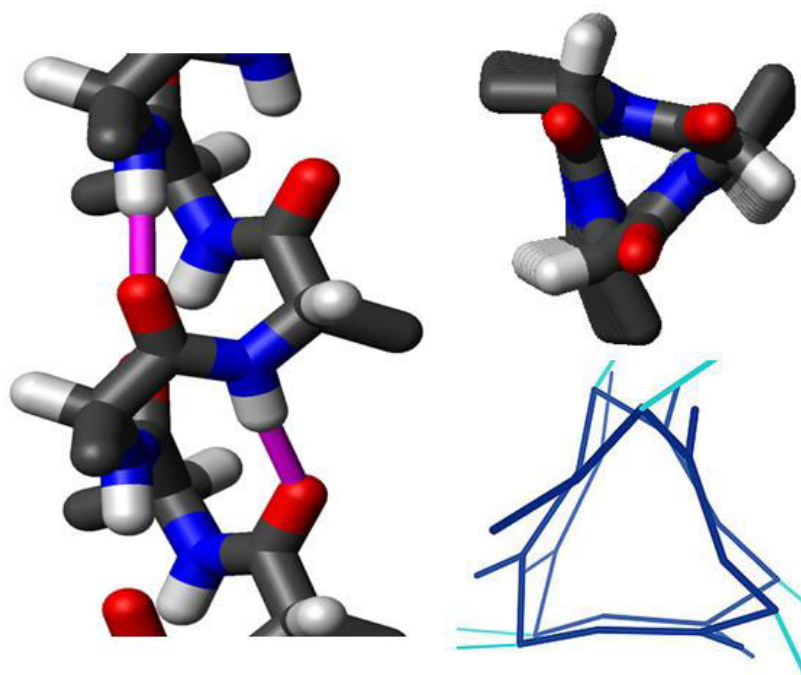


Figure I.8 : La structure d'Hélice 3_{10} : à gauche vue de côté ; à droite vue de dessus, elle est stabilisée par liaison hydrogène en C10 (rose)

iii. L'hélice- π

Une hélice- π est un type de structure secondaire qui est également rencontrée dans les protéines.⁷ L'hélice- π est une hélice droite, elle possède 4,1 résidus par tour, c'est-à-dire qu'entre chaque acide aminé, il existe un angle de 87° , une translation de $1.15\text{\AA}$ par résidu (0.115 nm), une liaison hydrogène se forme entre les résidus i et $i+5$. Une structure d'hélice π possède rarement plus de 7 résidus.

b. Le feuillet β

Le feuillet plissé β est composé d'au moins deux chaînes polypeptides appelées brins β . Dans cette structure, le brin peptidique est en conformation étendue. En conséquence, les valeurs d'angles standards dièdres sont proches de $\Phi = -120^\circ$ et $\psi = +120^\circ$, la distance inter-brin entre les aminoacides adjacents le long d'un brin β est de $3.5\text{\AA}$ (alors qu'elle est de $1.5\text{\AA}$ par résidu pour l'hélice- α). Les interactions entre les brins adjacents d'un feuillet β sont des liaisons hydrogène et les feuillets peuvent être antiparallèles ou parallèles (figure I.9).

⁷ Pauling, L., Corey, R. B. & Branson, H. R. The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *PNAS* **37**, 205–211 (1951).

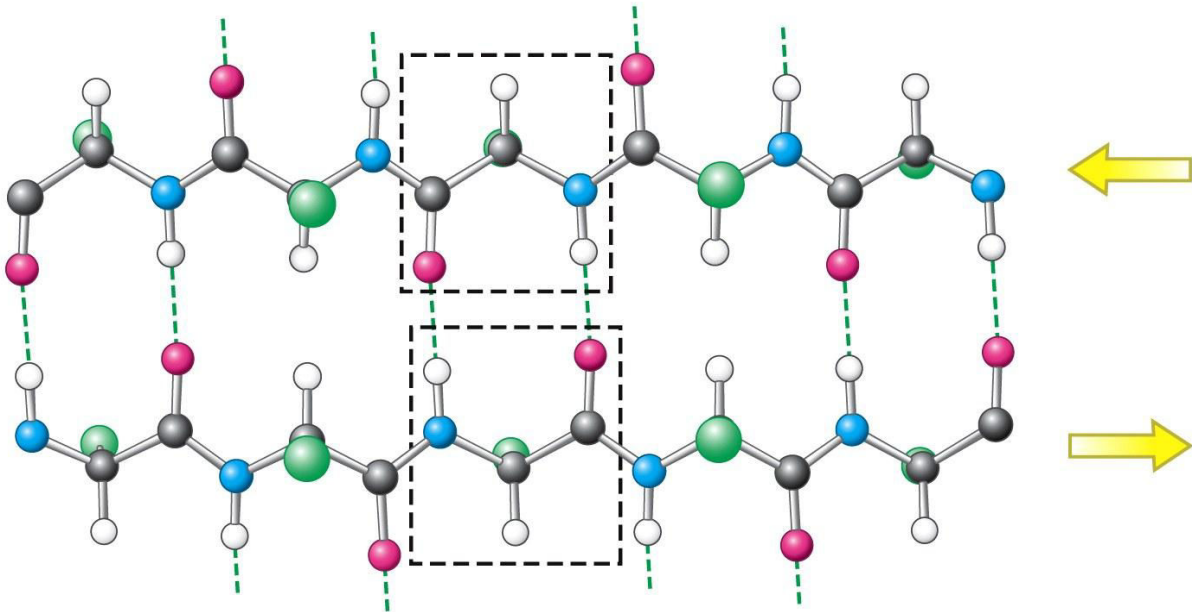


Figure 2.31
Biochemistry, Seventh Edition
 © 2012 W. H. Freeman and Company

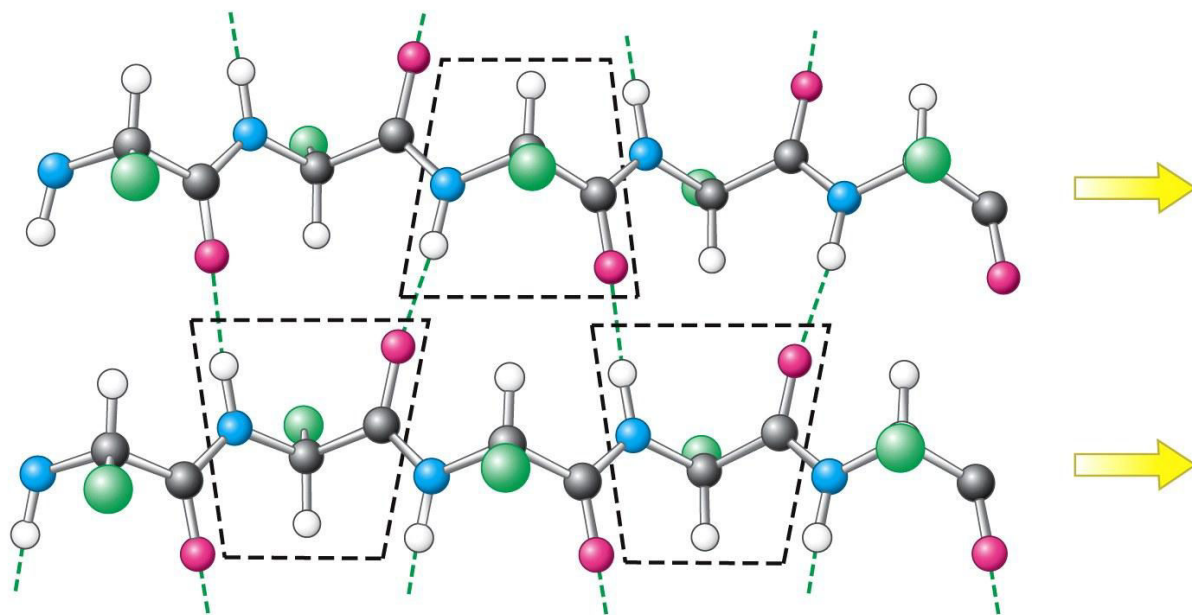


Figure 2.32
Biochemistry, Seventh Edition
 © 2012 W. H. Freeman and Company

Figure I.9 : Deux types de dispositions de feuillets β : feuillets β antiparallèles en haut et feuillets β parallèles en bas. Tous les deux sont stabilisés par des liaisons hydrogène.

Les feuillets β antiparallèles sont stabilisés par des liaisons hydrogène qui forment un pseudocycle à 10 atomes (C10), avec deux bandes CO présents sur le spectre IR. Dans le feuillet β antiparallèle, dont l'orientation des brins successifs est inversée, les angles dièdres caractéristiques sont $\Phi = -139^\circ$ et $\psi = +135^\circ$. Dans le cas des feuillets β parallèles, les liaisons

hydrogène qui stabilisent la structure forment un pseudocycle à douze atomes (C12), avec deux bandes CO présents sur le spectre IR, et les angles dièdres caractéristiques sont $\Phi = -119^\circ$ et $\psi = +113^\circ$. Le plus fréquent entre les deux types de disposition est feuillet β antiparallèles, la chaîne polypeptidique se replie sur elle-même. Une structure de feuillet β peut être antiparallèle, parallèle ou mixte.

c. Les coudes

Les coudes sont des éléments de la structure secondaire qui permettent d'opérer un changement de direction de la chaîne peptidique. Dans la Figure I.10 on voit que le coude est stabilisé par une liaison hydrogène entre les groupes CO du résidu i et NH du résidu $i+3$.

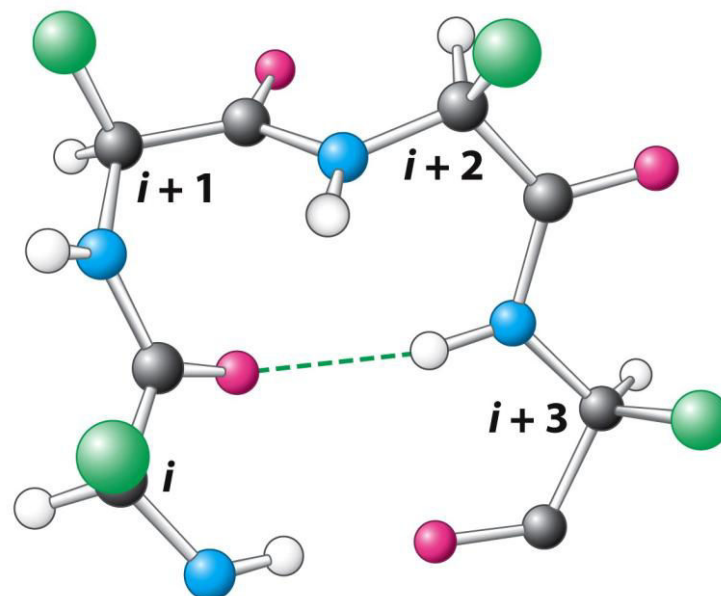


Figure 2.36
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Figure I.10 : Structure d'un coude β inverse stabilisé par une liaison hydrogène (pointillés verts)

Il existe plusieurs types de coudes.^{8,9} Les plus fréquents sont les coudes γ qui sont stabilisés par une liaison hydrogène C7 entre le CO du résidu i et le NH du résidu $i+2$, les coudes β stabilisés par une liaison hydrogène C10 entre le CO du résidu i et le NH du résidu $i+3$. Ces deux types de coudes sont ceux les plus souvent rencontrés dans les polypeptides

⁸ Chou, K.C. 2000. Prediction of tight turns and their types in proteins. *Analytical Biochem* 286: 1-16.

⁹ Chou, K.C. and Blinn, J.R. 1997. Classification and prediction of beta-turn types. *J. Protein Chem.* 16: 575-595.

naturels. En effet, ils sont plus stables, et les autres ont des temps de vie plus courts donc sont plus difficiles à caractériser.

i. Les coudes γ ou C_7

Les coudes γ ont été mis en évidence lors d'études spectroscopiques de dipeptides et de protéines en solution^{10,11,12}. Le premier exemple de coudes γ dans une protéine a été décrit par Matthews en 1977¹³.

Ces coudes γ sont ainsi caractérisés par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire de type $i+2 \rightarrow i$ stabilisant un pseudocycle à sept atomes, donc C_7 . Ce repliement existe sous deux formes^{14,15}, à savoir le coude γ classique rencontré le plus fréquemment dans les protéines (avec des angles dièdres $\Phi = 75^\circ$ et $\psi = -65^\circ$), et le coude γ inverse (avec des angles dièdres $\Phi = -75^\circ$ et $\psi = 65^\circ$)¹⁶ (Figure I.11).

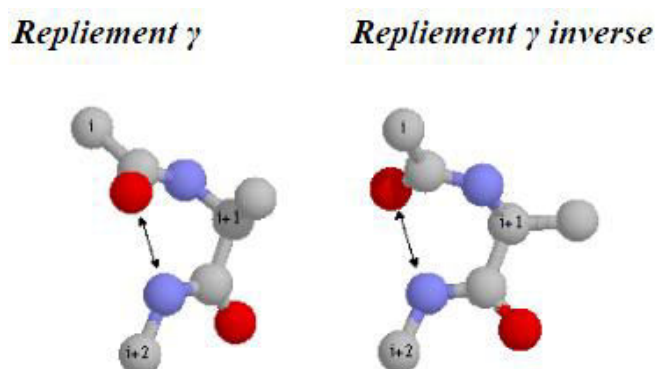


Figure I.11 : Représentation des structures des coudes γ classique et inverse

¹⁰ Boussard, G.; Marraud, M.; Aubry, A. *Biopolymers* **1979**, 18, 1297–1331.

¹¹ Milner-White, J.E. 1990. Situations of gamma-turns in proteins-their relation to alpha-helices, beta-sheets and ligand binding sites. *J. Mol. Biol.* 216: 385-397.

¹² Alkorta, I., Suarez, M.L., Herranz, R., Gonzalez-muniz, R. and Garcia-Lopez M.T. 1996. Similarity study on peptide gamma-turn conformation mimetics. *J. Mol. Model* 2: 16-25.

¹³ Matthews, B.W. 1972. *Macromolecules*. 5: 818-819.

¹⁴ Sibanda, B. L. & Thornton, J. M. β -Hairpin families in globular proteins. *Nature* **316**, 170–174 (1985).

¹⁵ Milner-White, J.E. 1990. Situations of gamma-turns in proteins-their relation to alpha-helices, beta-sheets and ligand binding sites. *J. Mol. Biol.* 216: 385-397.

¹⁶ Bystrov, V.F., Portnova, S.L., Tsetlin, V.I., Ivanov, V.T. and Ochinnikov, Y.A. 1969. Conformational studies of peptide systems. The rotational states of the NH-CH fragment of alanine dipeptides by nuclear magnetic resonance. *Tetrahedron* 25: 493-515.

ii. Les coudes β ou C_{10}

Le coude β implique quatre résidus. Dans ce type de coude, la chaîne polypeptide se replie sur elle-même de près de 180 degrés^{17,18,19,20,21}.

Le coude β permet de fermer un pseudocycle à dix atomes (C_{10}) par une liaison hydrogène de type $i+3 \rightarrow i$ ²². Ce repliement permet alors dans une protéine, d'inverser la direction de propagation d'une chaîne peptidique.

Les coudes β ont été identifiés par Venkatachalam en 1968,²³ qui a proposé trois conformations distinctes basées sur les valeurs des angles dièdres ϕ et ψ (I, II et III) et leurs images dans un miroir I', II' et III'. Chacun d'eux est stabilisé par une liaison hydrogène entre CO de i et NH de $i+3$ de la chaîne principale. Par la suite, Lewis P.N., Momany, F.A. et Scheraga, H.A. ont proposé une nouvelle définition, plus générale. Ils ont proposé que les C_{α} des résidus i et $i+3$ soient également proches de moins de 7Å. Pour inclure ces nouvelles données, ils ont prolongé la classification des coudes β en 10 types distincts (I, I', II, II', III, III', IV, V, VI et VII) à partir des structures cristallines des protéines. Les neuf types des coudes β les plus courants sont caractérisés par l'établissement d'une liaison hydrogène entre les CO du résidu i et le NH du résidu $i\pm 3$ et sont rassemblés dans le tableau I.5.²⁴

¹⁷ Lewis, P.N., Momany, F.A. & Scheraga, H. A. 1971. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 68: 2293-2297.

¹⁸ Lewis, P.N., Momany, F.A. & Scheraga, H. A. 1973. Biochim. Biophys. Acta, 303: 211-229.

¹⁹ Kuntz, I.D. 1972. J. Amer. Chem. Soc., 94: 4009-4012.

²⁰ Crawford, J.L., Lipscomb, W. N. & Schellman, C.G. 1973. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 70: 538-542.

²¹ Chou, P.Y. & Fasman, G. D. 1974. Biochemistry, 13: 222-245.

²² Zalkin, A., Forrester, J. D. & Templeton, D. H. Ferrichrome-A Tetrahydrate. Determination of Crystal and Molecular Structure1. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 1810–1814 (1966).

²³ Venkatachalam, C. M. 1968. Biopolymers, 6: 1425-1436.

²⁴ Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M. A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Protein Sci.* **3**, 2207–2216 (1994).

Tableau I.5 : Valeurs moyennes des angles de torsions pour les neuf principaux modes de repliement β caractérisés par une liaison hydrogène du type $i+3 \rightarrow i$.

Type	Résidu $i+1$		Résidu $i+2$	
	Φ	Ψ	Φ	ψ
β_I	-60	-30	-90	0
β_I'	60	30	90	0
β_{II}	-60	120	80	0
β_{II}'	60	-120	-80	0
β_{IV}	-61	10	-53	17
β_{VIa1}	-60	120	-90	0
β_{VIa1}	-60	120	-120	60
β_{VIb}	-135	135	-75	160
β_{VIII}	-60	-30	-120	120

Les deux catégories les plus stables rencontrées dans les peptides sont les coudes β de type I et II.²⁵ (Figure I.12)

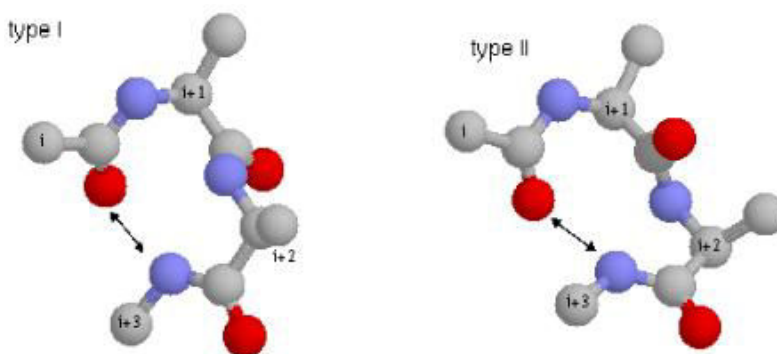


Figure I.12 : les deux types de coude β les plus stables

I.2 Les foldamères pseudopeptidiques

Comme nous l'avons déjà souligné, les protéines exercent des fonctions cruciales dans pratiquement tous les processus biologiques. Chacune de ces fonctions biologiques est liée à

²⁵ Wright, P. E., Dyson, H. J. & Lerner, R. A. Conformation of peptide fragments of proteins in aqueous solution: implications for initiation of protein folding. *Biochemistry* **27**, 7167–7175 (1988).

une structure 3D spécifique. Depuis longtemps, les chimistes s'appliquent à synthétiser des oligomères pour mimer les propriétés structurales des protéines.

Le terme « foldamère » est la contraction de « fold » repliement et de « oligomer ». Ils ont été définis par *Samuel H. GELLMAN*²⁶ comme une molécule à chaîne discrète ou oligomère qui adopte seule une structure secondaire stabilisée par des interactions non covalentes.

Ce sont des molécules synthétisées afin de reproduire la capacité des protéines, des acides nucléiques, des polysaccharides à adopter des conformations définies telles que les hélices et les coudes. Depuis la fin du 20^{ème} siècle, de nombreuses études ont été menées sur des modèles ressemblant à des molécules biologiques dont certaines ont une activité antimicrobienne.^{27, 28, 29, 30} En 2001, Jeffrey S. Moore avec ses collègues, ont étudié et comparé plusieurs foldamères qui possèdent différents types de structures secondaires. Ils ont également un grand potentiel d'applications pour le développement de nouveaux matériaux fonctionnels.^{31, 32, 33}

Afin d'adopter des propriétés structurales, les foldamères sont formés de motifs pseudopeptidiques et l'enjeu est d'ailleurs souvent de développer ces motifs. Quelques exemples de motifs couramment rencontrés sont représentés dans la figure I.13.³⁴

²⁶ Gellman, S. H. Foldamers: A Manifesto. *Acc. Chem. Res.* **31**, 173–180 (1998).

²⁷ Fremaux, J., Fischer, L., Arbogast, T., Kauffmann, B. & Guichard, G. Condensation Approach to Aliphatic Oligourea Foldamers: Helices with N-(Pyrrolidin-2-ylmethyl)ureido Junctions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 11382–11385 (2011).

²⁸ Guichard, Gilles. 2005. β -Peptides, γ -Peptides and Isosteric Backbones: New Scaffolds with Controlled Shapes for Mimicking Protein Secondary Structure Elements. *ChemInform* 36 (36).

²⁹ Laurencin, M. *et al.* From a Marine Neuropeptide to Antimicrobial Pseudopeptides Containing Aza- β 3-Amino Acids: Structure and Activity. *J. Med. Chem.* **55**, 2025–2034 (2012).

³⁰ Legrand, B. *et al.* Structure and mechanism of action of a de novo antimicrobial detergent-like peptide. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 106–116 (2011).

³¹ Caruso, M. M. *et al.* Mechanically-Induced Chemical Changes in Polymeric Materials. *Chem. Rev.* **109**, 5755–5798 (2009).

³² Toohey, K. S., Sottos, N. R., Lewis, J. A., Moore, J. S. & White, S. R. Self-healing materials with microvascular networks. *Nat Mater* **6**, 581–585 (2007).

³³ Davis, D. A. *et al.* Force-induced activation of covalent bonds in mechanoresponsive polymeric materials. *Nature* **459**, 68–72 (2009).

³⁴ Hill, D. J., Mio, M. J., Prince, R. B., Hughes, T. S. & Moore, J. S. A Field Guide to Foldamers. *Chem. Rev.* **101**, 3893–4012 (2001).

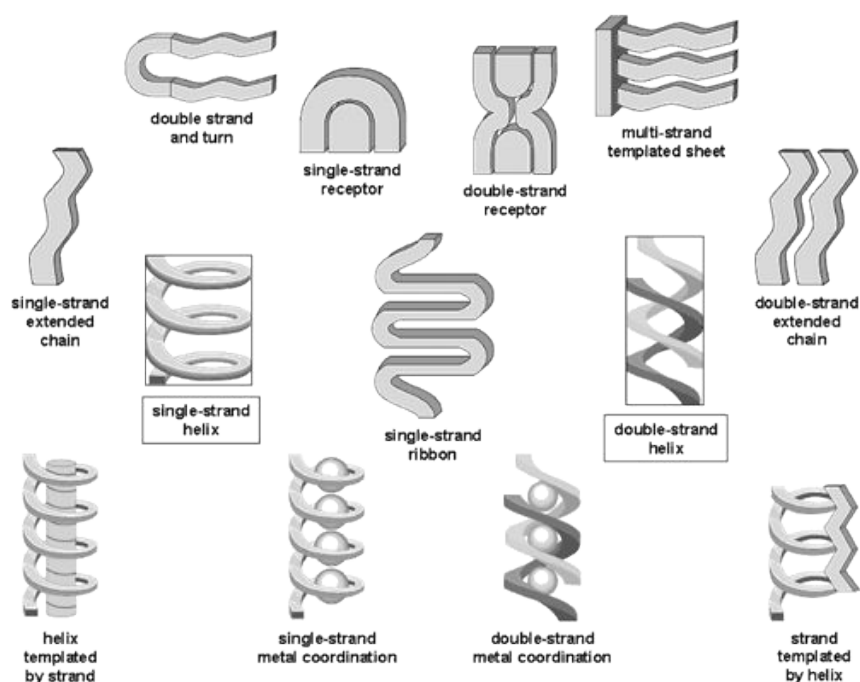


Figure I.13 : Différents types de structures secondaires rencontrées dans des foldamères³³.

Il existe de nombreux motifs pseudopeptidiques, comme les oligomères comprenant un seul type de β -peptide, γ -peptide^{35,36}, ou des oligomères mixtes comportant des squelettes alternant des acides aminés de type α/β , β/γ ou α/γ .^{37,38,39}

I.2.1 Les β -peptides

Les β peptides sont très couramment rencontrés, ils ont un carbone supplémentaire dans le squelette peptidique et ont montré leur utilité dans le développement de nouveaux foldamères. En général, les β peptides n'existent pas dans la nature, le seul β acide aminé

³⁵ Qureshi, M. K. N. & Smith, M. D. Parallel sheet structure in cyclopropane γ -peptides stabilized by C–HO hydrogen bonds. *Chem. Commun.* 5006–5008 (2006). doi:10.1039/B611882H

³⁶ Claudon, P. *et al.* Consequences of isostructural main-chain modifications for the design of antimicrobial foldamers: helical mimics of host-defense peptides based on a heterogeneous amide/urea backbone. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 333–336 (2010).

³⁷ Horne, W. S.; Gellman, S. H. *Accounts of Chemical Research* 2008, 41, 1399–1408.

³⁸ Roy, A.; Prabhakaran, P.; Baruah, P. K.; Sanjayan, G. J. *Chemical Communications* **2011**, 47, 11593.

³⁹ Vasudev, P. G.; Chatterjee, S.; Shamala, N.; Balaram, P. *Accounts of Chemical Research*. **2009**, 42, 1628–1639.

étant la β -alanine. Des applications sont développées et par exemple des antibiotiques synthétiques comprenant des β peptides sont étudiés comme un moyen de se soustraire à la résistance aux antibiotiques.⁴⁰ Les premières études montrant l'utilisation des β peptides dans les foldamères ont été publiées en 1996 par le groupe de Dieter Seebach⁴¹ et celui de Samuel Gellman⁴².

Il existe deux types principaux pour les β peptides, le β^3 -peptidomimétique, la chaîne (R) se trouve à côté de l'amide accrochée sur le carbone C_3 ou C^β , ou le β^2 -peptidomimétique, où la chaîne (R) se trouve à côté du groupe carbonyle accrochée sur le carbone C_2 ou C^α . (Figure I.14)

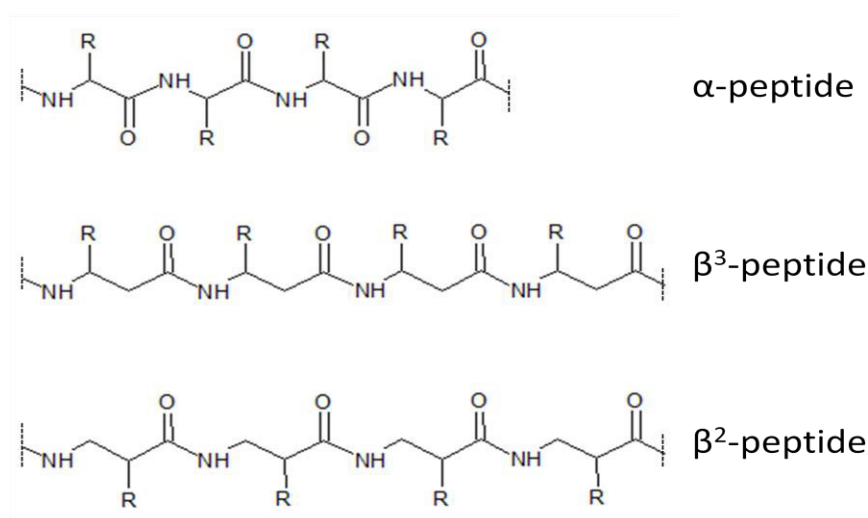


Figure I.14 : Structures chimiques de 2 types de β -peptides comparées à la structure des α -peptides

Comme la taille du squelette peptidique dans les β peptides est plus grande que les peptides naturels (à nombre du résidu égal), les β peptides adoptent des structures secondaires légèrement différentes. Jusqu'à maintenant, de nombreux types de structures hélicoïdales comprenant des β peptides ont été rapportés. Ces différents types de conformations se distinguent par le nombre d'atomes dans le pseudo-cycle fermé par la liaison hydrogène

⁴⁰ Porter, E. A., Wang, X., Lee, H.-S., Weisblum, B. & Gellman, S. H. Antibiotics: Non-haemolytic β -amino-acid oligomers. *Nature* **404**, 565–565 (2000).

⁴¹ Seebach, D. *et al.* β -Peptides: Synthesis by Arndt-Eistert homologation with concomitant peptide coupling. Structure determination by NMR and CD spectroscopy and by X-ray crystallography. Helical secondary structure of a β -hexapeptide in solution and its stability towards pepsin. *HCA* **79**, 913–941 (1996).

⁴² Appella, D. H., Christianson, L. A., Karle, I. L., Powell, D. R. & Gellman, S. H. β -Peptide Foldamers: Robust Helix Formation in a New Family of β -Amino Acid Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 13071–13072 (1996).

formée en solution, par exemple : hélice 8⁴³, hélice 10⁴⁴, hélice 12³⁹, hélice 14^{45,46}, hélice 10/12^{47, 48, 49} et hélice 10/14. Trois exemples de structures hélicoïdales différentes sont représentés dans la figure I.15.

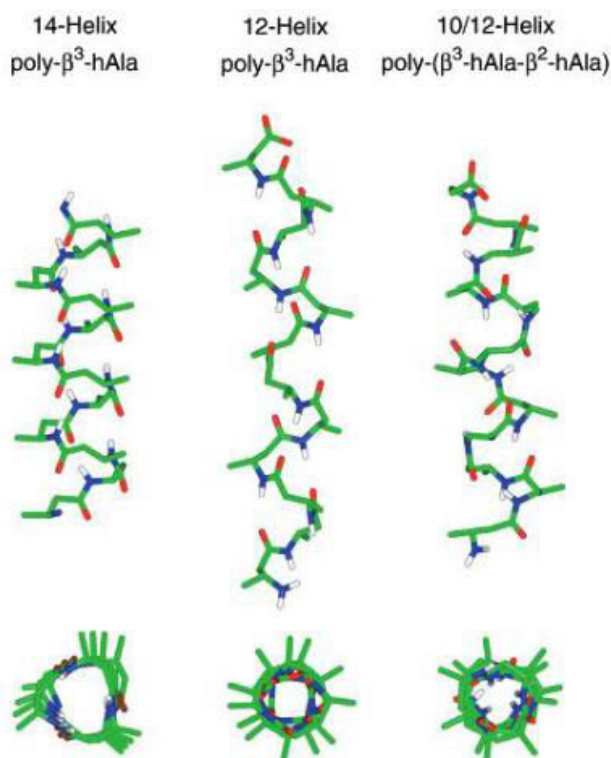


Figure I.15: Représentation de trois structures hélicoïdales dans les β -peptides.

Après avoir étudié et comparé le nombre des structures trouvées pour les différents types de foldamères, on remarque qu'en général, une hélice formée à partir d'acides β aminés est plus stable qu'une formée à partir d'acides α aminés.⁵⁰

⁴³ Li, X.; Wu, Y.-D.; Yang, D. *Accounts of Chemical Research* **2008**, 41, 1428-1438.

⁴⁴ Hetényi, A., Mándity, I. M., Martinek, T. A., Tóth, G. K. & Fülöp, F. Chain-Length-Dependent Helical Motifs and Self-Association of β -Peptides with Constrained Side Chains. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 547–553 (2005).

⁴⁵ Kritzer, J. A., Stephens, O. M., Guarracino, D. A., Reznik, S. K. & Schepartz, A. β -Peptides as inhibitors of protein–protein interactions. *Bioorg Med Chem* **13**, 11–16 (2005).

⁴⁶ Raguse, T. L., Lai, J. R. & Gellman, S. H. Environment-Independent 14-Helix Formation in Short β -Peptides: Striking a Balance between Shape Control and Functional Diversity. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 5592–5593 (2003).

⁴⁷ Wu, Y.-D. & Wang, D.-P. Theoretical Study on Side-Chain Control of the 14-Helix and the 10/12-Helix of β -Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9352–9362 (1999).

⁴⁸ Madalengoitia, J. S. ;Madalengoiti. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 4986.

⁴⁹ Guruprasad, K.; Prasad, M. s.; Kumar, G. r. *The Journal of Peptide Research* **2000**, 56, 250–263.

Dans le domaine des β -peptides, le laboratoire LCPM, a déjà participé à une étude visant à établir les contraintes conformationnelles des motifs β -oligomères capables d'afficher des structures secondaires bien définie au cours de l'oligomérisation.⁵¹

1.2.2 Les γ -peptides

Les γ -peptides représentent une autre famille de foldamères dans lesquels des atomes sont ajoutés dans le squelette peptidique.⁵² Depuis quelques années, Li Guo et Samuel H. Gellman ont beaucoup étudié de γ -peptides.^{53, 54, 55, 56, 57, 58} Ils montrent que les γ -peptides ont prouvé leur capacité à adopter différentes conformations stables comme par exemple des hélices-14 ou des hélice-9. L'introduction d'un pseudocycle sur le squelette, stabilisé par une liaison hydrogène, facilite l'obtention de conformations repliées.

Dans notre laboratoire, Marie-Christine Averlant-Petit a étudié le repliement de certains motif de γ -peptide⁵⁹, telle que (N,N'-Linked oligoureas)⁶⁰.

-
- ⁵⁰ Gademann, K., Hintermann, T. & Schreiber, J. V. Beta-peptides: twisting and turning. *Curr. Med. Chem.* **6**, 905–925 (1999).
- ⁵¹ Raynal, N. *et al.* Molecular modeling study for a novel structured oligomer subunit selection: the example of 2-aminomethyl-phenyl-acetic acid. *Tetrahedron Letters* **48**, 1787–1790 (2007).
- ⁵² Martinek, T. A. & Fülöp, F. Peptidic foldamers: ramping up diversity. *Chem Soc Rev* **41**, 687–702 (2012).
- ⁵³ Chi, Y., Guo, L., Kopf, N. A. & Gellman, S. H. Enantioselective Organocatalytic Michael Addition of Aldehydes to Nitroethylene: Efficient Access to γ 2-Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5608–5609 (2008).
- ⁵⁴ James III, W. H. *et al.* Intramolecular Amide Stacking and Its Competition with Hydrogen Bonding in a Small Foldamer. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14243–14245 (2009).
- ⁵⁵ Guo, L. *et al.* Helix Formation in Preorganized β/γ -Peptide Foldamers: Hydrogen-Bond Analogy to the α -Helix without α -Amino Acid Residues. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 7868–7869 (2010).
- ⁵⁶ Guo, L. *et al.* Stereospecific Synthesis of Conformationally Constrained γ -Amino Acids: New Foldamer Building Blocks That Support Helical Secondary Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 16018–16020 (2009).
- ⁵⁷ James, W. H. *et al.* Evolution of amide stacking in larger γ -peptides: triamide H-bonded cycles. *J Phys Chem A* **115**, 13783–13798 (2011).
- ⁵⁸ Guo, L. *et al.* Characteristic Structural Parameters for the γ -Peptide 14-Helix: Importance of Subunit Preorganization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 5843–5846 (2011).
- ⁵⁹ Claudon, P. *et al.* Consequences of Isostructural Main-Chain Modifications for the Design of Antimicrobial Foldamers: Helical Mimics of Host-Defense Peptides Based on a Heterogeneous Amide/Urea Backbone. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 333–336 (2010).
- ⁶⁰ Violette, A. *et al.* N,N'-linked oligoureas as foldamers: chain length requirements for helix

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous présenterons les principales méthodes spectroscopiques utilisées au cours de ma thèse pour caractériser les structures des biomolécules en général. Nous nous attacherons à décrire leur utilisation pour les peptides et pseudopeptides. Elles sont au nombre de quatre : la résonance magnétique nucléaire (RMN), la diffraction des rayons X (XRD), la spectroscopie Infrarouge (IR) et le Dichroïsme Circulaire (CD).

Toutes ces techniques sont basées sur le principe d'interaction entre un rayonnement électromagnétique et la matière. La figure II.1 montre la totalité du spectre électromagnétique. Nous pouvons y retrouver les gammes de longueur d'onde correspondant et chacune de ces techniques spectroscopiques.

Tout d'abord, la résonance magnétique nucléaire multi-dimensionnelle permet d'accéder aux distances internucléaires et aux angles dièdres des biomolécules en solution. Cette technique est limitée par la taille des molécules, car le nombre croissant d'atomes influe sur le phénomène de relaxation transverse qui lui-même augmente la largeur des raies de résonance. Les ondes utilisées en résonance magnétique nucléaire appartiennent au domaine des ondes radio. En diffraction des rayons X, la longueur d'onde observée est comprise entre 0.1 à 100 Å. Un pré-requis à l'utilisation de cette technique est l'obtention de monocristaux de la protéine et des pseudopeptides à étudier. Souvent à cause de la flexibilité du système étudié, il est difficile d'obtenir des cristaux de qualité et donc une structure cristalline haute résolution.

La spectroscopie Infrarouge a également été utilisée. Cette technique, pour notre problématique, permettra d'obtenir des informations précieuses quant à la présence de liaisons hydrogène. La spectroscopie infrarouge utilise un rayonnement électromagnétique de fréquence inférieure à la lumière visible rouge (700 nm) mais supérieur aux micro-ondes (1 mm). On travaille dans l'IR moyen, on est donc entre 1000 cm^{-1} (10^{-4} m) et 4000 cm^{-1} .

Enfin, le dichroïsme circulaire est une méthode simple et rapide qui permet d'avoir accès au repliement du squelette peptidique de la protéine ou du pseudopeptide en solution. La longueur d'onde absorbée dans le dichroïsme circulaire est dans le domaine de l'ultra violet.

formation in protic solvent investigated by circular dichroism, NMR spectroscopy, and molecular dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 2156–2164 (2005).

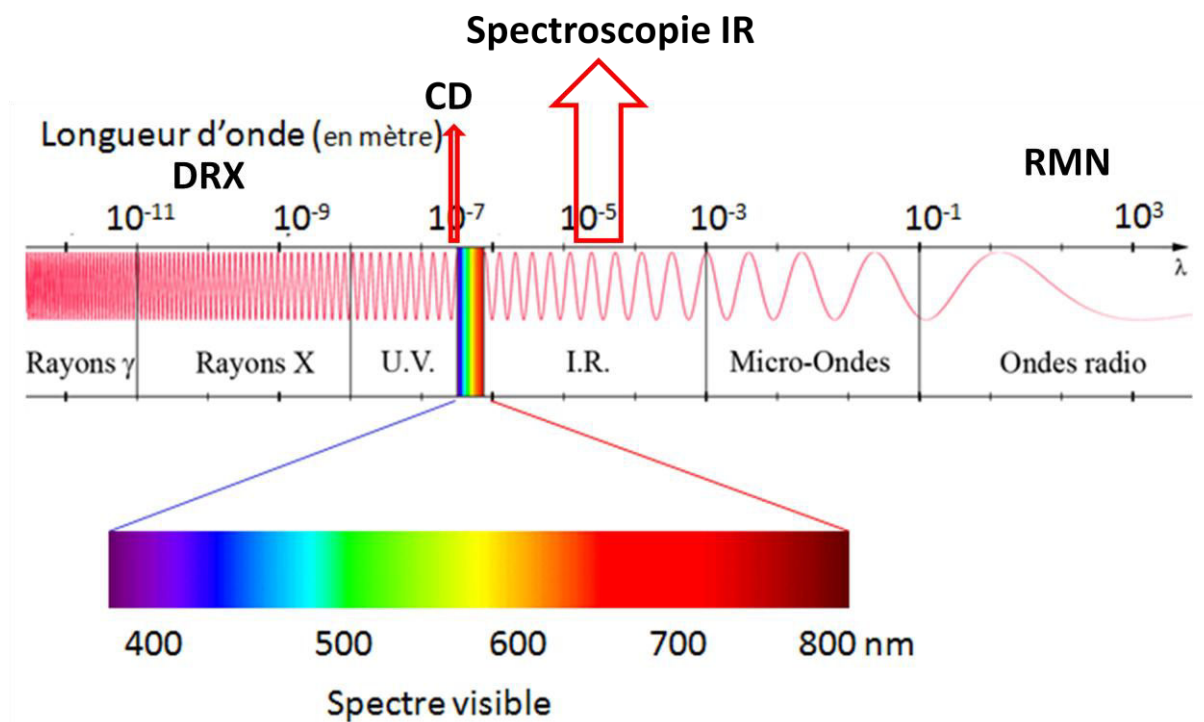


Figure II.1 : Spectre électromagnétique et spectroscopies (ref)

Au cours de mon travail de thèse, ces quatre techniques spectroscopiques ont été utilisées conjointement pour étudier les structures de plusieurs familles de pseudopeptides. Toutes les informations issues des différentes méthodes spectroscopiques, ont été combinées et utilisées comme contraintes structurales dans des simulations numériques. Les différentes étapes du protocole utilisé sont résumées dans la figure II.2.

Les synthèses des molécules ont été réalisées au LCPM ou dans les laboratoires de nos collaborateurs à l'IBMM de Montpellier, nous présenterons succinctement dans chaque chapitre les protocoles de synthèse, puisque nous n'y avons pas pris part.

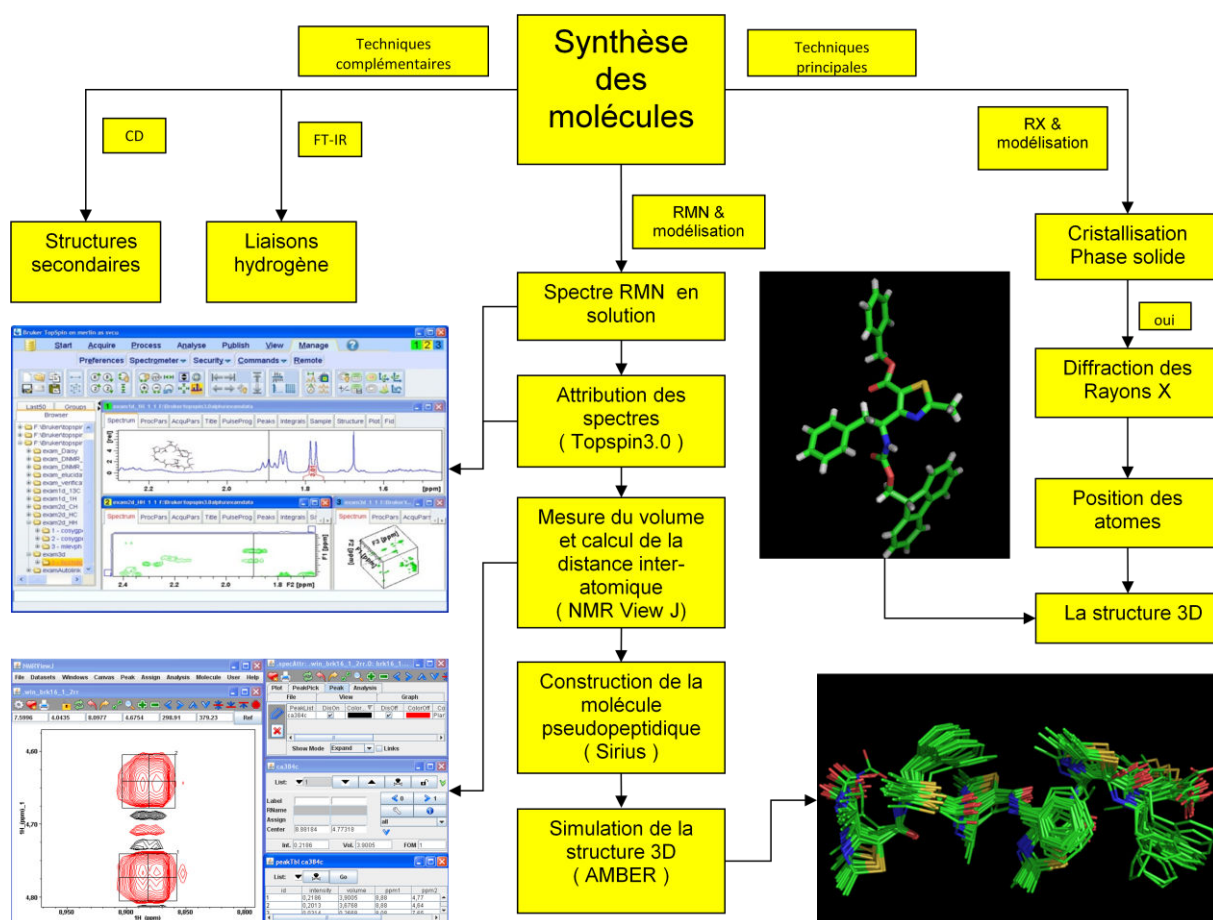


Figure II.2 : Schéma logique des différentes étapes utilisées pour l'élaboration d'une structure 3D de pseudopeptide.

Les mesures de diffractions ont été menées dans le service commun de cristallographie de l'Université de Lorraine sur un double micro source Mo-Cu (50W) détecteur CCD Atlas Oxford Diff, les mesures ont été réalisées et les structures élaborées par Emmanuel Wenger.

Dans la suite de ce manuscrit nous décrirons pour chacune de ces spectroscopies, les informations essentielles utiles pour notre étude.

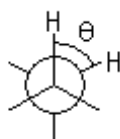
II.2 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La **Résonance magnétique nucléaire (RMN)**⁶¹ est une technique spectroscopique utilisée pour déterminer la structure tridimensionnelle de protéines ou peptides en solution. Elle est basée sur les propriétés de certains noyaux atomiques d'absorber les ondes électromagnétiques.

Les informations structurales issues de la RMN proviennent des couplages directs et indirects. Les premiers appelés couplage spin-spin ou couplage dipolaire ou encore couplage direct permettent d'obtenir une estimation des distances inter protoniques.

II.2.1 Le couplage spin-spin et les constantes de couplage vicinal ^3J (H,H)

Le couplage scalaire, également appelé couplage J ou couplage indirect est corrélé aux angles dièdres de la façon suivante :



$$^3J_{HH} = A + B\cos\theta + C\cos 2\theta$$

Figure I.3: Relation entre le couplage scalaire et les angles dièdres : l'équation de Karplus.⁶²

L'équation établie par Karplus de façon semi-empirique, peut être représentée avec un jeu de coefficients possibles.^{63,64,65} Nous avons utilisé le jeu de paramètres $A = 7.0$, $B = -1.0$ et $C = 5.0$ établi au laboratoire en 1974.⁶⁴

⁶¹ J. Keeler (2005). Understanding NMR Spectroscopy. John Wiley & Sons. ISBN 0470017864.

⁶² M. Karplus. KARPLUS EQUATION: Theoretical calculation links NMR coupling constant to molecular geometry. *Chem. Eng. News Archive* **81**, 37 (2003).

⁶³ Bystrov, V. F., Portnova, S. L., Tsetlin, V. I., Ivanov, V. T. & Ovchinnikov, Y. A. Conformational studies of peptide systems. The rotational states of the NH--CH fragment of alanine dipeptides by nuclear magnetic resonance. *Tetrahedron* **25**, 493–515 (1969).

⁶⁴ Cung, M. T., Marraud, M. & Neel, J. Experimental Calibration of a Karplus Relationship in Order to Study the Conformations of Peptides by Nuclear Magnetic Resonance. *Macromolecules* **7**, 606–613 (1974).

⁶⁵ Ramachandran, G. N., Chandrasekaran, R. & Kopple, K. D. Variation of the NH-C α H

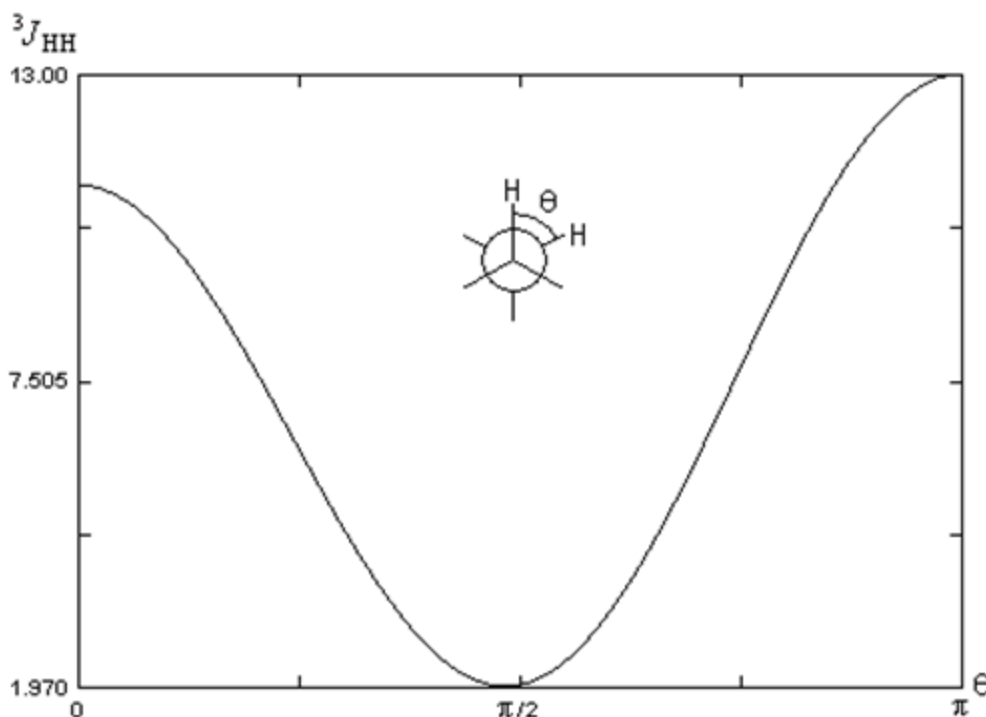


Figure II.4 : Allure de la courbe représentant le couplage $^3J_{HH}$ en fonction de l'angle dièdre

A partir de ces équations il sera possible d'obtenir des valeurs pour les angles dièdres permettant de réduire l'espace conformationnel lors des calculs de modélisation moléculaire.

II.2.2 Effet Overhauser Nucléaire (Effet NOE)

L'effet Overhauser nucléaire (nuclear Overhauser effect) a été découvert par le physicien américain Albert Overhauser en 1950⁶⁶. Il décrit une interaction entre spin électronique et spin nucléaire suffisamment proche à travers l'espace, c'est un couplage direct. L'intensité varie en $1/r^6$, où r est la distance entre les deux protons couplés, et est limitée à environ 5-6 Å.

Les mesures sont effectuées sur les spectres NOESY et ROESY. Nous avons utilisé l'une ou l'autre de ces deux expériences en fonction de la taille de nos oligomères et de la qualité des spectres obtenus. Les distances entre les deux protons peuvent être estimées en comparant l'intensité des corrélations croisées V_{ij} à l'intensité référence $V_{\text{réf}}$ d'un pic croisé,

coupling constant with dihedral angle in the NMR spectra of peptides. *Biopolymers* **10**, 2113–2131 (1971).

⁶⁶ Overhauser, A. Polarization of Nuclei in Metals. *Phys. Rev.* **92**, 411–415 (1953).

qui correspond à une distance connue pour deux protons. En général, nous avons choisi comme référence pour la distance une valeur référence connue, telle que la distance entre deux protons géminaux (CH_2) de 1,78 Å ou 2.48 Å entre les deux protons H_δ et H_ϵ du cycle aromatique de la tyrosine. Le volume de référence est alors mesuré dans les spectres. Il est important de choisir un pic bien résolu, le plus loin possible de la diagonale et sans recouvrement.

II.2.3 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La stratégie d'analyse structurale de peptides et pseudopeptides combine plusieurs expériences 2D homo- et hétéronucléaires (COSY, TOCSY, NOESY, ROESY, EXSY, HSQC etc.), Pour un petit peptide en solution, un spectre de RMN ^1H est attribué à l'aide des expériences 2D COSY, TOCSY et NOESY, comme chaque proton du résidu (acide aminé) est connu, le réseau de corrélations scalaires observé sur des spectres COSY ou TOCSY permet d'identifier tous les déplacements chimiques.

COSY (corrélation spectroscopy) permet de mettre en évidence des protons couplés éloignés par 2 ou 3 liaisons.

TOCSY (total correlation spectroscopy) permet d'identifier tous les protons couplés dans un système de spin.

NOESY (nuclear overhauser effect spectroscopy) permet de mettre en évidence des corrélations dipolaires entre deux protons avec une distance inférieure ou égale à 5 Å.

ROESY (rotating frame NOE spectroscopy), qui permet de mettre en évidence des corrélations entre deux protons avec une distance inférieure ou égale à 4 Å. Par rapport à l'expérience NOESY, le ROESY ne s'annule jamais et permet donc d'analyser des petites molécules ($\text{MM} \approx 1000$ Da) pour lesquelles le NOE s'annule.

RMN à deux dimensions hétéronucléaires:

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence): l'expérience a été décrite la première fois par Geoffrey Bodenhausen et D.J. Ruben en 1980⁶⁷ pour un système ^1H - ^{15}N , mais elle est également applicable à autres noyaux par exemple le système ^1H - ^{13}C .

Durant ma thèse, j'ai utilisé deux spectromètres RMN haute résolution 600 MHz, (Figure II.5), en fonction de la température nécessaire pour les expériences. Le spectromètre

⁶⁷ Bodenhausen, G. & Ruben, D. J. Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **69**, 185–189 (1980).

du service commun de RMN de la faculté des sciences (Figure II.10 .A) permet de descendre en température (jusqu'à -50°C) alors que le spectromètre du service commun SCBIM de la faculté de médecine (Figure II.10 .B) est équipé d'une cryosonde plus sensible, mais avec laquelle on ne peut pas travailler à froid. En fonction de nos besoins nous avons utilisé l'un ou l'autre de ces deux spectromètres.



Figure II.5 : A) Bruker Avance III 600 MHz wide bore, spectromètre équipé pour la RMN haute résolution multi-noyaux, valeur du champ magnétique: 14.1T, fréquence de résonance du proton: 600 MHz, il se trouve dans le service commun de RMN de la faculté des sciences, et est géré par l'équipe de Méthodologie RMN (RMN) du laboratoire de cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations, UMR CNRS 7036.

B) BRUKER Avance III (600 MHz) équipé d'une cryosonde TCI triple résonance ^1H , ^{13}C et ^{15}N avec gradient de champ selon l'axe Z et blindage actif. La cryosonde est refroidie sur les noyaux ^1H et ^{13}C , permettant ainsi un gain en sensibilité qui peut atteindre un facteur de 4 à 8 par rapport à une sonde classique. Elle peut fonctionner dans l'intervalle de température de 5 à $+60^{\circ}\text{C}$. Il se trouve au service commun SCBIM au biopôle sur le site de la faculté de médecine, Nancy Brabois.

II.3 La Diffraction des Rayons X (XRD)

La **Diffraction des Rayons X (XRD)** sur les cristaux⁶⁸ ou radiocristallographie est une technique de caractérisation de la matière cristalline. Elle mesure les intensités diffractées par les monocristaux minéraux, organique, biologique (pseudopeptides pour nous), ou organométalliques. Pour déterminer la position des atomes au sein du cristal, donc préciser les paramètres géométriques et conformationnels des molécules, les liaisons inter ou intramoléculaires (liaison hydrogène par exemple) enfin la structure 3D de la molécule plus précisément. Le cristal est irradié par un faisceau de rayons X, et un détecteur fait le tour de l'échantillon pour mesurer l'intensité des rayons X dans toutes les directions. Pour des raisons pratiques, on fait tourner l'échantillon en même temps. L'enregistrement des données a été réalisé au service de cristallographie de l'UHP *laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations (CRM2)*. L'appareil DRX du laboratoire CRM2 est présenté dans la figure en bas.

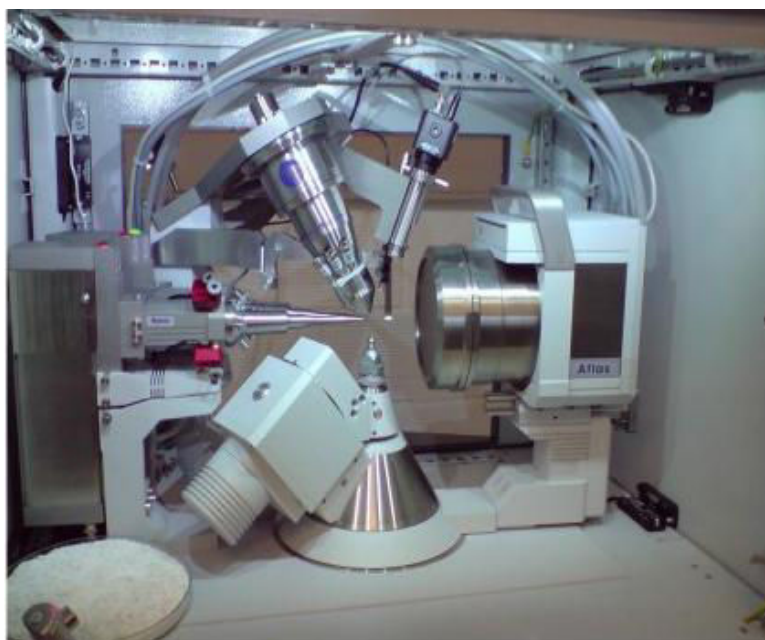


Figure II.6: Spectromètre de diffraction des rayons X, double micro source Mo-Cu (50W) détecteur CCD Atlas Oxford Diff du service commun de diffraction de l'Université de Lorraine et géré par le laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations (CRM2).

⁶⁸ Introduction to X-ray Powder Diffraction, R. Jenkins, R. L. Snyder, éd. Wiley Interscience, (1996), p341

La phase de cristallogenèse est effectuée au laboratoire dans une cellule par évaporation ou diffusion entre deux phases différentes.

Nous avons réussi à déterminer la structure tri-dimensionnelle de certains des composés étudiés, par exemple le composé Boc-(S)-ABOC-OH, Z-Ala-(S)-ABOC-Phe-NHiPr, le 2:1-[α /aza]-cyclo-homo-hexamère.

II.4 La spectroscopie infrarouge (IR)

La **spectroscopie infrarouge (IR)**⁶⁹ s'appuie sur l'absorption par les molécules d'ondes électromagnétiques de longueur d'onde correspondant à la région infrarouge du spectre électromagnétique (voir plus haut). Elle est largement utilisée par les chimistes à des fins analytiques, pour identifier les composés ou étudier les compositions de mélanges.

La découverte du rayonnement infrarouge est attribuée, au début du 19^{ème} siècle, à William Herschel, un astronome anglais d'origine allemande. Herschel a publié ses résultats en 1800 devant la société royale de Londres.

Herschel a placé un thermomètre de mercure dans le spectre obtenu par un prisme de verre afin de mesurer la chaleur propre de chaque couleur. Le thermomètre indique que la chaleur reçue du côté rouge du spectre est la plus forte, là où il n'y a plus de lumière. C'était la première expérience montrant que la chaleur pouvait se transmettre indépendamment d'une lumière visible. Il était surpris du résultat et les a appelés Rayons calorifiques qui seront appelés infrarouge à la fin du XIX^{ème} siècle.

La partie infrarouge du spectre électromagnétique est généralement divisée en trois régions. La plus haute énergie est l'infrarouge proche, dans le domaine de 14000-4000 cm⁻¹, longueur d'onde entre 0.8 à 2.5 μ m, qui correspond à des vibrations harmoniques. L'infrarouge moyen, aux environs de 4000 à 400 cm⁻¹, longueur d'onde de 2.5 à 25 μ m, peut être utilisé pour étudier les vibrations, rotation ou l'association des deux. L'infrarouge lointain, de 400 à 10 cm⁻¹, longueur d'onde de 25 à 1000 μ m, est la région avec une faible énergie est peut être utilisée pour étudier les rotations. Couramment, c'est l'absorption dans l'IR moyen qui est utilisé. (Figure II.7)

⁶⁹ Solberg, C., Saugen, E., Swenson, L.-P., Bruun, L. & Isaksson, T. Determination of fat in live farmed Atlantic salmon using non-invasive NIR techniques. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 692–696 (2003).

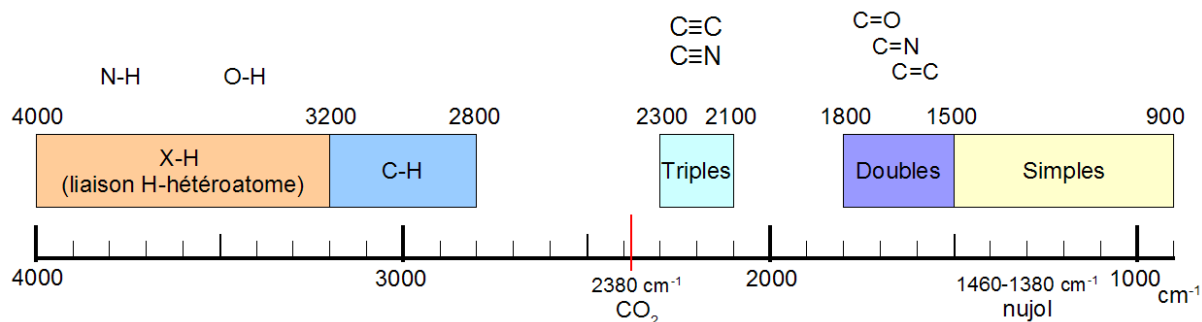


Figure II.7 : Les domaines d'absorption correspondant aux types de liaisons chimiques, l'unité de nombre d'onde est en cm^{-1} .

Pour les molécules peptidiques ou pseudopeptidiques, les spectres infrarouge contiennent des informations relatives aux vibrations d'élongation et de déformation du lien peptidique. Nous l'utilisons principalement pour identifier les modifications dans les vibrations des liaisons NH et CO afin d'identifier les liaisons hydrogène. En particulier, nous avons étudié l'influence des différents solvants et de la température sur la formation et la stabilité des liaisons hydrogène. Les principales bandes correspondant aux élongations de ces deux vibreurs sont :

- Liaison N-H : bande amide A dans le domaine $3520\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ et notée $\nu(\text{N-H})$.
- Liaison C=O : bande amide I dans le domaine $1800\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ et notée $\nu(\text{C=O})$.

Le vibreur NH présente donc une zone spécifique. Il est couramment reconnu que lorsque la bande de vibration supérieure à 3400 cm^{-1} , le proton amide est considéré comme libre, c'est à dire non impliqué dans une liaison hydrogène. Si une ou plusieurs bandes apparaissent dans le spectre inférieures à 3400 cm^{-1} , cela signifie qu'un ou plusieurs protons sont impliqués dans des liaisons hydrogène⁷⁰. Il faut ajouter à ce point que, si un même groupement présente deux situations (lié et libre) dans deux conformations de la molécule, alors les deux bandes apparaîtront dans le spectre infrarouge. Une autre zone est utilisée pour la détermination des liaisons hydrogène : la zone des CO qui se trouve entre 2000 cm^{-1} à 1600 cm^{-1} , de la même façon que ce qui a été précédemment décrit pour les NH, cela permet d'identifier les CO libres ou CO liés donc impliqués ou pas dans une liaison hydrogène.

⁷⁰ Formaggio, F. *et al.* α -Methyl, α -n-Propylglycine Homo-oligomers. *Macromolecules* **36**, 8164–8170 (2003).

Par ailleurs, la liaison hydrogène entraîne une diminution de la fréquence des deux vibreurs concernés et les variations relatives des fréquences reflètent la force des interactions mises en jeu.

Cependant, le champ d'application de cette méthode spectroscopique est souvent limité par trois facteurs :

- La transparence des solvants dans les zones de fréquences explorées ;
- La solubilité des molécules dans ces solvants transparents ;
- L'auto-association éventuelle dans ces mêmes solvants.

L'ensemble de ces problèmes conduit à une attribution précise assez difficile des bandes, en particulier avec des peptides comportant plusieurs NH et CO. Même si dans certains cas, ce problème peut être contourné par une déconvolution du spectre ou décomposition en plusieurs composantes à l'aide d'algorithmes mathématiques

Pour résumer, l'IR est donc un outil permettant de mettre en évidence des interactions et de confirmer l'existence ou non d'une conformation unique en solution. Pour les molécules très complexes, l'analyse des spectres est difficile et la méthode étant qualitative, il est très utile de confronter les résultats aux autres obtenus par d'autres méthodes spectroscopiques. (RMN ou DRX par exemple)

Durant ma thèse j'ai utilisé le spectromètre Bruker tensor 27 du laboratoire (Figure II.8).



Figure II.8: L'appareil de spectroscopie Infrarouge de laboratoire LCPM

Les spectres ont été réalisés en solution, tous les spectres (64 scans) ont été obtenus à une résolution de 2 cm^{-1} , en utilisant une cellule de CaF_2 solution de 500 mm et d'une purge d'air sec. Les spectres ont enregistré sur un Bruker Tensor, équipé d'un détecteur MCT refroidi à l'azote liquide. Tous les échantillons ont été dissous dans du chloroforme spectrophotométrique ($\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich). La ligne de base de tous les spectres a été corrigée, et les spectres lissée avec l'algorithme Savitzky-Golay.

II.5 Le Dichroïsme Circulaire (CD)

Le **Dichroïsme Circulaire (CD)**⁷¹ est une spectroscopie qui mesure la différence d'absorption par la lumière polarisée à droite ou à gauche par des molécules asymétriques. Ces asymétries peuvent être dues à la chimie (un carbone asymétrique) ou à la structure de la molécule. Le dichroïsme circulaire devient alors un outil pour analyser les structures secondaires de la protéine dans plusieurs conditions. En dichroïsme circulaire, on travaille en solution et il est donc possible de faire varier les conditions expérimentales (la température, la force ionique).

Le phénomène du dichroïsme circulaire a été découvert par Aimé COTTON en 1886, un physicien français. En 1969, Greenfield a estimé la structure secondaire de protéine par les données de Dichroïsme Circulaire.⁷² Plus récemment, certains chercheurs ont montré qu'il est possible de l'utiliser pour étudier la structure tertiaire.^{73,74}

Dans la chaîne polypeptidique, des acides aminés sont liés par une liaison peptidique. L'enchaînement peptidique se replie pour former la structure spécifique des macromolécules biologiques. Le groupe optiquement actif principal est la liaison peptidique, d'autres éléments participent également au phénomène : les noyaux aromatique, les liaisons disulfure, certains cofacteurs.

⁷¹ P. Atkins and J. de Paula (2005). Elements of Physical Chemistry, 4th ed. Oxford University Press. ISBN 0716773295.

⁷² Greenfield, N. J. & Fasman, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**, 4108–4116 (1969).

⁷³ Venyaminov SYu, null & Vassilenko, K. S. Determination of protein tertiary structure class from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* **222**, 176–184 (1994).

⁷⁴ Manavalan, P. & Johnson, W. C. Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Nature* **305**, 831–832 (1983).

Selon le niveau d'énergie des transitions électroniques, le spectre de dichroïsme circulaire d'une protéine est divisé en trois domaines de longueurs d'onde⁷⁵ :

- 1) inférieur à 250 nm, la région spectrale dans l'ultraviolet lointain, le phénomène dichroïque est causé par la transition électronique due à la liaison peptidique⁷⁶.

- 2) entre 250 à 300 nm, dans le proche-UV, le phénomène dichroïque est provoqué par les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ des groupes aromatiques des chaînes latérales.

- 3) entre 300 nm UV à 700 nm dans le visible, le signal dichroïque provient essentiellement de la présence de cofacteurs.

En conséquence, le dichroïsme circulaire dans l'UV lointain est principalement utilisé pour résoudre les éléments de structure secondaire des protéines, le dichroïsme dans l'UV moyen- proche révèle des informations sur les structures tertiaires des protéines, dans l'UV proche-visible le CD analyse les associations de cofacteurs.

Pendant ma thèse, j'ai effectué mes expériences de CD entre 190 nm et 250 nm, la région spectrale dans l'ultraviolet lointain dans laquelle le dichroïsme circulaire est provoqué par les transitions électroniques de la liaison peptidique pour étudier les structures secondaires des peptides et des protéines.

Dans la structure secondaire de la protéine ou d'un polypeptide, les liaisons peptidiques sont arrangées régulièrement, l'alignement directionnel détermine la situation de transition électronique. Si une protéine ou un polypeptide a une structure secondaire différente, les fréquences et les forces de l'absorption seront différentes aussi. Donc, la mesure des spectres de dichroïsme circulaire de protéines ou des polypeptides dans l'UV-lointain permet de mettre en évidence les différentes structures. Un exemple de spectres dichroïques pour les différentes structures secondaires rencontrées dans les protéines est donné par Joel D Morrisett, Joshua SK David et leurs collègues répertorient les fréquences d'absorption (Figure II.9⁷⁷ et tableau II.1).

⁷⁵ Sreerama, N. & Woody, R. W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Meth. Enzymol.* **383**, 318–351 (2004).

⁷⁶ Rogers, D. M. & Hirst, J. D. Calculations of protein circular dichroism from first principles. *Chirality* **16**, 234–243 (2004).

⁷⁷ Morrisett, J. D., David, J. S., Pownall, H. J. & Gotto, A. M. Interaction of an apolipoprotein (apoLP-alanine) with phosphatidylcholine. *Biochemistry* **12**, 1290–1299 (1973).

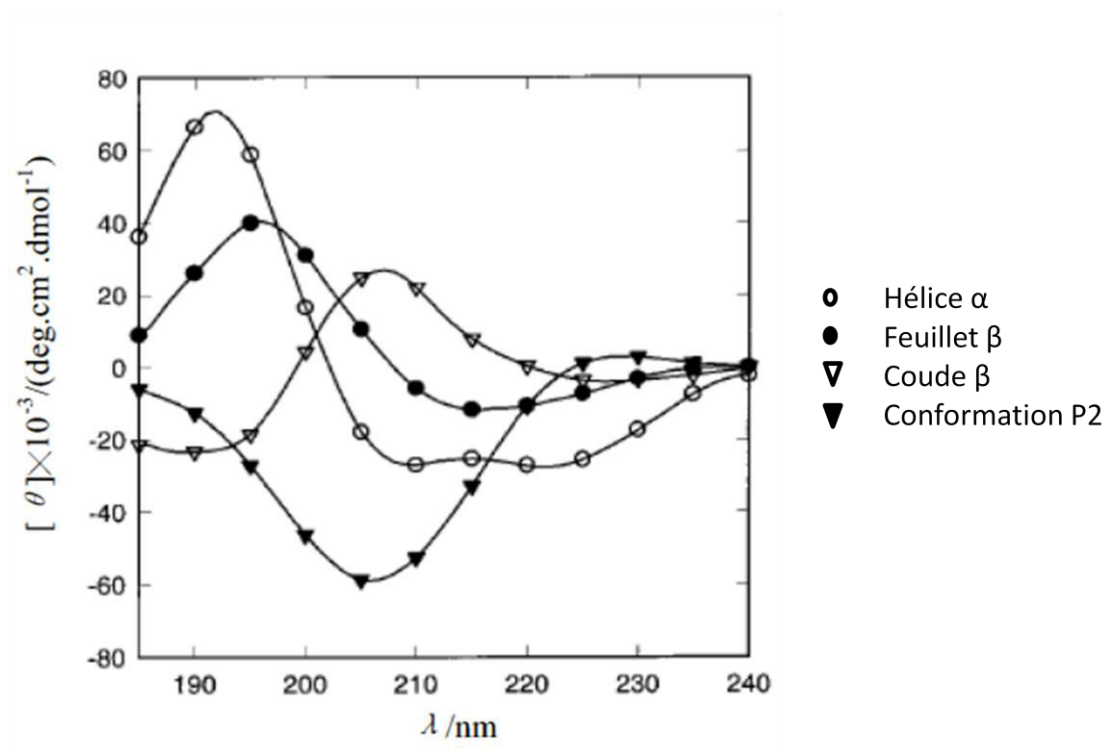


Figure II.9 : Dichroïsme circulaire (CD) spectres de polypeptides dans l'hélice α , feuillet β , coude β et conformation P2 (si c'est valeur positif, c'est-à-dire l'absorbance gauche est forte, si c'est négatif, l'absorbance droite forte).

Tableau II.1 : Les bandes de dichroïsme circulaire (CD) spectres de polypeptides dans l'hélice α , feuillet β , coude β et conformation P2 pour figure II.9.

	bande positive	bande négative	bande négative
hélice α	192 nm	208 nm	222 nm
feuillet β	195 nm	216 nm	
coude β	206 nm		
P2	$\approx 220-230$ nm	206 nm	

II.6 Le protocole de modélisation moléculaire

Les calculs de structure pour les différents composés ont été effectués avec AMBER10⁷⁸ en trois étapes: chauffage, recuit simulé dans le vide et raffinement dans une boîte de solvant. Le programme Amber permet d'effectuer des simulations de dynamique moléculaire, son champ de force est bien adapté aux biomolécules.

Le protocole est présenté ci-dessous, la première étape du calcul est un recuit simulé de 20 ps : 20000 étapes à effectuer (nstlim), donc 1fs, nmropt=1 signifie que l'on utilise des contraintes RMN, les informations sont enregistrées tous les 200 étapes (ntpr=200), la liaison entre deux atomes est limitée par 15 Å (cut=15), la vitesse maximum pour un atome est limitée par 10 (vlimit=10).

```
simulated annealing protocol, 20 ps

&cntrl
  nstlim=20000, pencut=-0.001, nmropt=1,
  ntpr=200, ntt=1, ntwx=200,
  cut=15.0, ntb=0, vlimit=10,
/
&ewald
  eedmeth=5,
/
#
#Simple simulated annealing algorithm:
#
#from steps 0 to 5000: heat the system to 1000K
#from steps 5001-18000: re-cool to low temperatures with long tautp
#from steps 18001-20000: final cooling with short tautp
#
&wt type='TEMP0', istep1=0, istep2=5000, value1=1000.,
      value2=1000.0, /
&wt type='TEMP0', istep1=5001, istep2=18000, value1=1000.0,
      value2=100.0, /
&wt type='TEMP0', istep1=18001, istep2=20000, value1=0.0,
      value2=0.0, /

&wt type='TAUTP', istep1=0, istep2=5000, value1=0.4,
      value2=0.4, /
&wt type='TAUTP', istep1=5001, istep2=18000, value1=4.0,
      value2=4.0, /
```

⁷⁸ D.A. Pearlman, D.A. Case, J.W. Caldwell, W.S. Ross, T.E. Cheatham, III, S. DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel & P. Kollman. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comp. Phys. Commun.* (1995) **91**, 1-41.

```

&wt type='TAUTP', istep1=18001, istep2=19000, value1=1.0,
      value2=1.0,      /
&wt type='TAUTP', istep1=19001, istep2=20000,value1=0.1,
      value2=0.05,      /

&wt type='REST', istep1=0, istep2=3000,value1=0.1,
      value2=1.0,      /
&wt type='REST', istep1=3001, istep2=20000,value1=1.0,
      value2=1.0,      /

&wt type='END'      /
LISTOUT=POUT
DISANG=MLU2109_new.dist

```

Rq: Ici MLU2109 correspond au nom du composé.

Tout d'abord, la température a été rapidement élevée et a été maintenue à 1000 K pour les 5000 premières étapes, ces étapes sont pour générer des structures aléatoires initiaux puis le système a été refroidi progressivement de 1000 K à 100 K à partir de l'étape 5001 jusqu'à l'étape 18000, enfin la température est portée à 0 K depuis l'étape suivante 18001 jusqu'à la fin l'étape 20000. Pour les 3000 premières étapes, la constante de la force des contraintes de distance a été augmentée progressivement de $2,0 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-1}$ à $20 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-1}$. Pour le reste de la simulation (étape 3001-20000), la constante de force est maintenue à $20 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-1}$. Tous les calculs ont été lancés dans le vide. Dans notre protocole de modélisation moléculaire, nous avons simulé 100 structures en trois dimensions grâce au logiciel AMBER, et nous avons conservés les 20 structures d'énergie les plus basses comme représentatives de la structure peptide. La représentation et l'analyse quantitative ont été réalisées à l'aide de Ptraj, molmol⁷⁹ et PyMOL⁸⁰

⁷⁹ Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K. MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics* **14**, 51–55 (1996).

⁸⁰ Lill, Markus A.; Danielson, Matthew L. Computer-aided drug design platform using PyMOL. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* (2011), 25(1), 13-19.

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Au cours de ma thèse, j'ai réalisé les études structurales de trois familles de pseudopeptides. Deux de ces pseudopeptides contiennent des mimes cycliques d'acides aminés, ils ont été synthétisés à l'IBMM de Montpellier. La troisième famille contient une modification aza dans laquelle le carbone α est remplacé par un atome d'azote. Les résultats structuraux obtenus à partir de la combinaison de plusieurs méthodes spectroscopiques sont présentés dans ce chapitre.

III.1 Etude structurale du motif ABOC

III.1.1 Introduction

Le premier projet dont j'ai été chargé concernait l'étude structurale d'une famille de pseudopeptides à base de l'acide (*S*)-aminobicyclo[2,2,2]octane-2-carboxylique **1**, que nous appellerons dans ce manuscrit le motif (*S*)-ABOC ou ABOC (Figure III.1). Ce travail a été réalisé en collaboration, tous les oligomères ont été synthétisés dans les équipes de Muriel Amblard et Monique Calmès à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de Montpellier et l'étude structurale a été réalisée en collaboration avec Baptiste Legrand, chercheur postdoctoral au LCPM. Le but de cette étude était de connaître la capacité du motif ABOC à former des structures secondaires dans ces oligomères.

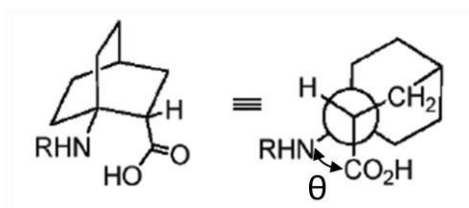


Figure III.1 : Représentation développée du motif (*S*)-ABOC **1** (R=H, $\theta=60^\circ$).

La figure III.1 montre que, les fonctions acides carboxyliques et amine sont en conformation décalée synclinale avec un angle θ d'environ 60° , caractéristique structurale *a priori* favorable à l'obtention d'une structure organisée par oligomérisation.

La motif (*S*)-ABOC, est fortement contraint. Tous les protons de deux groupes méthylènes voisins sont éclipsés deux à deux, les acides carboxyliques et les groupes amine dans une conformation synclinale, fournit un modèle de liberté conformationnelle

considérablement réduit autour de la liaison C(α)-C(β), par la présence du bicyclique. Cette propriété permet cependant une bonne conservation des angles du motif (S)-ABOC lorsqu'ils sont incorporés dans des séquences de peptides ou composés foldamères. Une structure cristalline du motif (S)-ABOC a été établie, ce qui nous a permis ensuite d'avoir une structure réaliste du motif ABOC. La structure cristalline du dérivé Boc-(S)-ABOC-OH **2** est présentée dans la figure III.2.

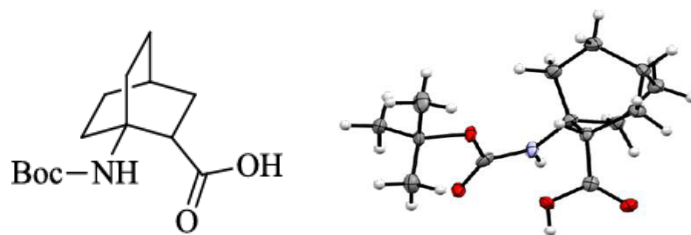


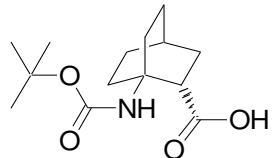
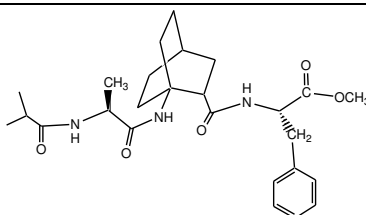
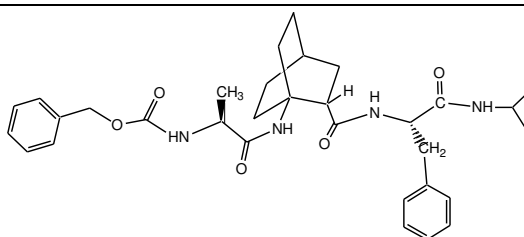
Figure III.2 : Représentation de la structure cristalline du Boc-(S)-ABOC-OH **2**

III.1.2 Les formules des oligomères

Ce composé est particulièrement intéressant, car il combine à la fois les propriétés structurales des composés cycliques contraints, et celles des acides β -aminés qui ont été utilisés de manière intensive en tant que précurseurs de foldamères.

Nous avons tout à bord recherché les capacités du motif (S)-ABOC à induire des structures secondaires. Pour cela, plusieurs oligomères de taille et de compositions variables ont été synthétisés par nos partenaires. Les séquences des premiers oligomères étudiés sont regroupées dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Structures développées des échantillons.

Nom	Structures développées étudiés
2 Mono ABOC	
3 iPrCO-Ala-(S)-ABOC-Phe-OMe	
4 Z-Ala-(S)-ABOC-Phe-NHiPr	

Pour ce travail nous avons fait appel à plusieurs techniques biophysiques : la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie infrarouge (FT-IR), le dichroïsme circulaire (CD) et la diffraction des rayons X (DRX). Tout d'abord nous avons cherché à caractériser les structures tridimensionnelles des oligomères par RMN et DRX. Pour les oligomères les plus petits, pour lesquels les essais de cristallisation étaient restés infructueux d'une part et les données RMN pauvres en informations structurales d'autre part, nous avons donc cherché à mettre en évidence la présence de liaisons hydrogène. Ces informations permettent de préciser un élément de structure secondaire et d'introduire ces données comme

contraintes dans les simulations numériques. Les techniques utilisées pour mettre en évidence les liaisons hydrogène sont la spectroscopie infrarouge (IR) et la RMN 1D en mélange de solvants. Après avoir réuni tous les éléments, nous avons effectué des calculs de modélisation moléculaire.

III.1.3 Synthèse des oligomères iPrCO-Ala-(S)-ABOC-Phe-OMe, Z-Ala-(S)-ABOC-Phe-NHiPr et Z-Ala-β-Ala-Phe-NHiPr

Trois tripeptides ont été synthétisés : **3** et **4** incorporant le motif (S)-ABOC en position centrale et le troisième tripeptide **10** où la β-alanine remplace le (S)-ABOC afin d'analyser l'influence du groupe (S)-ABOC, cette β-alanine a de nombreux degrés de liberté notamment la rotation autour de la liaison C(α)-C(β). Leur synthèse a été effectuée selon la stratégie de synthèse en solution décrite dans le schéma III.1. Toutes les molécules analysées ont été synthétisées par nos collaborateurs de Montpellier.

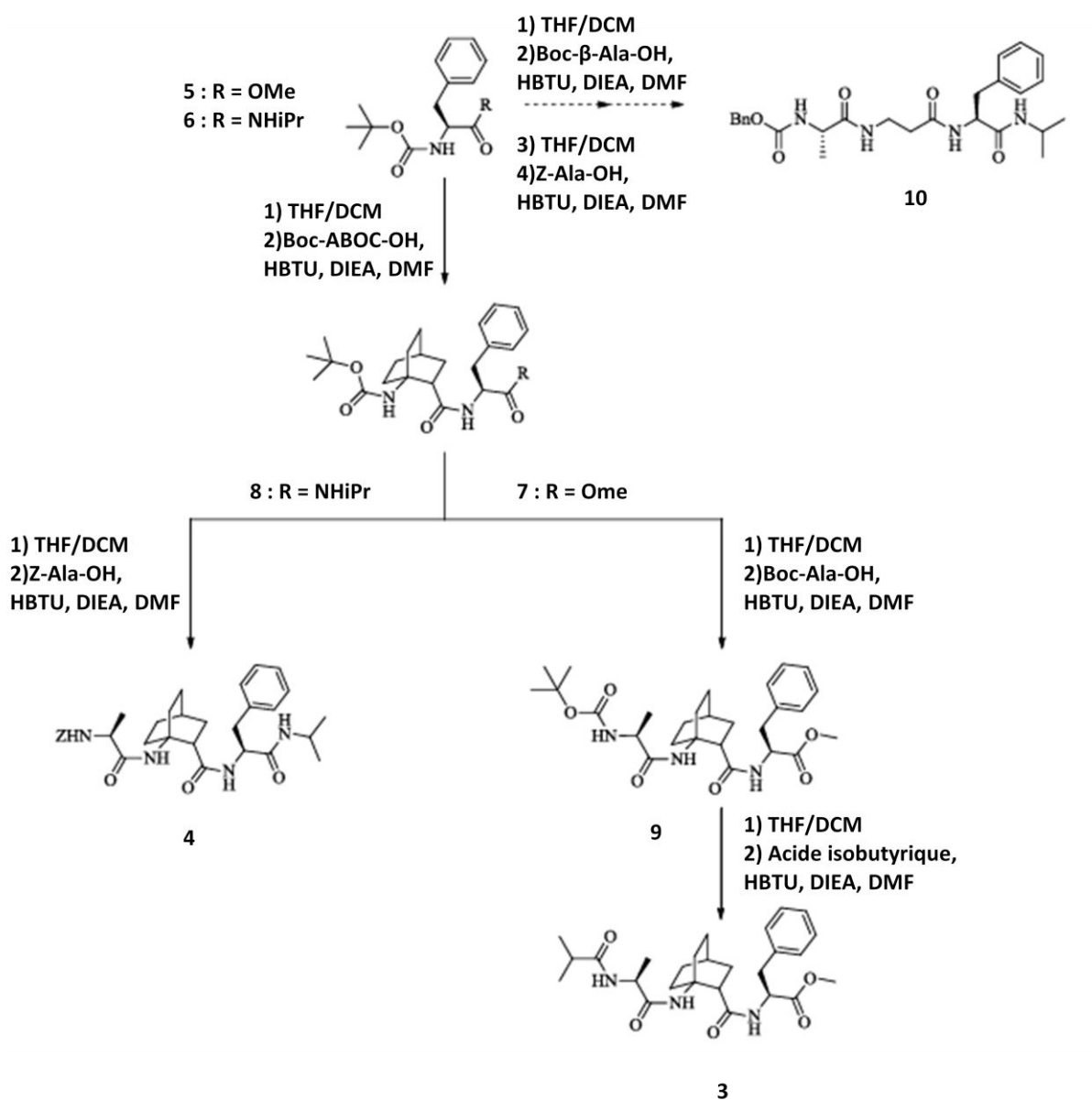


Schéma III.1: Synthèse des tripeptides **3** (iPrCO-Ala-(S)-ABOC-Phe-OMe), **4** (Z-Ala-(S)-ABOC-Phe-NHiPr) et **10** (Z-Ala-β-Ala-Phe-NHiPr).

III.1.4 les structure des tripeptides iPrCO-Ala-(S)-ABOC-Phe-OMe, Z-Ala-(S)-ABOC-Phe-NHiPr et Z-Ala-β-Ala-Phe-NHiPr

Plusieurs techniques d'analyses spectrales ont été utilisées conjointement pour étudier les caractéristiques structurales des oligomères. Nous avons commencé par étudier les structures des deux composés **3** (iPrCO-Ala-(S)-ABOC-Phe-OMe) et **4** (Z-Ala-(S)-ABOC-Phe-NHiPr) par la RMN. Le choix du solvant dépend de la solubilité des peptides et de la finesse de raie obtenue sur un spectre RMN 1D. Dans cette étude, nous avons utilisé deux solvants CDCl_3 et CD_3CN . Cependant dans les spectres RMN obtenus, il n'y a aucune différence significative observée entre CDCl_3 et CD_3CN (Figure III.3).

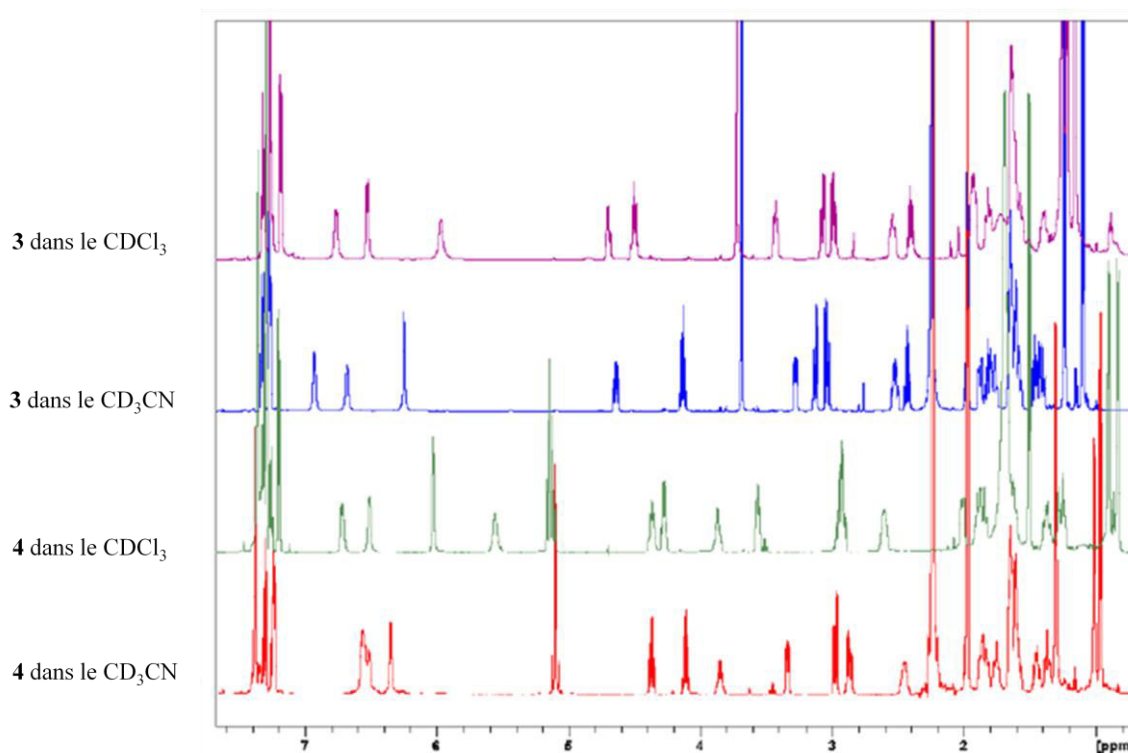


Figure III.3 : Les spectres RMN ^1H des tripeptides **3** et **4** dans les deux solvants CDCl_3 et CD_3CN à 298 K.

Après la comparaison des spectres RMN entre les deux solvants, nous avons choisi le chloroforme pour continuer à étudier les structures. Notre première approche a été de rechercher les liaisons hydrogène intermoléculaires présentes. La détermination des groupes NH exposés a été réalisée en ajoutant progressivement à une solution de l'oligomère étudié dissous dans le CDCl_3 de faibles quantités de DMSO-d_6 . Les protons impliqués dans des liaisons hydrogène perçoivent une différence dans leur environnement due aux changements

de solvant : leurs déplacements chimiques changent. *A contrario* les déplacements chimiques des protons impliqués dans une liaison hydrogène ne sont pas impactés par les changements de solvant. La présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire a également été sondée par l'enregistrement de spectres RMN 1D à cinq températures différentes entre 288K et 308K à 5K d'intervalle pour déterminer les coefficients de température. (Tableau III.2)

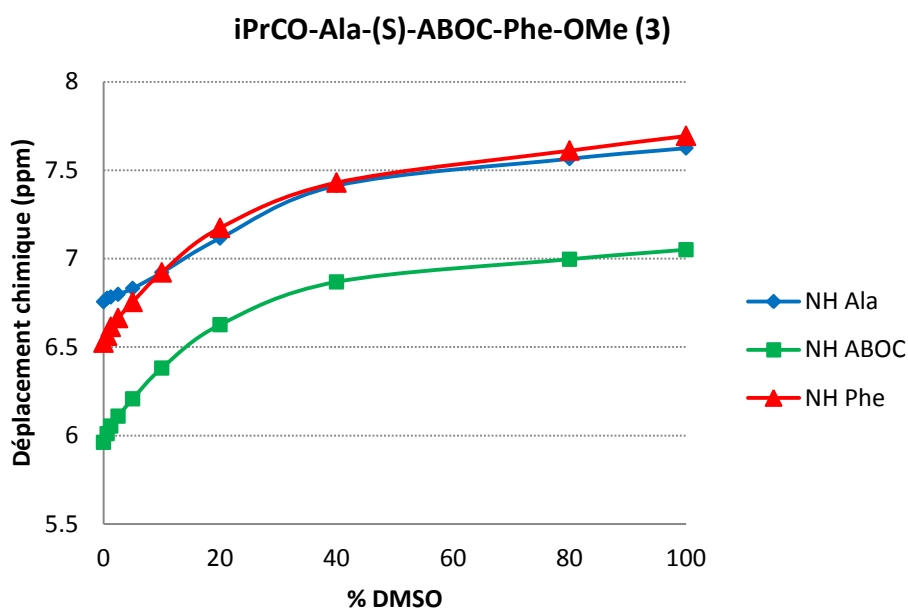


Figure III.4: Déplacements chimiques (ppm) des protons amide en fonction de la proportion de DMSO/CDCl₃ pour le composé **3** iPrCO-Ala-(S)-ABOC-Phe-OMe.

Nous avons observé que la variation de déplacement chimique la plus faible entre les trois courbes concerne le proton NH de l'alanine (la courbe bleue) (Figure 4).

On peut supposer que le coefficient de température le plus faible dans le DMSO-d₆ (< 5 ppb/K) correspond à des protons non accessibles aux solvants. Dans le cas de CDCl₃, si le coefficient de température est inférieur à 2,4 ppb/K, les protons sont non seulement blindés mais aussi accessibles⁸¹. En conséquence, seuls les coefficients de température sensiblement plus grands que 2,4 ppb/K dans le CDCl₃ peuvent être attribués sans ambiguïté à des protons NH initialement blindés, exposés au solvant au cours de l'intervalle de température. Les valeurs des coefficients de température des protons amide sont mesurées et présentées sur tableau III.2 et figure III.5.

⁸¹ Iqbal, M. and Balaram, P. *Biopolymers*, **1982**, 31, 1427-1433

Tableau III.2: Les coefficients de la température de composé **3** dans le solvant CDCl₃ et DMSO-d₆.

	Coefficients de Température pour 3 (ppb/K)	
Solvant	CDCl ₃	DMSO-d ₆
Ala1	4.38	3.7
Aboc2	1.43	4.5
Phe3	3.0	6.0

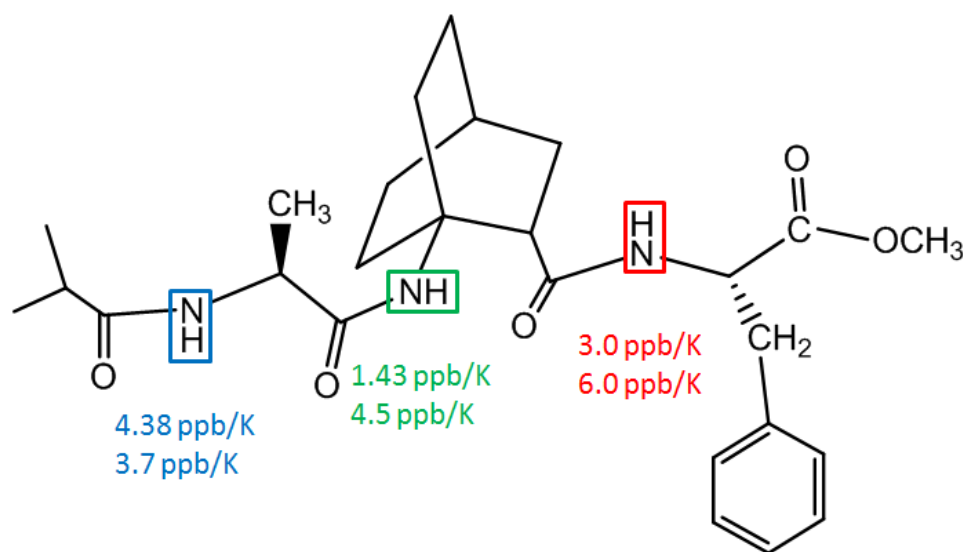


Figure III.5: Coefficients de température pour le composé iPrCO-Ala-(S)-ABOC-Phe-OMe **3** (en ppb/K) dans le solvant CDCl₃ et DMSO-d₆

Dans le CDCl₃, la valeur du coefficient de température du proton NH (Ala) est la plus grande (4,38 ppb/K), il est associé à de faibles variations de déplacement chimique dans les différents mélanges CDCl₃/DMSO-d₆ (0,869 ppm) ce qui suggère une faible accessibilité au solvant. En revanche, les protons NH du (S)-ABOC et de la Phénylalanine présentent de faibles coefficients de températures dans CDCl₃ (1,43 et 3,0 ppb/K respectivement), mais de forts coefficients de températures dans DMSO-d₆ (4,5 et 6,0 ppb/K respectivement), ce qui traduit l'accessibilité au solvant.

Les mêmes analyses ont été réalisées avec le composé Z-Ala-(S)-ABOC-Phe-NHiPr (**4**). Les courbes des déplacements chimiques (ppm) des protons NH dans des mélanges variables DMSO/CDCl₃ sont présentées dans la figure III.6.

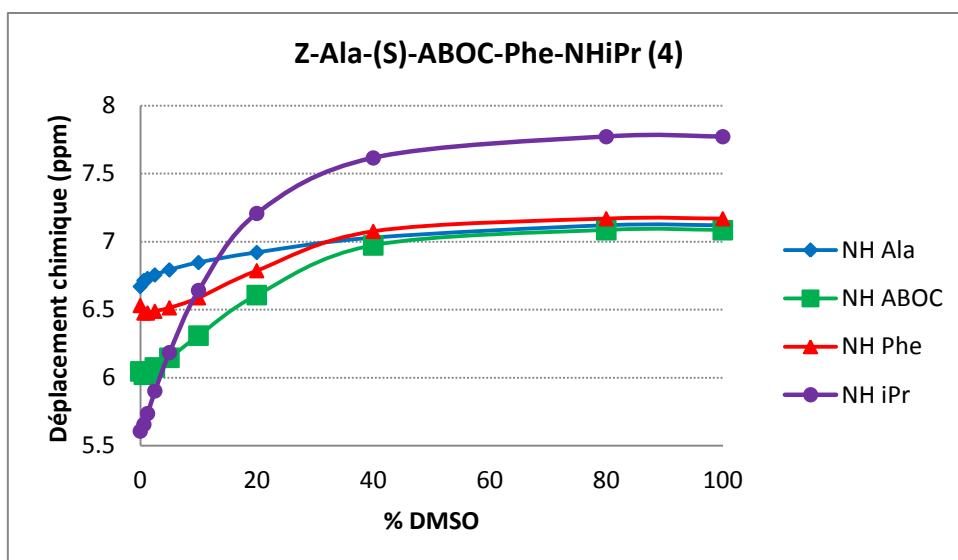


Figure III.6: Le déplacement chimique (ppm) en mélanges DMSO/ CDCl_3 pour le composé **4**.

Si on compare la figure III.6 avec la figure III.4, les observations sont semblables et nous voyons que comme pour le composé **3**, que le proton qui a les variations les plus faibles est celui de l'alanine (la courbe bleue).

Les coefficients de températures dans le CDCl_3 et le DMSO-d_6 pour **4** sont présentés dans le tableau III.3 et figure III.7.

Tableau III.3: Les coefficients de température du composé Z-Ala-(S)-ABOC-Phe-NHiPr (**4**) dans le solvant CDCl_3 et DMSO-d_6 . (c: non mesurable à cause des superpositions)

	Coefficients de Température pour 4 (ppb/K)	
	CDCl_3	DMSO-d_6
Ala1	5.20	c
Aboc2	0.90	4.0
Phe3	1.0	c
NHiPr	3.15	5.7

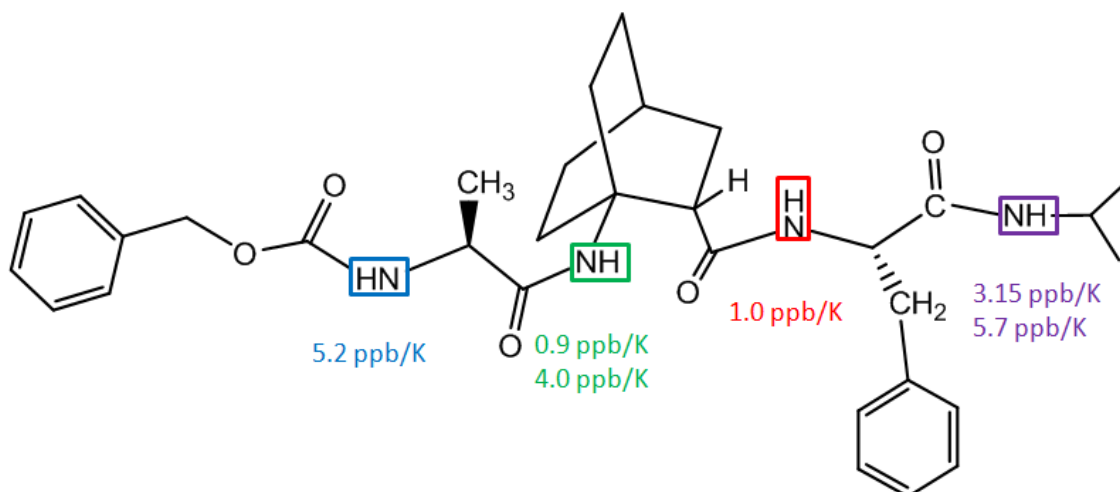


Figure III.7: Coefficients de température pour le composé Z-Ala-(S)-ABOC-Phe-NHiPr (4) (en ppb/K) dans le solvant CDCl₃ et DMSO-d₆ (en dessous pour ABOC et NHiPr)

Dans le CDCl₃, la valeur du coefficient de température du proton NH de l'Alanine est la plus élevée (5.2 ppb/K). Ceci est associé à de faibles variations de déplacement chimique dans les mélanges de solvants CDCl₃/DMSO (0,45 ppm) comme pour le composé **3**. Ceci suggère l'implication de ce proton dans une liaison hydrogène. Au contraire, les protons NH de (S)-ABOC et la Phénylalanine ont de très faibles coefficients de température dans CDCl₃ (0.9 et 1.0 ppb/K), et des coefficients de températures forts dans DMSO-d₆ (4.0 ppb/K) pour le proton NH de (S)-ABOC. Enfin, pour le proton amide NH du groupe isopropyl (iPr), le coefficient de température est faible dans CDCl₃, et grand dans DMSO-d₆. D'autre part, la variation des déplacements chimiques CDCl₃ et DMSO-d₆ est grande ($\Delta\text{NH} = 2,164$ ppm), donc le proton sur iPr est accessible au solvant.

Ces résultats ont été confrontés aux résultats obtenus en spectroscopie infrarouge. Comme mentionné précédemment, dans les peptides il est particulièrement intéressant d'observer les deux zones vibrationnelles: les NH (amide A) et les CO (amide I). Nous observons un déplacement des longueurs d'ondes des vibreurs vers des nombres d'onde plus faibles lorsque les vibreurs NH et CO sont impliqués dans des liaisons hydrogène.^{82,83,84}

⁸² Byler, D. M. & Susi, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* **25**, 469–487 (1986).

⁸³ Arrondo, J. L., Muga, A., Castresana, J. & Goñi, F. M. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**, 23–56 (1993).

Pour d'attribuer les spectres de tripeptides **3** et **4**, nous avons besoin d'étudier et de comparer avec des précurseurs, **6**, **8** dans le cas de **4**, et **7**, **9** dans le cas de **3**, afin d'attribuer sans ambiguïté les fréquences d'absorption. Tous les spectres (64 scans) ont été obtenus en solution à une résolution à 2 cm^{-1} , en utilisant une cellule avec des fenêtres en CaF_2 et un trajet optique de $500\text{ }\mu\text{m}$ et une purge d'air sec. Les spectres ont enregistré sur un spectromètre Bruker Tensor 27, équipé d'un détecteur MCT refroidi de l'azote liquide. Tous les échantillons ont été dissous dans du chloroforme de qualité spectrophotométrique ($\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich). La ligne de base de tous les spectres a été corrigée, et les spectres lissés avec l'algorithme Savitzky-Golay. Le nombre de points de lissage est indiqué dans le tableau III.4.

Tableau III.4 : Nombre de points de lissage pour les composés **3**, **4** et **6** à **9** pour la bande amide A et l'amide région I.

Composé	3	4	6	8	7	9
Amide I	17	17	15	17	13	17
Amide A	17	15	25	17	25	17

Les spectres des composés : **6**, **8** et **4** (Figure III.8 et 9) et **7**, **9** et **3** (Figure III.10 et 11) permettent l'attribution des bandes IR pour **3** et **4** (Figure III.12 et 13).

⁸⁴ Vass, E., Hollósi, M., Besson, F. & Buchet, R. Vibrational spectroscopic detection of beta- and gamma-turns in synthetic and natural peptides and proteins. *Chem. Rev.* **103**, 1917–1954 (2003).

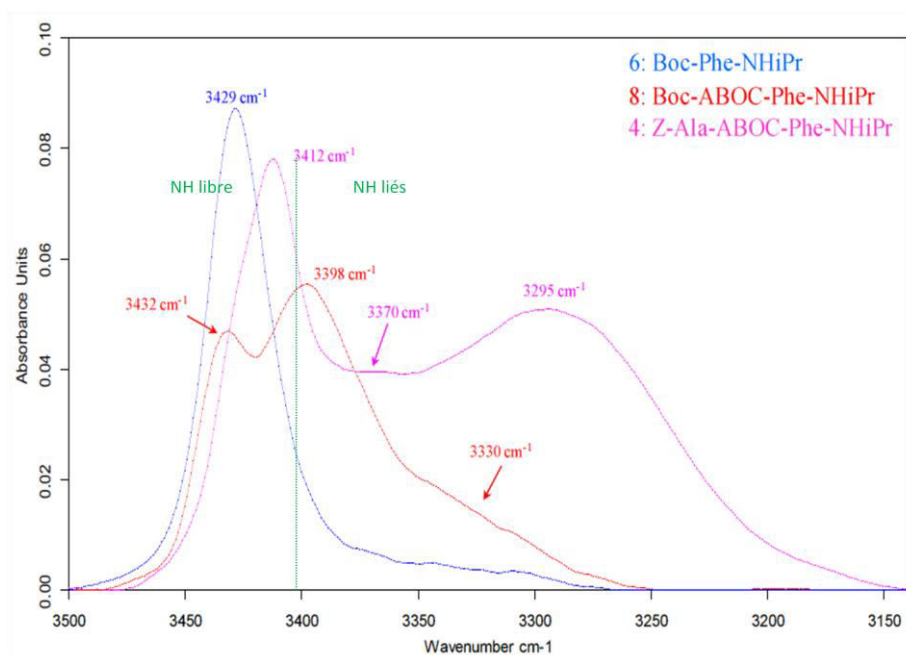


Figure III.8 : Spectres IR des molécules **6**, **8** et **4** : (région des NH). Les spectres sont enregistrés dans le chloroforme à 10 mM à température ambiante.

Pour le précurseur, le composé **6** (en bleu), il y a une seule bande d'absorption vers 3429 cm^{-1} , cette valeur est significative de l'absorbance d'un NH libre, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de liaison hydrogène. Dans le spectre du composé **8**, le motif (S)-ABOC fait apparaître une nouvelle bande à 3398 cm^{-1} , ce qui est le nombre d'onde limite pour des NH impliqués et non impliqués dans une liaison hydrogène. Donc si une liaison existe elle est sûrement très faible. Dans le cas de **4** (courbe rose), deux bandes à 3429 cm^{-1} qui correspond à un NH libre et une large bande à 3295 cm^{-1} qui suggère l'existence d'une forte liaison hydrogène intramoléculaire ou intermoléculaire. La présence de liaison hydrogène intermoléculaire a été éliminée, puisque nous nous sommes placés dans des conditions de dilution adéquates afin d'éviter les interactions intermoléculaires.

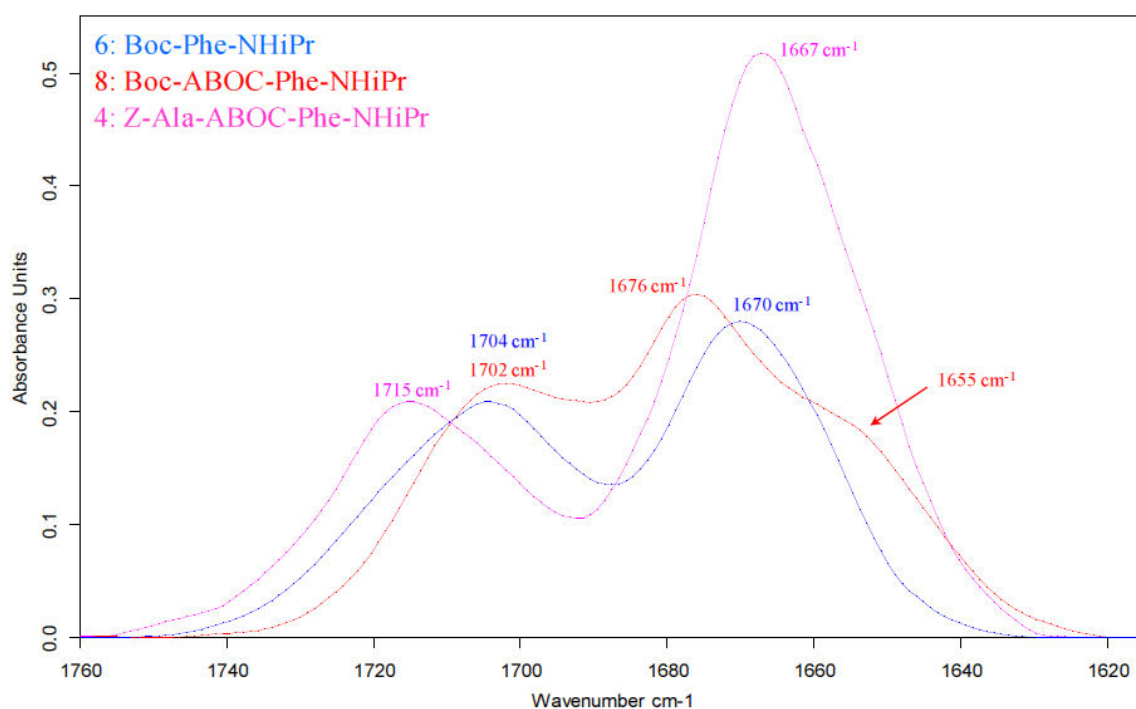


Figure III.9 : Spectres IR des molécules **6**, **8** et **4** : la région amide I (CO amide)

Dans la région des carbonyles, le spectre du précurseur **6** présente deux bandes à 1704 et 1670 cm⁻¹ correspondant respectivement à l'uréthane libre (Boc) et le CO (Phe). L'introduction du motif ABOC dans une séquence (composé **8**) conduit à l'apparition d'une nouvelle bande à 1676 cm⁻¹ qui est attribuée au CO amide libre (ABOC et Phe), et un épaulement à 1655 cm⁻¹ correspondant aux formes liées. Le tripeptide **4** montre une augmentation de la bande du CO lié située à 1655 cm⁻¹. Cela donne finalement une seule bande à 1667 cm⁻¹, qui est une valeur moyenne des formes libres et liées de carbonyles.

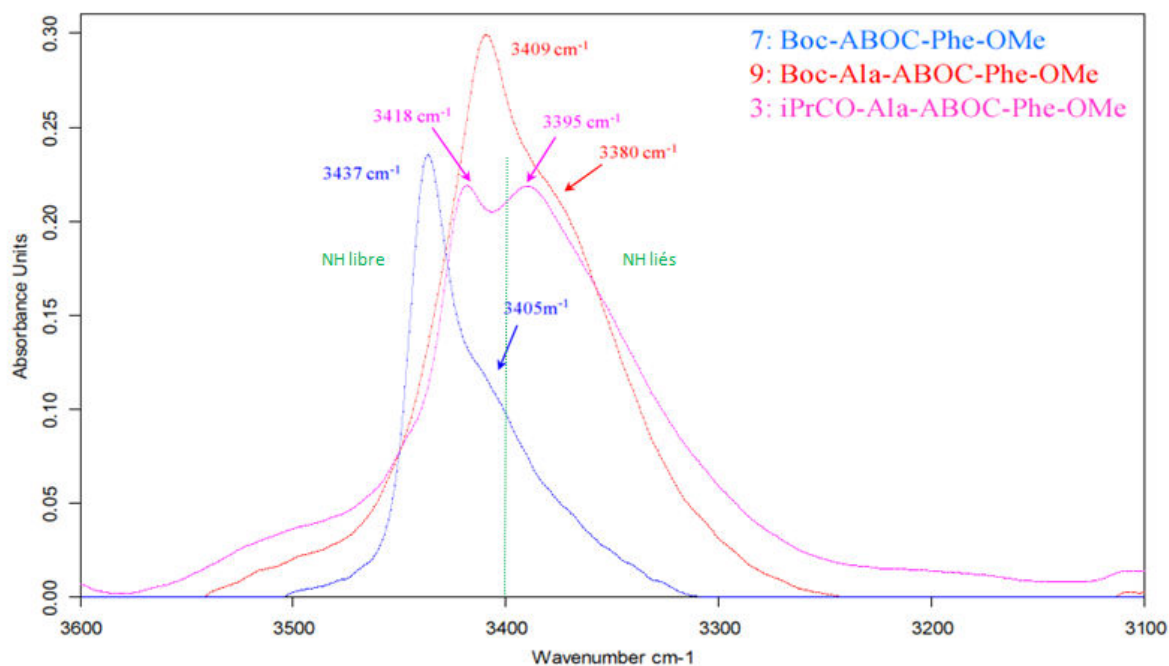


Figure III.10 : Spectres IR des molécules **3** (rose) et de ces précurseurs **7** (bleu), **9** (rouge): La partie de la région amide A dans le chloroforme à 36 mM.

La bande située à 3405 cm^{-1} (**7**) correspond à un début de structuration induite par le motif ABOC. Aucune bande n'est observée 3250 et 3350 cm^{-1} , correspondant à des NH fortement liés dans le tripeptide **3**. Cependant un élargissement du signal à 3380 cm^{-1} (**9**) suggère une liaison hydrogène émergente.

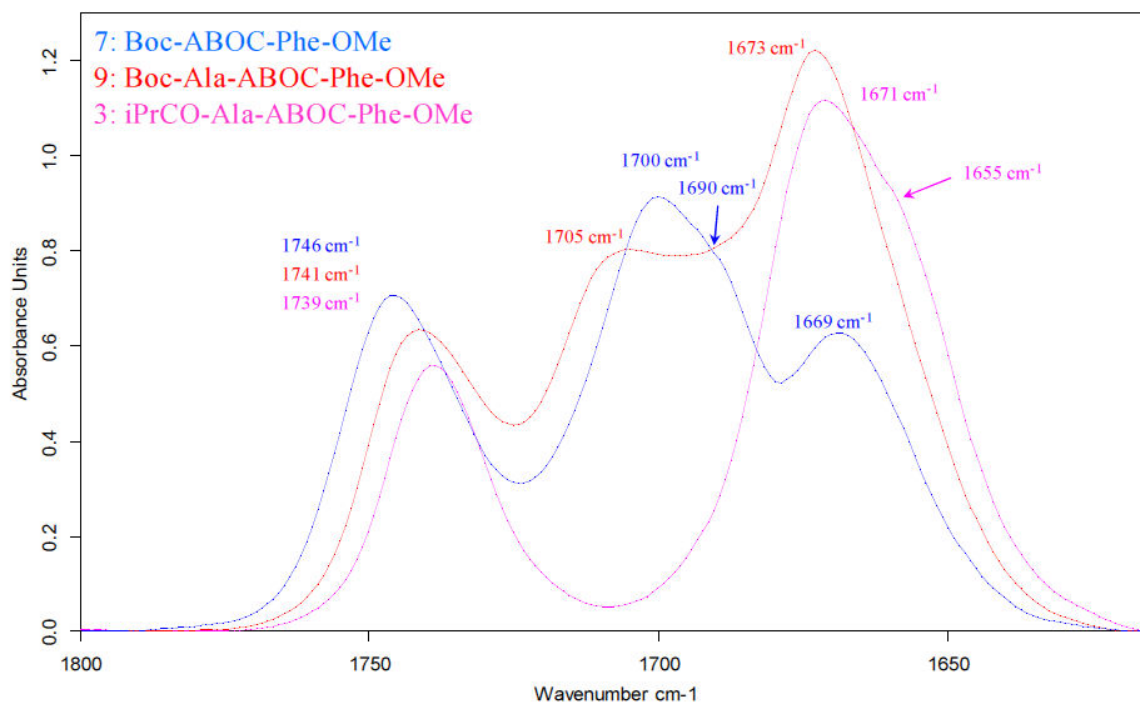


Figure III.11 : FT-IR : Région amide I du tripeptide **3** (rose) et de précurseurs **7** (bleu) et **9** (rouge) Les spectres ont été enregistrés dans le chloroforme à 36 mM.

Concernant les carbonyles, l'augmentation de la longueur du peptide conduit à une diminution progressive de la bande carbonyle de l'ester à des fréquences plus faibles (de 1746 à 1739 cm^{-1}), qui peut être attribué à une augmentation de la structuration. Le fragment précurseur dans le pseudopeptide **7** induit une structuration émergente (présence d'un épaulement à 1690 cm^{-1} correspondant au groupe carbonyle d'uréthane partiellement lié). Un autre épaulement à 1655 cm^{-1} , observé dans les spectres du tripeptide **3**, est aussi révélateur d'une structuration.

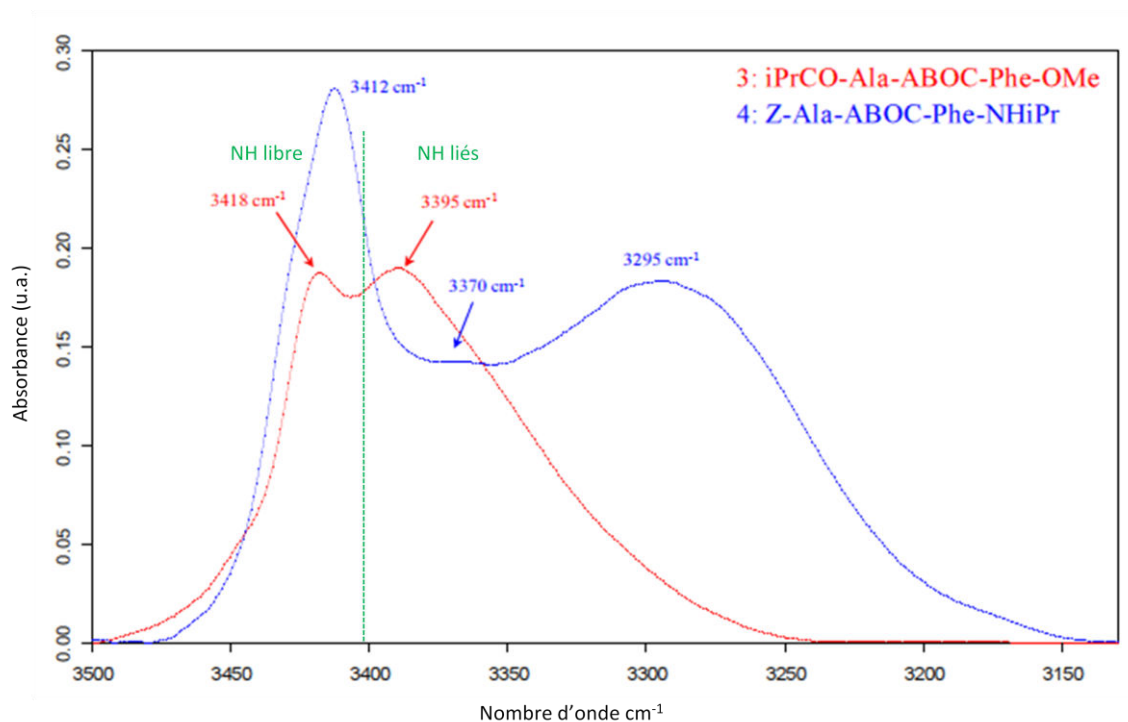


Figure III.12 : FT-IR : Comparaison de la région Amide A des tripeptides **3** (rouge) et **4** (bleu), enregistré dans le chloroforme à température ambiante.

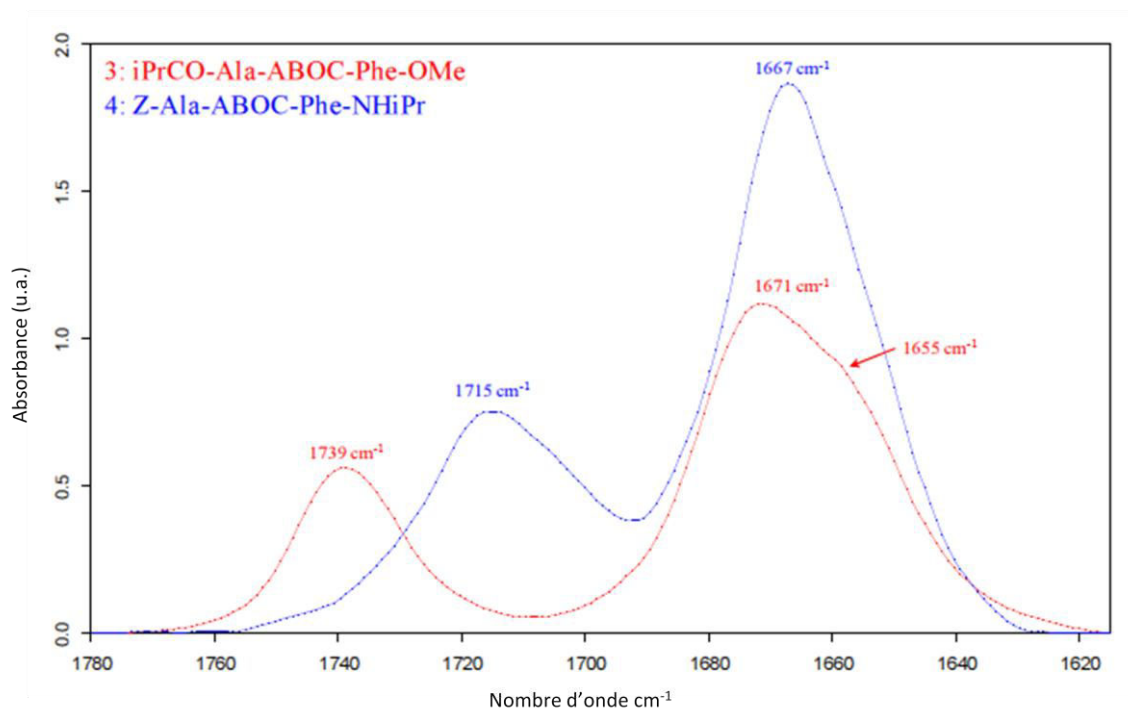
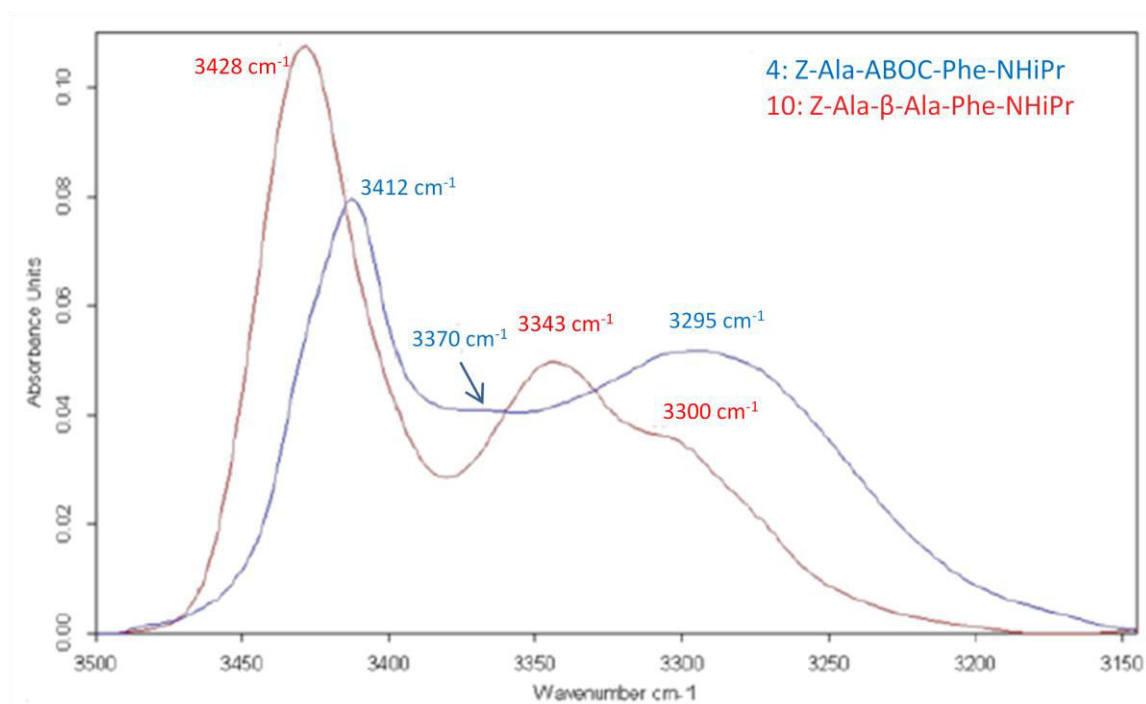


Figure III.13 : FT-IR : Comparaison de la région Amide I des tripeptides **3** (rouge) et **4** (bleu), Les spectres ont été enregistrés dans le chloroforme à température ambiante.

Les bandes amide I des spectres FT-IR des pseudopeptides **3** et **4** confirment l'implication des groupes CO dans des liaisons hydrogène.



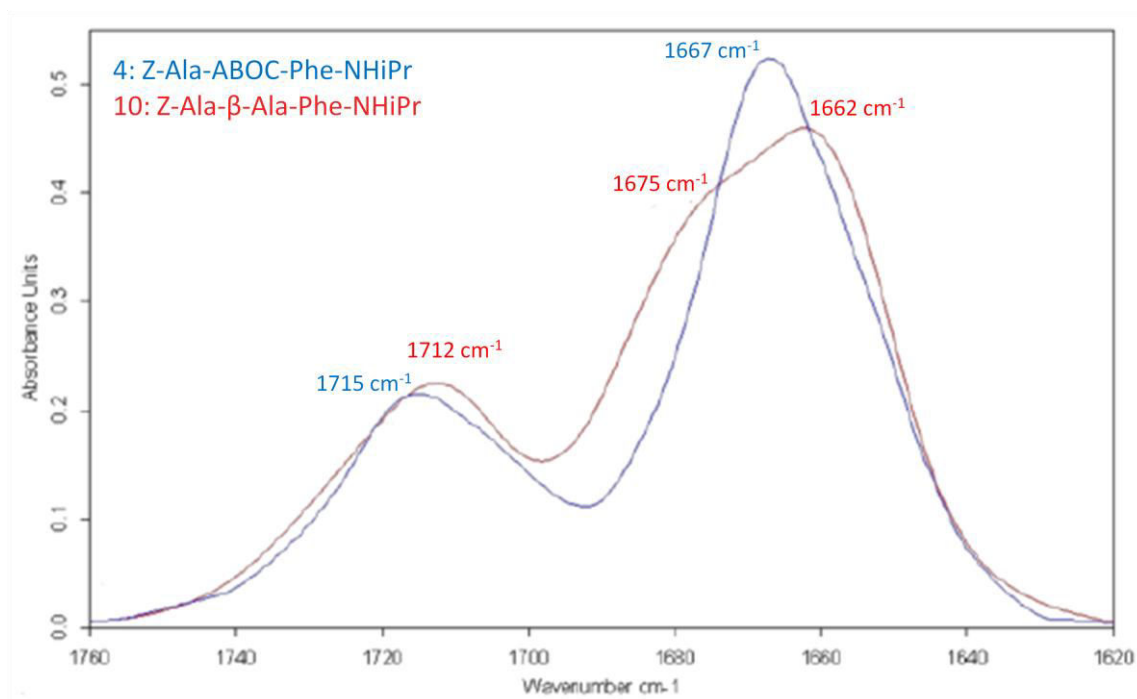


Figure III.14 : Comparaison des régions FT-IR Amide A (en haut) Amide I (en bas) des tripeptides **4** (bleu) et **10** (rouge) sans motif ABOC, enregistré dans le chloroforme.

En outre, les données de FT-IR et RMN de **4** ont été comparées à celles obtenues pour un tripeptide de référence, Z-Ala-βAla-Phe-NHiPr **10**, contenant un acide β-aminé non contraint contrairement au résidu ABOC rigide. La comparaison montre une structuration de celui-ci. En effet, dans la région amide A, le spectre de **4** fait apparaître une bande NH lié à une fréquence inférieure (3295 cm^{-1}). Le spectre du pseudopeptide **10**, présente lui une bande à 3343 cm^{-1} et un épaulement à 3300 cm^{-1} .

De plus, le rapport d'intégration des bandes NH lié et des bandes NH libres : AH/AF (AH: l'intégration des bandes NH lié, AF: l'intégration des bandes NH libre)^{85,86}, est beaucoup plus élevée dans le cas du tripeptide contenant ABOC ($\text{AH/AF} = 1,94$) que dans le cas de l'analogue β-Ala ($\text{AH / AF} = 0,89$). Cela suggère une plus grande implication des groupes NH dans des interactions intramoléculaires dans le tripeptide **4** par rapport à **10**.

⁸⁵ Benedetti, E. *et al.* Linear oligopeptides. 81. Solid-state and solution conformation of homooligo(α-aminoisobutyric acids) from tripeptide to pentapeptide: evidence for a 310 helix. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 2437–2444 (1982).

⁸⁶ Bonora, G. M., Mapelli, C., Toniolo, C., Wilkening, R. R. & Stevens, E. S. Conformational analysis of linear peptides: 5. Spectroscopic characterization of β-turns in Aib-containing oligopeptides in chloroform. *International Journal of Biological Macromolecules* **6**, 179–188 (1984).

Enfin, dans la région amide I, une bande de CO libre à 1675 cm^{-1} n'a été observée que pour **10**, ce qui confirme les observations précédentes d'un niveau plus élevé de structuration de **4**.

Nous avons également analysé l'influence de la température sur la formation des liaisons hydrogène. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure III.15). Pour les deux oligomères **3** et **4** nous avons observé que les spectres enregistrés ne changent pas en fonction de la température entre 20 et 60°C. Ceci nous indique que les liaisons hydrogène sont stables et assez fortes.

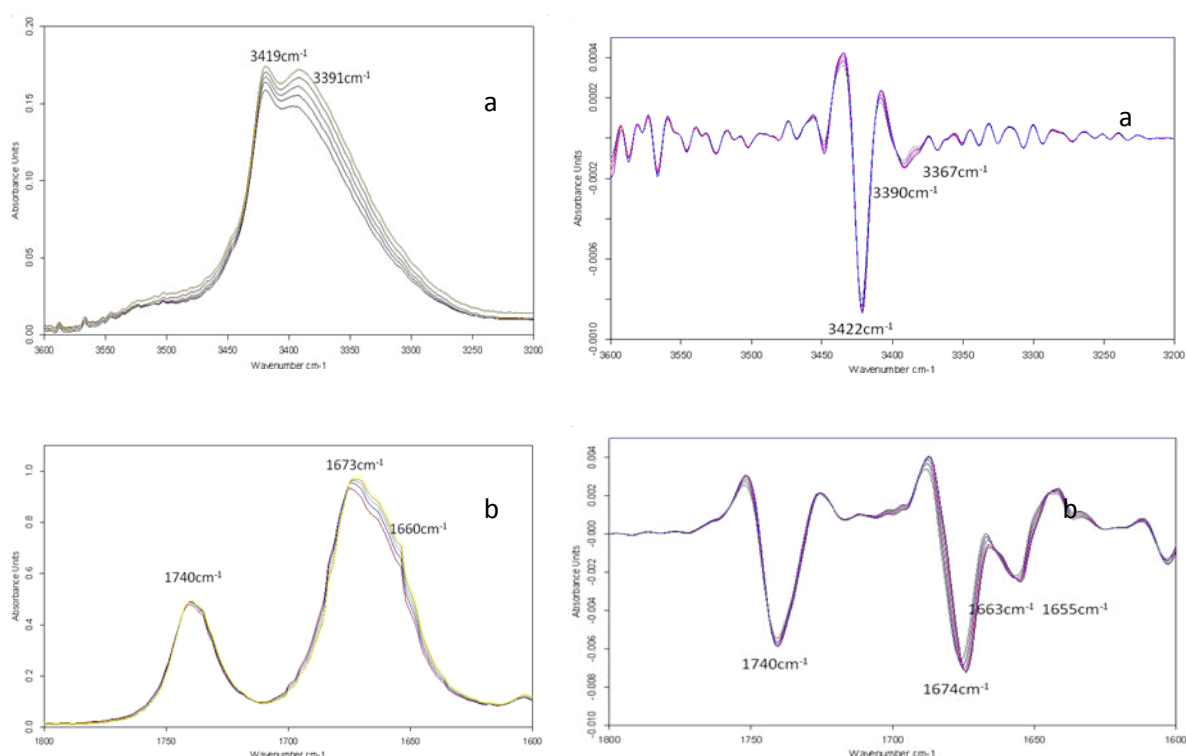


Figure III.15: Spectres FT-IR (à gauche) de la molécule **3** à température entre 20 et 60°C (concentration 20mM) des signaux des NH (a) et CO (b). La dérivée seconde (à droite) aide à la détermination des bandes d'absorption.

Nous avons également utilisé le Dichroïsme Circulaire (CD) qui permet de caractériser les éléments de structure secondaire des polypeptides et des protéines. Les expériences ont été réalisées en utilisant un dichrographe Jobin-Yvon CD6 (France). Les spectres ont été obtenus en solution en utilisant une cuve dont le trajet est de 2 mm, à 20°C, sur une plage de longueurs d'onde de 190-260 nm. Un mode de balayage continu a été utilisé, avec une réponse de 0,2 nm par 1.0 s. Le rapport signal sur bruit a été amélioré par l'acquisition de chaque spectre sur une moyenne de deux analyses. La ligne de base a été

corrigée en soustrayant le blanc à partir du spectre de l'échantillon. Les échantillons ont été dissous dans de l'acétonitrile de qualité spectroscopique ($\geq 99,8\%$, Carlo Erba) à $500\ \mu\text{M}$.

Dans notre cas, aucun spectre CD des oligomères d'ABOC n'avait été jusque là enregistré. Les spectres ont été enregistrés dans différentes conditions : à température ambiante, en température variable ou à différentes concentrations. Pour gagner plus de perspicacité dans la conformation des composés **3** et **4** en solution, nous avons enregistré les spectres de CD dans CD_3CN (Figure III.16).

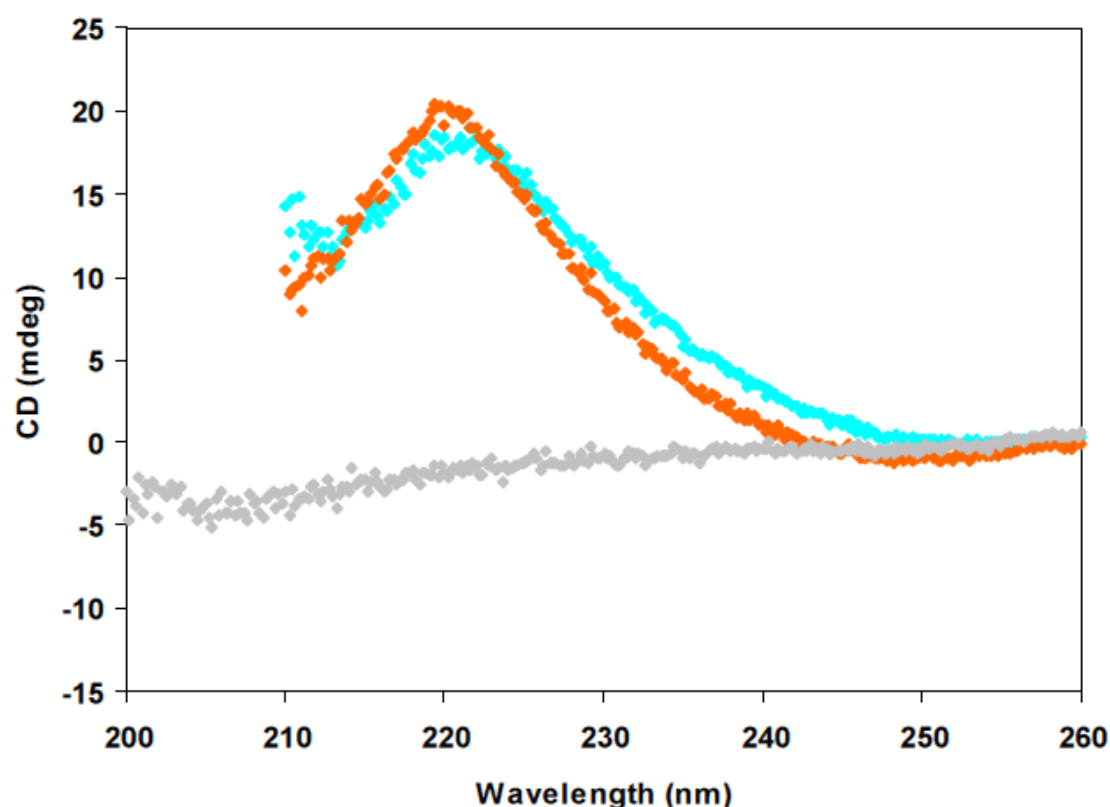


Figure III.16 : Spectres CD des composés **2** (gris), **3** (orange) et **4** (bleu).

Comme aucun signal n'a pu être détecté pour **2** (mono ABOC), nous pouvons déduire que le composé **2** ne se structure pas. D'autant plus que l'on obtient un signal dichroïque pour **3** et **4**, les deux spectres sont similaires avec un maximum observé autour de 220 nm. Cela indique la présence de structurations comparables pour les deux composés. Ces résultats confirment les éléments de structurations observés pour **3** et **4** par RMN et IR.

Pour compléter ces analyses dans la conformation des composés **3** et **4** en solution, nous avons effectué des études de RMN 2D sur la base de spectres ROESY (10 mM, 298 K) dans CDCl_3 et CD_3CN . Les déplacements chimiques protons ont été attribués selon les

procédures classiques. Les pics croisés NOE ont été intégrés et attribués dans le logiciel NMRView. Le volume d'un ROE entre la paire de protons méthylène a été utilisé comme référence pour une distance de 1,78 Å. La limite inférieure pour toutes les contraintes a été fixée à 1,8 Å et des limites supérieures à 2,7, 3,3 et 5,0 Å, correspondant à une interaction forte, moyenne et faible, respectivement. Des corrections de pseudo-atomes des limites supérieures ont été appliquées pour les noyaux aromatiques.

Pour les deux composés, les contraintes observées et les distances issues des mesures des volumes des pics ROE sont présentées dans le tableau III.5 pour le composé **3**, et celui des ROE dans CDCl₃ sont présentés dans la figure III.17. Le composé **4** est présenté dans le tableau III.8 et la figure III.18 résume les contraintes les plus importantes dans CDCl₃.

Tableau III.5 : Contraintes observées et distances dérivées des ROE pour le composé **3** dans CDCl₃. Le numéro 1, 2 et 3 placé devant le nom de l'atome correspond au numéro du résidu.

Name of the ROE Correlation	Distance upper bound (Å)		Type
	CD ₃ Cl	CD ₃ CN	
1.HN-2.HN	5.0	5.0	Sequential
1.HN-1.HA	5.0	5.0	Intra-residue
1.HN-1.HB	4.3	4.3	Intra-residue
1.HN-OMe	6.0	6.0	Long range
1.HN-HA iPr	3.3	3.3	Sequential
1.HN-CH ₃ iPr	-	6.0	Sequential
2.HN-3.HN	5.0	5.0	Sequential
2.HN-2.HA	5.0	5.0	Intra-residual
2.HN-1.HA	3.3	3.3	Inter-residual
2.HN-1.HB	4.3	6.0	Sequential
2.HN-OMe	6.0	6.0	Long range
3.HN-3.HA	3.3	5.0	Intra-residual
3.HN-3.HB	6.0	5.0	Intra-residual
3.HN-2.HA	2.7	2.7	Sequential
3.HN-2.HB	5.0	-	Sequential
3.HN-1.HA	5.0	-	Long range
3.HN-1.HB	6.0	6.0	Long range
3.HN-3.HD	5.3	7.0	Intra-residual
3.HN-OMe	6.0	-	Sequential
3.HA-3.HD	5.3	5.3	Intra-residual
3.HB-1.HB	5.3	6.0	Long range
3.HA-OMe	6.0	6.0	Sequential

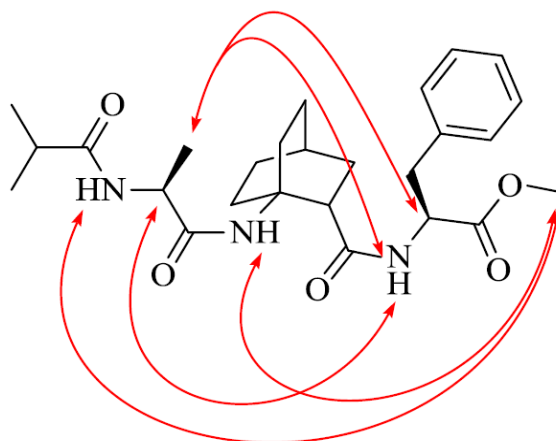


Figure III.17 : Représentation des contraintes ROE inter-résidu observées pour le composé **3** dans CDCl_3 .

Tableau III.6 : Contraintes observées et distances dérivées des ROE pour le composé **4** dans CDCl_3 . Le numéro 1, 2 et 3 placé devant le nom de l'atome correspond au numéro du résidu.

Name of the ROE Correlation	Distance upper bound (Å)		Type
	CD_3Cl	CD_3CN	
1.HN-2.HN	3.3	5.0	Sequential
1.HN-1.HA	3.3	5.0	Intra-residue
1.HN-1.HB	4.3	4.3	Intra-residue
1.HN-HN NHiPr	5.0	-	Long range
1.HN-HA NHiPr	5.0	5.0	Long range
1.HN-H Z	6.0	6.0	Sequential
1.HN-HB NHiPr	6.0	6.0	Long range
2.HN-3.HN	5.0	5.0	Sequential
2.HN-2.HA	5.0	5.0	Intra-residual
2.HN-1.HA	3.3	3.3	Inter-residual
2.HN-HB NHiPr	6.0	6.0	Long range
3.HN-3.HA	3.3	2.7	Intra-residual
3.HN-3.HB	4.3	5.0	Intra-residual
3.HN-2.HA	2.7	2.7	Sequential
3.HN-2.HB	5.0	5.0	Sequential
3.HN-1.HB	6.0	6.0	Long range
3.HN-3.HD	5.3	5.3	Intra-residual
3.HA-3.HD	5.3	5.3	Intra-residual
3.HB-1.HB	5.3	6.0	Long range
HN NHiPr-3.HB	6.0	6.0	Sequential
HN NHiPr-3.HA	2.7	2.7	Sequential
H Z-HD/HE Z	6.0	-	Intra-residual

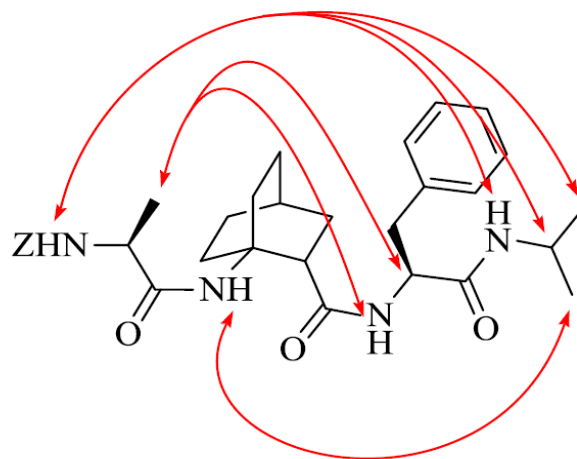


Figure III.18 : Représentation des contraintes ROE inter-résidu observées pour le composé **4** dans CDCl_3 .

Pour le composé **3** dans le solvant CDCl_3 , 21 contraintes de distance ont été observées et utilisées, et 19 contraintes de distance dans l'acétonitrile. Dans le tableau III.7, nous avons remarqué que les contraintes et les distances dans CDCl_3 et CD_3CN sont relativement similaires, et les contraintes les plus importantes sont identiques.

Pour le composé **4**, nous avons trouvé et utilisé 22 contraintes de distance dans le CDCl_3 , et 20 contraintes de distance dans l'acétonitrile. Nous avons fait la même comparaison que pour le composé **3**. Comme attendu, les NOEs observés sur les spectres ROESY étaient très proches pour **3** et **4** dans les deux solvants.

Les 15 structures d'énergies les plus basses pour chacun des deux pseudopeptides **3** et **4** dans CDCl_3 et CD_3CN sont présentées dans la figure III.19.

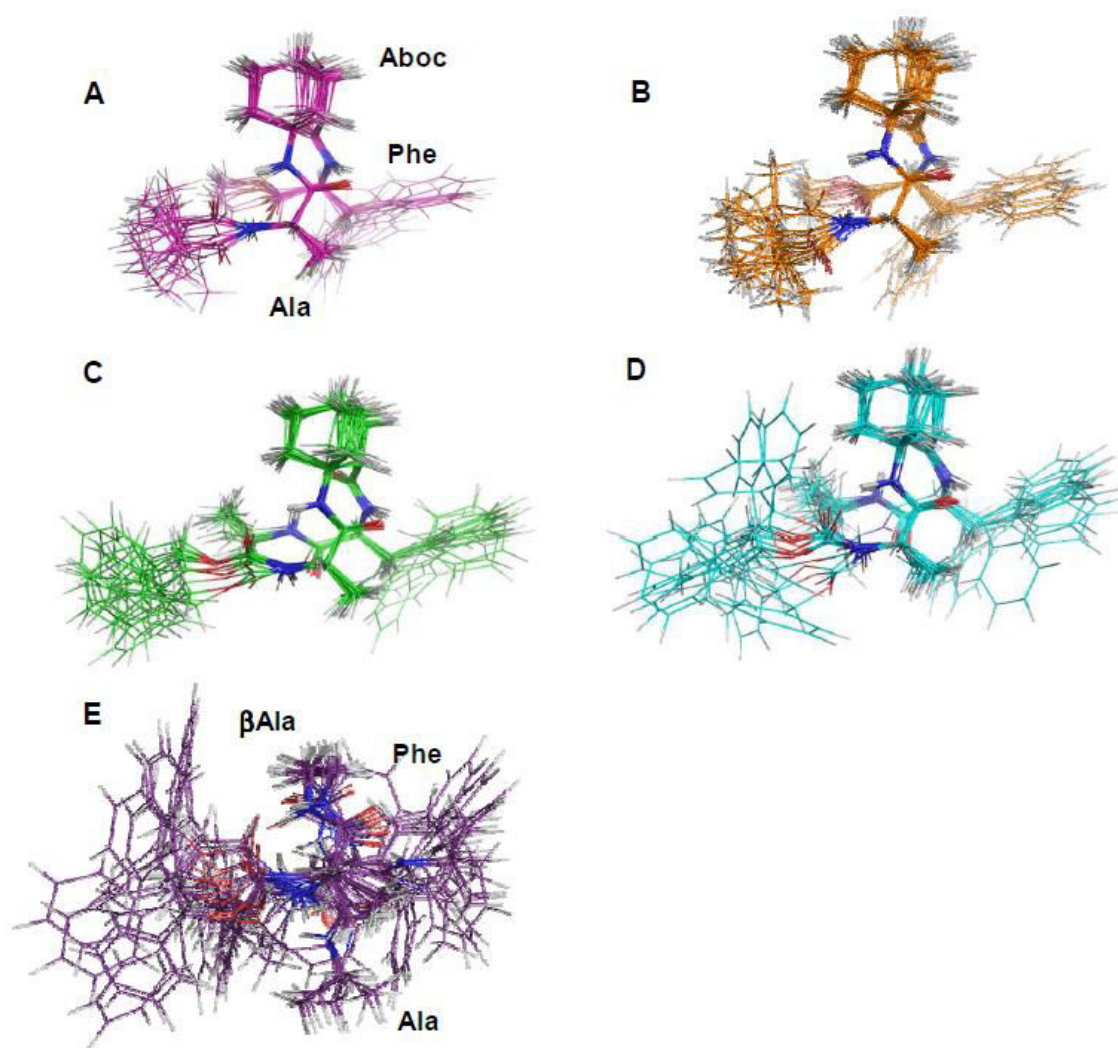


Figure III.19: Représentation des structures tri-dimensionnelles en solution: A) le composé **3** dans le CDCl_3 (RMSD sur les atomes du squelette=0.16 Å); B) le composé **3** dans le CD_3CN (RMSD =0.22 Å); C) le **4** dans le CDCl_3 (RMSD sur les atomes du squelette =0.13 Å); D) le **4** dans le CD_3CN (RMSD =0.12 Å); E) le **10** dans le CDCl_3 (RMSD =0.43 Å).

Nous avons choisi entre 15 et 20 structures de plus basses énergies pour étudier leur structure. Comme indiqué dans la figure III.19, les écarts quadratiques moyens (RMSD: Root Mean Square Déviation) d'ajustement sur la position des atomes lourds du squelette ont été très faibles dans les quatre ensembles de structures calculées. Ces RMSD diminuent de manière significative lorsque les atomes des extrémités sont omises (RMSD environ 0,2 Å). Dans la figure III.20, nous avons bien confirmé que les composés **3** (A. RMSD=0.16 Å dans le CDCl_3 et B. RMSD=0.22 Å dans le CD_3CN), et **4** (C. RMSD=0.13 Å dans le CDCl_3 et D. RMSD=0.12 Å dans le CD_3CN) sont bien stables, toutes les structures sont bien superposées. A partir de ces structures, les liaisons hydrogène sont calculées et présentées sur le tableau

III.7 et tableau III.8. Trois liaisons hydrogène ont été trouvées dans la structure du composé **3** et quatre liaisons hydrogène pour le composé **4**.

Tableau III.7: Les trois liaisons hydrogène calculées (bleu) sur les 30 structures d'énergie les plus basses du composé **3** (distance < 2.40Å, angle NHO < 35.0°).

donneur	accepteur	Nombre de LH/30, Distance (Å) et Angle (°)
H1	O4	29 (1.75..1.93) (2.6..23.6) *****0** *5*****0*****5*****0
H2	O1	22 (1.73..1.84) (12.4..16.4) * **5* *0** * **0* **5*****0
H3	O1	1 (1.73..1.73) (12.7..12.7) *
H3	O2	23 (1.89..2.03) (19.0..26.7) *****5 *** * *5***** * *5*****0

Tableau III.8: Les quatre liaisons hydrogène calculées (bleu) sur les 30 structures d'énergie les plus basses du composé **4** (distance < 2.40Å, angle NHO < 35.0°).

donneur	accepteur	Nombre de LH/15, Distance (Å) et Angle (°)
H1	O5	11 (1.72..2.28) (7.1..31.2) *** *****0* * 5
H14	O5	1 (2.40..2.40) (30.3..30.3) *
H15	O5	1 (2.25..2.25) (17.4..17.4) 5
H2	O2	10 (1.81..2.37) (14.0..27.9) ** *5* * * **5
H3	O3	11 (1.74..2.20) (12.7..32.3) ** * * **0*****
H4	O4	12 (1.86..2.19) (13.9..33.9) ** *5 **0*****5
H36	O1	3 (2.24..2.36) (15.9..31.3) * **

Pour le composé **10** (Figure III.19: E), 21 contraintes de distance ont été utilisées pour le calcul de la structure, mais seulement deux ROE longue distance ont pu être détectés dans le spectre ROESY dans CDCl₃. En effet, pour le composé **4**, les ROE caractéristiques impliquent le NH (Ala) avec les protons NH, CH, CH₃ du groupe NHiPr C-terminal, mais aucun d'entre eux n'a pu être détecté dans les spectres du composé **10**. En conséquence, l'ajustement de RMSD des atomes lourds squelette du composé **10** est supérieur à celui des composés **3** et **4** (0,429 pour **10** contre 0,160 et 0,131 pour **3** et **4**, respectivement), indiquant des disparités structurales significatives entre les structures RMN d'énergie les plus faibles. De plus, aucune structure n'a été calculée pour **10** dans CD₃CN en raison de la faible solubilité dans ce solvant, induisant des largeurs de raie pour les résonances protons amide et une mauvaise qualité des spectres ROESY. L'écart type significatif sur les valeurs d'angle

dièdre a également souligné la liberté de conformation supérieure du tripeptide **10** par rapport aux tripeptides **3** et **4** (Tableau III.9).

Les résultats de la modélisation moléculaire, montrent une conformation en coude inverse sur le squelette Ala (S)-ABOC-Phe dans les deux tripeptides **3** et **4** (Figure III.20).

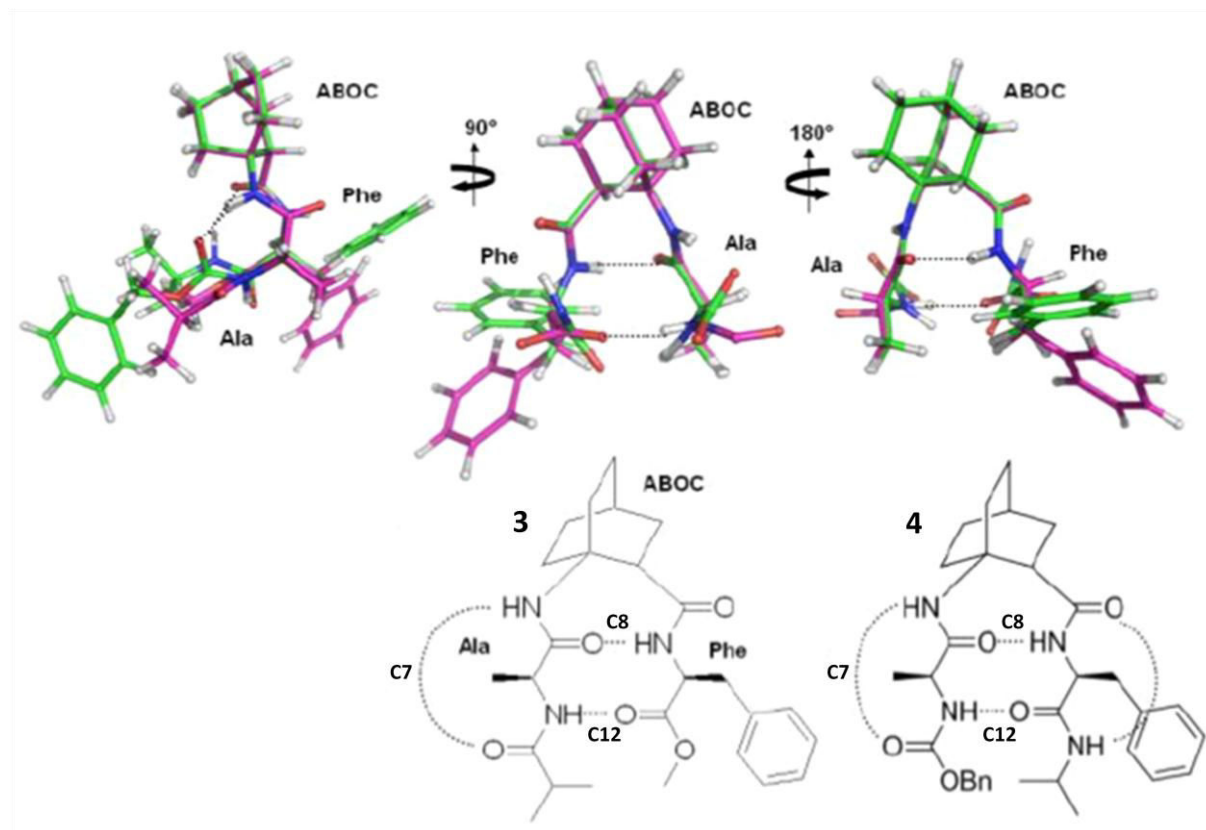


Figure III.20 : Superposition des structures RMN de **3** (magenta) et **4** (vert) dans CDCl₃ en haut, et en bas la représentation d'une conformation de coude inverse sur le squelette Ala (S)-ABOC-Phe sur **3** et **4**, les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes en pointillés.

La figure III.20 nous donne deux informations importantes : 1) les squelettes des composés **3** et **4** sont bien superposés, ils possèdent quasiment la même conformation dans le solvant CDCl₃, et nous avons trouvé le même résultat dans le solvant acétonitrile. 2) la structure du composé **4** est bien stabilisée par la présence de quatre liaisons hydrogène, et la structure du composé **3** est stabilisée par trois liaisons hydrogène à cause de l'absence du NH en Cterm. Dans les deux cas, le coude inverse sur le squelette Ala-(S)-ABOC-Phe est stabilisé par deux liaisons hydrogène, un pseudocycle C8 entre le NH (Phe) et CO (Ala), et un autre pseudocycle en C12 entre NH (Ala) et CO (Phe). L'absence du NH en Cterm pour le composé **3** induit une variation de l'angle ψ de la Phenylalanine qui fait remonter le CO Cterm (Phe) d'environ 40°, renforçant la liaison hydrogène CO (Phe) et NH (Ala). Ceci entraîne une légère

rotation de l'angle dièdre Φ de l'alanine 1 qui favorise cette liaison hydrogène. Néanmoins, ceci entraîne une variation de la position du carbonyle de l'isopropyle Nter qui n'est plus favorable à la liaison entre CO (iPr) et NH (ABOC). Il existe également un pseudocycle en C7 qui est stabilisé par une liaison hydrogène entre NH (ABOC) et CO (N-ter) pour les deux composés, et un autre pseudocycle en C7, stabilisé par une liaison hydrogène entre NH (NHiPr) et CO (ABOC), se trouve uniquement dans le composé **4**.

Nous avons, en parallèle, tenté de cristalliser nos échantillons afin de déterminer leurs structures par diffraction des rayons X. Pendant ma thèse, j'ai utilisé deux techniques pour obtenir des cristaux : par évaporation lente et par diffusion. Les cristaux du tripeptide **4** ont été obtenus dans CH_2Cl_2 par évaporation lente. Après la diffraction des rayons X, un modèle tridimensionnel est reconstruit, et la structure RX du composé **4** est montrée Figure III.21.

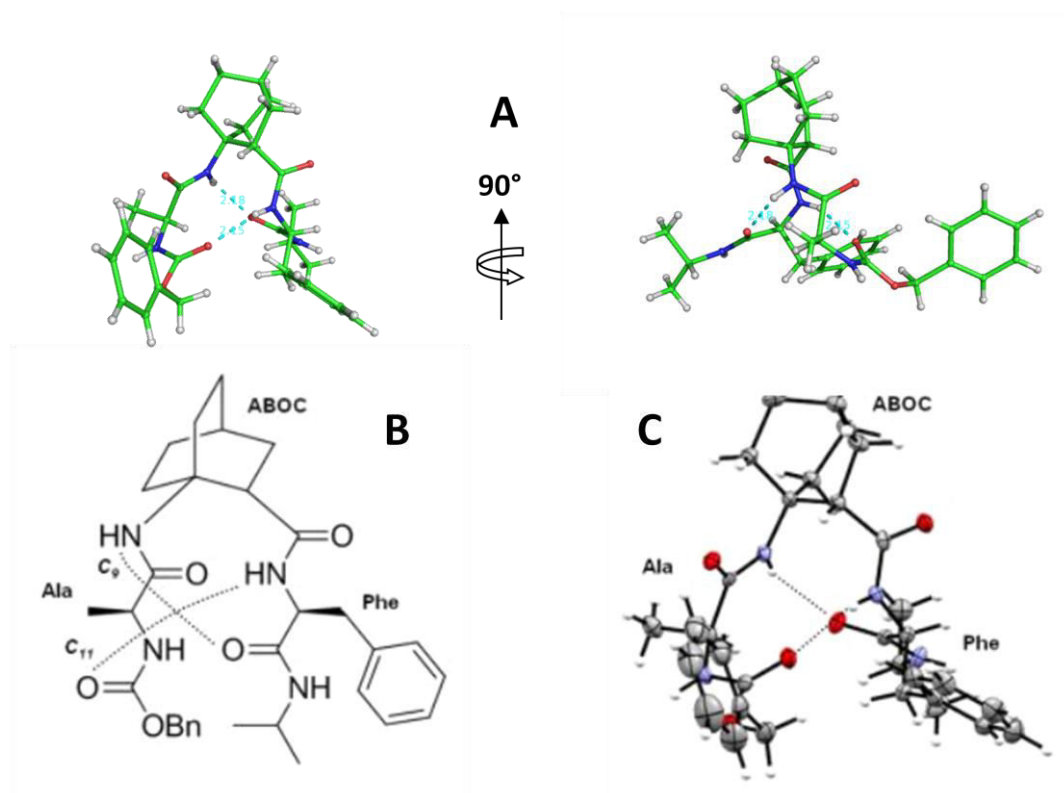


Figure III.21 : Structure cristalline du composé **4** ; les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés.

On observe que le motif (S)-ABOC induit des coudes β non canoniques. Par rapport à sa structure en solution, il représente un réseau de liaisons hydrogène différent. Dans le cristal, deux des liaisons hydrogène sont présentes : une entre le NH (ABOC) et du CO (Phe) formant un pseudocycle en C9, et une autre entre NH(Phe) et CO(Z) formant un pseudocycle en C11. La structure RX de **4** est assez différente de la structure en solution où seuls les protons NH

de l'ABOC et la Phe sont impliqués dans des liaisons hydrogène, alors qu'en solution les coefficients de température et les études en mélange de solvants, semblent également impliquer Ala dans une liaison hydrogène. La conformation préférentielle dans le cristal est stabilisée par une liaison hydrogène entre le CO(Z) et NH(Phe).

Une comparaison des structures cristallines et RMN en solution est représentée dans la figure III.22. Le squelette du structure RMN en solution (vert) et la structure RX cristalline (jaune) se superposent assez bien (B). Cependant en A, nous voyons que la différence principale est la situation du groupement fraction benzyle tourné vers la chaîne latérale de la phénylalanine à l'état solide (Figure III.22 A), ce qui est incompatible avec les règles d'engagement longue distance décrits en solution (en particulier entre le NH (Ala) et le groupe isopropyle).

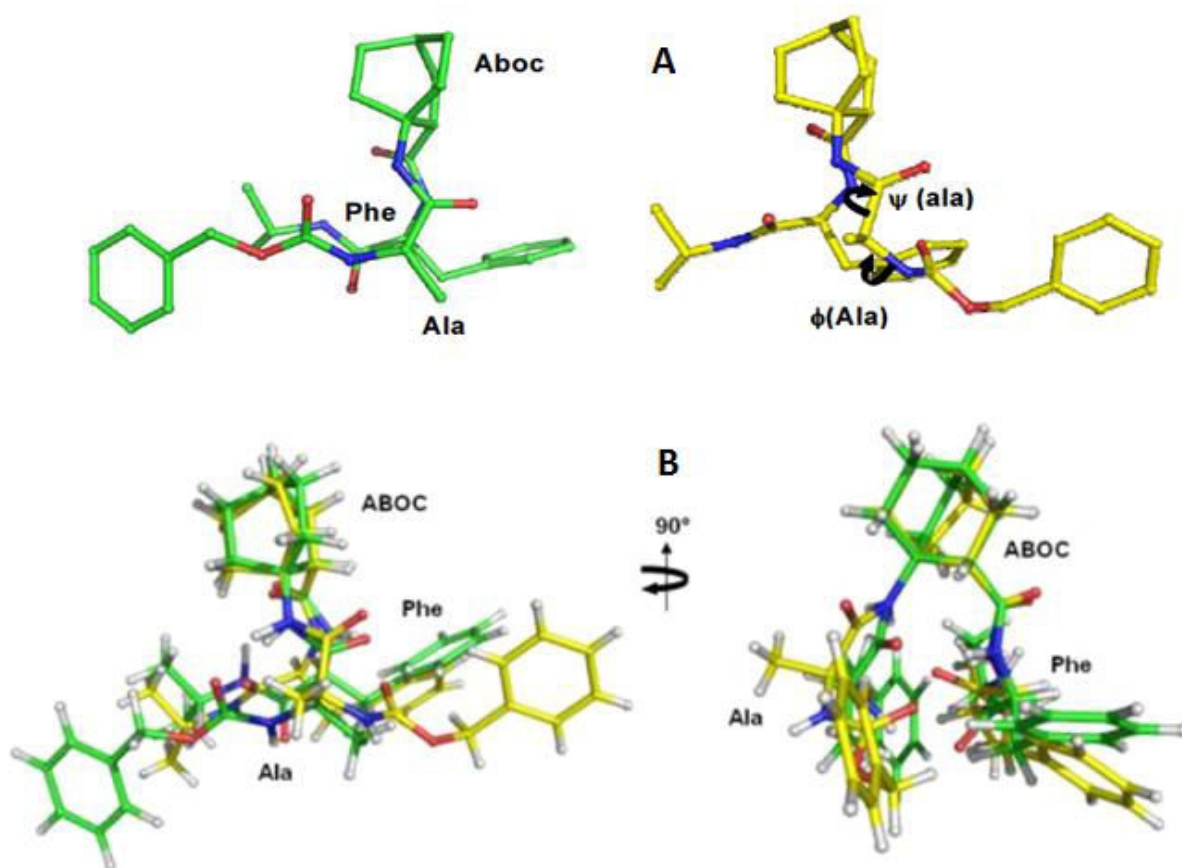


Figure III.22 : Comparaison de la structure du composé **4** dans les deux états différents : A) comparaison du squelette de la structure RMN en solution (vert) avec la structure RX (jaune); B) superposition de la structure RMN en solution (vert) avec la structure RX (jaune).

Pour comparer davantage le coude (S)-ABOC en solution et à l'état solide, les angles dièdres du squelette ϕ , ψ et θ ont été mesurés et présentés dans le tableau III.9. Comme nous

avons vu dans la figure III.20, les chaînes principales des structures des composés **3** et **4** sont similaires et superposables, donc les angles de torsion de squelette des composés **3** et **4** sont semblables comme prévu.

Tableau III.9: Angles dièdres (°) des oligomères **3**, **4** et **10** en solution dans CDCl₃ et **4** (XRD) en phase cristalline.

		ϕ	θ	ψ
Ala	3	-110.6 ± 28.6	-	17.6 ± 13.4
	4	-88.7 ± 19.2	-	31.1 ± 7.8
	4 (XRD)	-48.9	-	142.2
	10	-54.4 ± 46.9	-	33.6 ± 4.5
ABOC	3	63.8 ± 13.1	46.7 ± 8.7	-86.6 ± 6.3
	4	50.6 ± 9.6	47.7 ± 7.6	-90.1 ± 9.1
	4 (XRD)	76.2	62.4	-82.5
βAla	10	76.6 ± 22.6	10.5 ± 62.2	-87.3 ± 91.7
Phe	3	-65.0 ± 13.1	-	114.3 ± 17.3
	4	-68.1 ± 10.4	-	73.3 ± 16.0
	4 (XRD)	-70.0	-	74.7
	10	-109.0 ± 81.9	-	86.7 ± 62.5

La valeur de l'angle θ caractéristique du motif (S)-ABOC est comprise entre 50° et 60°. La variation de la position du groupe uréthane de benzyle en solution et à l'état solide, a été associée avec des rotations des angles dièdres de l'alanine: ϕ et ψ (c'est-à-dire -88.7° contre -48.9° et 31,1° par rapport à 142,2° en solution et dans le cristal, respectivement). Dans le tripeptide **4**, malgré les écarts dans le réseau de liaison hydrogène, les angles dièdres sont relativement proches en solution et dans le cristal. Pour le composé **10**, nous avons vu aussi que l'écart type significatif sur ces valeurs est grand, ce qui indique une plus grande mobilité de ce composé.

Ces résultats suggèrent que le motif (S)-ABOC est capable également d'initier un repliement en hélice.

III.1.5 Conclusions et perspectives

L'ensemble de ces résultats permet de répondre aux questions de nos collaborateurs : c'est à dire d'identifier une nouvelle génération d'oligomères poly-ABOC, définir les caractéristiques structurales du motif ABOC, construits à partir de mimes pseudopeptidiques contraints, capables d'adopter des structures secondaires déterminées.

Ainsi, il constitue un nouveau bloc de construction pour concevoir des oligomères à base de ce motif ABOC qui apporte des structures secondaires par exemple les hélices.

Par la suite d'autres études structurales ont été menées mettant en évidence les propriétés de ce motif à concevoir différents types d'hélices en fonction des séquences des pseudopeptides. De telles propriétés sont particulièrement intéressantes pour la conception d'hélices stables et également pour le placement des chaînes latérales dans l'espace^{87,88,89}.

⁸⁷ André, C. *et al.* (S)-ABOC: A Rigid Bicyclic β -Amino Acid as Turn Inducer. *Org. Lett.* **14**, 960–963 (2012).

⁸⁸ Legrand, B. *et al.* Robust Helix Formation in a New Family of Oligoureas Based on a Constrained Bicyclic Building Block. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 11267–11270 (2012).

⁸⁹ André, C. *et al.* Mixed oligoureas based on constrained bicyclic and acyclic β -amino acids derivatives: on the significance of the subunit configuration for folding. *Chemistry* **19**, 16963–16971 (2013).

III.2 Etude structurale du motif thiazole

III.2.1 Introduction

Le second projet dont j'ai été chargé concernait l'étude structurale d'une famille de pseudopeptides à base de motif thiazole. Cette étude a été menée en collaboration avec Ludovic Maillard de l'IBMM à Montpellier qui a imaginé et synthétisé ce motif. Le but de cette étude était également de connaître la capacité de ces motifs à former des structures secondaires contraintes permettant de considérer ces oligomères comme des foldamères. Bien que le motif soit différent du motif ABOC précédemment décrit, il s'agissait là également d'un motif cyclique hautement contraint. Comme pour l'étude précédente, notre démarche a consisté à utiliser plusieurs techniques spectroscopiques afin d'effectuer l'analyse structurale des pseudopeptides créés. Plusieurs oligomères de tailles et de compositions différentes ont été étudiés afin de connaître la taille minimum nécessaire pour voir apparaître une structuration et identifier les éléments qui stabilisent cette structure. Le motif thiazole est un mime d'acide aminé γ . Sa structure est représentée figure III.23, le cycle thiazole comprend le carbone alpha et beta, ce qui forme un γ -pseudopeptide. Dans la suite de ce chapitre nous appellerons ce motif « thiazole ».

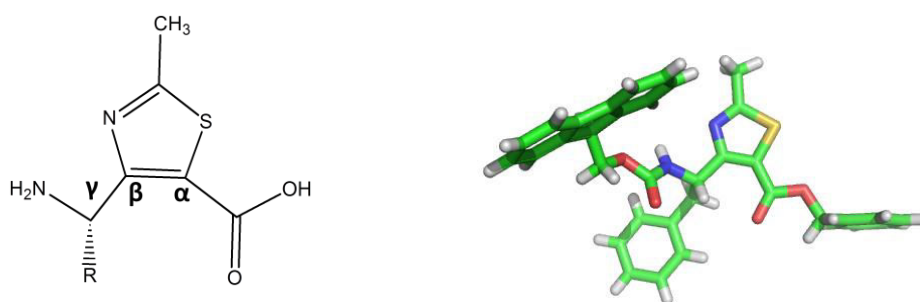


Figure III.23, représentation du motif thiazole et d'un mono- γ -peptide **6b** contenant le γ acide aminé (Fmoc- γ -Phe-Obzl).

Pour cette étude nous avons utilisé conjointement deux techniques biophysiques : la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la diffraction des rayons X. Comme dans l'étude précédente, le but était de mettre en évidence la formation des liaisons hydrogène qui stabilisent les structures et de collecter des contraintes structurales, afin d'établir une structure tridimensionnelle des différents oligomères.

III.2.2 Les formules des oligomères

Pour faciliter l'étude de ces échantillons d'acide γ -aminé, nous avons choisi un fragment thiazole comme unité de base : il possède deux acides γ -aminés, une γ -Alanine-thiazole à gauche et un l'autre γ -Phénylalanine-thiazole à droite (Figure III.24).

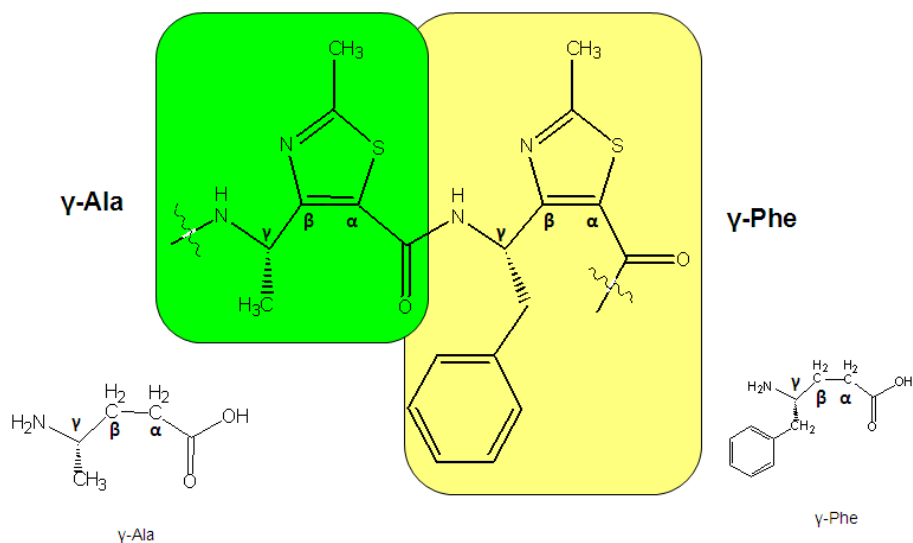


Figure III.24 : Représentation développée de l'unité de base acide γ -aminé: γ -Ala- γ -Phe comprenant le motif thiazole, en bas sont les γ -Ala et γ -Phe « classiques ».

Les structures des différents oligomères sont décrites dans le tableau III.10. Le composé **6b** qui possède une seul γ -Phénylalanine-thiazole, permet d'obtenir les caractères structuraux du cycle thiazole et ces paramètres seront par la suite utilisés et intégrés au champ de force d'AMBER pour calculer les structures des autre γ -pseudopeptides. Le composé **2**, possède deux acides γ -aminés-thiazole, le composé **3a** possède quatre acides γ -aminés-thiazole, et le plus long est le composé **3b** qui possède six acides γ -aminés-thiazole. Pour étudier les influences des extrémités, nous avons également choisi d'étudier la structure du composé **3d** et la comparer avec **3a**.

Tableau III.10 : Structures développées des échantillons γ -pseudopeptides.

Nom	Formules développées
6b Fmoc- γ -Phe- OBn	
2 Fmoc-dimère- OBn	
3a Fmoc- tétramère- OBn	
3b Fmoc- hexamère- OBn	
3d Boc-tétrmère- NHiPr	

III.2.3 Synthèse des acides γ -aminés-thiazole 6b, 2, 3a et 3b

La synthèse des composés à été mise au point par Ludovic Maillard. Les stratégies de synthèse du monomère (Schéma III.2) et des oligomères sont représentées dans les schémas ci-dessous (Schéma III.3, Schéma III.4).⁹⁰

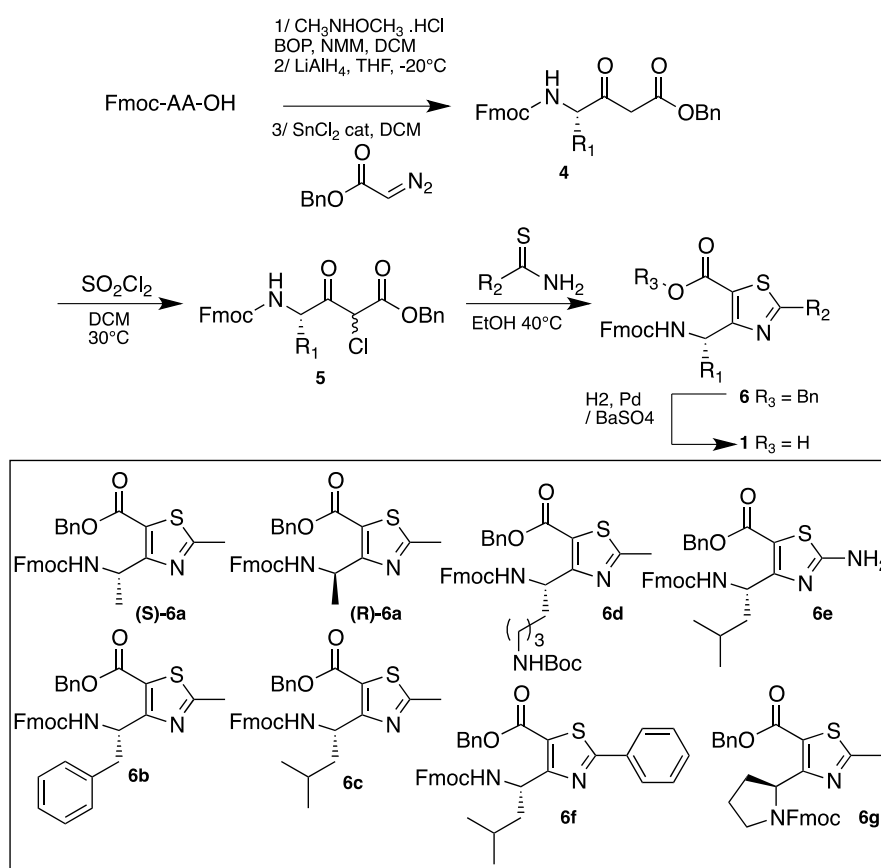


Schéma III.2: Synthèse des acides γ -aminé-thiazole N-Fmoc protégés. AA = Acide α -aminé, BOP = Benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate, NMM = N-méthylmorpholine.

⁹⁰ Chaubet, G., Maillard, L. T., Martinez, J. & Masurier, N. A tandem aza-Friedel–Crafts reaction/Hantzsch cyclization: a simple procedure to access polysubstituted 2-amino-1,3-thiazoles. *Tetrahedron* **67**, 4897–4904 (2011).

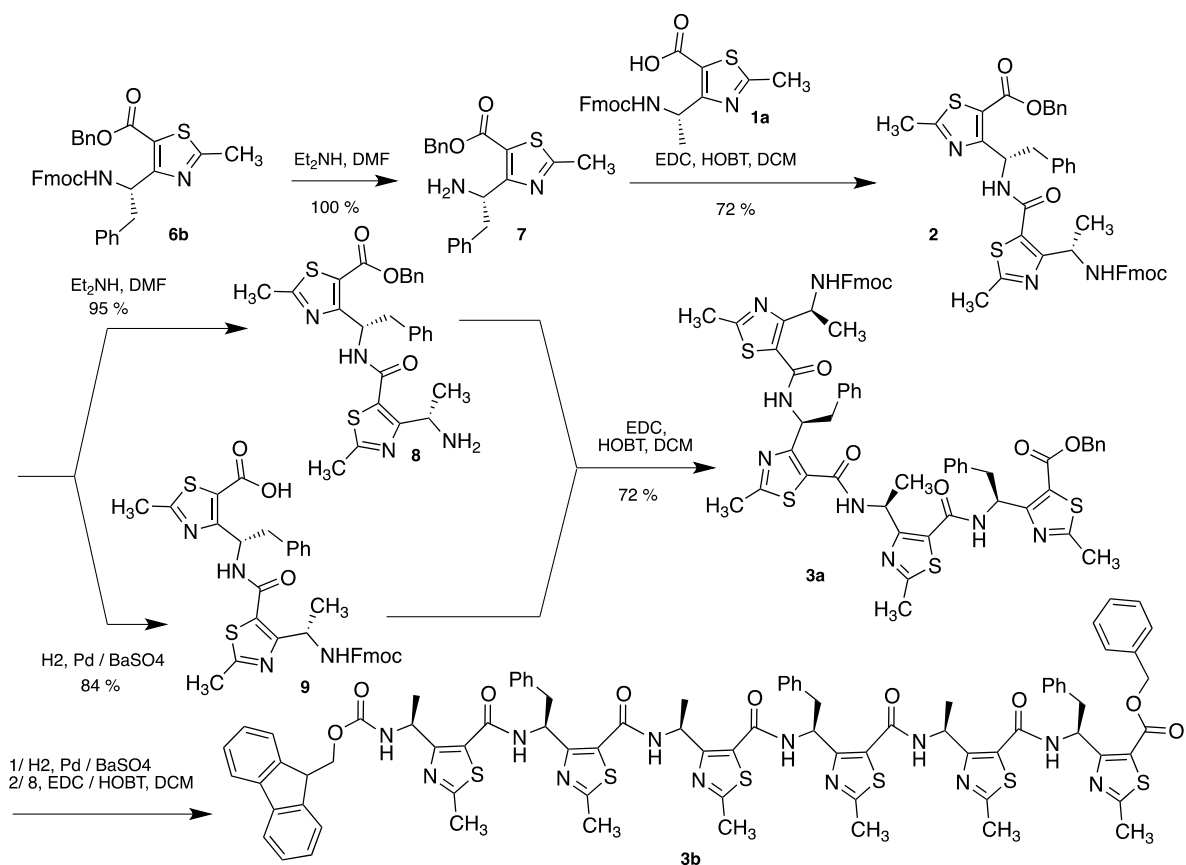


Schéma III.3: Synthèse des oligomères **2**, **3a**, **3b**.

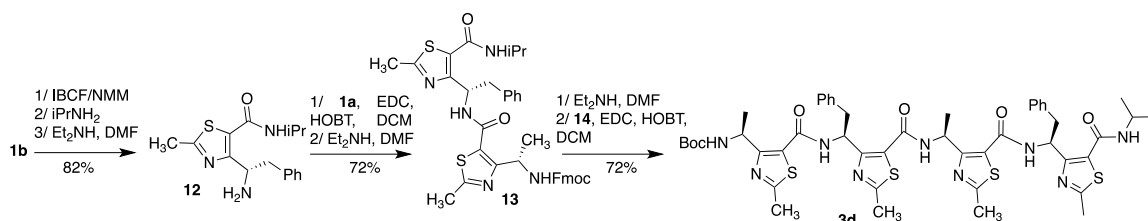


Schéma III.4: Synthèse des oligomères **3d**.

III.2.4 Résultats et discussions

Nous avons obtenu des cristaux pour le monomère **6b** et le tétramère **3c** et nous avons pu établir leurs structures par DRX. Le dimère **2**, les tétramères **3a** et **3d** et l'hexamère **3b** ont été étudiés en solution dans le CDCl_3 . Dans chaque cas, les signaux de RMN étaient bien dispersés et l'attribution de noyaux ^1H , ^{13}C et ^{15}N a été réalisée grâce à des expériences $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC, les noyaux ^{15}N et ^{13}C étant en abondance naturelle (Annexe). L'attribution séquentielle a été réalisée sur la base des expériences ROESY ($\tau_m = 450$ ms).

Les cinq angles de torsion pour le squelette peptidique sont notés dans la figure III.25.

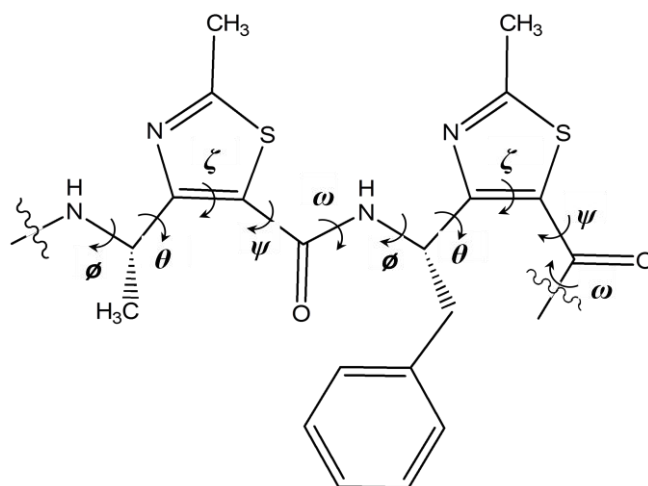


Figure III.25: Les paramètres utilisés pour définir les angles dièdres du squelette.

III.2.4.1 La structure de **6b** (Fmoc-γ-Phe-OBn)

Dans un premier temps, le monomère **6b** a été cristallisé, le moyen de cristallisation et le processus est présenté dans le tableau III.11. Pour obtenir un cristal de qualité, nous avons essayé beaucoup de solvants différents, le monomère **6b** est peu soluble dans le CHCl_3 , donc nous avons essayé de mélanger d'autres solvants avec le chloroforme par exemple méthanol, n-pentane avec eau ou isopropane avec eau. En suite, nous avons mis dans une chambre noire et les avons laissé évaporer lentement, après quatre jours, nous avons obtenu le premier cristal dans le solvant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, il faut attendre au moins dix jours dans le solvant $\text{CHCl}_3/\text{n-pentane}/\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{CHCl}_3/\text{isopropanol}/\text{H}_2\text{O}$.

Tableau III.11 : Moyens et le protocole pour obtenir le cristal du composé **6b**.

n°	solvant	soluble à T ambiante	opération	temps	cristal
1	acétonitrile	n			
2	acétone	n			
3	MeOH	n			
4	THF	n			
5	Acétate d'éthyle	n			
6	DCM	n			
7	CHCl_3	y	évaporation		n
8	$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	y	évaporation	4j	y
9	$\text{CHCl}_3/\text{n-pentane}/\text{H}_2\text{O}$	y	évaporation	10j	y
10	$\text{CHCl}_3/\text{isopropane}/\text{H}_2\text{O}$	y	évaporation	10j	y

Les spectres de diffraction RX ont été enregistrés et traités dans le service commun de diffraction de la faculté des sciences à l'université de Lorraine par Emmanuel Wenger et

Claude Didierjean. Les données DRX pour le composé **6b** ont été collectées à 100 K avec un diffractomètre Oxford Diffraction Xcalibur 2 équipé d'une source cuivre de haute intensité/faible puissance micro-source. Les données pour **6b** ont été traitées à l'aide de CrysAlis RED (Oxford Diffraction, 2003). Les structures ont été résolues avec SIR2004.⁹¹ Les affinements cristallographiques ont été réalisés à l'aide de SHELXL-97.⁹² Les données cristallographiques sélectionnées sont reportées dans le tableau III.12. La structure tridimensionnelle est représentée figure III.26.

Tableau III.12 : Les données cristallographiques sélectionnées pour **6b**

Composé	6b
Molecular formula	C ₃₅ H ₃₀ BrN ₂ O ₄ S
<i>Mr</i>	574.7
Wavelength	1.541
Space group	
<i>a</i>	4.883(5)
<i>b</i>	21.076(5)
<i>c</i>	14.224(5)
<i>alpha</i>	90
<i>beta</i>	98.205
<i>gamma</i>	90
Volume	1448.9(16)
<i>D_x</i> (g.cm ⁻³)	1.317
<i>Z</i>	2
F(000)	604
<i>N_{ref}</i>	6013
Data completeness	0.99
Theta(max)	76.96
<i>R</i> ₁	0.049 (5506)
<i>wR</i> ₂	0.132 (6013)
<i>S</i>	1.03
<i>N_{par}</i>	380

⁹¹ Burla, M. C. *et al.* SIR2004 : an improved tool for crystal structure determination and refinement. *Journal of Applied Crystallography* **38**, 381–388 (2005).

⁹² Sheldrick, G. M. A short history of SHELX. *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography* **64**, 112–122 (2008).

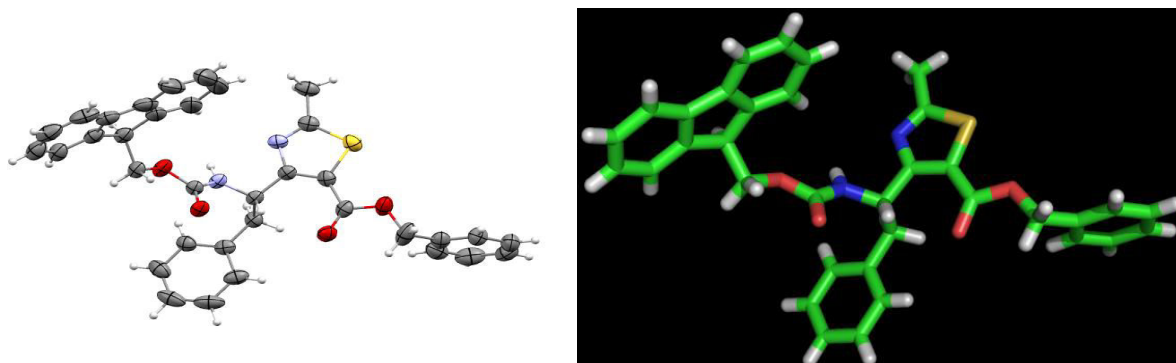


Figure III.26 : Représentation de la structure 3D pour la molécule **6b** Fmoc- γ -Phe-OBn par DRX.

Les monomères ATC (4-aminométhyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acids) ont été paramétrés en utilisant le programme Antechamber⁹³ du groupe de programmes AMBER à partir de la structure cristalline de ce composé **6b**, qui présentaient une conformation étendue avec des angles dièdres: $\phi = -126^\circ$, $\theta = 158^\circ$, $\zeta = -4^\circ$ et $\psi = 180^\circ$ (Tableau III.13) et (Figure III.27). Les NOE ont été utilisés pour les calculs de la structure en solution déterminée par spectroscopie RMN en utilisant un protocole de recuit simulé avec AMBER 10.⁹⁴

Tables III.13 : Les angles dièdres du composé **6b** sous forme cristalline

Angles dièdres ($^\circ$)	
ϕ	-126
θ	158
ζ	-4
ψ	180

⁹³ Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. & Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem* **25**, 1157–1174 (2004).

⁹⁴ D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, M. Crowley, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossvry, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, D. H. Mathews, M. G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, P. A. Kollman, University of California, San Francisco, 2008

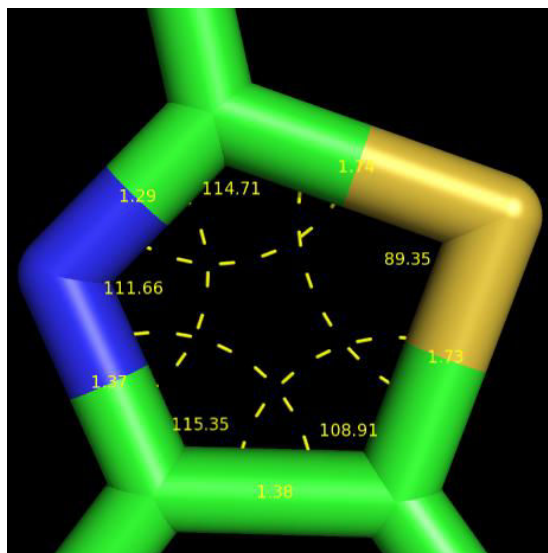


Figure III.27 : Les paramètres du cycle thiazole : angles et distances.

Le composé **2** (Fmoc-dimère-OBn) comporte une seule unité (une γ -Alanine-thiazole à gauche et un l'autre γ -Phénylalanine-thiazole à droite). Nous avons réalisé l'étude par RMN en solution dans le chloroforme-D à 293K. Les déplacements chimiques ^1H ont été attribués selon les procédures classiques. Les pics croisés NOE ont été intégrés et attribués dans le logiciel NMRView. Le volume d'un NOE entre la paire de protons d'un méthylène a été utilisé comme référence 1,8 Å. La limite inférieure pour toutes les contraintes a été fixée à 1,8 Å et des limites supérieures à 2,7, 3,3 et 5,0 Å correspondant à un NOE fort, moyen et faible respectivement. Des corrections de pseudo-atomes sur les limites supérieures ont été appliquées pour les signaux aromatiques non résolus, méthylène et les protons méthyle.⁹⁵ Les contraintes ROE observées pour le composé **2** et ses distances dérivées sont présentées sur le tableau III.14.

Tableau III.14 : Représentation des contraintes observées et des distances dérivées des ROE pour le composé **2** dans CDCl_3 à 293K. (Fort "s" < 2.7 Å; moyen "m" < 3.3 Å; faible "w" < 5.0 Å. Le numéro placé devant le nom de l'atome correspond au numéro du résidu.)

Name of the NOE correlation	NOE	Type
2.HN-1.HG	w	Sequential
2.HN-1.HD	m	Sequential
2.HA-CH ₂ (Bn)	w	Sequential
2.HB-CH ₂ (Bn)	w	Sequential
2.HZ-CH ₂ (Bn)	w	Sequential

⁹⁵ K Wüthrich; NMR of Proteins and Nucleic Acids. Wiley-Interscience, New York (1986)

Sur le spectre ROESY, cinq contraintes de distance sont observées et utilisées dans le solvant CDCl_3 . La figure III.28 représente les deux contraintes ROE inter-résidu observées pour le composé **2** dans CDCl_3 à 293 K, entre le proton NH du résidu γ -Phénylalanine-thiazole avec les protons sur C_γ et C_δ de l'autre résidu γ -Alanine-thiazole. Cela signifie que dans la solution, les deux groupes sur les différents résidus sont proches.

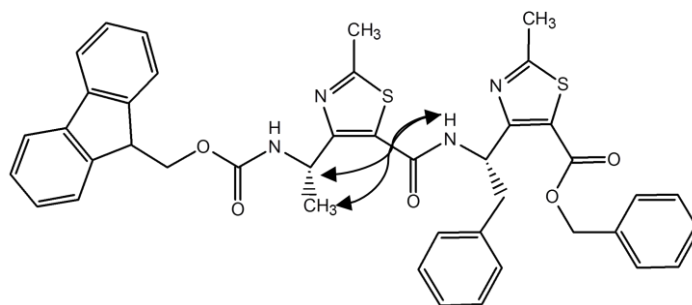


Figure III.28 : Représentation des contraintes ROE inter-résidu observées pour le composé **2** dans CDCl_3 à 293 K.

Les calculs de structure pour le composé **2** ont été effectués avec AMBER10 en trois étapes: chauffage, recuit simulé dans le vide et raffinement dans une boîte de solvant. Le protocole est décrit dans le matériel et méthode. Nous avons simulé 100 structures en trois-dimensions grâce au logiciel AMBER, et nous avons conservé les 20 structures d'énergie la plus basse comme représentatifs de la structure du peptide **2** (Figure III.29).

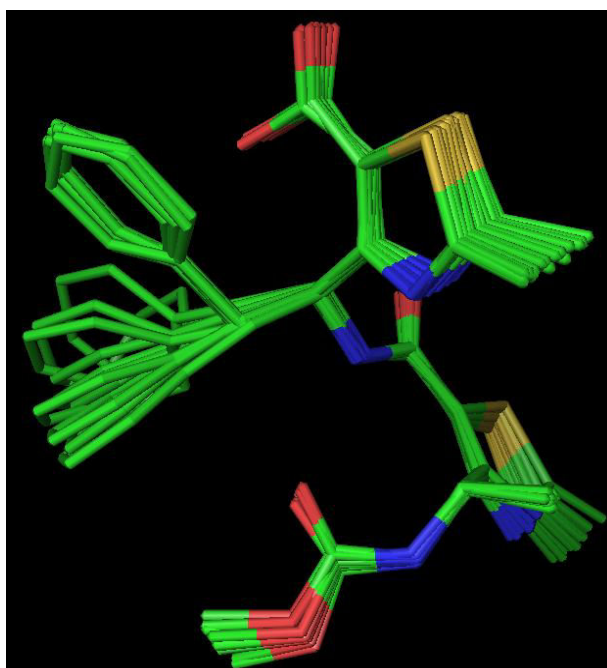


Figure III.29 : Représentation de la structure tri-dimensionnelle de la molécule **2** (Fmoc-dimère-OBn) dans le CDCl_3 , (RMSD sur les atomes du squelette = $0.086 \text{ \AA}$)

Ces vingt structures d'énergie les plus basses sont relativement bien superposées (RMSD sur les atomes du squelette=0.086 Å), ce qui signifie que la structure du composé **2** en solution est bien stable. Nous avons recherché des liaisons hydrogène pour les vingt structures de plus basses énergies sélectionnées (Tableau III.15), nous avons trouvé que la structure du composé **2** est stabilisée (20 liaisons hydrogène sur 20 structures) par une seule liaison hydrogène de 1.85 Å en moyenne entre de NH du résidu de γ -Phénylalanine-thiazole et le CO du résidu γ -Alanine-thiazole, qui stabilise un pseudocycle en C9 (Figure III.30).

Tableau III.15: La liaison hydrogène calculée (bleu) sur les 20 structures d'énergies les plus basses du composé **2** (distance < 2.40Å, angle NHO < 35.0°).

donneur	accepteur	Nombre de LH/30, Distance (Å) et Angle (°)
HN ^{Phe}	O ^{Fmoc}	20 (1.83..1.98) (16.2..21.1) *****5*****0*****5*****0

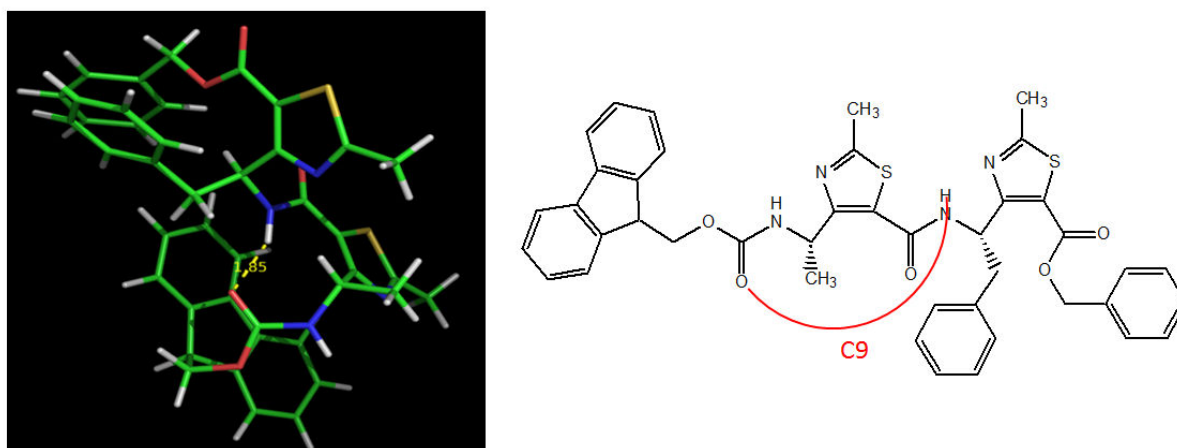


Figure III.30 : La molécule **2** (Fmoc-dimère-OBn) adopte une structure stabilisée par une liaison hydrogène (en jaune à gauche). Elle ferme un pseudocycle de 9 atomes (en rouge à droite).

Le composé **3a** (Fmoc- γ -tétramère-OBn) et **3b** (Fmoc- γ -hexamère-OBn) ont été étudiés dans le même solvant : le CDCl₃ et modélisés selon le même protocole que pour le composé **2**. Pour faciliter la comparaison les résultats seront exposés ensemble.

Tout à bord, nous avons les analyses par RMN en solution dans le chloroforme-D à 293 K (Figure III.31). Dans les spectres, nous avons vu il y a plusieurs régions, certaines sont

différentes et d'autres comparables. La région amide (entre 11 ppm et 8.5 ppm) comprend tous les NH sauf le proton de l'amide du premier résidu qui à un déplacement chimique de 5.7 ppm. A titre de comparaison, Kunwar et ses collaborateurs ont décrit antérieurement une hélice-9 pour un oligomère γ -peptide, dans laquelle les protons amide ont un déplacement chimique entre 6,9 et 7,6 ppm dans CDCl_3 ⁹⁶. Les protons amides déblindés peuvent être attribués à un modèle de liaison hydrogène très stable et/ou à un effet de cycle actuel de l'hétérocycle thiazole; la région aromatique (entre 8ppm et 7 ppm), la région des protons sur le C^γ (entre 6.5 ppm et 5 ppm); les protons du Fmoc (4.23 ppm pour CH, vers 4.4 ppm pour CH_2); les paires de protons de méthylène sur C^δ du résidu γ -Phénylalanine-thiazole qui jouent le rôle de référence pour calculer les distances entre les protons pour les contraintes NOE, les CH_3 sur le thiazole (vers 2.6 ppm); et les protons méthyle sur C^δ du résidu γ -Alanine-thiazole qui se trouvent le plus à droite sur les spectres champs forts.

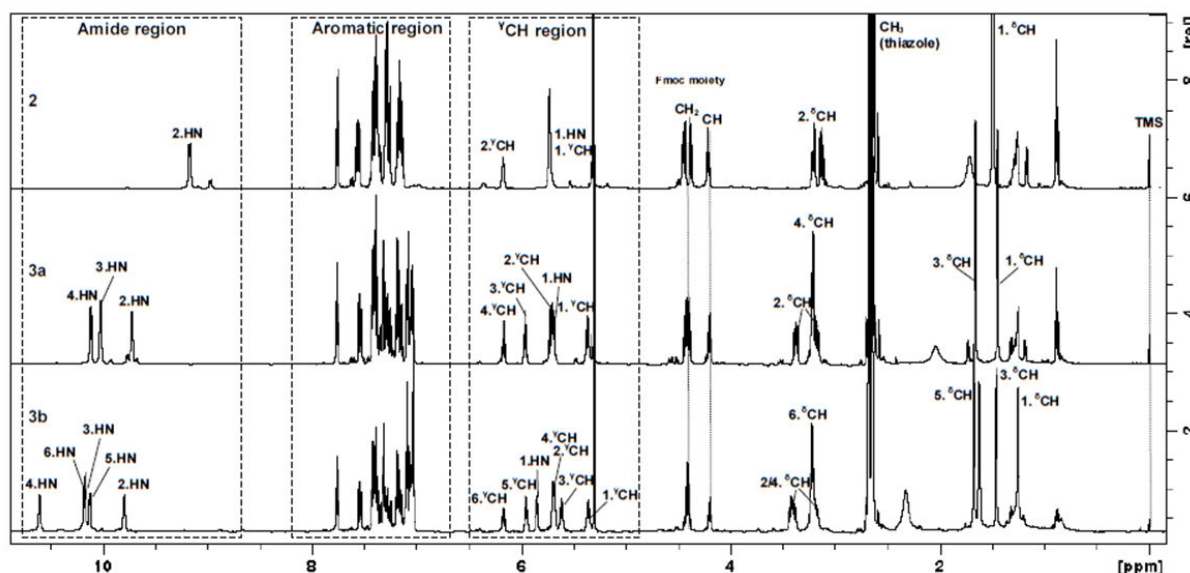


Figure III.31 : Les spectres RMN ^1H observés pour les trois composés **2**, **3a** et **3b** dans le chloroforme-D à 293 K.

Sur le spectre ROESY, nous avons trouvé dix contraintes pour **3a** et seize contraintes pour **3b** dans le solvant CDCl_3 à la température de 293 K. Les contraintes ROE observées et les distances dérivées pour le composé **3a** (en vert) et **3b** (en noir) sont présentées sur le tableau III.16. Nous avons vu, entre les deux composés, que les contraintes observées et les distances calculées sont comparables. Les contraintes sont respectées trois à trois, c'est-à-dire

⁹⁶ Sharma, G. V. M. *et al.* A Left-Handed 9-Helix in γ -Peptides: Synthesis and Conformational Studies of Oligomers with Dipeptide Repeats of C-Linked Carbo- γ 4-amino Acids and γ -Aminobutyric Acid. *Angewandte Chemie* **118**, 3010–3013 (2006).

la contrainte entre HG du résidu γ -Alanine-thiazole i et HD du résidu suivant γ -Phénylalanine-thiazole i+1, la contrainte entre HN du résidu γ -Phénylalanine-thiazole i+1 et HG du résidu γ -Alanine-thiazole i, la contrainte entre HN du résidu γ -Phénylalanine-thiazole i+1 et HD du résidu γ -Alanine-thiazole i.

Tableau III.16 : Représentation des contraintes observées et des distances dérivées des ROE pour le composé **3a** (vert) **3b** (noir) dans CDCl₃. Ici fort “s” < 2.7 Å; moyen “m” < 3.3 Å; faible “w” < 5.0 Å. Le numéro placé devant le nom de l’atome correspond au numéro du résidu.

Name of the NOE correlation	NOE	Type
1.HN-CH ₂ (Fmoc)	w	Sequential
1.HG-2.HD	w/w	Sequential
2.HN-1.HG	s/ s	Sequential
2.HN-1.HD	w/w	Sequential
2.HG-3.HD	w/w	Sequential
3.HN-2.HG	s/ s	Sequential
3.HN-2.HD	w/w	Sequential
3.HG-4.HD	w/w	Sequential
4.HN-3.HG	s/s	Sequential
4.HN-3.HD	w/w	Sequential
4.HG-5.HD	w	Sequential
5.HN-4.HG	s	Sequential
5.HN-4.HD	w	Sequential
5.HG-6.HD	w	Sequential
6.HN-5.HG	s	Sequential
6.HN-5.HD	w	Sequential

La figure III.32 est complémentaire du tableau III.16, elle présente les contraintes ROE pour le composé le plus long **3b** dans CDCl₃ à 288K, la superposition de la région NH/¹CH du TOCSY (en rouge) et ROESY montre que les contraintes NOE HN (i)/¹CH (i-1) sont typiquement séquentielles, et la figure b nous montre le modèle de NOE inter-résidus selon les oligomères **3b**, ce modèle a également été trouvé dans le composé **2** et **3a**. A partir des contraintes de distances, nous pensons que les oligomères de cette série de γ -peptide pourraient se structurer en Hélice-9.

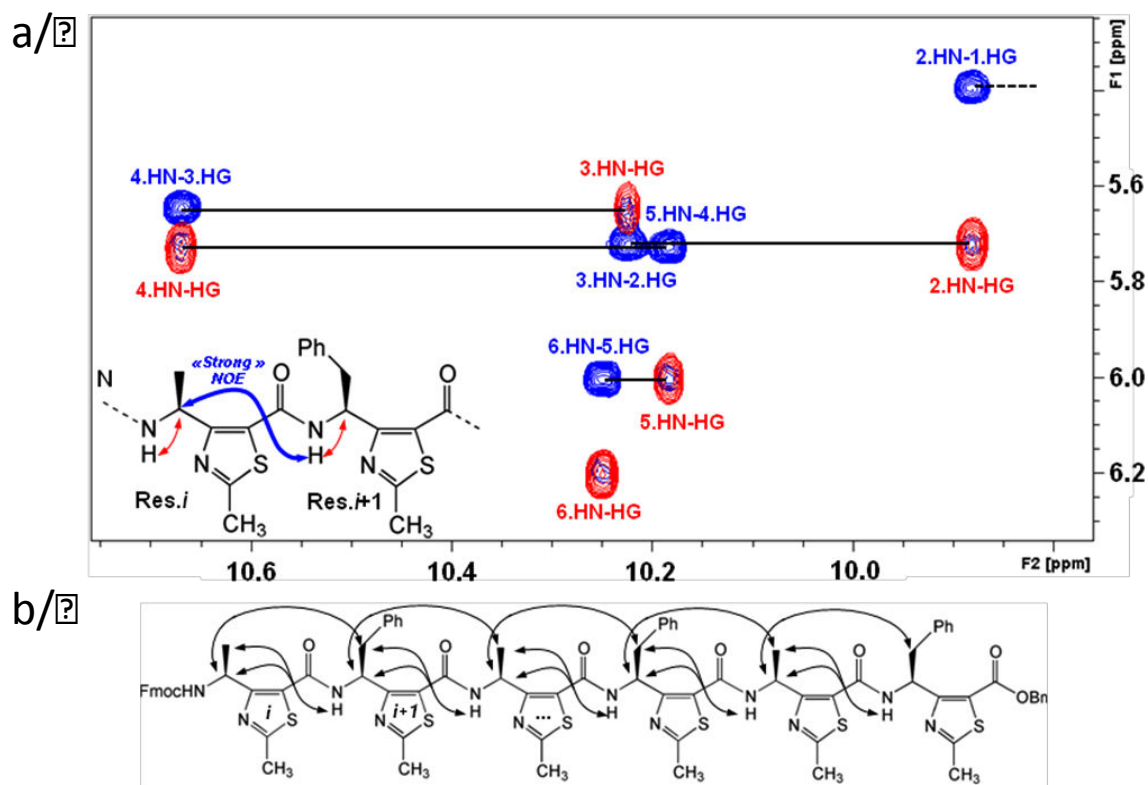


Figure III.32 : a/ La superposition de la région NH/ ^{1} CH du TOCSY (en rouge) et ROESY (en bleu) du spectre hexamère **3b** enregistré dans CDCl_3 à 288K. Les contraintes NOE HN (i)/ ^{1} CH (i-1) sont annotées. b/ Modèle de NOE inter-résidus selon les oligomères **3b**.

Pour prouver notre hypothèse à partir des contraintes trouvées, nous avons simulé la structure en suivant le protocole de la molécule **2**. 100 structures ont été générées puis ont suivi le protocole décrit plus haut dans le logiciel AMBER, et nous avons gardé les 20 structures ayant les énergies les plus basses (Figure III.33).

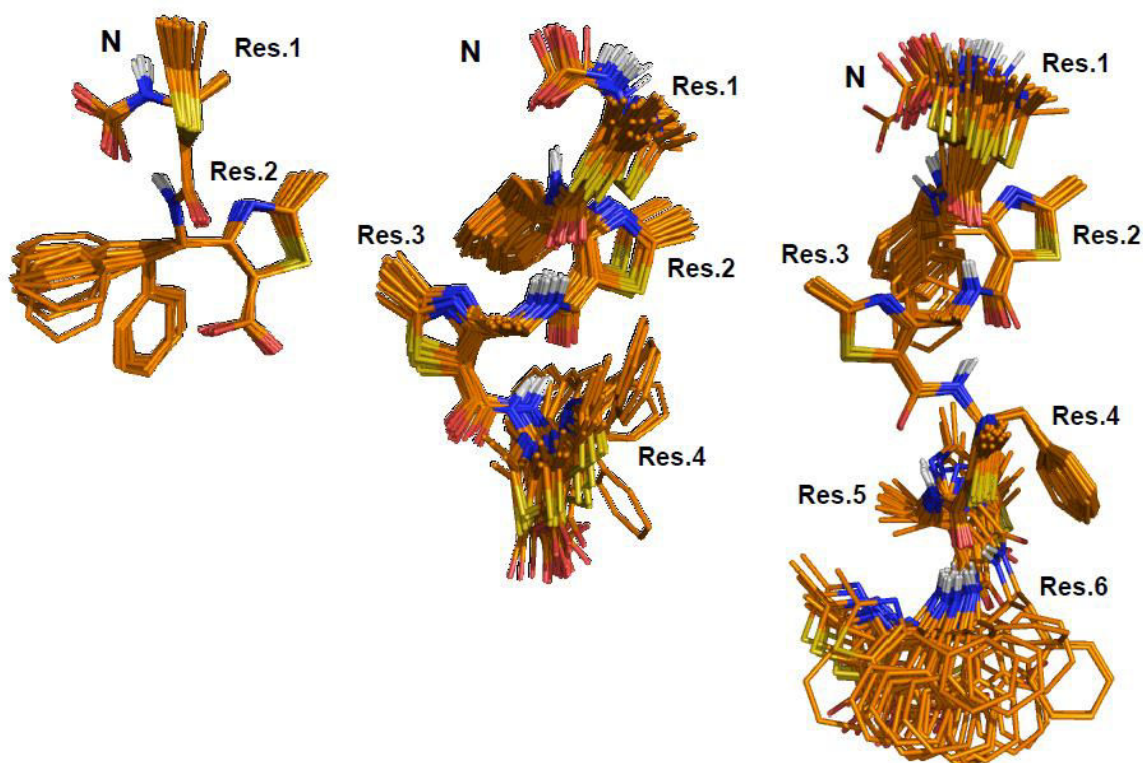


Figure III.33: Représentation et superposition du squelette (les atomes lourds: C en orange, N en bleu O en rouge et S en jaune) des vingt structures tridimensionnelles d'énergies les plus basses en solution dans CDCl_3 , de gauche à droite : le composé dimère **2** (RMSD=0.086 Å), tétramère **3a** (RMSD=0.353 Å) et hexamère **3b** (RMSD=0.510 Å).

La superposition des trois molécules (dimère **2** (RMSD=0.11 Å), tétramère **3a** (RMSD=0.48 Å) et hexamère **3b** (RMSD=0.63 Å)) montre que le série de ce γ -oligomère est bien stable. Le tétramère **3a** et l'hexamère **3b** sont structurés en hélice-9 droite. Ils sont stabilisés par une liaison hydrogène intramoléculaire qui ferme un pseudocycle C9 entre le CO du résidu i et le NH du résidu $i+2$ (Figure III.34). Si on compare cette liaison hydrogène du dimère **2**, ou tétramère **3a** jusqu'à l'hexamère **3b**, nous pouvons trouver une règle : 1) il n'y a que cette liaison hydrogène qui joue le rôle de stabilisation de la molécule ; 2) cette liaison hydrogène est toujours entre le CO (i) de N-terminal et le NH ($i+2$) de C-terminal ; 3) à partir de dimère **2**, l'augmentation de deux résidus acide γ -aminé-thiazole introduit 2 pseudocycles C9; 4) les cycle thiazoles se répètent régulièrement.

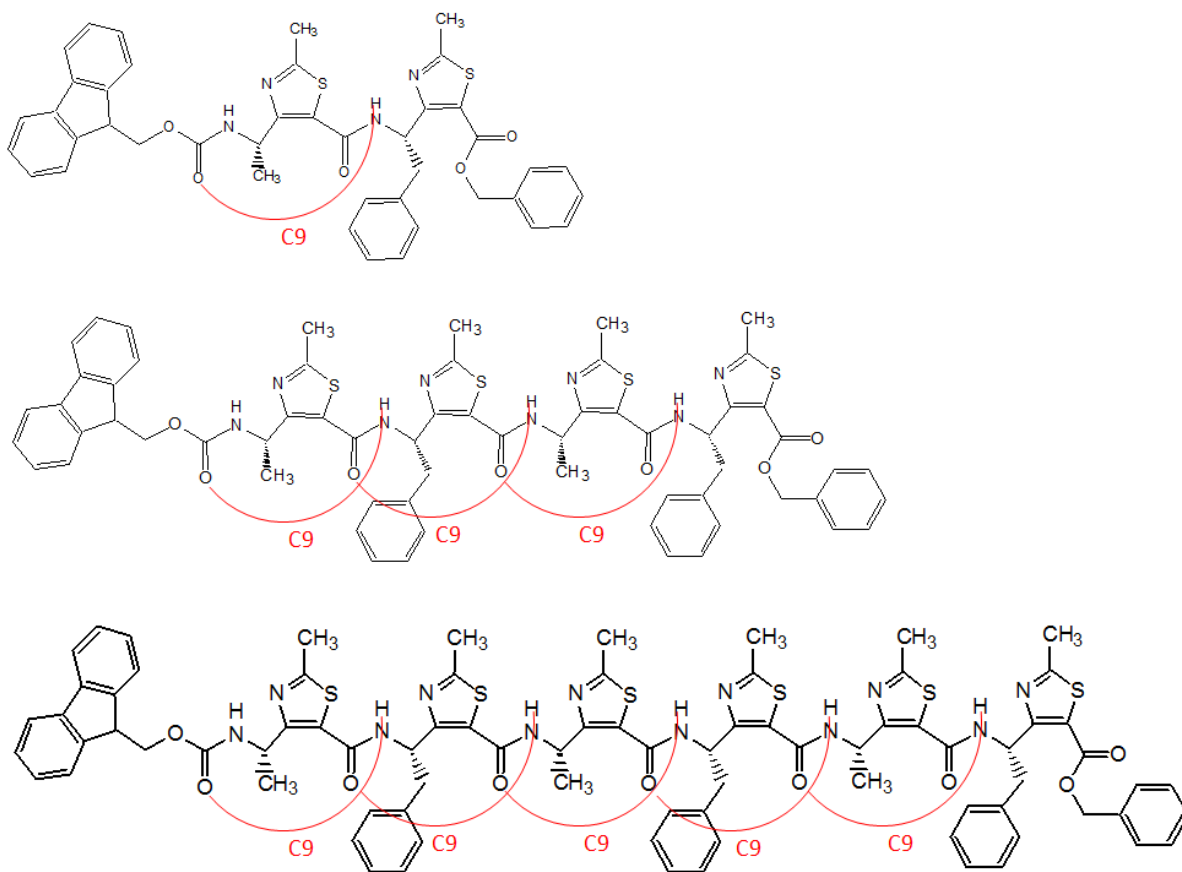


Figure III.34 : Le série de molécules (**2**, **3a** et **3b**) adopte une structure stable stabilisée par une liaison hydrogène C9

Les paramètres des liaisons hydrogène pour ces trois composés sont mesurés et présentés dans le tableau III.17. Si on fait une comparaison on voit le donneur et accepteur pour la liaison hydrogène sont identiques. La distance entre N...O (2.8 Å pour **2**, 2.77 Å en moyenne pour **3a** et 2.8 Å en moyenne pour **3b**, la distance entre H...O (1.85 Å pour **2**, 1.77 Å en moyenne pour **3a** et 1.79 Å en moyenne pour **3b**), et l'angle N-H...O (153.69° pour **2**, 167° en moyenne pour **3a** et 169° en moyenne pour **3b**), tous les paramètres des liaisons hydrogène pour ces trois composés sont similaires.

Tableau III.17: Paramètres des liaisons hydrogène intramoléculaires pour **2**, **3a** et **3b**.

<i>donor</i>	<i>acceptor</i>	<i>N...O[Å]</i>	<i>H...O[Å]</i>	<i>Angle N-H...O[°]</i>
2: Fmoc-dimère-OBn				
N ^{Phe2}	O ^{Fmoc}	2.8	1.85	153.69
3a: Fmoc-tétramère-OBn				
N ^{Phe2}	O ^{Fmoc}	2.77	1.77	167.78
N ^{Ala3}	O ^{Ala1}	2.77	1.76	169.27
N ^{Phe4}	O ^{Phe2}	2.74	1.77	159.2
3b: Fmoc-hexamère-OBn				
N ^{Phe2}	O ^{Fmoc}	2.79	1.79	164.60
N ^{Ala3}	O ^{Ala1}	2.84	1.82	176.63
N ^{Phe4}	O ^{Phe2}	2.80	1.80	162.79
N ^{Ala5}	O ^{Ala3}	2.81	1.79	172.01
N ^{Phe6}	O ^{Phe4}	2.78	1.77	168.62

Les liaisons hydrogène présentes dans la même molécule sont similaires. Par exemple, sur l'hexamère **3b** qui est la molécule la plus longue, les cinq liaisons hydrogène de l'extrémité N-terminale à C-terminale ont des distances de 1.79 Å, 1.82 Å, 1.80 Å, 1.79 Å et 1.71 Å et l'angle N-H...O 164.60°, 176.63°, 162.79°, 172.01° et 168.62° (Figure III.35).

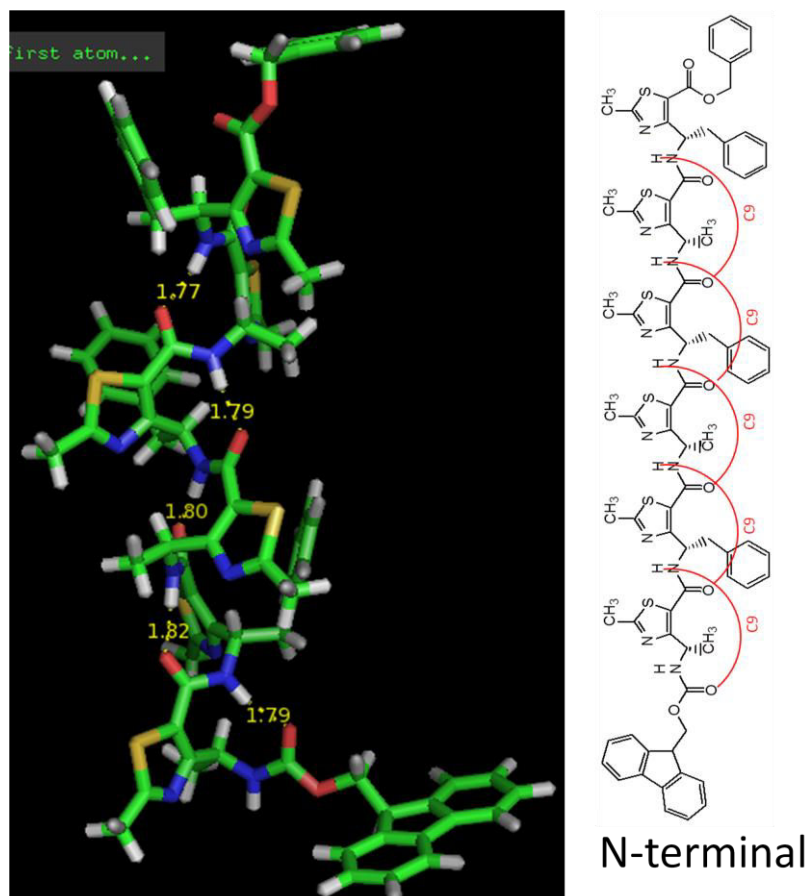


Figure III.35: L'hexamère **3b** adopte une structure en hélice stabilisée par des liaisons hydrogène fermant à chaque fois un pseudocycle à 9 atomes.

L'ensemble des résultats trouvés signifie que la structure du composé **3b** en solution est sous forme d'hélice qui est stabilisée par des liaisons hydrogène. Et les structures du composé **2** et **3a** sont semblables à celle de **3b**. On peut ainsi dire que cette série de γ -oligomères adopte une structure en hélice-9. Cette hélice est stabilisée par des liaisons hydrogène entre $\text{CO}(i) \dots \text{HN}(i+2)$ régulières.

Pour vérifier l'hypothèse précédente, et pour connaître la taille minimum permettant à l'oligomère de se structurer, nous avons comparé le squelette des trois structures tridimensionnelles d'oligomères (Figure III.36). En a) sont superposées les structures du composé dimère **2** (en rouge) avec le tétramère **3a** (en bleu), à gauche à partir de l'extrémité N-terminale du composé **3a**, à droite entre **2** et **3a** mais du côté C-terminal. Dans les deux cas, les squelettes des deux composés sont bien superposés. Sur la figure b) nous avons comparé le composé **3a** avec **3b** de la même façon, c'est-à-dire en superposant soit sur la partie N-terminale de l'oligomère le plus long, soit sur sa partie C-terminale. Les squelettes du

composé **3a** et **3b** sont également bien superposés. La figure c) représente une superposition des trois composés vers le côté N-terminal. L'ensemble de la figure a, b et c nous montre que les trois structures tridimensionnelles sont bien superposées, les structures sont régulières et ce dès l'oligomère le plus petit.

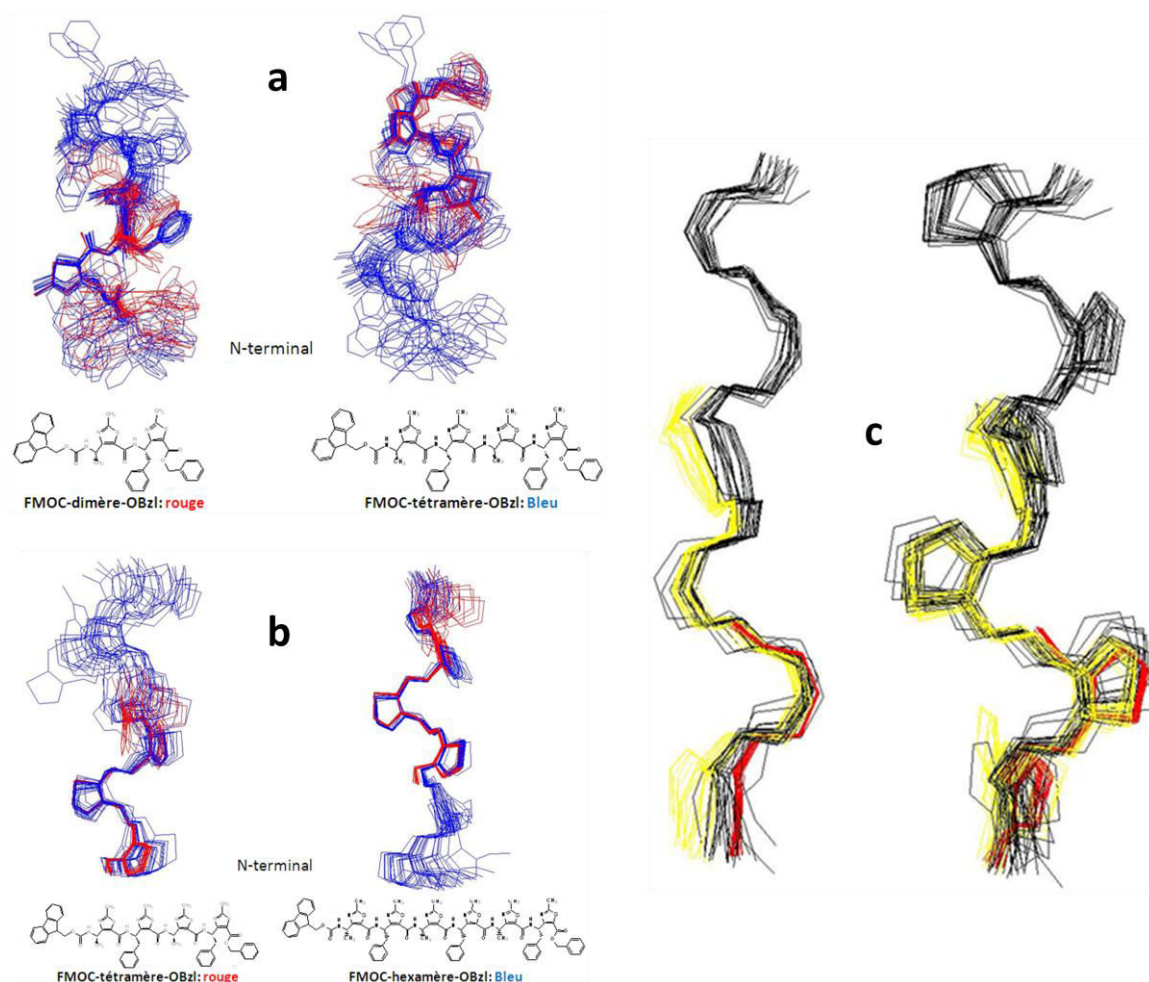


Figure III.36: Représentation des 3 structures tridimensionnelles:

- a, superposition de **2** Fmoc-dimère-OBzl en rouge et **3a** Fmoc-tétramère-OBzl en bleu ;
- b, superposition de **3a** Fmoc-tétramère-OBzl en rouge et **3b** Fmoc-hexamère-OBzl en bleu ;
- c, superposition des squelettes principaux de **2** en rouge, **3a** en jaune et **3b** en noir ;

L'hexamère **3b** adopte une structure en hélice-9. Donc à l'aide du composé **3b**, nous avons également mesuré les caractéristiques et la forme d'hélice (Figure III.37) : les acides aminés 1 et 4, 2 et 5, 3 et 6 sont présentés dans la même direction. Le pas de l'hélice est de 3 résidus (Tableau III.18), la hauteur d'un tour est égale à 10.85 Å, le diamètre est de 11 Å.

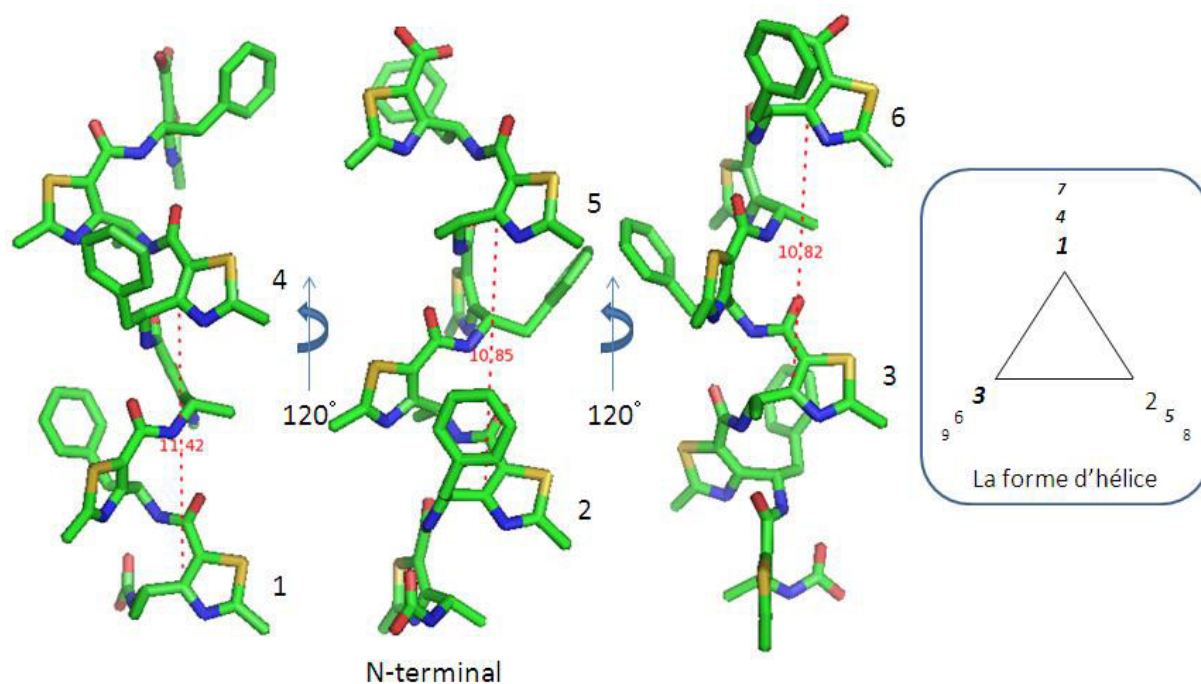


Figure III.37: Représentation de l'hélice-9 présente dans la molécule **3b**.

Tableau III.18 : Les Caractéristiques de l'hélice présente dans la molécule **3b**.

Oligomère	Type d'hélice	Résidu /tour	Hauteur par une tour	Diamètre d'hélice	Liaison H CO-HN
Hexamère	γ -hélice	3	10.85 Å	11 Å	i, i+2

Nous avons mesuré aussi les angles de torsion du squelette principal pour la molécule **3b** (Tableau III.19).

Table III.19: Les angles de torsion du squelette [°] pour **3b**

	ϕ	θ	ζ	ψ	ω	Orientation
Fmoc-hexamère-OBzl: MLU2126						
Residue 1 Ala	-76.18	124.41	-10.2	-32.12	164.54	axial
Residue 2Phe	-69.58	130.48	-8.97	-36.9	171.5	axial
Residue 3 Ala	-94.33	117.01	-7.02	-26.07	126.24	axial
Residue 4 Phe	-70.94	127.44	-9.08	-31.67	171.99	axial
Residue 5 Ala	-80.27	117.86	-5.23	-25.72	161.58	axial
Residue 6 Phe	-65.77	138.11	-0.09	179.19	179.63	axial

Pour étudier l'influence des groupes N- et C-terminaux sur la structure secondaire, le composé **3d** a été synthétisé et analysé par RMN dans les mêmes conditions et comparé à **3b**. Après l'étude des contraintes NOE dans CDCl_3 , les structures simulées et les paramètres structuraux des composés **3d** et **3a** sont similaires, **3d** adopte également une structure en hélice stabilisée par des liaisons hydrogène fermant des pseudocycles en C9 (Figure III.38).

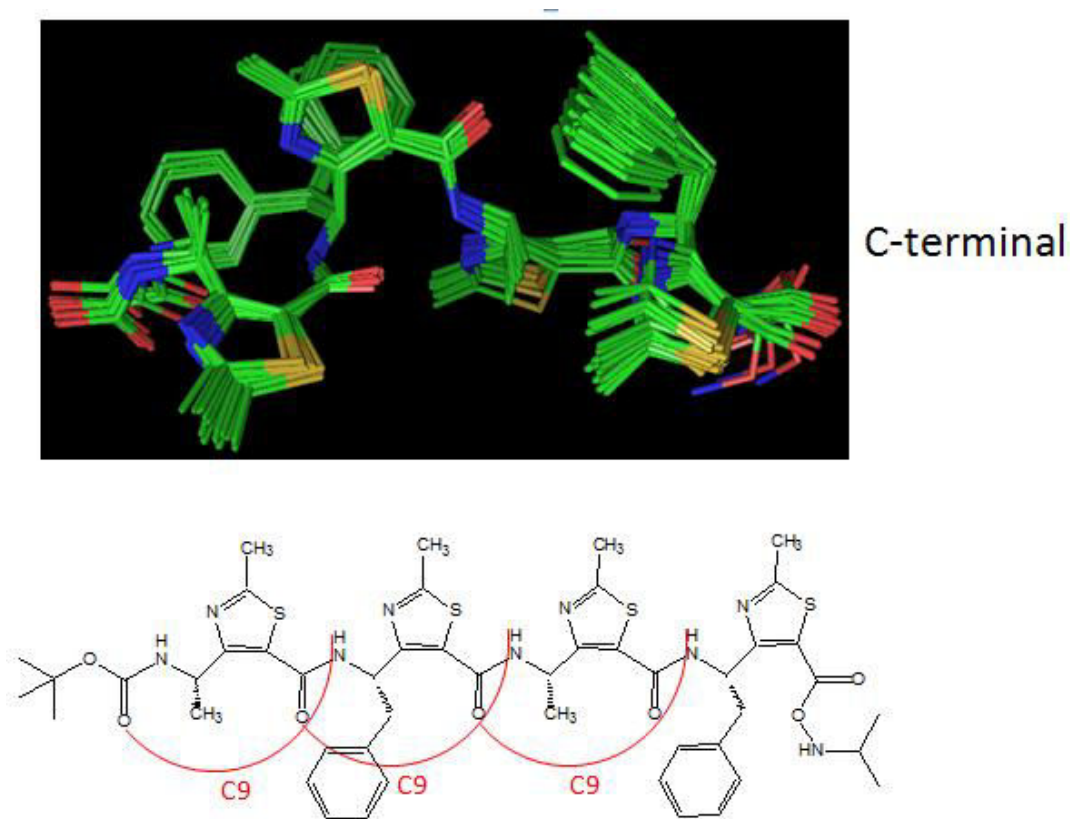


Figure III.38 : Représentation de la superposition du squelette (les atomes lourds) des vingt structures tridimensionnelles d'énergies les plus basses en solution dans CDCl_3 , pour le composé **3d** (RMSD=0.21 Å).

La comparaison des vingt structures 3D d'énergies les plus basses des deux γ -tétramères est présentée dans la figure III.39. Les deux structures sont bien superposées, nous pouvons donc déduire qu'il n'y a pas d'influence des groupes N et C-terminaux sur la structuration de ces oligomères.

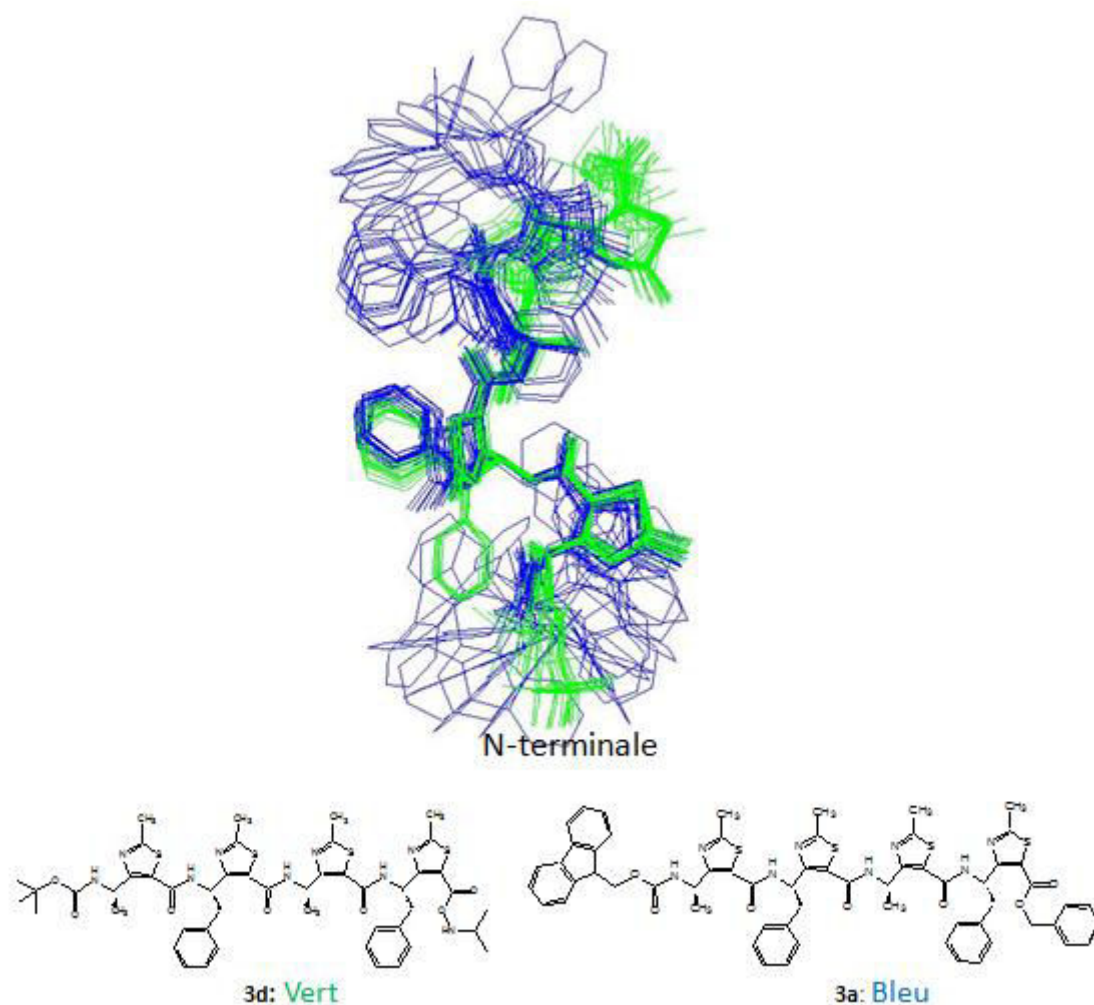


Figure III.39 : comparaison des structures tridimensionnelles de **3a** (en bleu) et **3d** (en vert).

Pour savoir s'il y a des différences entre les structures en solution ou en phase solide pour cette série de γ -oligomères, **3c** a été cristallisée et la structure résolue par DRX. La structure cristalline de **3c** est présentée dans la figure III.40, quatre liaisons hydrogène sont présentes qui permettent de stabiliser la structure.

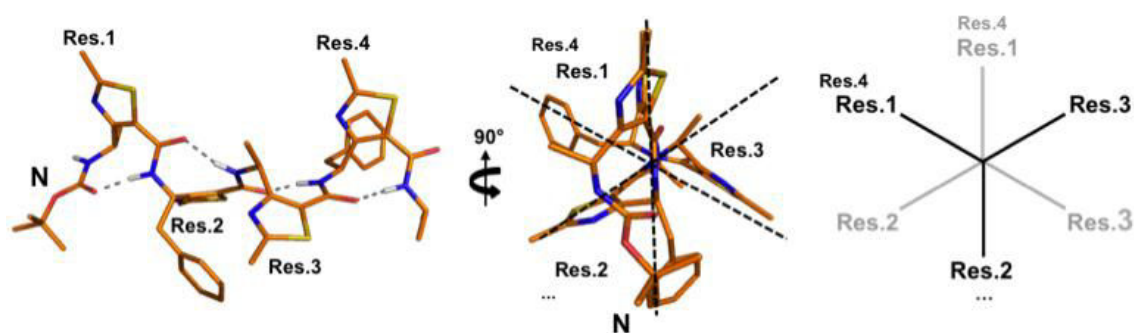


Figure III.40 : Vues orthogonales et la projection axiale de la structure 3D du tétramère **3c**.

Le tableau III.20 nous donne les valeurs moyennes des angles dièdres du squelette des composés **2**, **3a**, **3b** et **3d** obtenus à partir des vingt structures d'énergie la plus basse pour chaque composé et du composé **3c** en DRX avec l'ordre des résidus de C à N-terminal. Nous avons fait deux comparaisons différentes, la comparaison horizontale entre le même résidu dans chaque molécule, ou la comparaison verticale entre les résidus d'une même molécule. Dans les deux cas, les valeurs des angles dièdres sont similaires. Les résultats trouvés sur la comparaison des angles dièdres nous indiquent que la structure de cette série γ -oligomère est stable et se répète régulièrement tout le long de la séquence.

Tableau III.20 : Les angles dièdres du squelette pour les composés **2**, **3a**, **3b**, **3d** (les valeurs moyennes sur les vingt structures d'énergie la plus basse) et **3c**, l'ordre du résidu est de C à N-terminal.

<i>Residue</i>	<i>Angles</i>	<i>2 (20)</i>	<i>3a (20)</i>	<i>3b (20)</i>	<i>3d (20)</i>	<i>3c (DRX)</i>
Res.1	ϕ	-77 ± 12	-71 ± 7	-76 ± 6	-67 ± 4	-81
	θ	119 ± 4	121 ± 2	122 ± 2	149 ± 17	121
	ζ	-8 ± 2	-8 ± 2	-8 ± 2	-6 ± 1	-4
	ψ	-21 ± 2	-29 ± 3	-30 ± 3	-33 ± 1	-40
Res.2	ϕ	-82 ± 10	-61 ± 3	-66 ± 4	-60 ± 2	-78
	θ	148 ± 5	123 ± 2	127 ± 2	122 ± 1	119
	ζ	2 ± 2	-9 ± 1	-9 ± 1	-5 ± 1	0
	ψ	1 ± 2	-30 ± 3	-34 ± 2	-38 ± 2	-38
Res.3	ϕ		-68 ± 8	-84 ± 8	-92 ± 9	-75
	θ		119 ± 3	119 ± 4	175 ± 3	121
	ζ		-7 ± 2	-7 ± 2	-7 ± 2	-1
	ψ		-25 ± 3	-26 ± 3	-23 ± 3	-45
Res.4	ϕ		-96 ± 30	-65 ± 3	-75 ± 3	-80
	θ		150 ± 6	127 ± 2	$-45 \pm$	147
	ζ		1 ± 3	-9 ± 1	170 ± 1	3
	ψ		3 ± 3	-33 ± 3	-69 ± 1	-165
Res.5	ϕ			-85 ± 14		
	θ			119 ± 6		
	ζ			-6 ± 4		
	ψ			-23 ± 9		
Res.6	ϕ			-84 ± 20		
	θ			139 ± 7		
	ζ			1 ± 3		
	ψ			2 ± 3		

III.2.5 Conclusions et perspectives

Cette étude présente donc la conception d'une nouvelle famille d'oligomères formés à partir de monomères contraints de type thiazole développés par Ludovic Maillard à l'IBMM à Montpellier et nous avons déterminé les structures tridimensionnelles de ces γ -pseudopeptides, comprenant une nouvelle structure hélice-9 droite. Ces γ -peptides sont stabilisés par des liaisons hydrogène qui ferment des pseudocycles à 9 atomes (C9). L'étude montre également que cette hélice est observable dès le tétramère et la robustesse du repliement depuis deux résidus est suffisante pour initier la formation de l'hélice. Ces caractéristiques résultent de la conformation plane de l'angle de torsion $^{\gamma}\text{C}-^{\beta}\text{C}-^{\alpha}\text{C}-\text{C}(\text{O})$ imposée par l'hétérocycle thiazole. De plus, nous avons démontré que les oligomères ATC présentent une grande stabilité, par la suite le Dr B. Legrand a trouvé le même résultat en milieux aqueux, ce qui est particulièrement important pour les applications en chimie médicinale.

Le processus de synthèse rapide et très robuste assure l'accès à une grande diversité de ATC énantionpurs, donnant ainsi une réelle opportunité pour moduler les propriétés physico-chimiques des oligomères et de conduire à la reconnaissance moléculaire. En outre, la voie de synthèse donne la possibilité d'introduire une grande diversité de substituants nécessaire pour moduler les propriétés physico-chimiques des oligomères et conduire à la reconnaissance de biomolécules.

III.3 Etude structurale du motif Aza

III.3.1 Introduction

Au cours des dernières décennies, la synthèse et l'étude structurale de nouvelles molécules pour imiter les structures secondaires des peptides et des protéines a connu une croissance exponentielle.^{97, 98, 99, 100, 101, 102, 103} Le Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire (LCPM) a été impliqué dans la synthèse et l'étude de conformations de pseudo-peptides et d'oligomères pseudo-peptidiques.^{104, 105, 106} Au cours des dernières années, Brigitte Jamart, Jacques Bodiguel et Régis Vanderesse ont beaucoup étudié plusieurs modifications pseudo-peptidiques particulières, à savoir des modifications bis-azote. Plusieurs études, réalisées sur ces pseudo-peptides bis-azotés (hydrazino-peptides^{107,108,109} et N-amino-peptides^{110,111,112}), ont montré que l'insertion d'un atome d'azote supplémentaire dans un

⁹⁷ R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. De Grado *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219-3232.

⁹⁸ S. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 1111-1239.

⁹⁹ C. M. Goodman, S. Choi, S. Shander, W. F. De Grado *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 252-262.

¹⁰⁰ D. Seebach, J. Gardiner *Acc. Chem. Rev.* **2008**, *41*, 1366-1375.

¹⁰¹ T. A. Martinek, F. Fulop *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 687-702.

¹⁰² V. Semetey, D. Rognan, C. Hemmerlin, R. Graff, J. P. Briand, M. Marraud, G. Guichard *Angew. Chem. Int-Ed.* **2002**, *41*, 1893-1895.

¹⁰³ A. Violette, M. C. Averlant-Petit, V. Semetey, C. Hemmerlin, R. Casimir, R. Graff, M. Marraud, J. P. Briand, D. Rognan, G. Guichard *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2156-2164.

¹⁰⁴ A. Lecoq, G. Boussard, M. Marraud, A. Aubry *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5209-5212.

¹⁰⁵ F. André, A. Vicherat, G. Boussard, A. Aubry, M. Marraud, *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 372-381.

¹⁰⁶ R. Vanderesse, V. Grand, D. Limal, A. Vicherat, M. Marraud, C. Didierjean, A. Aubry *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9444-9451.

¹⁰⁷ I. Bouillon, N. Brosse, R. Vanderesse, B. Jamart-Grégoire *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2223-2234.

¹⁰⁸ I. Bouillon, R. Vanderesse, N. Brosse, O. Fabre, B. Jamart-Grégoire *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9635-9641.

¹⁰⁹ R. O. Moussodia, S. Acherar, A. Bordessa, R. Vanderesse, B. Jamart-Grégoire *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4682-4692.

¹¹⁰ A. S. Felten, S. Dautrey, J. Bodiguel, R. Vanderesse, C. Didierjean, A. Arrault, B. Jamart-Grégoire *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10741-10753.

¹¹¹ A. S. Felten, R. Vanderesse, N. Brosse, C. Didierjean, B. Jamart-Grégoire *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 156-158.

¹¹² N. Brosse, A. Grandeury, B. Jamart-Grégoire *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2009-2011.

squelette peptidique induit une plus grande résistance à la biodégradation et induit une structuration locale originale au sein de ces pseudo-peptides.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à des résidus dans lesquels le carbone α est remplacé par un atome d'azote. Nous pouvons citer par exemple les 2:1-[α /aza]-oligomères et les 1:1-[α /aza]-oligomères (représentés figure III.41).

Dans le cas des 1:1-[α /aza]-oligomères, après quelques mois d'étude, Cécile Abbas a montré qu'aucune structuration de ces oligomères ne pouvait être mise en évidence. Que ce soit à l'état solide ou en solution, aucune structure n'a pu être calculée sur ces séries en raison de la présence de trop nombreux conformères. De plus, la répétition de la séquence aza- α n'était pas suffisante pour induire un repliement régulier de la molécule. Nous avons alors étudié des oligomères de type 2:1-[α /aza] (Figure III.41). Cette étude a été menée en étroite collaboration avec Zhou Zhou, doctorant au laboratoire. Outre la synthèse de ces oligomères, il a également réalisé une partie des résultats (spectroscopie infrarouge et RMN 1D) présentés dans ce chapitre. Il a également obtenus des cristaux qui ont été confiés à Claude Didierjean et Emmanuel Wenger au laboratoire de cristallisation de l'université de Lorraine (CRM2).

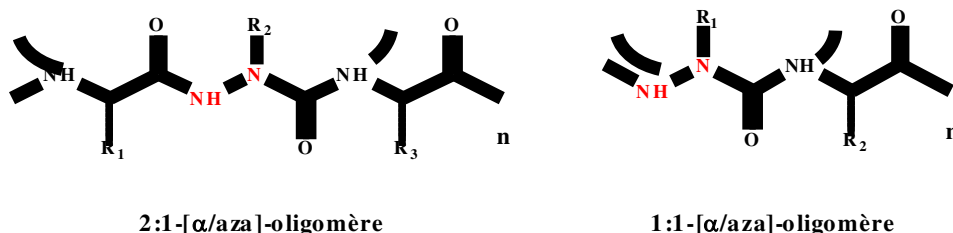


Figure III.41 : Formules développées des 2:1-[α /aza]-oligomères et des 1:1-[α /aza]-oligomères.

III.3.2 Formules des oligomères étudiés

Dans ce contexte, l'étude a commencé avec des trimères α /aza/ α , afin d'étudier l'influence du résidu acide aza dans la structure de l'oligomère d'une part, et d'autre part celle de la configuration absolue des carbones α des acides aminés adjacents. Pour ce faire, nous

avons étudié la conformation des oligomères de type 2:1-[α /aza] en version homo-chiral et hétéro-chiral. Ces études ont été effectuées en solution par des techniques de RMN, FT-IR combinées à des calculs de dynamique moléculaire. La séquence choisie est Phe-AzaPhe-Ala. Deux chaînes latérales très différentes ont été choisies pour deux raisons. La première, pour éviter les recouvrements sur les spectres RMN : un acide aminé avec un groupe méthylène a été choisi afin d'avoir une référence pour l'intégration des spectres NOESY ou ROESY. La seconde concerne la nature aromatique de la Phe. Cette chaîne latérale permet d'introduire des interactions de type π - π aromatiques qui peuvent être très utiles dans des processus d'auto-assemblage. (Figure III.42).

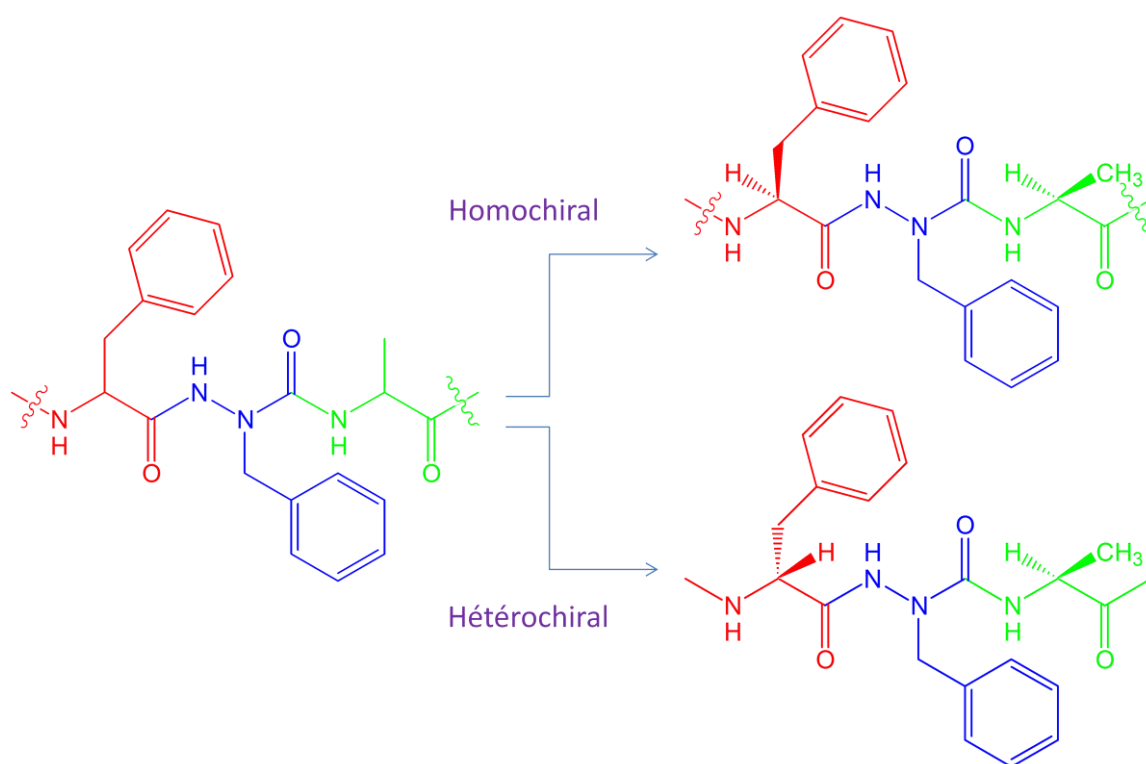


Figure III 42: Représentation de l'unité de base (trimère) : Phe-AzaPhe-Ala.

La nomenclature utilisée pour l'angle dièdre du squelette du polymère est représentée dans la figure III.43.

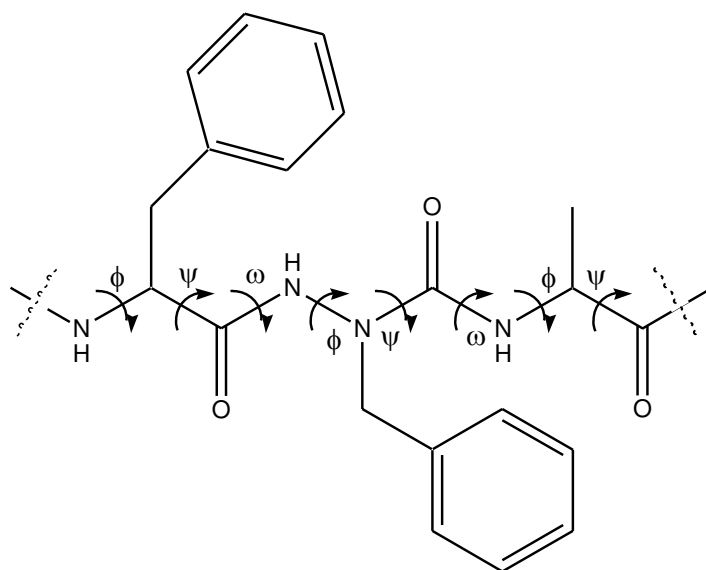
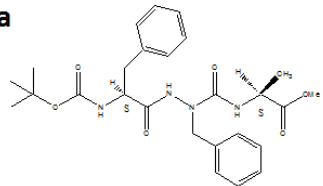
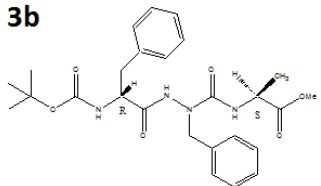
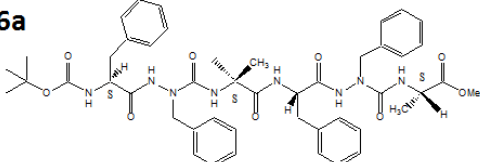
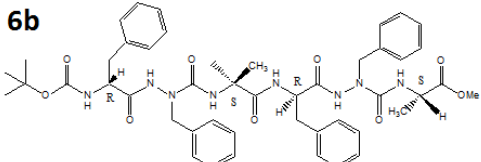
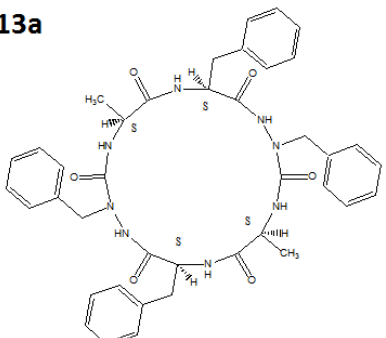
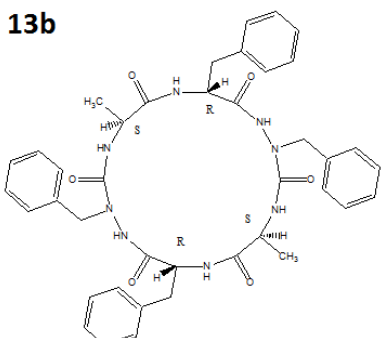


Figure III.43: Nomenclature utilisée pour les angles dièdres du squelette de l'oligomère.

Les structures des différents aza-peptides que nous avons étudiés sont décrites dans le tableau III.21. Deux séries de diastéréoisomères d'oligomères ont été synthétisées : le composé **3a** (homochiral) et **3b** (hétérochiral) qui possèdent une seule unité de la séquence de base Phe-AzaPhe-Ala. Dans la suite de ce manuscrit, nous les appellerons des trimères. Ensuite, des composés plus longs, que nous appellerons hexamères. **6a** (homochiral) et **6b** (hétérochiral), possédant deux unités de la séquence de base ont été synthétisés ainsi que leurs analogues cycliques **13a** (homochiral) et **13b** (hétérochiral).

Tableau III.21: Les formules des 2:1-[α /aza]-oligomères étudiés.

	Homochiral	Hétérochiral
Trimère	3a 	3b 
Hexamère	6a 	6b 
Hexamère	13a 	13b 

III.3.3 Synthèse des 2 :1-[α /aza]-oligomères linéaires **3a**, **3b**, **6a** et **6b**

La synthèse, présentée dans le schéma III.5, de tous ces composés a été réalisée par Zhou Zhou pendant de sa thèse au LCPM. La synthèse des oligomères 2:1-[α /aza] consiste dans un premier temps à déprotéger l'extrémité N-terminale du précurseur **2**, puis coupler avec la Boc-Phe-OH pour obtenir les trimères **3a** et **3b** selon la configuration de la Phe. Les hexamères **6a** et **6b** sont quant à eux obtenus suite au couplage des trimères déprotégés en N-terminale (**5a**, **5b**) avec les trimères déprotégés en C-terminal (**4a**, **4b**).

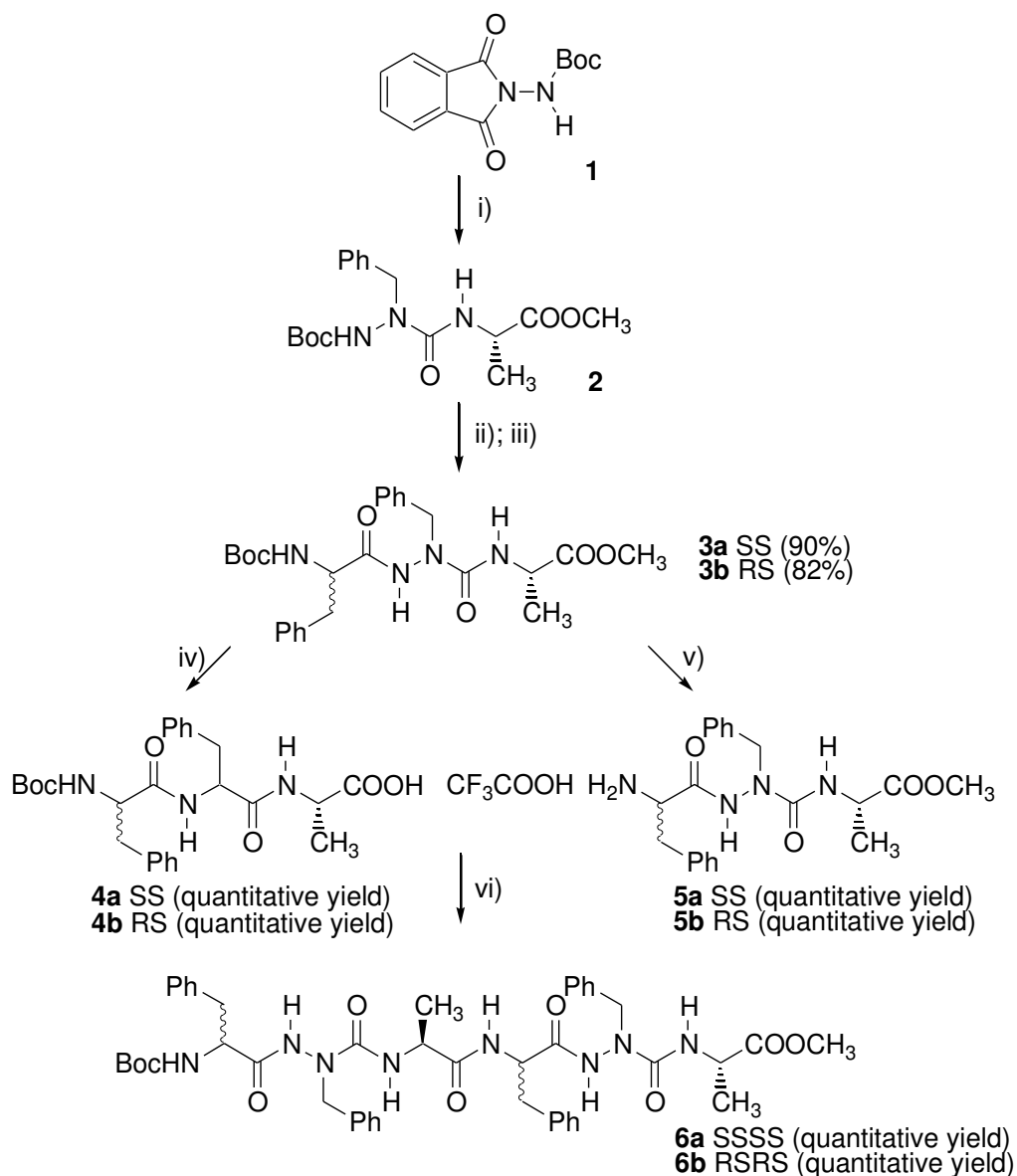


Schéma III.5: Synthèse d'oligomères **3a**, **3b**, **6a** et **6b** à partir de N-tert-butyloxycarbonyl aminophthalimide **1** ¹¹³; ii) CF₃CO₂H, CH₂Cl₂; iii) C₃F₃N₃, BocPheOH, pyridine, CH₂Cl₂; iv) NaOH 1M, MeCN; v) CF₃CO₂H, CH₂Cl₂; vi) HBTU, DIEA, CH₂Cl₂/DMF.

¹¹³ C. Abbas, G. Pickaert, C. Didierjean, B. Jamart-Grégoire, R. Vanderesse *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 4158-4160.

III.3.4 Résultats et discussions

a) Etudes structurales du 2:1-[α /aza]-homo-trimère

Notre première étape a été d'étudier la structure du composé **3a** 2:1-[α /aza]-homo-trimère (Boc-Phe-azaPhe-Ala-OMe) en solution. La résolution par diffraction des rayons X de la structure cristalline avait déjà été présentée par Cécile Abbas-Quinternet lors de sa thèse effectuée au LCPM. Elle a notamment démontré que le composé **3a** adopte un coude de type β II (Figure III.44).

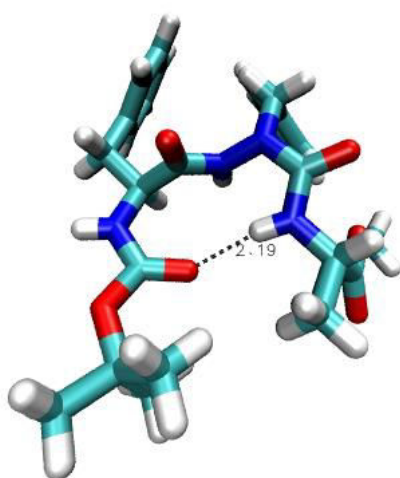


Figure III.44 : Structure moléculaire dans le cristal du 2:1-[α /aza]-trimère **3a**

Une liaison hydrogène intramoléculaire entre la fonction carbonyle CO du groupement Boc et le proton du groupement NH du résidu Alanine stabilise le coude dans la structure cristalline. La distance interatomique entre l'azote et l'oxygène est de 3,05 Å et celle entre l'hydrogène et l'oxygène est de 2.19 Å. L'atome N $^{\alpha}$, sur le résidu acide aza-aminé, a un caractère légèrement pyramidal. En effet nous avons observé un écart par rapport au plan, défini par les trois atomes qui lui sont liés (C $^{\beta}$, N, C'), de 0.24 Å, avec trois angles de 114°, 117° et 119°. Par analogie avec les carbones asymétriques (en adoptant des règles de priorité de Cahn-Ingold-Prelog), il adopte ainsi à l'état cristallin une chiralité de type R (Figure III.45).

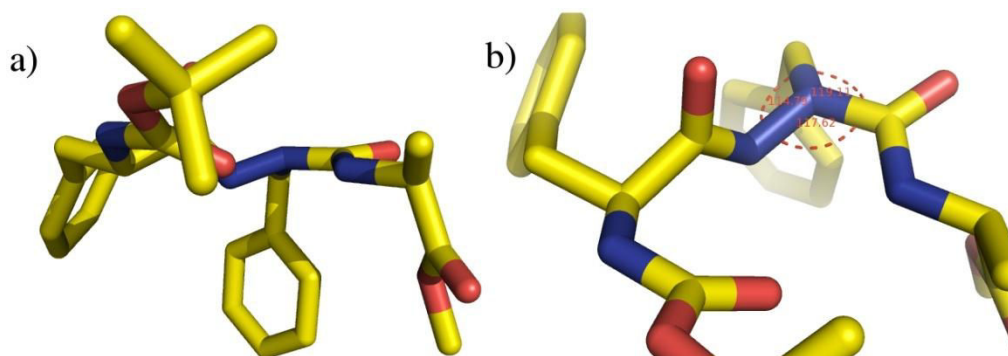


Figure III.45: Représentation de la géométrie pyramidale de l'azote azaPhe de **3a**. a) La distance au plan définie par les trois atomes liés avec l'azote- α est égale à 0.24 Å; b) Les trois angles: 114°, 117° et 119° sont représentés.

En phase liquide nous avons tout d'abord recherché la présence de liaisons hydrogène. Pour ce faire nous avons effectué des mesures de spectroscopie infrarouge sur le composé **3a** dans le chloroforme à une concentration de 5 mM. Cette concentration est suffisamment faible pour écarter le risque de créer des liaisons hydrogène intermoléculaires (Figure III.46). Les vibrateurs que nous regardons ici sont les groupes carbonyles (accepteurs de liaison hydrogène) et les protons amide (donneurs de liaisons hydrogène). La partie du spectre infrarouge correspondant aux vibrateurs NH est représentée dans la figure III.46.

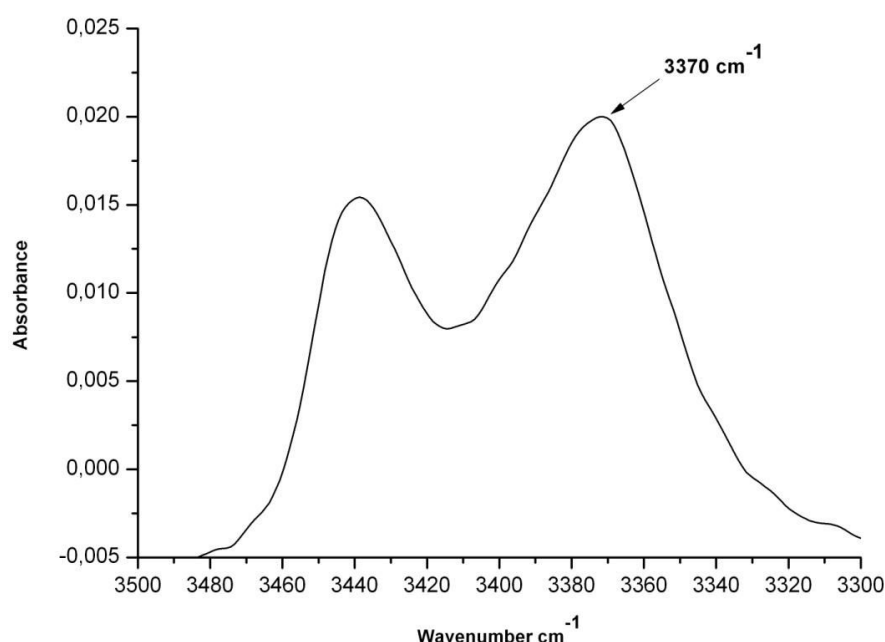


Figure III.46 : Spectre IR du composé **3a** dans la zone des élongations de liaison des groupements NH. Les spectres ont été enregistrés dans le chloroforme à 5 mM à température ambiante.

Le vibreur NH est considéré comme lié en solution lorsque le nombre d'onde est inférieur à 3400 cm^{-1} et libre lorsque le nombre d'onde est supérieure à 3400 cm^{-1} . Nous observons une bande à 3370 cm^{-1} correspondant à la vibration d'élongation de la liaison NH lorsque l'hydrogène est impliqué dans une liaison hydrogène.

Les spectres infrarouge ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Tensor 27 équipé du logiciel OPUS¹¹⁴. Après acquisition des données, un traitement post-acquisition de déconvolution des bandes dans la zone de vibration des C=O a été réalisé d'après la méthode de Levenberg-Maquard (Figure III.47).

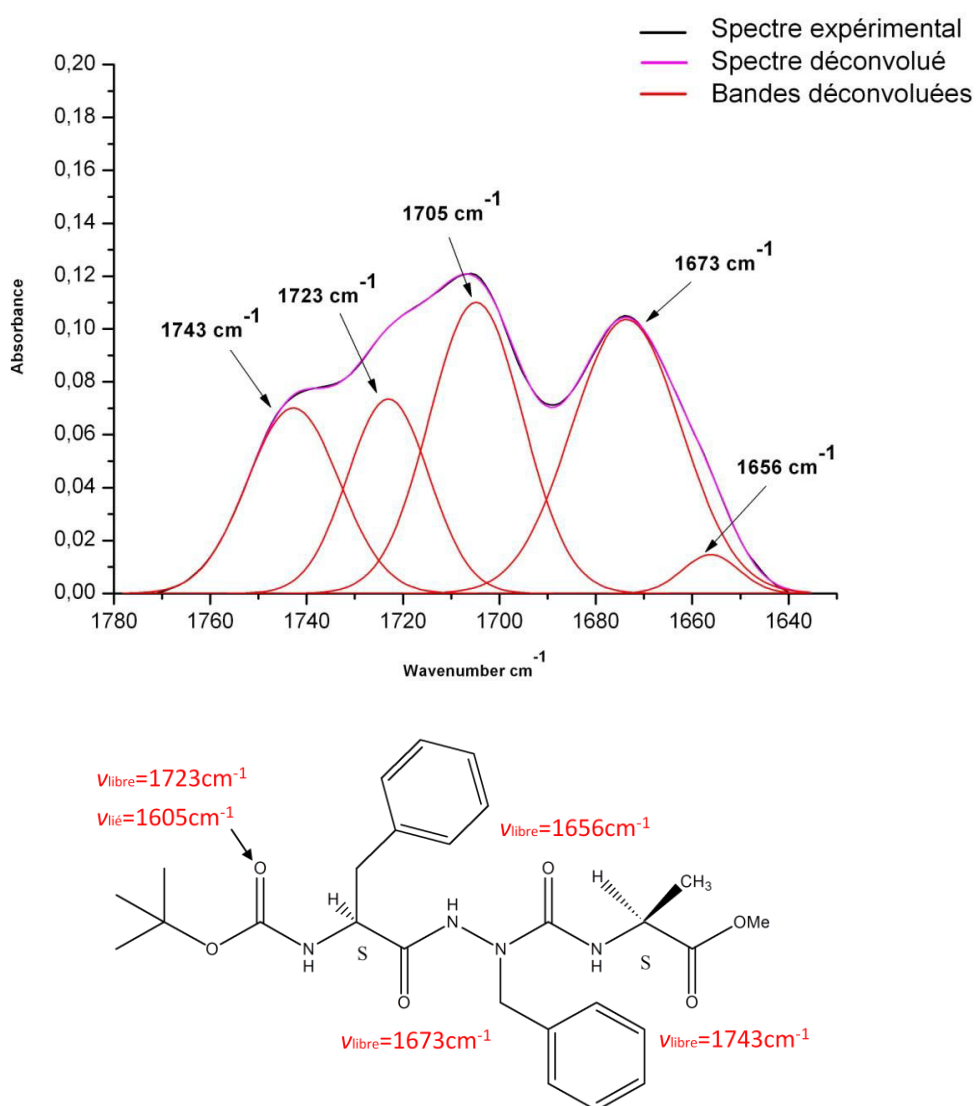


Figure III.47: La déconvolution de la zone des vibreurs C=O du composé **3a** met en évidence cinq bandes de vibration.

¹¹⁴ Bruker Optics

Après déconvolution, cinq bandes ont été mises en évidence pour quatre carbonyles présents dans la molécule. En s'appuyant sur les tables et sur l'expérience acquise au laboratoire, une bande caractéristique du carbonyle de l'ester méthylique est visible à 1743cm^{-1} . Une bande vers 1723 cm^{-1} correspond au Boc libre, une bande à 1673 cm^{-1} correspond au CO du résidu phénylalanine. La bande à 1705 cm^{-1} correspond au CO du groupement Boc lié. Finalement, une bande vers 1656 cm^{-1} , trouvée après avoir effectué la dérivée seconde du spectre, correspond au CO de l'aza-Phe.

L'ensemble des résultats trouvés sur le spectre IR nous montrent que le composé **3a** possède une liaison hydrogène entre un proton amide de la molécule et l'oxygène du carbonyle du groupement Boc.

L'accessibilité aux solvants des protons amide a été mesurée en enregistrant plusieurs expériences dans des mélanges $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$ de compositions différentes (de 0 à 100% DMSO). Les déplacements chimiques des protons NH dans les différents solvants sont présentés dans le tableau III.22 et les courbes des déplacements chimiques (ppm) en fonction de la concentration de $\text{DMSO}/\text{CDCl}_3$ sont présentées dans la figure III.48.

Tableau III.22 : Le déplacement chimique des protons NH de trois acides aminés différents pour le composé **3a** depuis un mélange 100% CDCl_3 / 0% DMSO à un mélange 0% CDCl_3 / 100% DMSO à une température de 308K.

% DMSO	Déplacement Chimique (ppm)		
	NH Phe	NH aza-Phe	NH Ala
0	4.86	7.57	6.15
0.625	4.88	7.68	6.15
1.25	4.92	7.8	6.16
2.5	5	8.12	6.18
5	5.17	8.6	6.2
10	5.55	9.18	6.25
20	5.89	9.68	6.3
40	6.5	10	6.38
80	7.19	10.24	6.4
100	7.30	10.29	6.41
$\Delta\delta$	2.44	2.72	0.26

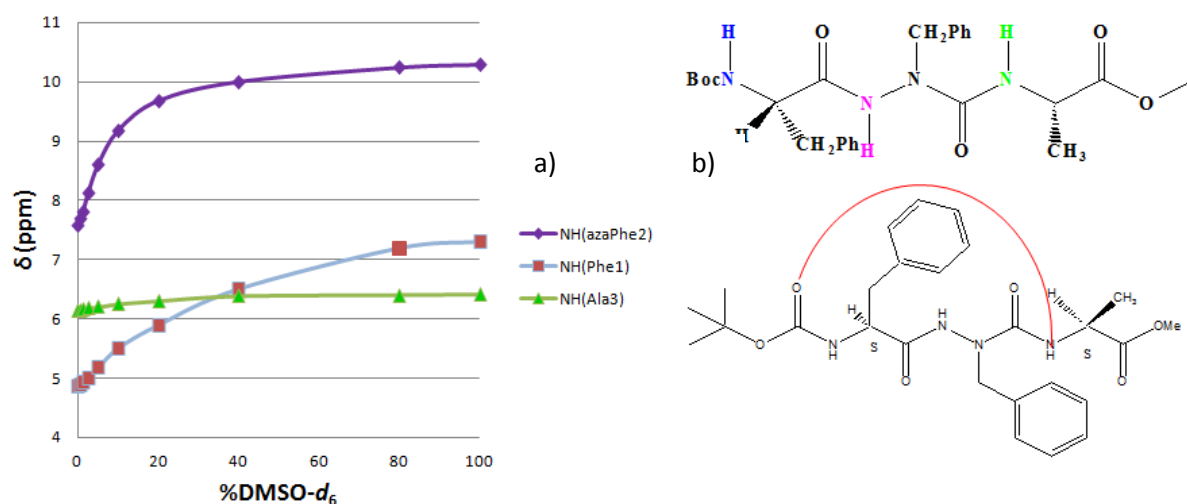


Figure III.48 : Variation des déplacements chimiques des protons NH du trimère **3a** Boc-Phe-AzaPhe-Ala-OMe (SS) en fonction du solvant: a) courbes b) structure développée des molécules et représentation de la liaison hydrogène supposée (en rouge).

Comme nous l'avons déjà vu, les protons qui perçoivent le changement de solvant sont les protons les plus exposés. Leurs déplacements chimiques varient alors fortement. Au contraire, les protons impliqués dans des liaisons hydrogène ont une très faible variation des déplacements chimiques. Dans la figure II.50b) on observe que les déplacements chimiques de deux protons varient beaucoup (NH azaPhe2 et NH Phe1) alors que celui d'un proton amide varie très peu (0.26 ppm), celui de l'alanine 3. On déduit de cette observation que le proton amide de l'alanine 3 est impliqué dans une liaison hydrogène. En rapprochant ce résultat des précédentes observations faites grâce à la spectroscopie infrarouge, nous pouvons en déduire que la structure en solution du composé **3a** est stabilisée par une liaison hydrogène entre le carbonyl du groupe protecteur Boc et le proton amide de Ala 3.

Parallèlement des expériences de RMN 2D nous ont permis de confirmer ces résultats et d'affiner la structure tridimensionnelle de **3a**. Cette molécule a été étudiée en solution dans le CDCl₃ à une concentration de 3mM pour éviter d'éventuelles liaisons hydrogène intermoléculaires. Après plusieurs essais, la meilleure résolution spectrale pour le composé **3a** a été trouvée à 308 K. Les déplacements chimiques ¹H ont été attribués selon les procédures classiques. Les pics croisés NOE ont été attribués puis intégrés grâce au logiciel NMRView¹¹⁵. Le volume d'un NOE entre la paire de protons du méthylène de la

¹¹⁵ Robson, B. & Platt, E. Refined models for computer calculations in protein engineering. Calibration and testing of atomic potential functions compatible with more efficient calculations. *J. Mol. Biol.* **188**, 259–281 (1986).

phenylalanine 1 a été utilisé comme référence de volume pour une distance de 1,8 Å. La limite inférieure pour toutes les contraintes a été fixée à 1,8 Å et des limites supérieures à 2,7, 3,3 et 5,0 Å correspondent une corrélation forte, moyenne et faible, respectivement. Les contraintes ROE observées pour le composé **3a** et les distances dérivées sont présentées dans le tableau III.23.

Tableau III.23 : Résumé des contraintes observées et des distances dérivées des ROE pour le composé **3a** dans CDCl₃ à 308 K. Ici fort “s” < 2.7 Å; moyen “m” < 3.3 Å; faible “w” < 5.0 Å. Le numéro 1, 2 et 3 placé devant le nom de l’atome correspond au numéro du résidu et les lignes en gras correspondent aux contraintes inter-résidus moyenne distance.

Name of the NOE Correlation	NOE	Type
1.HN – 1.HB	s	Intra-residue
3.HN – 3.HB	m	Intra-residue
2.HN – 1.HN	m	Sequential
3.HN – 2.HN	m	Sequential
2.HN – 1.HA	s	Sequential
2.HN – 1.HB	w	Sequential
2.HN – 3.HA	w	Sequential
1.HA – 1.HB	s	Intra-residue
3.HA – 3.HB	s	Intra-residue
1.HN – 1.AR	s	Intra-residue
2.HN – 2.AR	m	Intra-residue
1.HA – 1.AR	s	Intra-residue
1.HB – 1.AR	s	Intra-residue
3.HN – 2.AR	w	Sequential
3.HB – 2.AR	w	Sequential
Boc – 1.HN	m	Sequential
Boc – 1.HA	w	Sequential
Boc – OMe	s	Intra-residue

Sur le spectre ROESY dans le CDCl₃, nous avons relevé 18 contraintes de distance. La figure III.49 représente les cinq contraintes inter-résidus moyenne distance observées pour le composé **3a** dans le CDCl₃ à 308 K.

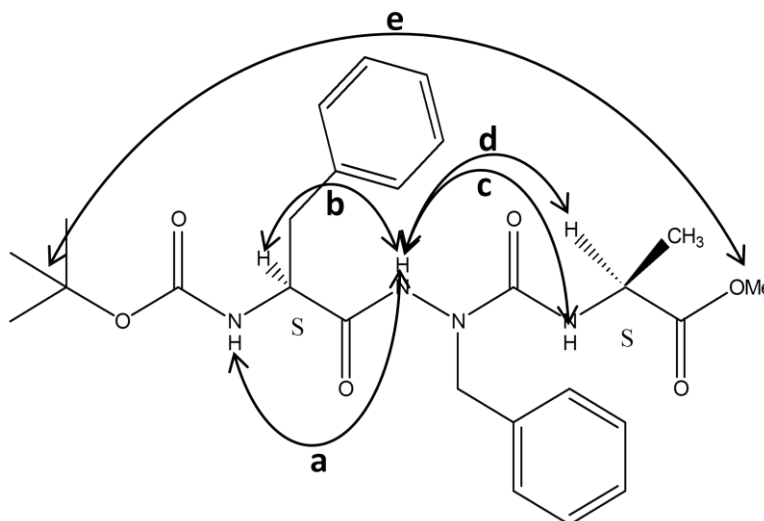


Figure III.49 : Représentation des contraintes ROE inter-résidu observées pour le composé **3a** dans CDCl₃.

La distance entre le proton α de la Phénylalanine et le proton NH du résidu aza-Phénylalanine (a) et la corrélation entre NH du aza-Phénylalanine et NH de Alanine (c) suggèrent un type de coude,¹¹⁶ une corrélation moyenne entre le NH de la Phénylalanine et le NH de l'aza-Phénylalanine (a) avec une faible corrélation entre le NH de l'aza-Phénylalanine et le proton sur le C $^\alpha$ du résidu Alanine (d) suggère un autre type de coude possible. De plus, une forte corrélation entre les protons sur l'extrémité N-terminale Boc et les protons méthyle sur l'extrémité C-terminale OMe (e), indique que les deux côtés de la molécule sont proches, ce qui signifie que la molécule se replie en solution, grâce aux coudes présents.

Les simulations de la structure du composé **3a** à partir des contraintes RMN observées ont été conduites en utilisant le logiciel AMBER10 en trois étapes selon le protocole déjà décrit : chauffage, recuit simulé dans le vide et affinement dans une boîte de solvant. Nous avons simulé 100 structures. Nous avons conservé les 23 structures d'énergies les plus basses comme représentatives de la structure de l'oligomère **3a**. La superposition de ces 23 structures dans le CDCl₃ est présentée dans la Figure III.50.

¹¹⁶ Lee, H.-J.; Park, H.-M.; Lee, K.-B. *Biophysical Chemistry* **2007**, 125, 117–126.

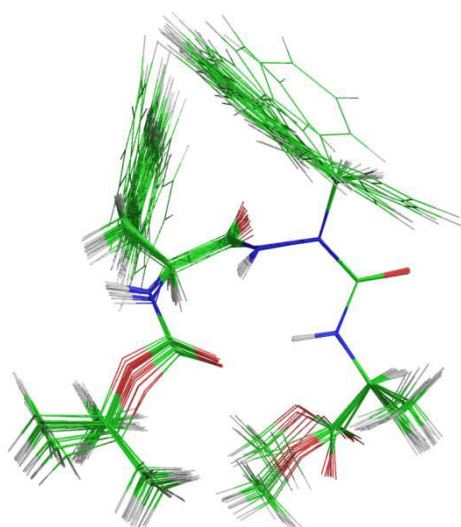


Figure III.50: Superposition des 23 structures de plus basses énergies du peptide **3a** (308 K) (RMSD sur les atomes du squelette = 0.08 Å)

Les vingt-trois structures d'énergie les plus basses sont très bien superposées (RMSD sur les atomes du squelette = 0.08 Å), ce qui signifie que la structure du composé **3a** dans le CDCl_3 est stable. Le taux de présence de la liaison hydrogène dans ces vingt structures est présenté dans le tableau III.24. Nous avons observé que la liaison hydrogène est présente dans chacune des vingt-trois structures.

Tableau III.24: La liaison hydrogène calculée (en bleu) sur les 23 structures d'énergies les plus basses du composé **3a** (distance < 2.40 Å, angle NHO < 35.0°).

H	O	Nombre de LH/23, Distance (Å) et Angle (°)
HN^{Ala}	CO^{Boc}	23 (1.81..2.03) (6.4..11.7) *****5*****0*****5*****0****

Nous avons trouvé que la structure du composé **3a** est stabilisée (23 liaisons hydrogène sur 23 structures) par une seule liaison hydrogène fermant un pseudocycle en C10 de 1.88 Å en moyenne entre le NH du résidu Alanine et le CO du groupement Boc (Figure III.51).

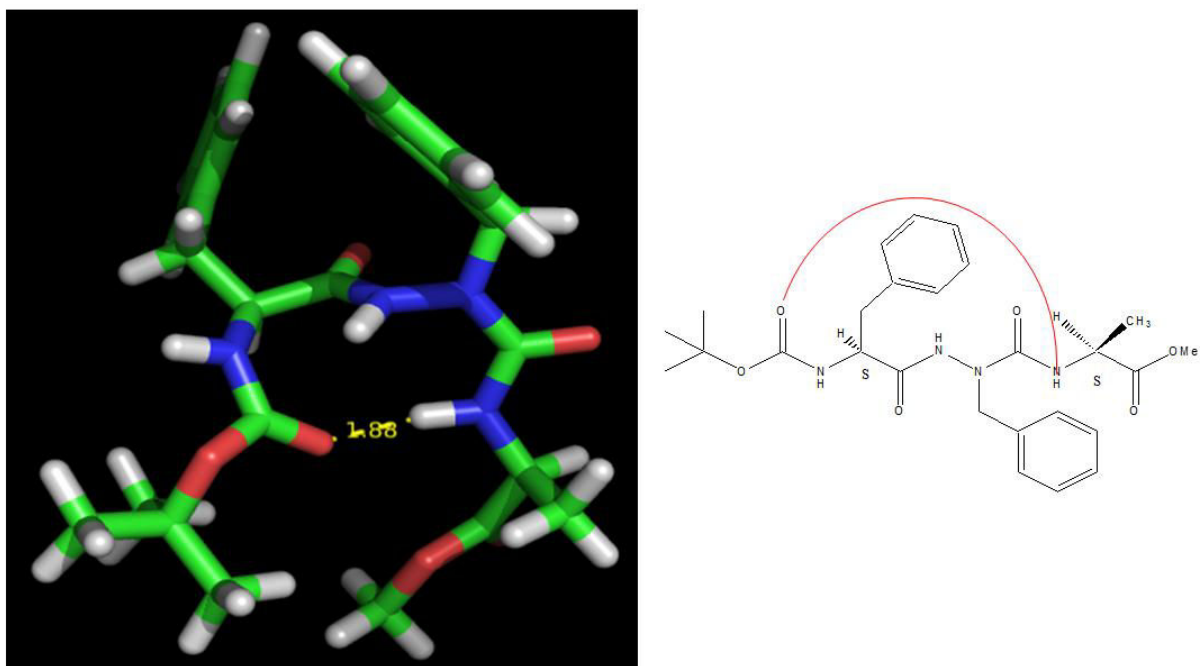


Figure III.51: La molécule **3a** adopte une structure en coude β stabilisée par une liaison hydrogène (en jaune).

Cette conformation est similaire à la structure cristalline présentée plus haut. Les angles de torsion mesurés dans la conformation en solution sont présentés dans le tableau III.25. Ces mesures nous permettent de déterminer que le type de repliement observé correspond à un coude de type β_I .

Tableau III.25 : comparaison des angles dièdres mesurés sur l'oligomère homochiral **3a** avec les valeurs moyennes des angles de torsion pour les six principaux modes de repliement β caractérisés par une liaison hydrogène du type $i+3 \rightarrow i$.

Angle dièdre	ϕ	ψ	ω
Boc-Phe-AzaPhe-Ala-OMe (zz49 SS)			
Résidu 1 Phe	-64.87	-4.57	170.46
Résidu 2 AzaPhe	-93.89	-8.18	-172.45
Résidu 3 Ala	-151.66	-70.19	

Type	Résidu i+1		Résidu i+2	
	Φ	Ψ	Φ	ψ
β_I	-60	-30	-90	0
β_I'	60	30	90	0
β_{II}	-60	120	80	0
β_{II}'	60	-120	-80	0
β_{VI}	-60	120	-120	60

b) Etudes structurales du 2:1-[α /aza]-hétéro-trimère **3b**

Nous avons étudié le trimère Boc-((*R*)Phe-azaPhe-(*S*)Ala)-OMe **3b** par spectroscopie infrarouge dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le composé **3a** ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ dans CDCl₃). La figure III nous montre une comparaison des spectres dans la zone des NH entre les deux composés **3b** et **3a** (Figure III.52).

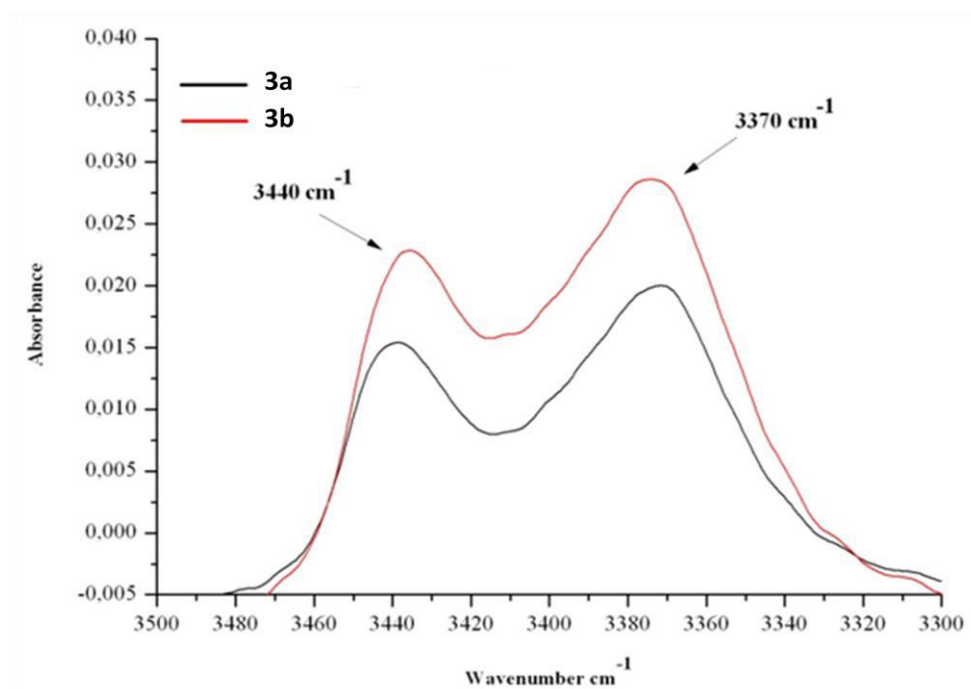


Figure III.52 : Comparaison des spectres infrarouge de **3a** et **3b** dans la zone des elongations de liaison des groupements NH ($5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ /CDCl₃)

Les allures des deux spectres sont très similaires. Il semble donc que l'inversion de configuration absolue de la Phe n'influe pas sur le spectre IR dans la zone des elongations de liaison des groupements NH. La bande vers 3370 cm⁻¹ indique une vibration caractéristique de l'elongation de la liaison NH lorsque le proton est impliqué dans une liaison hydrogène faible.

Le spectre du composé **3b** a également été comparé avec celui de **3a** dans la zone de vibration des liaisons CO (Figure III.53).

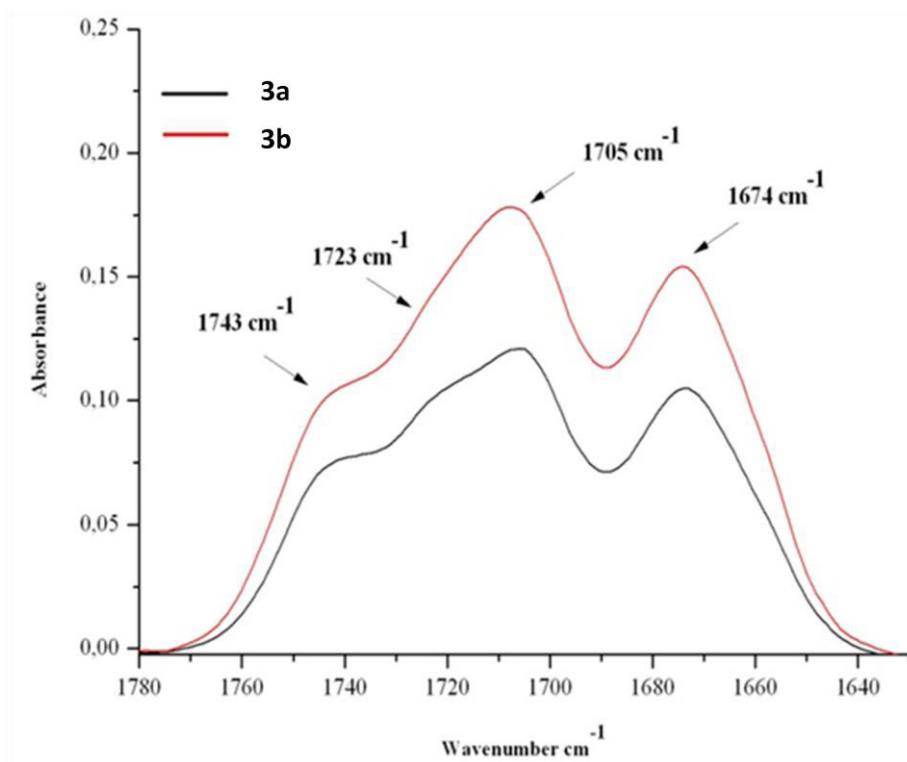


Figure III.53 : Comparaison des spectres infrarouge entre **3a** (noir) et **3b** (rouge) dans la zone des vibrations des liaisons C=O ($5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} / \text{CDCl}_3$)

Les spectres infrarouges des deux spectres sont similaires, donc il est probable qu'une conformation de type coude β existe également dans la structure de **3b**. La bande à 1705 cm^{-1} correspond au CO lié du groupement Boc. Le composé **3b** doit posséder une liaison hydrogène entre un NH de la molécule et le CO du groupement Boc.

Nous avons étudié l'influence de la sensibilité du déplacement chimique des protons des groupements NH du trimère **3b** en fonction des mélanges de solvants ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$) de compositions différentes. (Figure III.54).

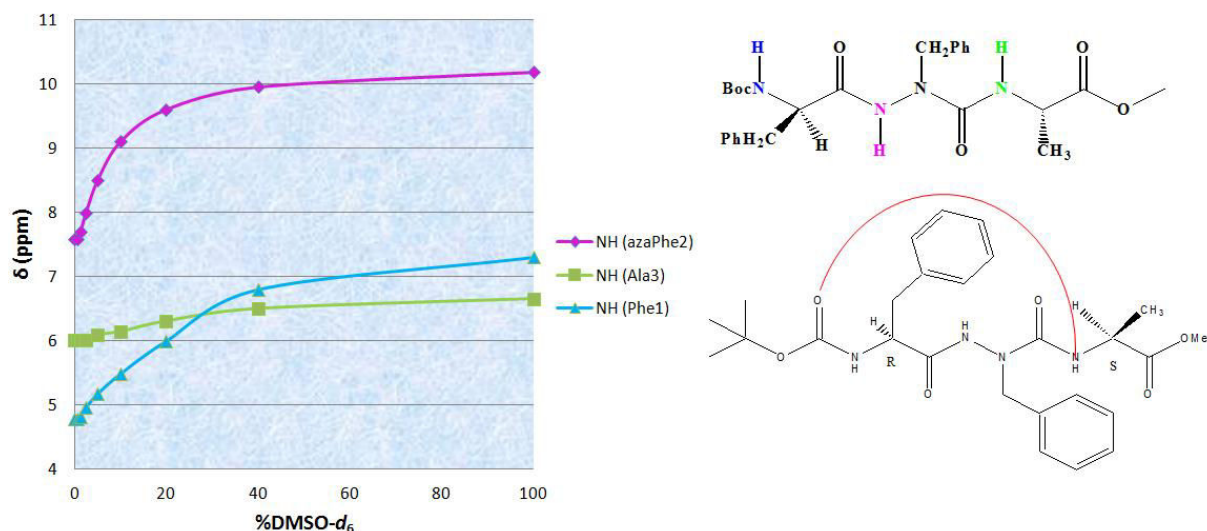


Figure III.54 : Variation des déplacements chimiques des protons NH du trimère **3b** Boc-Phe(R)-AzaPhe-Ala(S)-OMe en fonction d'une proportion croissante de DMSO- d_6 (0-100%)

Comme dans le cas du composé **3a**, nous avons observé que le proton percevant le moins l'influence du solvant est le proton NH de l'alanine (la courbe verte). Les déplacements chimiques des protons NH de la phénylalanine et l'aza-phénylalanine sont plus élevés. Ces résultats indiquent que, comme pour **3a**, le proton NH (Ala) du composé **3b** est engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire car il est peu sensible au changement de composition du mélange. Avec l'ensemble des résultats trouvés sur le spectre IR et la variation des déplacements chimiques des protons NH, nous supposons qu'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le CO du groupement Boc et le proton NH (Ala) sur le résidu Alanine s'est établie.

Comme pour **3a**, ces résultats ont été confirmés lors d'une étude conformationnelle par RMN 2D et modélisation moléculaire. Les contraintes ROE observées pour le composé **3b** et les distances calculées à partir des volumes des pics sont présentées sur le tableau III.26.

Tableau III.26 : Contraintes observées et distances calculées à partir des ROE pour le composé **3b** (3 mM dans CDCl₃ à 308 K). Fort “s” < 2.7 Å; moyen “m” < 3.3 Å; faible “w” < 5.0 Å. Le numéro 1, 2 et 3 placé devant le nom de l’atome correspond au numéro du résidu et les lignes en gras correspondant aux contraintes inter-résidus moyenne distance.

Name of the NOE Correlation	NOE	Type
1.HN – 1.HA	s	Intra-résidue
3.HN – 3.HA	w	Intra-résidue
1.HN – 1.HB	m	Intra-résidue
3.HN – 3.HB	s	Intra-résidue
2.HN – 1.HN	w	Sequential
3.HN – 2.HN	w	Sequential
2.HN – 1.HA	m	Sequential
2.HN – 1.HB	w	Sequential
2.HN – 3.HA	w	Sequential
2.HN – 3.HB	w	Sequential
1.HA – 1.HB	m	Intra-résidue
3.HA – 3.HB	s	Intra-résidue
1.HN – 1.AR	m	Intra-résidue
1.HA – 1.AR	s	Intra-résidue
1.HB – 1.AR	s	Intra-résidue
2.HB – 2.AR	s	Intra-résidue
Boc – 1.HN	m	Sequential
Boc – 1.HA	m	Sequential
Boc – 1.HB	m	Sequential
Boc – 1.AR	m	Sequential
Boc – OMe	s	Intra-résidue

Sur le spectre ROESY, nous avons trouvé 21 contraintes de distance. La figure III.55 représente les 6 contraintes moyenne distance pour le composé **3b** dans le CDCl₃ à 308K: entre le proton du C_α du résidu Phénylalanine et le proton amide du résidu aza-Phénylalanine (b); une corrélation faible entre le NH de l'aza-Phénylalanine et le NH de l'Alanine (c) ; une corrélation faible entre le NH de la Phénylalanine et le NH de l'aza-Phénylalanine (a) ; deux corrélations faibles entre le NH de l'aza-Phénylalanine et le proton sur le C_α (d) et les protons sur le C_β (f) du résidu Alanine. Toutes ces corrélations suggèrent la présence d'un coude. De plus, une corrélation forte trouvée comme dans **3a** entre les protons sur l'extrémité N-terminale Boc et les protons méthyle sur l'extrémité C-terminale OMe (e), montre que les

deux extrémités de la molécule sont proches dans l'espace. Les corrélations NOE trouvées dans le spectre ROESY pour les deux trimères sont similaires.

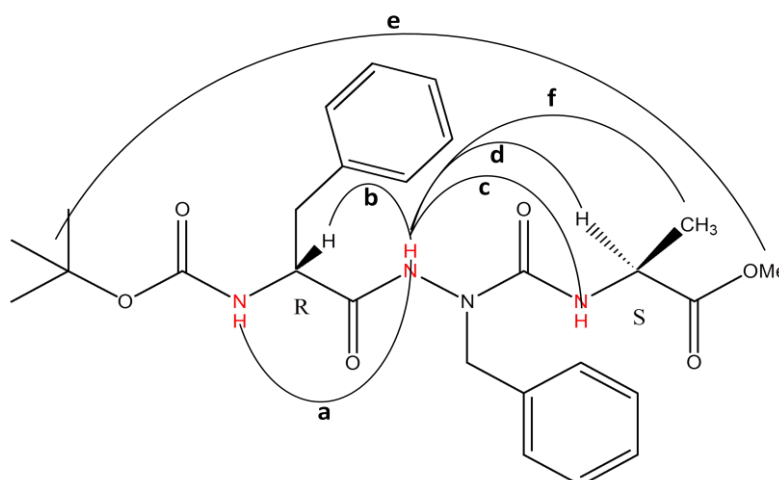


Figure III.55: Représentation des contraintes ROE inter-résidu observées pour le composé **3b** dans CDCl₃ à 308K.

Les calculs de modélisation moléculaire ont été menés en utilisant les contraintes citées plus haut. Nous avons choisi 21 structures d'énergies les plus basses et nous les avons considérées comme représentatives du structure de peptide **3b**. Par rapport au composé **3a**, on observe une faible corrélation supplémentaire entre le NH de l'aza-Phénylalanine et les protons sur le groupe méthyle du résidu Alanine (f).

La superposition des 21 structures de plus basses énergies dans le CDCl₃ est rapportée dans la Figure III.56.

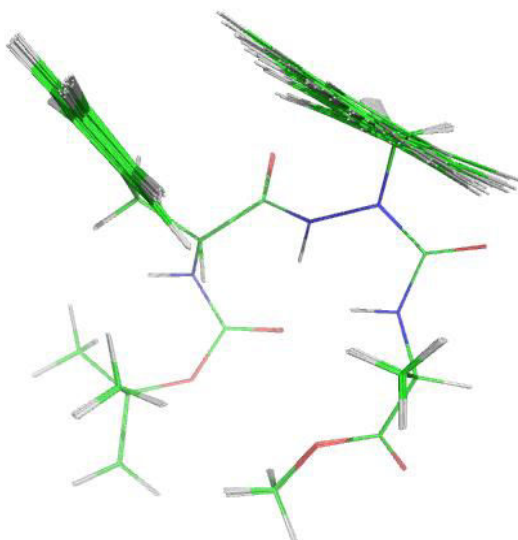


Figure III.56: Superpositions de 21 structures de plus basses énergies de l'oligomère **3b** dans CDCl₃ à 308 K. (RMSD sur les atomes du squelette = 0.01Å)

Ces vingt-trois structures de plus basse énergie sont bien superposées (RMSD sur les atomes du squelette = 0.01 Å). Cette valeur très faible du RMSD signifie que la conformation du composé **3b** dans CDCl₃ est très bien conservée d'une structure à l'autre. Elle est sûrement très peu mobile et en comparaison moins mobile que le composé **3a**. Les caractéristiques des liaisons hydrogène pour ces vingt-et-une structures sont représentées dans le tableau III.27.

Tableau III.27: La liaison hydrogène calculée (couleur bleue) sur les 21 structures d'énergies les plus basses du composé **3b** (distance < 2.40 Å, angle < 35.0°).

H	O	Nombre de LH/21, Distance (Å) et Angle (°)
HN ^{Ala}	CO ^{Boc}	21 (1.81..1.86) (10.7..13.3) ****5****0****5****0*

La même liaison hydrogène est trouvée dans les 21 structures. La structure du composé **3b** est stabilisée par cette seule liaison hydrogène qui ferme un pseudo-cycle en C10. La longueur de cette liaison est en moyenne de 1.83 Å entre le NH du résidu Alanine et le CO du groupement Boc (Figure III.57).

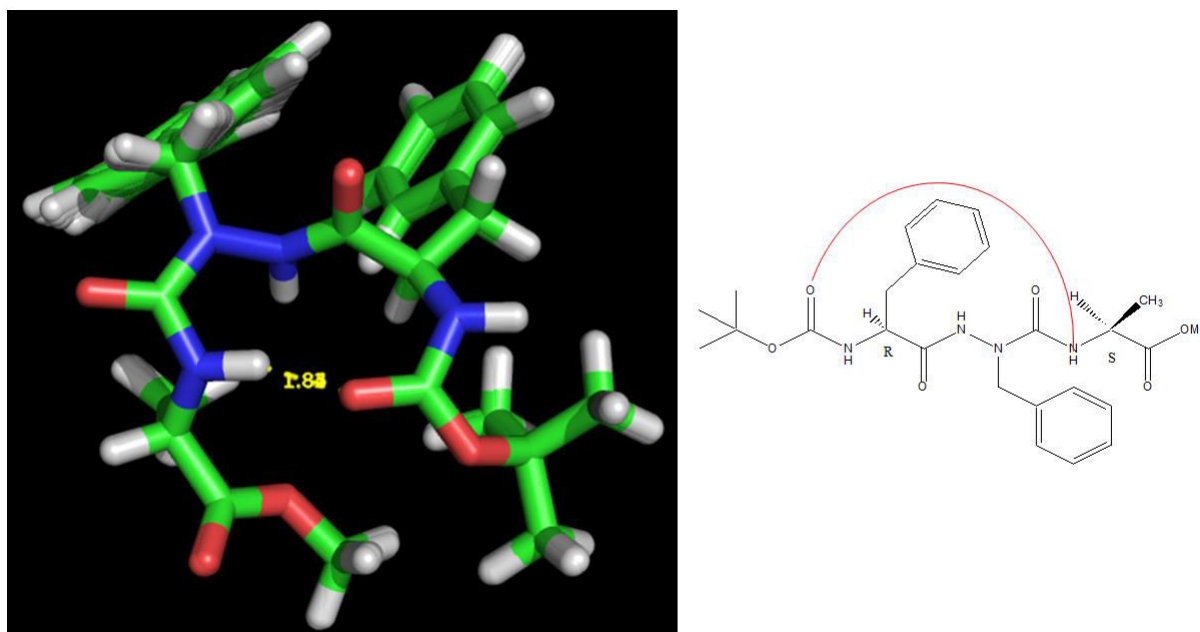


Figure III.57: Représentation de la structure 3D adoptée par le composé **3b** et stabilisée par une liaison hydrogène (en jaune).

Les valeurs des angles de torsion pour la structure en solution sont présentées dans le tableau III.28 et nous permettent de déterminer que le repliement correspond à un coude de type βII'.

Tableau III 28: Angles dièdres mesurés pour l'oligomère hétéro chirale **3b**. Comparaison avec les valeurs moyennes des angles de torsion pour les six principaux modes de repliement en coude β .

Angle dièdre	ϕ	ψ	ω
Boc-Phe-AzaPhe-Ala-OMe (3b RS)			
Résidu 1 Phe	77.59	-113.42	161.97
Résidu 2 AzaPhe	-116.01	11.25	-126.03
Résidu 3 Ala	-179.19	-84.60	

Type	Résidu i+1		Résidu i+2	
	Φ	Ψ	Φ	ψ
β_I	-60	-30	-90	0
β_I'	60	30	90	0
β_{II}	-60	120	80	0
β_{II}'	60	-120	-80	0

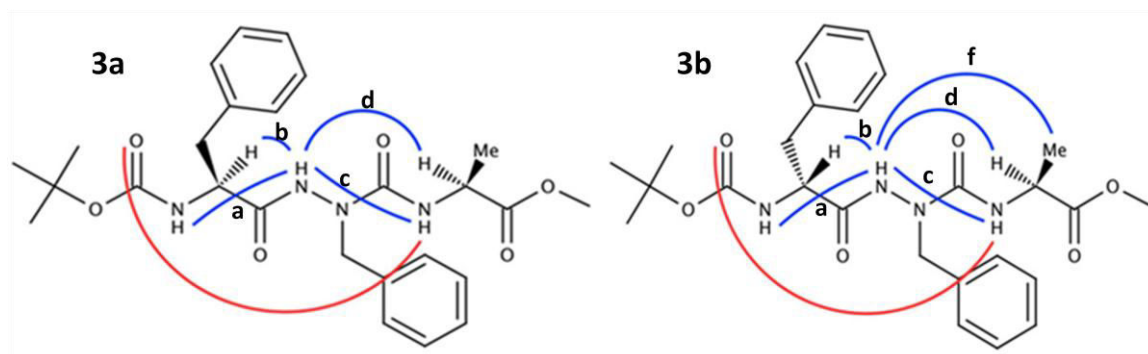


Figure III.58 : Comparaison entre **3a** et **3b** : les contraintes NOE (bleu) et la liaison hydrogène (en rouge). Contraintes relevées dans les spectres ROESY dans $CDCl_3$ à 308K.

Dans la figure III.58, nous montrons la comparaison pour les deux oligomères **3a** et **3b**, des contraintes NOE utilisées pour le calcul de structure (en bleu) et la liaison hydrogène (en rouge). Les contraintes NOE notées a,b,c et d sont observées dans les spectres ROESY des deux oligomères. Pour le composé **3b** on observe une contrainte supplémentaire (notée f). Les deux composés **3a** et **3b** sont stabilisés par une même liaison hydrogène entre NH du résidu Alanine et le CO du groupement Boc refermant ainsi un pseudo-cycle de 10 atomes. A

partir des valeurs des angles dièdres mesurés nous en avons conclu que le coude est de type βI dans le composé **3a** et de type $\beta II'$ dans le composé **3b**.

Les deux composés présentent des structures stables. Cependant les structures du composé **3b** sont mieux superposées que le composé **3a**. Les RMSD sur les atomes du squelette sont de 0.08 Å pour **3a** pour 0.011 Å pour **3b**. Nous pouvons voir ici une influence indirecte du changement de chiralité. En effet, il induit ici un changement de la direction de la chaîne latérale de la phénylalanine, et favorise une interaction de π - π stacking entre les noyaux aromatiques (Figure III.57). Cette interaction est confirmée par l'angle (22°) et le décalage (3 Å) mesurés entre les plans des noyaux aromatiques, qui selon l'étude de Hunter *et al.*^{117,118} favorisent l'interaction. (Figure III.59).

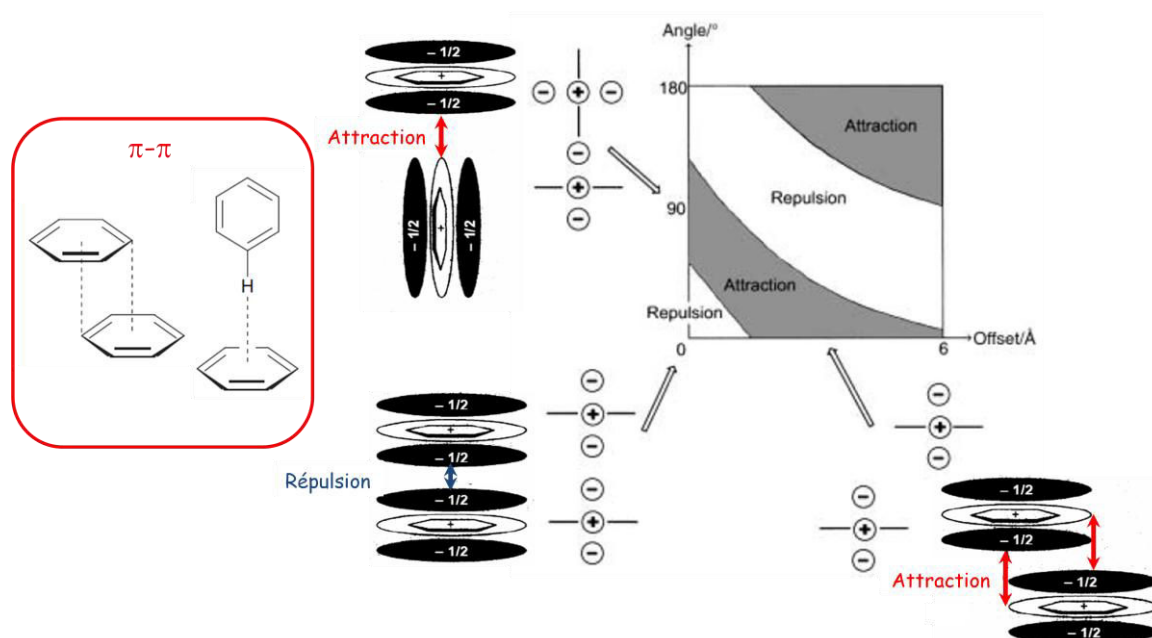


Figure III.59: Interaction des groupements aromatiques en fonction de l'orientation et de décalage des plans l'un par rapport à l'autre²².

En conclusion, les deux oligomères ont des structures très semblables, montrant un coude β fermé par une liaison hydrogène entre le carbonyle du groupe Boc et le proton amide de l'Alanine. L'inversion de configuration du carbone α a dans ce cas une influence puisqu'en changeant l'orientation de la chaîne latérale de la Phénylalanine et favorise alors une interaction π - π entre les deux noyaux aromatiques.

¹¹⁷ Hunter, C.A., Sanders, J.K.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5525

¹¹⁸ Hunter, C.A., Lawson, K.R., Perkins, J., Urch, C.J., *J. Am. Soc. Perkin Trans.2* **2001**, 651

c) Etudes structurales des 2:1-[α /aza]-hexamères **6a** et **6b**

Les premières études ont été menées par Cécile Abbas-Quinternet dans des mélanges de solvants polaire/non polaire en faisant varier les proportions des solvants. L'étude de l'oligomère **6a** s'est faite dans des mélanges CD₃CN/DMSO-d₆ à une concentration molaire de 10⁻² mol.L⁻¹. L'oligomère **6b** a lui été étudié dans des mélanges CDCl₃/DMSO-d₆ à une concentration molaire de 10⁻² mol.L⁻¹. Les déplacements chimiques des protons des groupes NH des résidus Alanine varient peu avec l'ajout de DMSO-d₆, ce qui nous permet de déduire qu'ils sont liés par liaisons hydrogène. Ces premiers résultats encourageants nous ont permis de supposer que les composés **6a** et **6b** adoptent un repliement. Les expériences infrarouge n'ont pas été exploitées à cause de leurs complexités.

Afin de vérifier notre hypothèse, nous verrons tout d'abord le cas de l'hexamère hétéro chiral **6b**. Les expériences ROESY ont été réalisées sur les deux hexamères à une concentration C de 2*10⁻³ mol.L⁻¹ dans CDCl₃ et à 253 K. La figure III.60 montre le spectre ROESY de l'oligomère **6b** à deux températures différentes 278 K et 253 K. Les mêmes contraintes NOE sont observées à ces deux températures. Toutefois le spectre enregistré à 253 K est mieux résolu. Nous avons donc décidé de réaliser notre étude structurale à cette température.

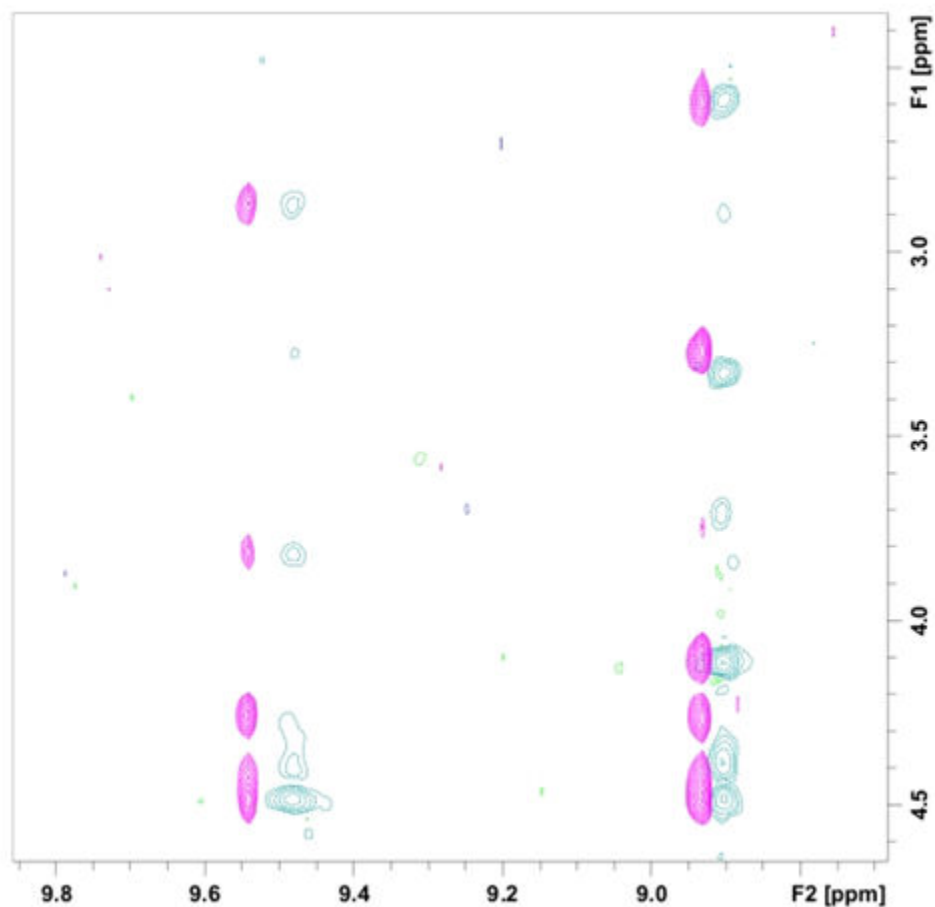


Figure III.60 : Spectre ROESY de l'oligomère **6b** à 278 K (en bleu) et 253 K (en rose). Les mêmes NOE ont été observés à ces deux températures, mais le spectre enregistré à 253K est mieux résolu.

A partir des contraintes observées dans le spectre ROESY (Figure III.62), nous avons calculé la structure de cette oligomère en suivant un protocole similaire à celui appliqué pour les oligomères plus petits. Les NOE utilisés pour ces calculs, issus des spectres ROESY réalisés dans le CDCl_3 à 253 K, sont présentés dans la figure III.61.

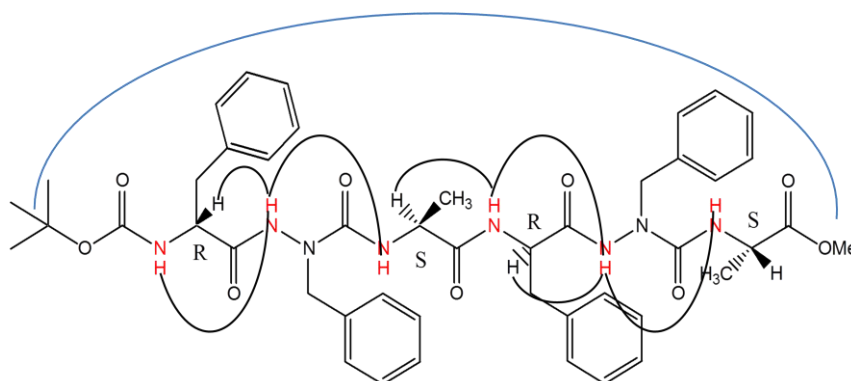


Figure III.61 : Représentation des contraintes ROE inter-résidu observées pour le composé **6b** dans CDCl_3 à 253 K.

Pour l'oligomère **6b**, nous avons obtenus deux familles de structures. Elles sont représentées dans la figure III.63. A la fin de notre protocole, les 22 structures de plus basses énergies ont été sélectionnées et réparties dans deux familles ; 9 dans la première (Figure III.62.a) et 13 dans la seconde. (Figure III.62.b).

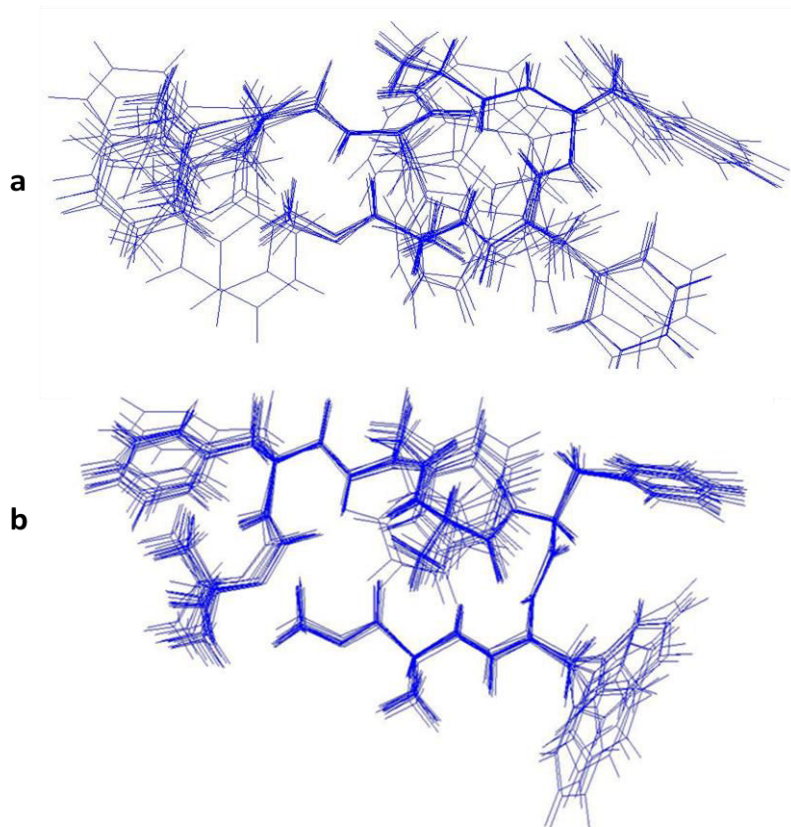


Figure III.62: Représentation des deux familles de l'oligomère **6b** à l'issue du calcul. Neuf structures sont superposées dans la première famille **a** avec un RMSD sur les atomes du squelette de 0.134 Å; treize dans la seconde famille avec un RMSD sur les atomes du squelette de 0.1 Å.

Dans les deux cas nous avons observé des coudes stabilisés par des liaisons hydrogène. (Figure III.63).

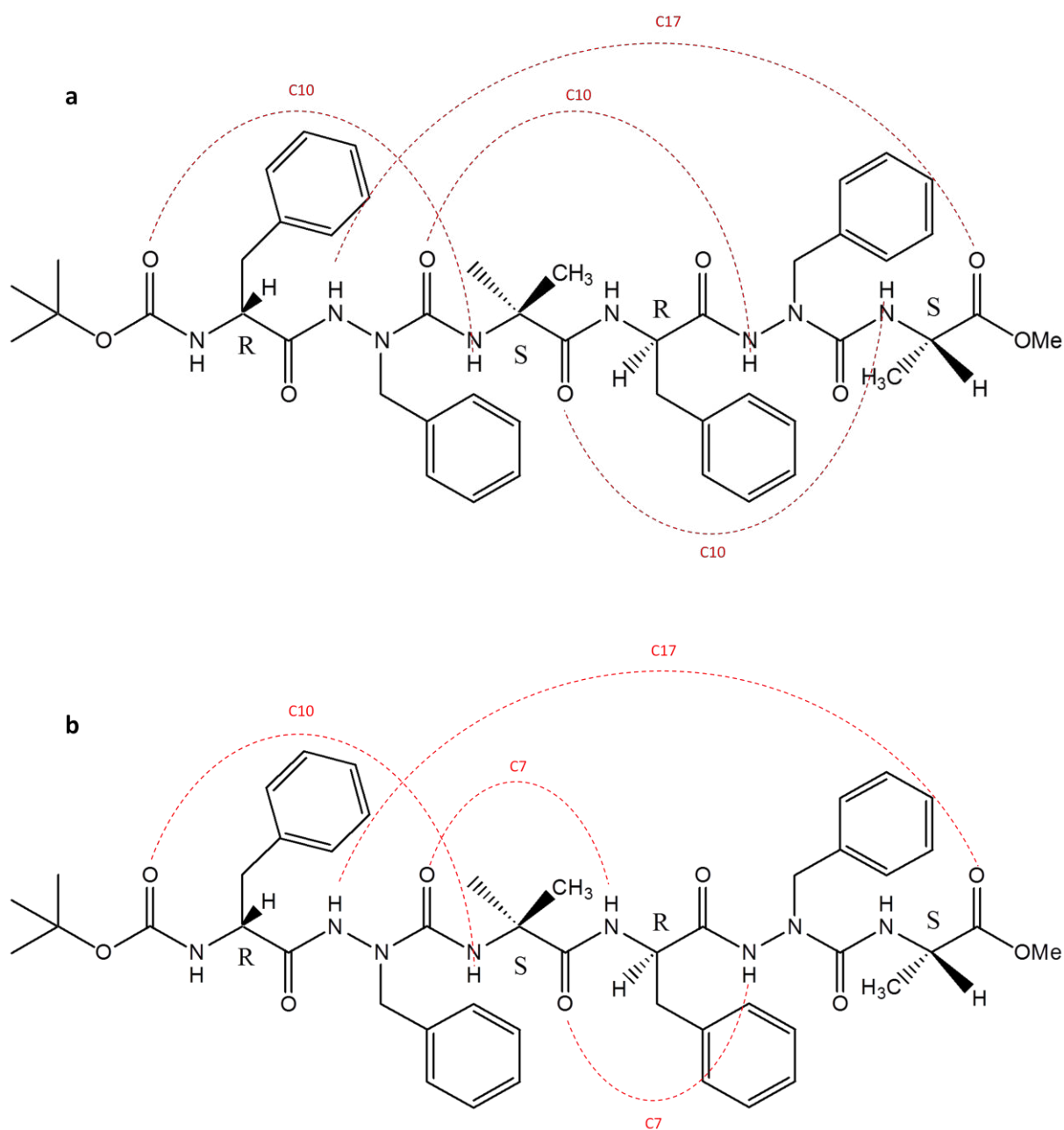


Figure III.63 : représentation des liaisons hydrogène observées pour chacune des deux familles de l'oligomère **6b**.

Les caractéristiques des liaisons hydrogène dans chaque cas sont reportées dans les tableaux ci-dessous (Tableau III.29 pour **a**, et le tableau III.30 pour **b**).

Tableau III.29 : Les caractéristiques des liaisons hydrogène de la structure de **6b** dans la famille **a**.

Atome	Atome	Distance Å	Angle	Nombre de structure	Taille du pseudo-cycle
HN ^{AzaPhe2}	O _{Ala6}	1.99..2.09	28.2..30.7	5/9	C17
HN _{Ala3}	O _{Boc}	1.95..2.25	8.0.. 9.0	6/9	C10
HN _{AzaPhe5}	O _{AzaPhe2}	1.76..1.83	5.3..10.5	9/9	C10
HN _{Ala6}	O _{Ala3}	1.88..1.97	11.3..13.4	9/9	C10

Tableau III.30 : Les caractéristiques des liaisons hydrogène de la structure de **6b** dans la famille **b**.

Atome	Atome	Distance Å	Angle	Nombre de structure	Taille du pseudo-cycle
HN _{AzaPhe2}	O _{Ala6}	2.11..2.30	28.7..32.9	12/13	C17
HN _{Ala3}	O _{Boc}	2.08..2.37	12.3..17.6	8/13	C10
HN _{Phe4}	O _{AzaPhe2}	1.68..1.71	13.2..19.1	13/13	C7
HN _{AzaPhe5}	O _{Ala3}	1.77..1.82	15.2..19.0	13/13	C7

Les résultats des simulations nous montrent plusieurs choses: premièrement la structure est plus mobile avec l'augmentation de la longueur de chaîne pseudo-peptidique. Nous avons d'ailleurs dû effectuer les études à des températures beaucoup plus basses que pour les trimères. Ensuite, la structure du composé **6b** est stabilisée par plusieurs liaisons hydrogène. Dans la famille **a**, nous avons observé trois liaisons hydrogène fermant des pseudocycles en C10 et une liaison hydrogène fermant un pseudocycle en C17. Dans la famille **b**, comme dans la famille **a**, nous avons également observé quatre liaisons hydrogène. Le pseudo-cycle en C10 (entre le CO du Boc et le NH de l'Ala 3) ainsi que pseudo-cycle en

C17 sont conservés. Les deux autres pseudo-cycles en C10 observés dans la famille **a** sont remplacées par des pseudo-cycles C7 dans la famille **b**.

La structure de l'oligomère homonucléaire *SSSS* (**6a**) a également été étudiée en solution dans le CDCl_3 à 253K par RMN. Nous avons tout d'abord contrôlé qu'il existe trois conformères en solution (selon les proportions de 44/36/20%). L'oligomère est mobile, il adopte plusieurs conformations en solution et la vitesse d'échange entre les différents conformères est lente comparée à l'échelle de temps de la RMN. Pour calculer les structures, nous avons utilisé les NOE du conformère majoritaire. La structure calculée à partir des contraintes issues des NOE est représentée dans la figure III.64.

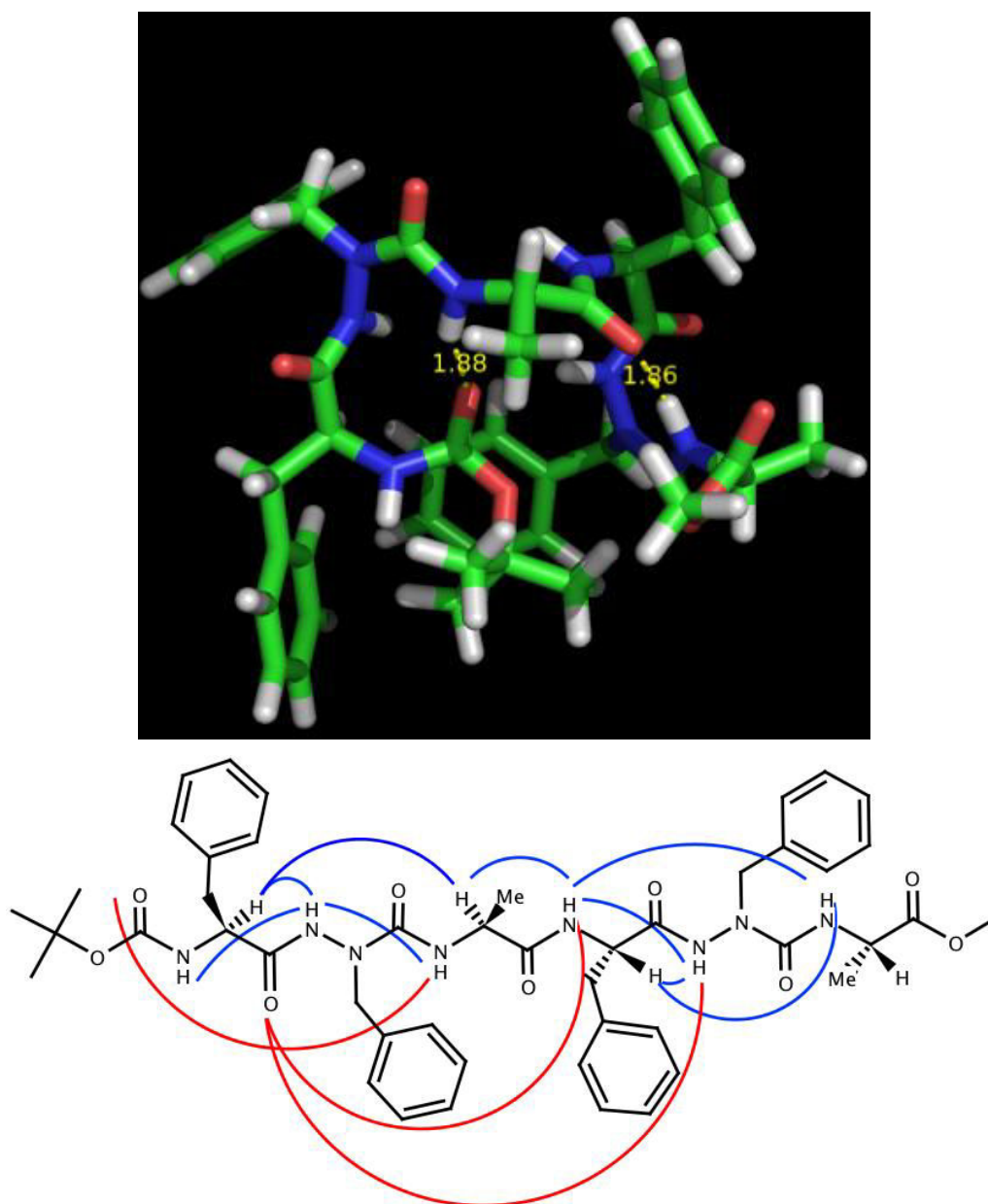


Figure III.64 : Les NOE utilisés pour calculer la structure de **6a** sont représentés en bleu ; les liaisons hydrogène observées sont représentées en rouge. (CDCl_3 à 253 K).

La conformation de l'oligomère **6a** est stabilisée par deux liaisons hydrogène. Une entre le NH du résidu Alanine 3 et le CO du groupement Boc (1.88 Å) et une autre entre le NH du résidu Alanine 6 et le CO du résidu Alanine 3 (1.86 Å).

Tableau III.31 : Conditions expérimentales appliquées pour les études des oligomères Boc-[α -aza- α]_n-OMe .

Composé	Chiralité	Solvant/température	Nombre de conformations observées
Trimère 3a	Homo SS	CDCl ₃ /253K	1
Trimère 3b	Hétéro RS	CDCl ₃ /253K	1
Hexamère 6a	Homo SSSS	CDCl ₃ /308K	3
Hexamère 6b	Hétéro RSRS	CDCl ₃ /308K	1

Tableau III.32 : Les angles dièdres du squelette pour les composés **3a**, **3b**, **6a**, **6b** (les valeurs moyennes sur les vingt structures d'énergie la plus basse) et **3b** en état cristallin, l'ordre des résidus est de C à N-terminal.

résidu	angles	3b XRD	3a (20) vacuum	3a (20) CHCl ₃	3b (20) vacuum	3b (20) CHCl ₃	6a (20) vacuum	6a (20) CHCl ₃	6b (20) vacuum	6b (20) CHCl ₃
Phe	Φ	-54	-69 ± 3	-73 ± 10	82 ± 18	101 ± 25	-65 ± 113	-66 ± 38	46 ± 1	50 ± 7
	Ψ	125	3 ± 7	5 ± 12	-114 ± 5	-69 ± 46	30 ± 16	30 ± 7	26 ± 4	29 ± 10
azaPhe	Θ	103	-92 ± 4	-69 ± 6	-122 ± 27	-107 ± 25	14 ± 119	20 ± 87	91 ± 1	83 ± 4.76
	Ψ	-10	-11 ± 2	-20 ± 14	12 ± 3	6 ± 8	-5 ± 15	-5 ± 8	12 ± 1	11 ± 7
Ala	Φ	-89	-156 ± 6	-152 ± 11	-27 ± 177	151 ± 85	-63 ± 159	-58 ± 99	-64 ± 1	-62 ± 9
	Ψ	51	-10 ± 63	-54 ± 85	-86 ± 19	-5 ± 154	86 ± 84	97 ± 62	45 ± 3	48 ± 11
Phe	Φ						-13 ± 131	-3 ± 93	74 ± 1	68 ± 7
	Ψ						-4 ± 49	-2 ± 30	-54 ± 2	-59 ± 7
azaPhe	Θ						88 ± 17	90 ± 8	-103 ± 3	-91 ± 8
	Ψ						-4 ± 12	-3 ± 7	-3 ± 2	-15 ± 6
Ala	Φ						-129 ± 45	-128 ± 21	-153 ± 2	-156 ± 13
	Ψ						123 ± 149	121 ± 45	145 ± 2	126 ± 102

En conclusion, nous avons réalisé l'étude structurale de quatre oligomères Boc-[α -aza- α]_n-OMe avec n= 1 ou 2. Nous avons également fait varier les configurations absolues des carbones α des acides α -aminés afin d'étudier l'influence de la chiralité dans la structuration de ces familles de molécules.

Les analyses ont été menées dans différentes conditions. Pour chaque oligomère nous avons observé un seul jeu de signaux dans les spectres, sauf pour l'oligomère **6a** qui présente 3 jeux de signaux (Tableau III.31). Les valeurs des angles dièdres pour les quatre oligomères linéaires sont reportées dans le tableau III.25. Des variations sont observées dans les valeurs

des angles mesurées, ce qui montre que si le motif aza induit des coudes, il n'est cependant pas assez contraignant pour induire un type de coude β pour tous les oligomères. Cette notion de contrainte est également observée dans les nombres de conformères en solution. En particulier, en observant les hexamères on voit que ceux-ci sont mobiles. Soit plusieurs conformères sont observés en solution ce qui traduit un échange lent, soit plusieurs solutions sont possibles dans les calculs des structures conduisant à deux familles pour l'oligomère **6b**, ce qui dans ce cas nous fait penser à un échange rapide. Enfin la mobilité des hexamères est également traduite par le fait que nous ayons dû enregistrer les expériences à basse température et le très grand nombre de conformères trouvés dans les spectres infrarouge a rendu impossible leur exploitation.

d) Etudes des oligomères cycliques

La synthèse des 2:1-[α /aza]-cyclo-oligomères a été effectuée par Zhou Zhou durant sa thèse au LCPM, selon le protocole suivant (Schéma III.6).

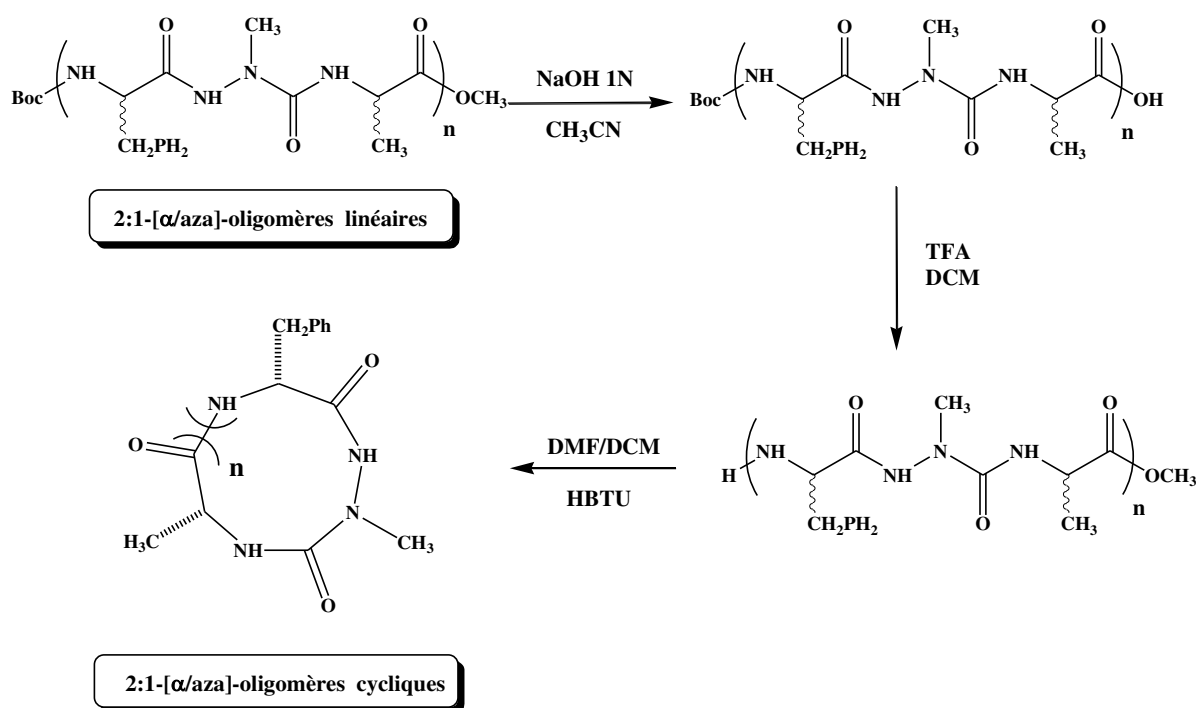


Schéma III.6 : Synthèse des 2:1-[α /aza]-oligomères cycliques.

Les extrémités *N*- et *C*-terminales des oligomères linéaires sont déprotégées. Puis, ce dernier, en solution dans le dichlorométhane, est alors très lentement ajouté goutte à goutte à une solution de HBTU et de DIEA dans un mélange dichlorométhane/DMF de façon à obtenir

une concentration finale d'environ $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Ce protocole a permis d'isoler deux 2:1- $[\alpha/\text{aza}]$ -hexamères cycliques diastéréoisomères **13a** (homochiral) et **13b** (hétérochiral).

Zhou Zhou a également cristallisé le cyclohexamère homochiral 2:1- $[\alpha/\text{aza}]$ **13a** par évaporation lente d'un mélange hexane/acétone, et ces cristaux ont été analysés par diffraction des rayons X. La figure III.65 montre un cycle unique avec la numérotation des résidus. La structure montrant plusieurs cycles est représentée dans la figure III.66.

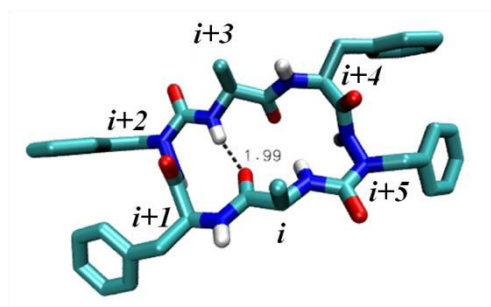


Figure III .65: La structure du composé **13a** présentée avec les numéros du résidu.

A l'état cristallin, les molécules s'auto-assemblent en formant un réseau de liaisons hydrogène intermoléculaires donnant lieu à la formation d'un nanotube. La vue de profil de la structure cristalline du nanotube montre que celui-ci est stabilisé par trois liaisons hydrogène intermoléculaires, dont deux entre le CO de la Phe et le NH de l'azaPhe (distance de 2.22 Å et 2.34 Å respectivement entre les atomes d'oxygène et les protons amide) et la troisième entre le CO de l'Ala^{*i+3*} et le NH de Phe^{*i+4*} (distance de 2.22 Å entre l'atome d'oxygène et le proton amide). Par contre, nous avons trouvé une seule liaison hydrogène intramoléculaire C10 entre le CO de l'Ala^{*i*} et le NH de l'Ala^{*i+3*} avec une distance de 1,99 Å entre l'atome d'oxygène et le proton amide.

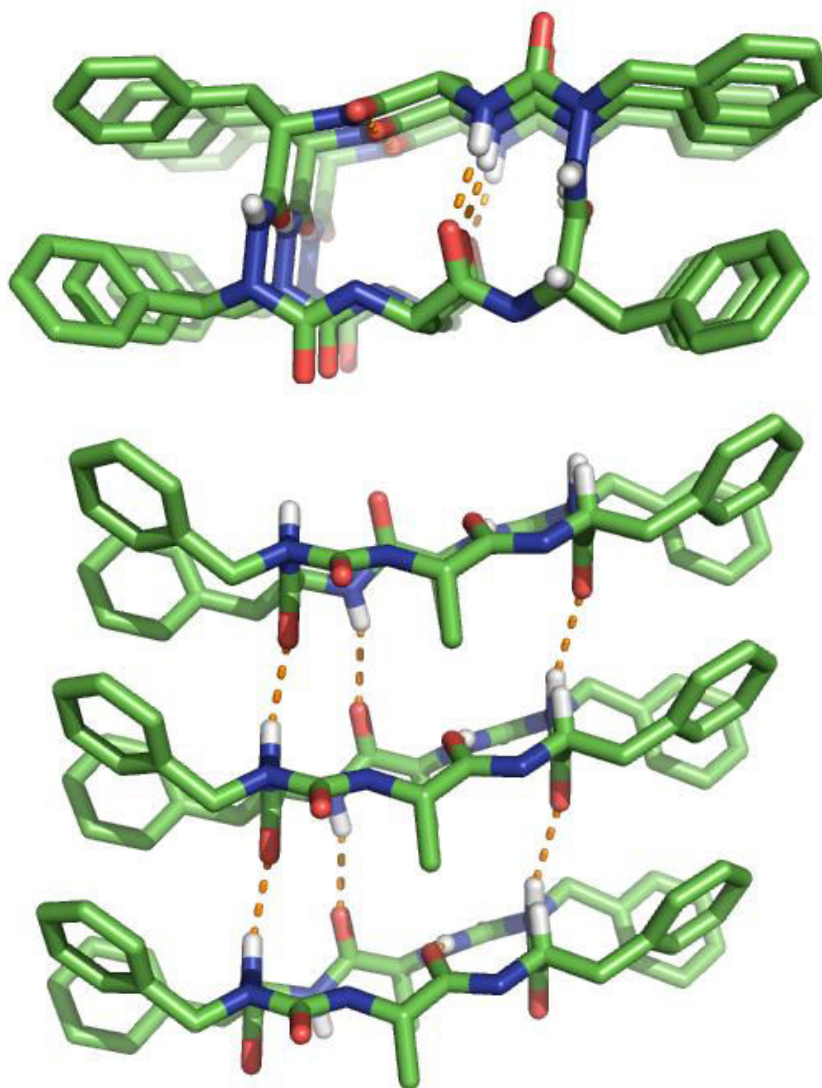


Figure III.66 : Vue de dessus et de côté d'un nanotube formé par l'auto-assemblage du cyclohexamère homochiral **13a**.

L'analyse RMN est effectuée dans le CDCl_3 à une concentration de $0.8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ à 253 K. Dans le spectre TOCSY, trois conformations sont présentes (Figure III.67), c'est-à-dire que la structure de cette molécule évolue entre ces trois conformations ce qui traduit sa mobilité.

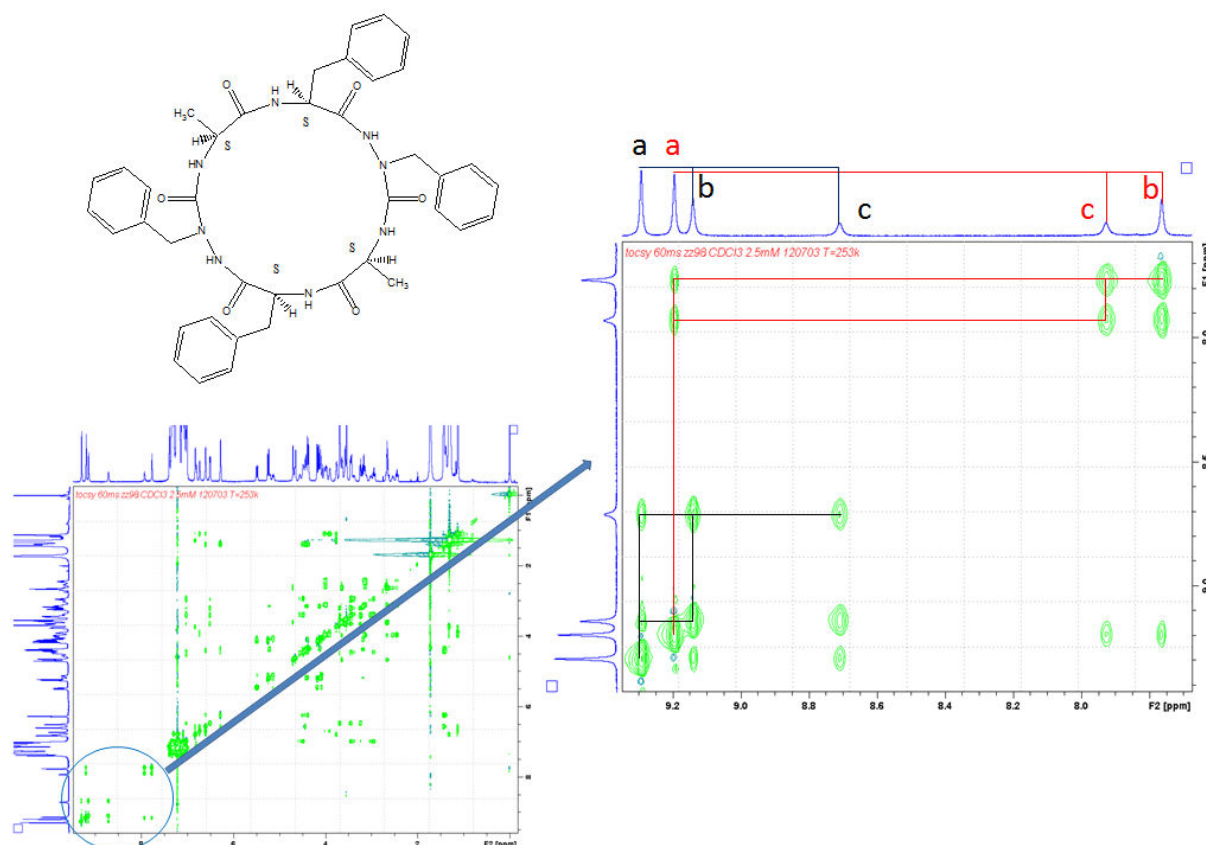


Figure III.67 : Dans le spectre TOCSY de l'hexamère cyclique **13a** trois conformères sont observés.

Sur le spectre ROESY, les protons NH (Phe) sont cachés dans la zone des protons aromatiques. Il n'est donc pas possible de voir les contraintes entre le proton NH (Phe) et les autres protons, les contraintes étaient alors insuffisantes pour calculer les structures.

Pour l'autre cyclohexamère hétérochiral **13b**, aucun cristal n'a été obtenu, et comme pour l'oligomère homochiral, l'étude RMN en solution n'a pas été possible à cause des nombreuses conformations (au moins trois selon les proportions de 45/44/11%) (Figure III.68).

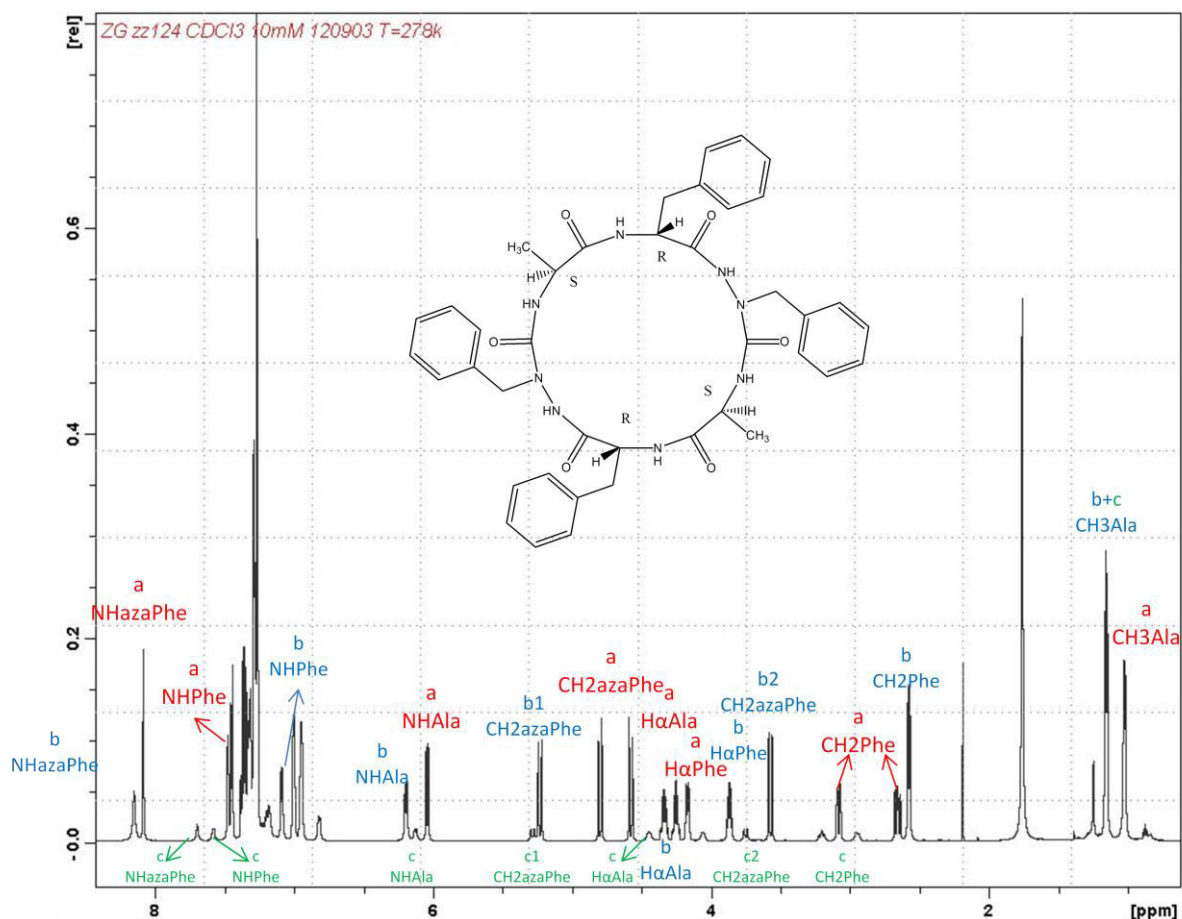


Figure III.68: Le spectre 1D en solution de l'hexamère cyclique *RSRS* montre la présence de 3 conformères

III.3.5 Conclusion

L'analyse IR et RMN en solution pour les trimères **3a** et **3b** nous montre que les deux trimères sont stables et possèdent une seule conformation. Ils sont stabilisés par une seule et même liaison hydrogène fermant un pseudocycle en C10 entre le CO du Boc et le NH du résidu Alanine. La structure issue des simulations en solution pour **3a** et **3b** est similaire. Les structures de l'homo-trimère **3a** en solution et à l'état cristallin sont pratiquement identiques. De plus, d'après la modélisation, il semble que le composé hétérochiral **3b** est plus stable que l'homochiral **3a**, probablement grâce à des interactions de type π - π aromatique. Par contre, les hexamères sont plus mobiles en solution, et présentent plusieurs conformations. En RMN, nous avons vu trois conformations pour le composé **6a** en raison de l'échange lent, et une seule conformation pour **6b** sur le spectre RMN en raison de l'échange rapide. Tous les

oligomères étudiés sont mobiles, en particulier les plus longs. Ils sont tous structurés, il existe plusieurs conformations avec un échange entre ces conformations lent ou rapide.

Dans le cas des cycliques, comme l'échange est plus lent à cause du cycle, les trois conformations sont présentes dans le spectre RMN.

L'analyse DRX à l'état cristallin pour le composé homochiral **13a** nous propose une structure en nanotube. De plus le composé hétérochiral **13b** a formé des gels, ce qui indique la probable auto-structuration de cet oligomère.

Conclusion

Connaître la structure des molécules bioactives est primordial, puisque l'activité des biomolécules est étroitement liée à l'agencement dans l'espace des fonctions chimiques responsable de la réactivité ou de l'interaction. Cependant pour les petites molécules, il n'est pas toujours aisé d'accéder à ces structures par une seule technique spectroscopique. Les molécules trop mobiles cristallisent mal et donnent peu de NOE en RMN. Au laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire nous utilisons depuis longtemps la complémentarité des spectroscopies pour parvenir à dégager suffisamment d'informations structurales pour converger vers un modèle.

Dans cette thèse nous avons montré que l'étude structurale de pseudopeptides peut être menée en combinant plusieurs spectroscopies. Nous avons étudié trois familles de pseudopeptides, avec des modifications pseudopeptidiques différentes.

La première famille concerne les oligomères à base de motifs (S)-ABOC qui a été synthétisée par le groupe des docteurs Muriel Amblard et Monique Calmès de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) à Montpellier et en collaboration avec Baptiste Legrand alors chercheur postdoctoral au LCPM. J'ai évalué les propriétés de structuration du motif (S)-ABOC et mis en évidence le fait que le motif (S)-ABOC, lorsqu'il est introduit dans une séquence peptidique, est capable de générer des coudes beta. L'enchaînement de ces coudes a conduit à la formation d'hélices qui, en fonction des motifs pseudo-peptidiques associés, présentent des caractéristiques différentes.

La seconde famille étudiée comprenait des oligomères formées à partir de monomères contraints de type thiazole développé par M. Ludovic Maillard à l'IBMM à Montpellier. Nous avons montré que ce motif forme des pseudocycles en C9 qui s'organisent ensuite en une hélice observable dès le tétramère.

Enfin la troisième famille d'oligomères étudiée est issue du LCPM. Elle comprend des oligomères alternant des acides alpha-aminés et des acides aminés de type aza dans lesquels le carbone alpha a été remplacé par un atome d'azote. J'ai réalisée cette étude conjointement avec Zhou Zhou en thèse au LCPM. Nous avons montré que le motif aza induit un repliement en coude beta facilitant la cyclisation de la molécule.

Dans cette thèse, j'ai caractérisé les propriétés d'auto-structuration de trois familles de foldamères pseudopeptidiques en combinant les résultats expérimentaux issus de la résonance magnétique nucléaire, la spectroscopie infrarouge, le dichroïsme circulaire et la diffraction des rayons X et en les intégrant à des calculs de modélisation moléculaire.

Cette étude répertorie les propriétés de chaque motif à former des éléments de structure secondaire et à induire la formation de foldamères. Elle montre également bon nombre de manières d'obtenir des informations structurales qui permettent ensuite d'aboutir à un modèle de structure.

Annexe 1 : Tableaux de déplacements chimiques des peptides (ppm)

SI : les déplacements chimiques des pseudopeptides ABOC

Tableau SI.1 : Déplacement chimique ^1H NMR (ppm) pour **3** dans le solvant CDCl_3 à la température 298 K.

AA	H ^N	H α	H β	Autres
iPr	-	-	-	CH 2.403; CH ₃ 1.156
Ala1	6.67	4.48	1.20	
ABOC2	5.97	3.422	1.63, 1.92	γCH 1.63; δCH 1.65; 1.64, 1.597; ϵCH 2.54, 1.37; 1.957, 1.267
Phe3	6.528	4.69	3.06, 2.99	δCH 7.178; ϵCH 7.314; ζCH 7.26; OMe 3.70

Tableau SI.2 : Déplacement chimique ^{15}N et ^{13}C NMR (ppm) pour **3** dans le solvant CDCl_3 à la température 298 K.

AA	N ^H	C α	C β	Autres
iPr	-	-	-	C 35.41; CH ₃ 19.2
Ala1	121.2	48.7	16.89	
ABOC2	128.4	43.74	28.8	γC 23.61; δC 25.88, 25.76 ; ϵC 29.6, 28.49
Phe3	121.2	53.9	37.14	δC 128.95; ϵC 128.71 ; ζC 127.15; OMe 52.4

Tableau SI.3 : Déplacement chimique ^1H NMR (ppm) pour **4** dans le solvant CDCl_3 à la température 298 K.

AA	H ^N	H α	H β	Autres
Z	-	-	-	CH 5.104; δCH 7.33; ϵCH 7.33; ζCH 7.296
Ala1	6.705	4.339	1.47	
ABOC2	5.97	3.535	1.98, 1.65	γCH 1.696; δCH 1.66; 1.81, 1.614; ϵCH 2.57, 1.33; 1.85, 1.21
Phe3	6.451	4.238	2.898	δCH 7.17; ϵCH 7.26; ζCH 7.23
iPr	5.484	3.836	0.871, 0.806	

Tableau SI.4 : Déplacement chimique ^{15}N et ^{13}C NMR (ppm) pour **4** dans le solvant CDCl_3 à la température 298 K.

AA	N ^H	C α	C β	Autres
Z	-	-	-	C 66.8; δC 128.16; ϵC 128.16; ζC 128.4
Ala1	92.6	51.2	16.88	
ABOC2	127.5	43,0	28.8	γC 23.8; δC 25.74, 25.69 ; ϵC 29.52, 28.44
Phe3	124.3	55.4	37.6	δC 129.1; ϵC 128.41 ; ζC 127.01
iPr	138.2	41.3	22.1, 21.96	

Tableau SI.5 : Déplacement chimique ^1H NMR (ppm) pour **3** dans le solvant CD_3CN à la température 298 K.

AA	H ^N	H α	H β	Autres
iPr	-	-	-	CH 2.43; CH_3 1.098, 1.087
Ala1	6.68	4.13	-	CH_3 1.23
ABOC2	6.248	3.422	1.63, 1.92	γCH 1.59; δCH 1.64; 1.77, 1.58; ϵCH 2.5, 1.44; 1.81, 1.401
Phe3	6.926	4.64	3.127, 3.036	δCH 7.27; ϵCH 7.31; ζCH 7.27; OMe 3.68

Tableau SI.6 : Déplacement chimique ^{15}N et ^{13}C NMR (ppm) pour **3** dans le solvant CD_3CN à la température 298 K.

AA	N ^H	C α	C β	Autres
iPr	-	-	-	C 35.41; CH_3 19.2
Ala1	120.4	49.33	17.26	
ABOC2	126.9	43.8	28.8	γC 23.81; δC 25.67, 25.23 ; ϵC 29.7, 27.71
Phe3	120.2	53.93	36.61	δC 129.01; ϵC 128.15 ; ζC 126.6; OMe 51.8

Tableau SI.7 : Déplacement chimique ^1H NMR (ppm) pour **4** dans le solvant CD_3CN à la température 298 K.

AA	H ^N	H α	H β	Autres
Z	-	-	-	CH 5.104; δCH 7.38; ϵCH 7.38; ζCH 7.38
Ala1	6.513	4.11	-	CH_3 1.30
ABOC2	6.35	3.34	1.87, 1.62	γCH 1.602; δCH 1.642; 1.746, 1.588; ϵCH 1.442, 2.45; 1.366, 1.826
Phe3	6.56	4.36	2.97, 2.88	δCH 7.23; ϵCH 7.304; ζCH 7.304
iPr	6.54	3.85	1.01, 0.958	γNH 3.85, CH_3 1.006, 0.958

Tableau SI.8 : Déplacement chimique ^{15}N et ^{13}C NMR (ppm) pour **4** dans le solvant CD_3CN à la température 298 K.

AA	N ^H	C α	C β	Autres
Z	-	-	-	C 65.9; δC 127.6; ϵC 127.6; ζC 127.6
Ala1	91.3	50.9	17.1	
ABOC2	126.57	43.7	28.79	γC 23.87; δC 25.55, 25.32 ; ϵC 29.58, 27.44
Phe3	121.9	54.8	37.6	δC 129.2; ϵC 128.2 ; ζC 126.6
iPr	133.29	41.1	21.4	

SII : les déplacements chimiques des pseudopeptides thiazole

Tableau SII.1 : Déplacement chimique ^1H NMR (ppm) pour **2** dans le solvant CDCl_3 à la température 293 K.

Résidu	HN	$^{\nu}\text{CH}$	$^{\delta}\text{CH}$	Autres
Fmoc				$^{\alpha}\text{CH}$ 4.38, 4.44, $^{\beta}\text{CH}$ 4.24, $^{\delta}\text{CH}$ 7.56, $^{\epsilon}\text{CH}$ 7.27, $^{\zeta}\text{CH}$ 7.38, $^{\eta}\text{CH}$ 7.76
Ala 1	5.73	5.73	1.49	$^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.65
Phe 2	9.18	6.18	3.14, 3.2	$^{\zeta}\text{CH}$ 7.29, $^{\eta}\text{CH}$ 7.165, $^{\theta}\text{CH}$ 6.98, $^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.63
Z				CH 5.31, $^{\nu}\text{CH}$ 7.42, $^{\delta}\text{CH}$ 7.4, $^{\epsilon}\text{CH}$ 7.16

Tableau SII.2 : Déplacement chimique ^{15}N et ^{13}C NMR (ppm) pour **2** dans le solvant CDCl_3 à la température 293 K.

Residue	N	$^{\nu}\text{C}$	$^{\delta}\text{C}$	Autres
Fmoc				$^{\alpha}\text{C}$ 67.08, $^{\beta}\text{C}$ 47.09, $^{\delta}\text{C}$ 124.97, $^{\epsilon}\text{C}$ 129.32, $^{\zeta}\text{C}$ 127.8, $^{\eta}\text{C}$ 119.94
Ala 1		45.29	20.9	$^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.66
Phe 2	127.9	51.46	40.37	$^{\zeta}\text{C}$ 129, $^{\eta}\text{C}$ 126, $^{\theta}\text{C}$ 129, $^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.23
Z				C 67.09, $^{\nu}\text{C}$ 128, $^{\delta}\text{C}$ 128, $^{\epsilon}\text{C}$ 128

Tableau SII.3: Déplacement chimique ^1H NMR (ppm) pour **3a** dans le solvant CDCl_3 à la température 293 K.

Residue	HN	$^{\nu}\text{CH}$	$^{\delta}\text{CH}$	Autres
Fmoc				$^{\alpha}\text{CH}$ 4.4, 4.42, $^{\beta}\text{CH}$ 4.24, $^{\delta}\text{CH}$ 7.55, $^{\epsilon}\text{CH}$ 7.29, $^{\zeta}\text{CH}$ 7.39, $^{\eta}\text{CH}$ 7.76
Ala 1	5.72	5.38	1.45	$^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.66
Phe 2	9.72	5.72	3.18, 3.37	$^{\zeta}\text{CH}$ 7.08, $^{\eta}\text{CH}$ 7.05, $^{\theta}\text{CH}$ 7.05, $^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.64
Ala 3	10.04	5.97	1.66	$^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.65
Phe 4	10.12	6.16	3.2	$^{\zeta}\text{CH}$ 7.3, $^{\eta}\text{CH}$ 7.19, $^{\theta}\text{CH}$ 7.36, $^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.65
Z				CH 5.3, $^{\nu}\text{CH}$ 7.42, $^{\delta}\text{CH}$ 7.39, $^{\epsilon}\text{CH}$ 7.32

Tableau SII.4 : Déplacement chimique ^{15}N et ^{13}C NMR (ppm) pour **3a** dans le solvant CDCl_3 à la température 293 K.

Residue	HN	$^{\nu}\text{C}$	$^{\delta}\text{C}$	Autres
Fmoc				$^{\alpha}\text{C}$ 67.4, $^{\beta}\text{C}$ 47.1, $^{\delta}\text{C}$ 125, $^{\epsilon}\text{C}$ 126.8, $^{\zeta}\text{C}$ 127.65, $^{\eta}\text{C}$ 119.8
Ala 1		43.5	20.4	$^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.76
Phe 2	132.1	50.9	39.3	$^{\zeta}\text{C}$ 128.7, $^{\eta}\text{C}$ 128.3, $^{\theta}\text{C}$ 128.3, $^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.76
Ala 3	134.5	44.8	19.6	$^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.76
Phe 4	129.5	51.68	40.3	$^{\zeta}\text{C}$ 128.3, $^{\eta}\text{C}$ 128.7, $^{\theta}\text{C}$ 129, $^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.76
Z				C 67, $^{\nu}\text{C}$ 128.3, $^{\delta}\text{C}$ 128.6, $^{\epsilon}\text{C}$ 129

Tableau SII.5 : Déplacement chimique ^1H NMR (ppm) pour **3b** dans le solvant CDCl_3 à la température 288 K.

Residue	HN	$^{\nu}\text{CH}$	$^{\delta}\text{CH}$	Autres
Fmoc				$^{\alpha}\text{CH}$ 4.45, $^{\beta}\text{CH}$ 4.23, $^{\delta}\text{CH}$ 7.56, $^{\epsilon}\text{CH}$ 7.27, $^{\zeta}\text{CH}$ 7.38, $^{\eta}\text{CH}$ 7.76
Ala 1	5.93	5.39	1.5	$^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.69
Phe 2	9.89	5.72	3.21, 3.42	$^{\zeta}\text{CH}$ 7.08, $^{\eta}\text{CH}$ 7.05, $^{\theta}\text{CH}$ 7.05, CH_3 2.71
Ala 3	10.23	5.65	1.66	$^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.68
Phe 4	10.67	5.72	3.24, 3.44	$^{\zeta}\text{CH}$ 7.08, $^{\eta}\text{CH}$ 7.05, $^{\theta}\text{CH}$ 7.05, $^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.71
Ala 5	10.18	6.0	1.71	$^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.69
Phe 6	10.26	6.21	3.25	$^{\zeta}\text{CH}$ 7.3, $^{\eta}\text{CH}$ 7.19, $^{\theta}\text{CH}$ 7.36, $^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.68
Z				CH 5.34, $^{\nu}\text{CH}$ 7.45, $^{\delta}\text{CH}$ 7.42, $^{\epsilon}\text{CH}$ 7.16

Tableau SII.6 : Déplacement chimique ^{15}N et ^{13}C NMR (ppm) pour **3b** dans le solvant CDCl_3 à la température 288 K.

Residue	HN	$^{\nu}\text{C}$	$^{\delta}\text{C}$	Autres
Fmoc				$^{\alpha}\text{C}$ 67, $^{\beta}\text{C}$ 46.9, $^{\delta}\text{C}$ 125, $^{\epsilon}\text{C}$ 126.7, $^{\zeta}\text{C}$ 127.6, $^{\eta}\text{C}$ 119.87
Ala 1		45.28	20.39	$^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.64
Phe 2	132.17	21.05	39.2	$^{\zeta}\text{C}$ 128.7, $^{\eta}\text{C}$ 128.3, $^{\theta}\text{C}$ 128.3, $^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.64
Ala 3	134.8	45.23	19.6	$^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.64
Phe 4	133.59	51.05	39.2	$^{\zeta}\text{C}$ 128.7, $^{\eta}\text{C}$ 128.3, $^{\theta}\text{C}$ 128.3, $^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.64
Ala 5	134.75	44.6	19.75	$^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.64
Phe 6	129.9	51.78	40.24	$^{\zeta}\text{C}$ 129, $^{\eta}\text{C}$ 128.7, $^{\theta}\text{C}$ 128.3, $^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.64
Z				C 66.95, $^{\nu}\text{C}$ 128.3, $^{\delta}\text{C}$ 128.6, $^{\epsilon}\text{C}$ 129

Tableau SII.7 : Déplacement chimique ^1H NMR (ppm) pour **3d** dans le solvant CDCl_3 à la température 293 K.

Residue	HN	$^{\gamma}\text{CH}$	$^{\delta}\text{CH}$	Autres
$\text{C}(\text{CH}_3)_3$				$(\text{CH}_3)_3$ 2.065
Ala 1	6.62	5.52	1.46	$^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.668
Phe 2	10.47	5.67	3.26, 3.4	$^{\zeta}\text{CH}$ 6.9, $^{\eta}\text{CH}$ 6.99, $^{\theta}\text{CH}$ 7.04, $^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.69
Ala 3	10.08	5.58	1.59	$^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.647
Phe 4	10.62	6.41	3.19, 3.4	$^{\zeta}\text{CH}$ 7.2, $^{\eta}\text{CH}$ 7.2, $^{\theta}\text{CH}$ 7.2, $^{\epsilon}\text{CH}_3$ 2.687
iPr	9.06			CH 4.2, $(\text{CH}_3)_2$ 1.29

Tableau SII.8 : Déplacement chimique ^{15}N et ^{13}C NMR (ppm) pour **3d** dans le solvant CDCl_3 à la température 293 K.

Residue	HN	$^{\gamma}\text{C}$	$^{\delta}\text{C}$	Autres
$\text{C}(\text{CH}_3)_3$				C 20.13
Ala 1	132.91	44.22	20.12	$^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.29
Phe 2	133.28	51.26	39.12	$^{\zeta}\text{C}$ 128.38, $^{\eta}\text{C}$ 128.12, $^{\theta}\text{C}$ 126.53, $^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.29
Ala 3	134.72	45.19	19.42	$^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.29
Phe 4	133.36	52.37	39.62	$^{\zeta}\text{C}$ 128.9, $^{\eta}\text{C}$ 128.1, $^{\theta}\text{C}$ 126.53, $^{\epsilon}\text{C}(\text{CH}_3)$ 19.29
iPr	137.88			$^{\alpha}\text{C}$ 41.99, $^{\beta}\text{C}$ 22.64

Tableau SII.9: Couplage entre NH et $^{\gamma}\text{CH}$ (Hz)

Residue	2	3a	3b	3d
Ala 1		7.98	7.86	7.08
Phe 2	7.44	6.18	6.00	6.00
Ala 3		5.58	5.22	5.52
Phe 4		7.38	5.82	6.24
Ala 5			5.64	
Phe 6			7.44	
iPr				7.62

SIII : les déplacements chimiques des aza-peptides

Tableau SIII.1 : Déplacement chimique ^1H NMR (ppm) pour **3a** dans le solvant CDCl_3 à la température 308 K.

Residue	HN	$^\alpha\text{CH}$	$^\beta\text{CH}$	Autres
BOC				CH_3 1.38
Phe 1	4.8162	4.0164	2.9387, 3.05	CH_{AR} 7.17
Aza Phe 2	7.4802		4.933	CH_{AR} 7.261
Ala 3	6.1148	4.4773	1.3945	
OMe				CH_3 3.7171

Tableau SIII.2 : Déplacement chimique ^1H NMR (ppm) pour **3b** dans le solvant CDCl_3 à la température 308 K.

Residue	HN	$^\alpha\text{CH}$	$^\beta\text{CH}$	Autres
BOC				CH_3 1.3789
Phe 1	4.7617	4.1161	2.86, 3.1	CH_{AR} 7.17
Aza Phe 2	7.485		4.656	CH_{AR} 7.261
Ala 3	5.999	4.4516	1.39	
OMe				CH_3 3.7

Tableau SIII.3 : Déplacement chimique ^1H NMR (ppm) pour **6a** dans le solvant CDCl_3 à la température 253 K.

Residue	HN	$^\alpha\text{CH}$	$^\beta\text{CH}$	Autres
BOC				CH_3 1.31
Phe 1	4.71	3.65	2.66	CH_{AR} 7.11
Aza Phe 2	9.2		4.4, 4.09	CH_{AR} 7.13
Ala 3	6.83	3.77	1.32	
Phe 4	6.51	4.48	3.45, 2.94	CH_{AR} 7.05
Aza Phe 5	9.3		5.23, 4.18	CH_{AR} 7.16
Ala 6	6.28	4.44	1.44	
OMe				CH_3 3.69

Tableau SIII.4 : Déplacement chimique ^1H NMR (ppm) pour **6b** dans le solvant CDCl_3 à la température 253 K.

Residue	HN	$^\alpha\text{CH}$	$^\beta\text{CH}$	Autres
BOC				CH_3 1.33
Phe 1	4.49	4.1	2.6	CH_{AR} 6.97
Aza Phe 2	8.95		4.41, 4.26	CH_{AR} 7.2
Ala 3	6.75	3.82	1.3	
Phe 4	6.42	4.49	3.26, 2.87	CH_{AR} 6.97
Aza Phe 5	9.35		5.3, 4.26	CH_{AR} 7.18
Ala 6	6.35	4.49	1.39	
OMe				CH_3 3.26

Annexe 2 : Articles publiés sur les résultats de la thèse

Résumé de la thèse en français

Le sujet de cette thèse concerne les études structurales d'une nouvelle génération d'oligomères, les foldamères, construits à partir de mimes pseudopeptidiques capables d'adopter des structures secondaires déterminées. Trois familles d'oligomères ont été étudiées. Plusieurs méthodes spectroscopiques ont été à chaque fois employées couplées à la modélisation moléculaire, afin de caractériser les propriétés structurales des foldamères. La première famille a été synthétisée par le groupe de Muriel Amblard et Monique Calmès de l'IBMM à Montpellier. Nous avons évalué les propriétés à se structurer du motif (S)-ABOC. Plusieurs oligomères de tailles variables ont été synthétisés et nous avons montré le motif (S)ABOC lorsqu'il est introduit dans une séquence peptidique est capable de générer des coudes beta. L'enchaînement de ces coudes conduits à la formation d'hélices qui en fonction des motifs pseudo-peptidiques associés présentent des caractéristiques différentes. La seconde famille étudiée comprenait des oligomères formés à partir de monomères contraints de type thiazole. Nous avons montré que ce motif, développé par Ludovic Maillard à l'IBMM à Montpellier forme des pseudocycles en C9 qui s'organisent ensuite en une hélice qui est observable dès le tétramère. La troisième famille d'oligomères étudiée est issue du LCPM. Elle comprend des oligomères alternant des acides alpha-aminés et des acides aminés de type aza dans lesquels le carbone alpha a été remplacé par un atome d'azote. Nous avons montré que le motif aza induit un repliement en coude beta facilitant la cyclisation de la molécule. Dans ma thèse nous avons caractérisé les propriétés à s'auto-structurer de trois familles de foldamères pseudopeptidiques en combinant les résultats expérimentaux issus de la résonance magnétique nucléaire, la spectroscopie infrarouge, le dichroïsme circulaire et la diffraction des rayons X et en les intégrant à des calculs de modélisation moléculaire. Notre étude répertorie les propriétés de chaque motif à former des éléments de structure secondaire et à induire la formation de foldamères.

Résumé de la thèse en anglais

The subject of this thesis deals with the structural studies of a new generation of oligomers, so called foldamers, constructed from pseudopeptidic mimics and able to adopt determined secondary structures. Three families of oligomers were investigated. For each oligomer several spectroscopic methods have been used combined with molecular modeling in order to characterize their structural properties. The first family was studied in collaboration with the group of Muriel Amblard and Monique Calmès at IBMM in Montpellier. We have evaluated the structural properties of the motif (S)-ABOC. Several oligomers of varying sizes were synthesized and we have shown that the pattern (S)-ABOC, when introduced into a peptide sequence, is capable of generating beta turn. The sequence of these turn leads to the formation of helices, which, according to associated pseudo-peptide patterns shows different characteristics. The second project discussed the conformation of oligomers family formed from constrained thiazole monomers. We have shown that this pattern developed by Ludovic Maillard at IBMM in Montpellier adopted pseudocycles C9 which led to helices. This property was observed starting from the tetramer. The third family of oligomers comes from the LCPM, alternating oligomers of alpha amino acids and aza amino acids, in which the alpha carbon has been replaced by a nitrogen atom. We showed that the pattern aza induces folding of the beta turn, facilitating the cyclization of the molecule. In this thesis we have characterized the properties to self-structuring of three families of pseudopeptide foldamers by combining experimental results from nuclear magnetic resonance, infrared spectroscopy, circular dichroism and X-ray diffraction combined with molecular modeling calculations. Our study lists the properties of each pattern to form secondary structure elements and to induce the formation of foldamers.

Mots clé (en français):

RMN, modélisation moléculaire, pseudopeptide, foldamère, structure 3D,

Mots clé (en anglais):

NMR, molecular modeling, pseudopeptide, foldamer, 3D structure.

Titre de la thèse en français:

Analyse conformationnelle de nouveaux systèmes organisés biomimétiques

Titre de la thèse en anglais:

Structural analysis of new organized biomimetic systems