



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>

001NPL077N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques

Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire

INPL-CNRS-UMR 7568

THESE

présentée par

Laurent THEVENET

en vue d'obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Génie des Procédés

**PSEUDOPEPTIDES DERIVES D' α -AMINOXY ACIDES :
SYNTHESES ET STRUCTURES. APPLICATION A L'INHIBITION DE
L'ELASTASE LEUCOCYTAIRE HUMAINE**

Soutenue publiquement le 29 Septembre 2000 devant la commission d'examen

Membres du jury



D 136 024226 4

Pr E. DELLACHERIE
: Dr G. CHASSAING
Pr J. VIDAL
Pr B. JAMART-GREGOIRE
Dr M. MARRAUD
Dr R. VANDERESSE

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

136 024 226 4

001 NPLD 77 N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques

[4] 2000 THEVENET, L.

Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire

INPL-CNRS-UMR 7568

THESE

présentée par

Laurent THEVENET

en vue d'obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Génie des Procédés

**PSEUDOPEPTIDES DERIVES D' α -AMINOXY ACIDES :
SYNTHESES ET STRUCTURES. APPLICATION A L'INHIBITION DE
L'ELASTASE LEUCOCYTAIRE HUMAINE**

Soutenue publiquement le 29 Septembre 2000 devant la commission d'examen

Membres du jury

Présidente : Pr E. DELLACHERIE
Rapporteurs : Dr G. CHASSAING
Pr J. VIDAL
Examineurs : Pr B. JAMART-GREGOIRE
Dr M. MARRAUD
Dr R. VANDERESSE

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

AVANT-PROPOS

Ce présent travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire, CNRS-INPL-UMR 7568, de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy, au sein du groupe Biostructures, dirigé par Monsieur le Docteur M. T. CUNG.

Que Monsieur le Docteur M. MARRAUD, directeur de recherche au CNRS, trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour avoir su développer mon intérêt pour la recherche et pour ses nombreux conseils scientifiques.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Docteur R. VANDERESSE, chargé de recherche CNRS, qui a dirigé ma thèse, pour son omniprésente disponibilité ainsi que pour sa constante gentillesse.

J'aimerais exprimer ma gratitude envers Monsieur le Docteur G. CHASSAING, directeur de recherche CNRS, et Madame le Professeur J. VIDAL pour avoir accepté de rapporter et de juger ce travail.

Je remercie vivement Madame le Professeur E. DELLACHERIE, directrice du laboratoire, de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Ma profonde reconnaissance va également à Madame le Professeur B. JAMART-GREGOIRE pour la confiance qu'elle m'a témoignée tout au long des trois années de monitorat à l'Ecole Européenne d'Ingénieurs en Génie des Matériaux de Nancy, pour avoir ainsi contribué à renforcer mon goût pour l'enseignement et pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'associe à ses remerciements Madame le Professeur M. REBOUD-RAVAUX, Madame V. BOURGUIGNON, Madame le Docteur A. MEREAU pour la réalisation des tests biologiques, Monsieur le Docteur C. DIDIERJEAN pour la radiocristallographie et l'équipe de Monsieur le Docteur G. GUICHARD pour la réalisation des spectres de masse.

Je ne saurais oublier de remercier Monsieur A. VICHERAT pour m'avoir formé à l'utilisation du spectromètre RMN et Monsieur J.-M. GROSSE pour ses compétences informatiques qui m'ont été fort utiles pour la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

	<u>Page</u>
<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	1
<u>INTRODUCTION</u>	4
<u>CHAPITRE I - PSEUDOPEPTIDES DERIVES D'AMINOXY ACIDES</u>	6
<u>I-1 INTRODUCTION</u>	6
<u>I-1-1 : Les pseudopeptides</u>	6
a) Peptides et analogues peptidiques :	6
b) La modification pseudopeptidique :	7
c) Analogues peptidomimétiques et <i>building-blocks</i> :	9
<u>I-1-2 : Les hydrazide peptides</u>	10
a) Préparation des hydrazino acides :	10
b) Synthèse des hydrazide peptides :	12
c) Les hydrazide peptides d'intérêt biologique :	13
<u>I-1-3 : Amidoxy peptides, oxime peptides et amidoxy peptides réduits</u>	14
a) Les amidoxy peptides : les analogues d'intérêt biologique synthétisés	14
b) Oxime peptides et ligation chimique :	14
c) Amidoxy peptides réduits :	15

I-2 : SYNTHÈSE.....	16
<u>I-2-1 : Synthèse des aminoxy acides</u>	16
<u>I-2-2 : Synthèse des amidoxy peptides</u>	18
a) Généralités sur la synthèse peptidique en phase liquide :	18
b) Synthèses d'amidoxy peptides : étude bibliographique et résultats	21
<u>I-2-3 : Synthèse des oxime peptides</u>	23
a) Préparation des α -amino aldéhydes <i>N</i> -protégés :	24
b) Synthèse des oxime peptides : les résultats	29
c) Synthèse de cétoximes :	30
<u>I-2-4 : Synthèse des amidoxy peptides réduits</u>	31
I-3 : ETUDE STRUCTURALE.....	34
<u>I-3-1 : Généralités</u>	34
a) Notation et description du squelette peptidique :	34
b) Liaisons hydrogène et éléments de structure secondaire :	35
c) Méthodes et techniques d'étude :	39
<u>I-3-2 : Structure des amidoxy peptides</u>	41
a) Etude des composés $R-CO\psi[CO-NH-O]Xaa-NHR'$ (avec $Xaa = Gly$ ou Ala ; $R = 'Bu$ ou $O'Bu$; $R' = Me$ ou $'Pr$) :	41
b) Etude des composés $R-CO-Pro-N(R'')-OMe$ (avec $R = 'Bu$ ou $O'Bu$; $R'' = H$ ou Me) :	45
c) Etude des dipeptides $R-CO-Pro\psi[CO-NH-O]Xaa-NHR'$ (avec $Xaa = Gly$ ou Ala ; $R = 'Bu$ ou $O'Bu$; $R' = Me$ ou $'Pr$) :	48
<u>I-3-3 : Discussion</u>	51
a) Comparaison avec les résultats de la littérature :	51

b) Comparaison entre amidoxy et hydrazide peptide :	53
c) Isomérisation Z/E de la liaison hydrazide :	56
<u>I-3-4: Structure des oxime peptides</u>	58
a) Mise en évidence d'une isomérisation Z/E de la liaison oxime :	59
b) Etude par spectroscopie IR :	61
c) Etude par spectroscopie RMN :	62
d) L'équilibre entre les formes Z et E de la liaison oxime :	63
<u>I-3-5: Structure des amidoxy peptides réduits</u>	64
a) Etude par spectroscopie IR :	65
b) Etude par spectroscopie RMN :	66
c) Etude du composé Piv-Proψ[CH ₂ -NH-O]Gly-NH ⁱ Pr par radiocristallographie :	66
<u>I-3-6: Conclusion</u>	68

CHAPITRE II - ETUDE D'INHIBITEURS DE L'ELASTASE LEUCOCYTAIRE HUMAINE.....70

II-1 : INTRODUCTION.....70

<u>II-1-1 : L'élastase leucocytaire humaine</u>	70
a) Les enzymes : les protéases à sérine	70
b) L'élastase leucocytaire humaine :	71
<u>II-1-2 : Les inhibiteurs hydrazide peptides de l'ELH</u>	73
a) Choix de la séquence :	73
b) Les résultats :	74
<u>II-1-3 : Présentation de notre étude</u>	74

II-2 : SYNTHÈSE..... 75

II-2-1 : Synthèse des amidoxy peptides en phase liquide homogène 75

a) Synthèse de Z-Ala-Ala-Pro-Val ψ [CO-NH-O]Ala-Ala-NHⁱPr : 75

b) Synthèse de Z-Ala-Ala-Pro ψ [CO-NH-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr : 78

II-2-2 : Synthèse des amidoxy peptides sur support solide 79

a) Généralité sur la synthèse sur support solide : 79

b) Synthèse de Z-Ala-Ala-Pro ψ [CO-NH-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr : 82

II-2-3 : Synthèse des oxime peptides et des amidoxy peptides réduits 84

a) Synthèse de Z-Ala-Ala-Pro ψ [CH=N-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr : 84

b) Synthèse de Z-Ala-Ala-Pro-Val ψ [CH=N-O]Ala-Ala-NHⁱPr : 86

c) Synthèse des amidoxy peptides réduits : 87

II-2-4 : Conclusion 87

II-3 : ETUDE DES PSEUDOHEXAPEPTIDES SYNTHETISES..... 88

II-3-1 : Tests biologiques 88

II-3-2 : Etude structurale 90

a) Caractérisation et expériences de RMN à deux dimensions : 90

b) Mise en évidence de différentes isoméries : 91

c) Méthodes employées pour l'étude structurale : 92

d) Structure du composé

Z-Ala-Ala-Pro-Val ψ [CO-NH-O]Ala-Ala-NHⁱPr : 94

e) Structure du composé

Z-Ala-Ala-Pro ψ [CO-NH-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr : 95

f) Structure du composé

Z-Ala-Ala-Pro-Val ψ [CH=N-O]Ala-Ala-NHⁱPr : 96

g) Structure du composé

Z-Ala-Ala-Pro ψ [CH=N-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr : 97

h) Structure du composé	
Z-Ala-Ala-Pro-Val ψ [CH ₂ -NH-O]Ala-Ala-NH ⁱ Pr :	98
i) Structure du composé	
Z-Ala-Ala-Pro ψ [CH ₂ -NH-O]Val-Ala-Ala-NH ⁱ Pr :	99
 <u>II-3-3 : Discussion</u>	 101
a) Synthèse des résultats de l'étude structurale :	101
b) Relation structure-activité :	101
c) Comparaison avec les hydrazides peptides :	102
 <u>II-3-4 : Conclusion</u>	 102

CHAPITRE III - ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES PROTEINES REV ET TAP(P32) DU VIH..... 104

III-1 : INTRODUCTION..... 104

<u>III-1-1 : Généralités sur le VIH</u>	104
a) Naissance d'une nouvelle épidémie à la fin du XX ^e siècle :	104
b) Le cycle de vie du VIH-1 :	107
 <u>III-1-2 : Interaction Rev-TAP(p32)</u>	 109
a) La protéine Rev :	109
b) La protéine p32 :	111
 <u>III-1-3 : Objectifs des travaux</u>	 113

III-2 : SYNTHESE.....114

<u>III-2-1 : Synthèse peptidique sur phase solide</u>	114
a) La stratégie Boc :	114

b) La stratégie Fmoc :	116
<u>III-2-2 : Les difficultés posées par la séquence</u>	117
a) Problèmes rencontrés lors de l'élongation de la chaîne peptidique :	117
b) Problèmes rencontrés au cours du clivage :	119
<u>III-2-3 : Les peptides synthétisés</u>	121
a) Synthèse du fragment 191-215 de TAP(p32)	121
b) Autres peptides synthétisés :	122
III-3 : ETUDE DES PEPTIDES SYNTHETISES.....	123
<u>III-3-1 : Tests biologiques</u>	123
a) Résultats obtenus avec un premier fragment 191-215 synthétisé :	124
b) Tests des autres peptides synthétisés :	126
c) Test par Biacore® X :	128
<u>III-3-2 : Présentation de l'étude structurale par RMN</u>	129
a) Les informations apportées par la RMN-2D :	129
b) Etude du fragment 191-215 de TAP(p32) dans le DMSO :	130
c) Etude du fragment 191-215 dans l'eau : expérience de NOESY transférée	132
<u>III-3-3 : Résultats et discussion</u>	134
a) Etude structurale dans le DMSO :	134
b) Etude structurale dans l'eau :	135
c) Conclusion :	135
<u>CONCLUSION GENERALE.....</u>	136

<u>ANNEXE A : PARTIE EXPERIMENTALE</u>	138
---	-----

<u>ANNEXE B : DONNEES CRISTALLOGRAPHIQUES</u>	183
--	-----

<u>ANNEXE C : EFFETS DE SOLVANT</u>	197
--	-----

<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	200
---	-----

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : acétyle
AcOEt : acétate d'éthyle
AcOH : acide acétique
ADN : acide désoxyribonucléique
Ala (ou A) : résidu alanine
Arg (ou R) : résidu arginine
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
Asn (ou N) : résidu asparagine
Asp (ou D) : résidu acide aspartique
Boc : *tert*-butyloxycarbonyle
BOP : hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium
Bzl : benzyle
ccm : chromatographie sur couche mince
CDCl₃ : chloroforme deutérié
CHCl₃ : chloroforme
d : doublet
DBU : 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-ène
DCCI : dicyclohexylcarbodiimide
DCM : dichlorométhane
dd : doublet dédoublé
DIEA : diisopropyléthylamine
DME : diméthoxyéthane
DMSO : diméthylsulfoxyde
DMSO-*d*₆ : diméthylsulfoxyde hexadeutérié
EDC : 1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ELH : élastase leucocytaire humaine
EP : éther de pétrole
éq : équivalent
EtOH : éthanol
Et₂O : diéthyléther

Fmoc : 9-fluorénylméthylèneoxycarbonyle
Gln (ou Q) : résidu glutamine
Glu (ou E) : résidu acide glutamique
Gly (ou G) : résidu glycine
HATU : hexafluorophosphate de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
HMPT : hexaméthylphosphorotriamide
HOAt : 1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt : *N*-hydroxybenzotriazole
HPLC : chromatographie liquide haute performance
^tBu : isobutyle
ICF : chloroformiate d'isobutyle
Ile (ou I) : résidu isoleucine
ⁱPr : isopropyle
ⁱPrOH : isopropanol
IR : infrarouge
kb : kilo base
kDa : kilo Dalton
Leu (ou L) : résidu leucine
Lys (ou K) : résidu lysine
M : molaire (concentration 1 mol/L)
m : multiplet
Me : méthyle
MeOH : méthanol
Met (ou M) : résidu méthionine
NMM : *N*-méthylmorpholine
OcHex : cyclohexyloxy
Ph : phényle
Phe (ou F) : résidu phénylalanine
Piv : pivaloyle
PivCl : chlorure de pivaloyle
ppb : partie par billion
ppm : partie par million
Pr : propyle
Pro (ou P) : résidu proline
q : quadruplet

Rf : rapport frontal

RMN : résonance magnétique nucléaire

s : singulet

Ser (ou S) : résidu sérine

SIDA : syndrome immunodéficitaire acquis

SN₂ : substitution nucléophile bimoléculaire

SPPS : synthèse peptidique sur phase solide

Su : résidu succinimide

Suc : succinyle

t : triplet

TBTU : tétrafluoroborate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium

^tBu : *tert*-butyle

TFA : acide trifluoroacétique

TFMSA : acide trifluorométhanesulfonique

THF : tétrahydrofurane

Thr (ou T) : résidu thréonine

TMSOTf : trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle

Tos : tosyle

Trp (ou W) : résidu tryptophane

Tyr (ou Y) : résidu tyrosine

UV : ultraviolet

Val (ou V) : résidu valine

VIH : virus de l'immunodéficiência humaine

Z : benzyloxycarbonyl

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les peptides constituent une classe de molécules qui jouent un rôle primordial dans un grand nombre de processus vitaux. Ils seraient donc susceptibles de donner naissance à des médicaments sélectifs et bien tolérés par l'organisme. Des études pharmacocinétiques ont cependant montré que les peptides franchissent difficilement les barrières physiologiques, sont rapidement dégradés par les enzymes et ne présentent pas toujours la sélectivité attendue.

Des modifications chimiques du squelette peptidique permettent, tout en conservant la nature des chaînes latérales nécessaires à une bonne reconnaissance, de favoriser certaines conformations. Les pseudopeptides ainsi obtenus présentent souvent une structure rigidifiée qui induit parfois une meilleure affinité pour la molécule cible que le peptide parent. L'introduction d'un lien pseudopeptidique peut également limiter la biodégradation par les protéases et améliorer les propriétés pharmacocinétiques.

Une famille de pseudopeptides a été obtenue par insertion d'un groupement NH dans la chaîne principale : une liaison amide ($-C^{\alpha}-CO-NH-C^{\alpha}-$) est alors remplacée par un motif hydrazide ($-C^{\alpha}-CO-NH-NH-C^{\alpha}-$). Les hydrazide peptides sont étudiés au laboratoire depuis quelques années. Ils présentent des propriétés structurales intéressantes mais leur synthèse pose un certain nombre de difficultés. Nous avons alors opté pour une famille de pseudopeptides comportant un motif hydroxamide ($-C^{\alpha}-CO-NH-O-C^{\alpha}-$) : les amidoxy peptides. En substituant le groupement NH additionnel par un atome d'oxygène, nous espérons rendre les synthèses plus faciles tout en conservant la structure des hydrazide peptides.

Les amidoxy peptides sont préparés à partir d'un aminoxy acide ($H_2N-O-C^*HR-COOH$). Ce pseudoamino acide peut aussi donner naissance à deux autres familles de pseudopeptides : les oxime peptides et les amidoxy peptides réduits. La fonction aminoxy peut en effet réagir sur un α -amino aldéhyde pour former un lien oxime ($-C^{\alpha}-CH=N-O-C^{\alpha}-$). Par réduction de ce dernier, nous avons obtenu un motif hydroxylamine ($-C^{\alpha}-CH_2-NH-O-C^{\alpha}-$) dans le squelette peptidique.

La mise au point des synthèses des trois familles de pseudopeptides a été réalisée sur des dipeptides. Une étude par spectroscopie infrarouge et RMN de ces derniers a permis d'examiner les modifications structurales induites par l'introduction de ces différents motifs pseudopeptidiques.

Nous avons par ailleurs souhaité insérer les modifications pseudopeptidiques obtenues à partir d'un résidu α -aminoxy acide dans des peptides bioactifs. Nous recherchions également à évaluer les modifications structurales induites par ces différents liens pseudopeptidiques dans des peptides plus grands que des dipeptides modèles. L'élastase leucocytaire humaine (ELH) est une enzyme dont l'activité non régulée est responsable de maladies chroniques dégénératives comme l'emphysème pulmonaire. Au cours d'une étude récente, des analogues hydrazide d'un hexapeptide substrat de l'ELH ont été préparés. Des tests biologiques ont montré que certains d'entre eux étaient des inhibiteurs de l'ELH. Disposant alors de données comparatives, nous avons synthétisé les analogues amidoxy ainsi que les analogues oxime et amidoxy réduits. Les composés obtenus ont été biologiquement testés et ont fait l'objet d'une étude structurale. L'objectif ultime de cette étude n'est pas la conception de nouveaux inhibiteurs de l'ELH. Il en existe déjà un grand nombre et certains se sont avérés très efficaces. Le but réside, en fait, dans une meilleure connaissance du mécanisme catalytique : la position des inhibiteurs dans le site actif de l'enzyme est mal connue. L'approche pseudopeptidique avait paru particulièrement adaptée car elle permet des modifications fines de la structure des inhibiteurs.

Notre travail a également porté sur la protéine TAP(p32) du virus VIH-1 du SIDA. Dans le cycle de vie du virus, TAP(p32) en interagissant avec la protéine Rev, jouerait un rôle central dans le contrôle du processus d'épissage (élimination de séquences introniques), donc dans la production de nouveaux virions et dans la progression de la maladie. Nous avons synthétisé sur support solide des fragments de TAP(p32) susceptibles de se fixer sur Rev pour empêcher cette dernière d'inhiber l'épissage. L'objectif de ce travail était dans un premier temps de mieux comprendre les mécanismes biologiques de reconnaissance entre les protéines Rev et TAP(p32), puis de synthétiser des pseudopeptides, agents thérapeutiques potentiels. Ce dernier objectif n'a pas pu être atteint, le système biologique s'étant avéré trop complexe.

**CHAPITRE I - PSEUDOPEPTIDES
DERIVES D'AMINOXY ACIDES**

CHAPITRE I – PSEUDOPEPTIDES DERIVES D'AMINOXY

ACIDES

I-1 : INTRODUCTION

I-1-1 : Les pseudopeptides

a) Peptides et analogues peptidiques :

Les peptides, enchaînements d'acides aminés liés entre eux par une liaison amide, sont impliqués dans de très nombreux processus biologiques. Ces hormones, neurotransmetteurs, neuromodulateurs, inhibiteurs d'enzymes... régulent diverses fonctions physiologiques et présentent donc un intérêt thérapeutique potentiel. Actuellement, un nombre restreint de médicaments d'origine peptidique sont disponibles sur le marché. On peut, par exemple, citer l'insuline (traitement du diabète), la calcitonine (contre l'ostéoporose), la vasopressine (contre l'hypertension artérielle), la somatostatine (traitement des ulcères) ou encore la TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone) (traitement de l'hypothyroïdie). Les propriétés pharmacocinétiques des peptides limitent cependant leur utilisation comme agents thérapeutiques. Les peptides sont souvent dégradés rapidement par les peptidases dans le système digestif ou dans les fluides biologiques et, par ailleurs, franchissent difficilement les barrières physiologiques (1). Dans certains cas, leur flexibilité excessive peut les rendre non sélectifs car affins pour plusieurs sites actifs (2).

Pour remédier à ces problèmes, la première approche proposée a été la synthèse d'analogues peptidiques. Ces composés peuvent être obtenus de différentes manières. La première consiste à tronquer les extrémités *N*- et *C*-terminales du peptide naturel afin d'éliminer des sites de clivage potentiels et ainsi conserver les seuls résidus indispensables à l'interaction avec le récepteur. La fonction amine terminale peut également être acylée et le groupement carboxylique transformé en groupement carboxamide pour accroître la résistance aux amino et carboxypeptidases. Des résidus du peptide parent peuvent, enfin, être éliminés, remplacés par d'autres acides aminés naturels, des acides aminés de configuration *D* ou encore des acides aminés non naturels. Les analogues peptidiques permettent de mieux comprendre l'activité biologique de certains peptides, par exemple en remplaçant successivement tous les

résidus à chaîne latérale fonctionnalisée par une alanine (Ala-scanning). Certains analogues présentent, par ailleurs, une sélectivité accrue vis à vis du récepteur biologique et une meilleure résistance aux peptidases que le peptide parent (3, 4).

b) La modification pseudopeptidique :

Les modifications chimiques qui aboutissent aux analogues peptidiques ne concernent, en principe, que les chaînes latérales des acides aminés et n'affectent que la structure primaire des peptides. Il est par contre possible de modifier chimiquement le squelette peptidique et plus particulièrement la liaison amide (CO-NH) tout en conservant la nature des chaînes latérales. Les composés ainsi obtenus sont généralement appelés analogues pseudopeptidiques. La liaison peptidique est modifiée dans le but d'accroître la résistance à l'hydrolyse par les protéases et de moduler le caractère hydrophile/hydrophobe afin de faciliter le franchissement des parois membranaires. Le remplacement d'une liaison amide affecte la structure secondaire des peptides : il induit une conformation locale différente en favorisant la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires et en modulant la rigidité et la longueur de la chaîne principale. La flexibilité du squelette peptidique se trouve ainsi souvent réduite, ce qui peut permettre une sélectivité accrue et parfois une activité biologique renforcée.

Un très grand nombre de modifications pseudopeptidiques ont été étudiées. Pour les décrire nous utiliserons la notation mise au point par Spatola (5). Nous désignerons la modification chimique A entre les acides aminés Xaa et Xbb par Xaaψ[A]Xbb. Les motifs pseudopeptidiques les plus souvent rencontrés sont rassemblés dans le *tableau I-1* accompagnés de quelques références bibliographiques.

Certains de ces motifs ont été conçus pour mimer l'intermédiaire réactionnel tétraédrique formé lors de l'hydrolyse d'une liaison amide par une enzyme (*Figure I-1*). L'analogue ainsi obtenu est susceptible de se fixer sur le site catalytique de l'enzyme et de bloquer l'activité de cette dernière. Cette approche a été mise en œuvre pour la conception de familles d'inhibiteurs enzymatiques.

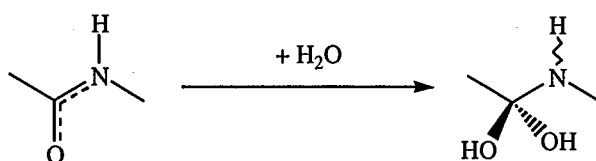


Figure I-1 : Représentation de l'intermédiaire réactionnel lors de l'hydrolyse d'une liaison amide par une enzyme

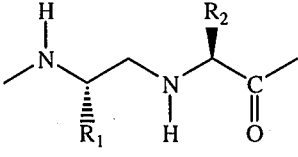
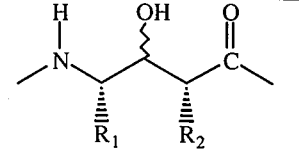
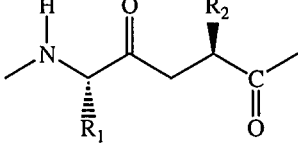
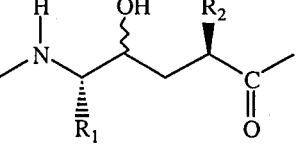
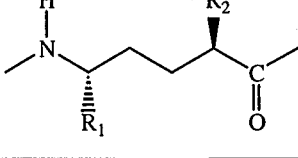
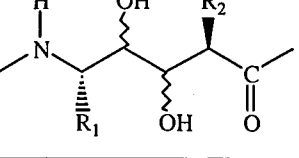
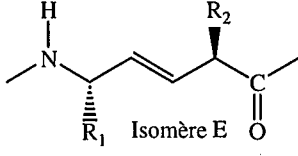
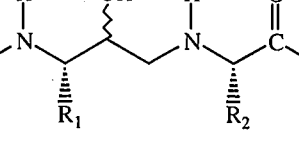
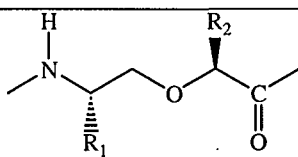
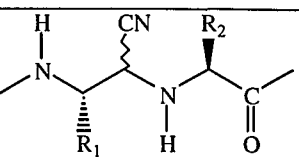
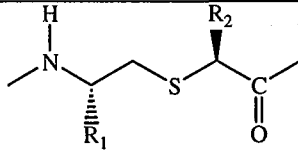
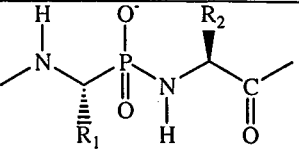
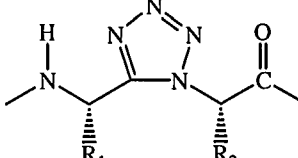
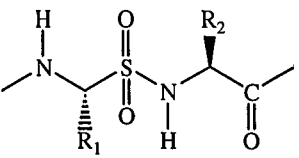
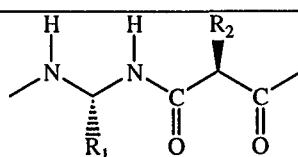
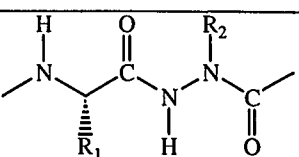
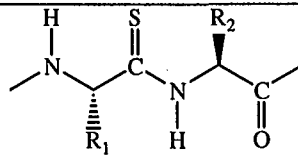
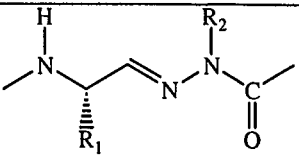
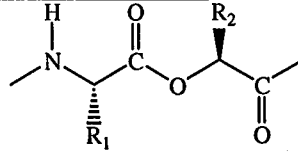
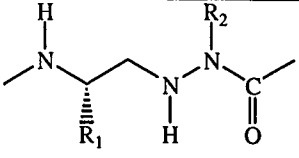
méthylène amino (peptide réduit) $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ (6-9, 21, 45)		hydroxyméthylène $\psi[\text{CH}(\text{OH})]$ (32)	
cétométhylène $\psi[\text{COCH}_2]$ (10-12)		hydroxyéthylène $\psi[\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2]$ (10, 33, 34)	
éthylène (carba) $\psi[\text{CH}_2\text{CH}_2]$ (13-15)		dihydroxyéthylène $\psi[\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})]$ (35, 36)	
oléfine Z ou E (vinylogue) $\psi[\text{CH}=\text{CH}]$ (15-18)		hydroxyéthylène amino $\psi[\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}]$ (37-39)	
méthylène oxy $\psi[\text{CH}_2\text{O}]$ (19-21, 46)		cyanométhylène amino $\psi[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]$ (11)	
méthylène thio $\psi[\text{CH}_2\text{S}]$ (22)		phosphonamide $\psi[\text{PO}_2\text{NH}]$ (40)	
tétrazole $\psi[\text{CN}_4]$ (23, 24)		sulfonamide $\psi[\text{SO}_2\text{NH}]$ (41)	
rétro-inverso $\psi[\text{NHCO}]$ (25, 26)		Aza (Az) (42, 43)	
thioamide $\psi[\text{CSNH}]$ (27-30)		Imino aza $\psi[\text{CH}=\text{N}]\text{Az}$ (44, 45)	
ester (depsipeptide) $\psi[\text{CO}_2]$ (31)		Imino aza réduit $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]\text{Az}$ (45)	

Tableau I-1 : Tableau récapitulatif des motifs pseudopeptidiques les plus utilisés

Les hydrazide peptides ($\psi[\text{CO-NH-NH}]$) (Figure I-2) feront l'objet d'une étude particulière dans la partie suivante car ils constituent une référence pour notre étude. En effet, le travail que nous rapportons dans le présent mémoire a pour objet trois familles de pseudo-peptides obtenus à partir d'un résidu aminoxy acide : les amidoxy peptides ($\psi[\text{CO-NH-O}]$), les oxime peptides ($\psi[\text{CH=N-O}]$) et les amidoxy peptides réduits ($\psi[\text{CH}_2\text{-NH-O}]$) (Figure I-2). Nous comparerons les amidoxy et les hydrazide peptides puisque seule la nature de l'hétéroatome supplémentaire varie.

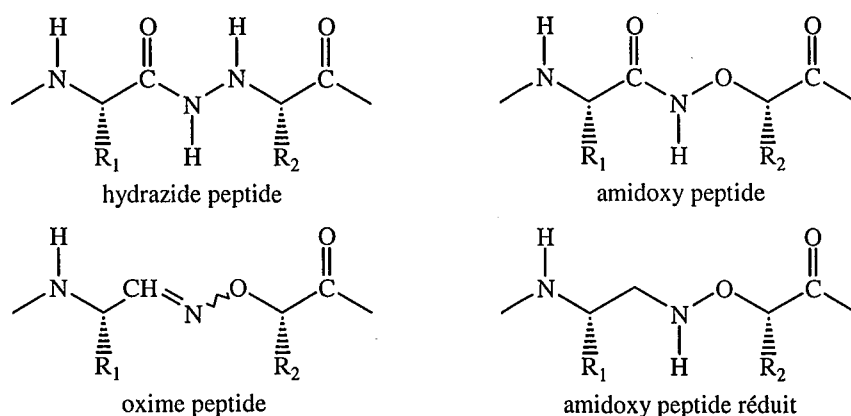


Figure I-2 : Les hydrazide peptides et les trois familles de pseudo-peptides obtenues à partir d'un résidu aminoxy acide

c) Analogues peptidomimétiques et *building-blocks* :

L'approche pseudo-peptidique n'est pas la seule à permettre la stabilisation de structures secondaires des peptides. Des cyclisations ont été envisagées par l'intermédiaire de liaison lactame ou de pont disulfure. Certaines ont abouti à des analogues biologiquement actifs (46, 47). Des modifications chimiques peuvent, par ailleurs, être simultanément effectuées sur le squelette peptidique et sur les chaînes latérales. On peut alors parler d'analogues peptidomimétiques. Plus récemment enfin, des synthons ou *building-blocks* (Figure I-3), mimes de certaines structures secondaires [repliement type β , type γ , feuillets β ou encore hélice α (voir I-3-1-b)] ont été introduits dans la chaîne peptidique pour tenter de bloquer le peptide dans une conformation donnée bio active.

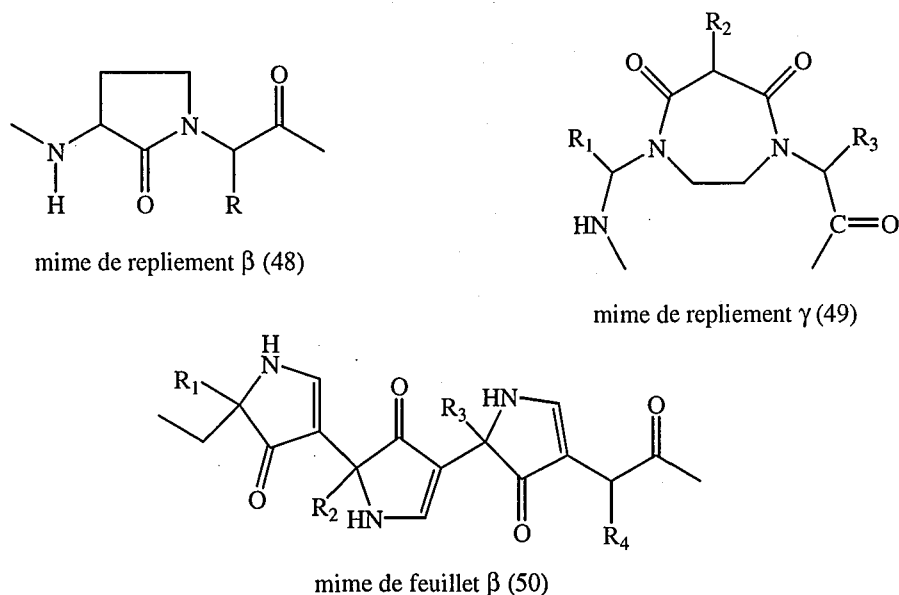


Figure I-3 : "Building-blocks", mimes de structure secondaire

I-1-2 : Les hydrazide peptides

Ils sont obtenus par couplage d'un α -hydrazino acide ($\text{H}_2\text{N}^\beta\text{-N}^\alpha\text{H-C}^*\text{HR-COOH}$) avec la fonction acide carboxylique d'un acide α -aminé. Un atome d'azote supplémentaire est inséré dans le squelette peptidique et la liaison amide est donc remplacée par un lien hydrazide.

a) Préparation des hydrazino acides :

Il est difficile de préparer des α -hydrazino acides optiquement purs. La substitution nucléophile bimoléculaire ($\text{S}_\text{N}2$) sur un α -halogéno acide par l'hydrazine reste limitée par le risque d'épimérisation (51-53). Il faut cependant noter que, récemment, des excès énantiomériques intéressants ont été obtenus en utilisant BocNHNH_2 [$\text{Boc} = (\text{CH}_3)_3\text{C-O-CO-}$] comme nucléophile sur des α -triflylesters (54). La *N*-*tert*-butyloxycarbonylaminophthalimide permet de convertir des α -hydroxy acides en α -hydrazino acides par la réaction de Mitsunobu (55). On trouve également dans la littérature quelques exemples de synthèses asymétriques : des hydrogénations de *N*-acylhydrazone catalysées par un complexe chiral du rhodium (56) ou des aminations électrophiles d'énolates chiraux par un dialkylazodicarboxylate (57-62). La conversion d'une urée en hydrazine est connue sous le nom de réarrangement de Shestakow (63). Cette transposition a été appliquée aux acides α -aminés, préalablement transformés en acides hydantoïques, pour l'obtention d' α -hydrazino acides optiquement purs (*Schéma I-1*) (64, 65). Le rendement de la réaction a pu être augmenté en remplaçant l'hypochlorite de sodium (NaOCl) par l'hypochlorite de potassium (KOCl) (66).

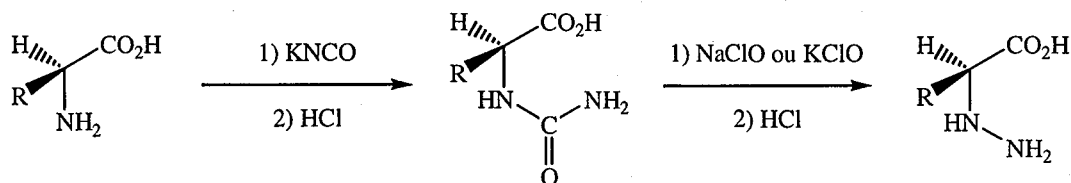


Schéma I-1 : Préparation d'α-hydrazino acides par réarrangement de Shestakow

La méthode la plus souvent employée reste cependant la *N*-amination des acides α-aminés faisant intervenir des oxaziridines (67-70). Des réactifs comme la *N*-Boc-3-(4-cyanophényl)oxaziridine (Collet A. *et coll.* Brevet WO 97/09303) ou la *N*-Boc-3-trichlorométhylloxaziridine (69) permettent d'obtenir directement des hydrazino acides Boc *N*^β-protégés optiquement purs (Schéma I-2). Notons qu'il est préférable, pour accroître le rendement de la *N*-amination, de *N*-benzyler préalablement les fonctions amine primaire. En effet, la réaction secondaire entre l'arylaldehyde, libéré par l'oxaziridine, et le groupement amine primaire, conduisant à une base de Schiff, ne peut alors se produire. Il est, par ailleurs, plus intéressant, pour le couplage ultérieur, de préparer un hydrazino acide comportant aussi un groupement protecteur sur l'azote α, les deux azotes pouvant être déprotégés sélectivement (68).

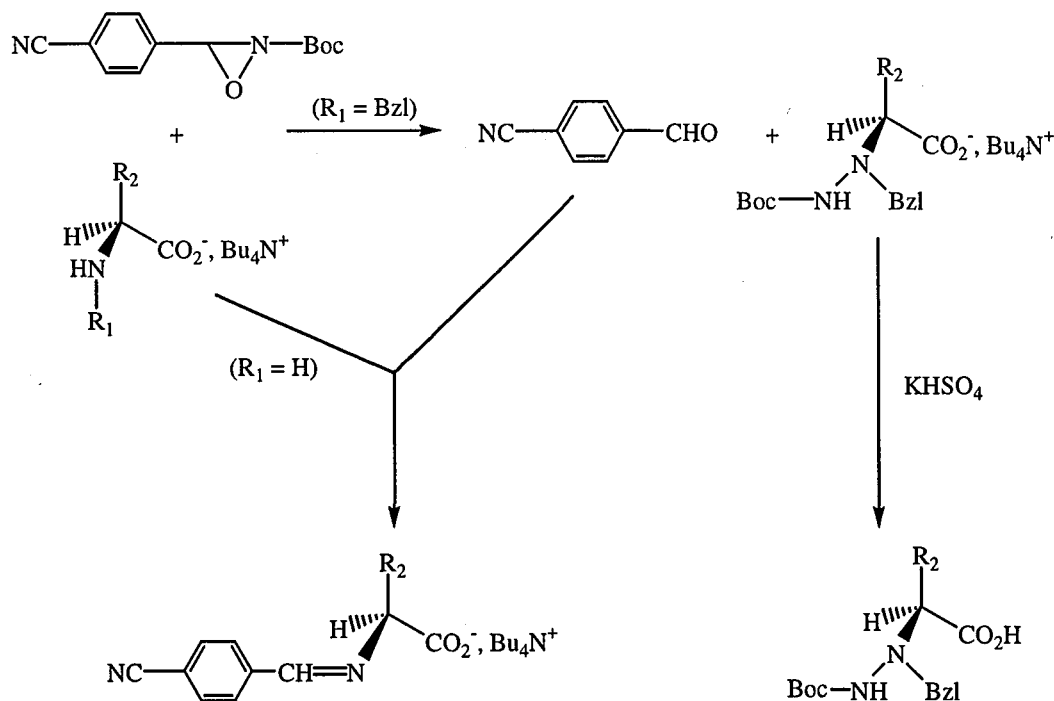


Schéma I-2 : N-amination électrophile des acides α-aminés par la *N*-Boc-3-(4-cyanophényl)oxaziridine

Il faut également remarquer que la *N*-protection sélective d'un hydrazino acide est très complexe et conduit souvent à un mélange de dérivés *N*^α-protégés, *N*^β-protégés et *N*^α,*N*^β-diprotégés accompagnés parfois de produits réarrangés (71-73). Elle dépend fortement des conditions expérimentales et de la nature de l'agent acylant. Par exemple, l'acylation de la *N*-aminoglycine donne 80 % de composé *N*^α-protégé en utilisant le réactif Z₂O (Z = PhCH₂-O-CO-) et 85 % de produit *N*^β-protégé avec Z-OSu (voir I-2-2-a) (71, 72). Elle est moins sélective dans le cas d'un groupement Boc, excepté avec Boc₂O où 80 % de dérivés α-acylés sont obtenus (71, 72).

b) Synthèse des hydrazide peptides :

La formation des hydrazide peptides pose aussi un certain nombre de difficultés de régiosélectivité des deux atomes d'azote. Lors du couplage de la partie C-terminale d'un hydrazino acide *N*^β-protégé avec la fonction amine libre d'un peptide en croissance, des produits secondaires peuvent se former (73). Par exemple, la méthode aux anhydrides mixtes (voir I-2-2-a) n'est pas applicable aux hydrazino acides non *N*^α-protégés. On note en effet un transfert du groupement alkyloxycarbonyle de l'anhydride mixte vers l'azote α, qui se trouve alors bloqué quasi irréversiblement. D'autres méthodes de couplage comme la méthode aux esters activés (voir I-2-2-a) conduisent à des dicétopipérazines ou à des oligomères (Schéma I-3).

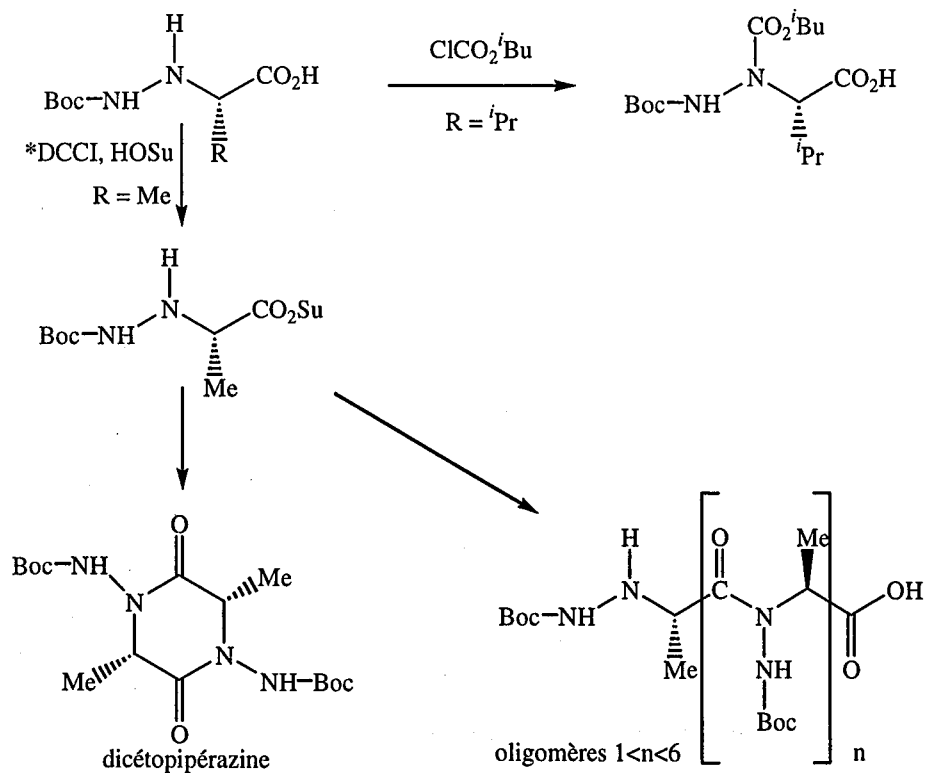


Schéma I-3 : Réactions parasites lors du couplage d'hydrazino acides non *N*^α-protégés
(* voir I-2-2-a)

Un acide α -aminé *N*-protégé acyle quasi exclusivement l'azote β d'un hydrazide peptide quelle que soit la méthode de couplage (74). On ne peut toutefois pas exclure des risques d' α -acylation du résidu *N*-aminoglycine.

c) Les hydrazide peptides d'intérêt biologique :

Deux hydrazide peptides naturels présentant des propriétés antibactériennes ont été isolés à ce jour : la linatine (75) et la négamycine (76) respectivement issues de la graine de lin et de *Streptomyces purpeofuscus*. Quelques hydrazide peptides ont été synthétisés : des analogues de la partie *C*-terminale de l'élédoisine (77), des analogues de l'ocytocine (78) ou de l'acide norophthalmique (79) et plus récemment des inhibiteurs de l'élastase leucocytaire humaine (ELH) (74). Le nombre limité d'analogues hydrazide peptidiques préparés s'explique par les difficultés à obtenir des α -hydrazino acides optiquement purs et par les problèmes liés à la régiosélectivité lors du couplage des deux atomes d'azote. L'insertion d'un azote supplémentaire dans le squelette peptidique induit cependant une structuration locale intéressante. L'azote α et le groupement carbonyle du lien hydrazide sont engagés dans une liaison hydrogène bifide avec le NH de la liaison amide suivante, repliant ainsi la molécule (Figure I-4).

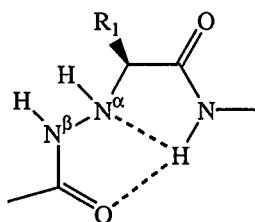


Figure I-4 : Structure induite par un lien hydrazide

Nous avons envisagé le remplacement du N^H par un atome d'oxygène, espérant conserver la structuration tout en limitant les difficultés liées à la synthèse. Nous avons alors étudié une nouvelle famille de pseudopeptides, les amidoxy peptides.

I-1-3 : Amidoxy peptides, oxime peptides et amidoxy peptides réduits

a) Les amidoxy peptides : les analogues d'intérêt biologique synthétisés

Les amidoxy peptides sont obtenus en faisant réagir la fonction acide carboxylique d'un acide α -aminé sur un α -aminoxyle ($H_2N-O-C^*HR-COOH$). La liaison amide est donc remplacée par un groupement hydroxamide.

Dans la littérature, on trouve quelques exemples d'amidoxy peptides. La malioxamycine est un antibiotique d'origine naturelle. Une étude a permis de déterminer sa structure : il s'agit de l'amidoxy dipeptide $H-(L)-Val\psi[CO-NH-O]-(D)-Asp-OH$ (80). Divers analogues pseudopeptidiques des enchaînements Ala-Ala et Ala-Ala-Ala ont été synthétisés. Seuls les analogues hydrazide et amidoxy ont présenté une activité antibactérienne importante (81). Les mécanismes d'action de ces derniers ont par ailleurs fait l'objet d'une étude approfondie (82). La résistance à l'hydrolyse enzymatique des amidoxy peptides a été testée sur un tripeptide modèle Phe-Lys-Leu et sur des analogues de l'acétylcholine. Les peptides contenant un motif hydroxamide, comme ceux comportant un acide aminé de configuration *D*, sont moins facilement dégradés (83). Chez les mammifères, la pentagastrine ($Boc-\beta Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2$) accroît la sécrétion d'acide gastrique. Des résidus aminoxy acide ont été introduits en position C-terminale [par exemple $H-Trp-Met-Asp\psi[CO-NH-O]Phe-NH_2$ (84)] et N-terminale (85, 86). Dans cette dernière position, les dérivés ont présenté une activité accrue (87). Des analogues amidoxy de la Leu-enképhaline ($H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH$) (88), de la dermorphine ($H-Tyr-(D)-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH_2$) (89) et d'un tripeptide N-formylé chimiotactique ($HCO-Met-Leu-Phe-OMe$) (90) ont également été synthétisés. Une réduction de l'activité biologique par rapport au peptide parent a été mise en évidence pour tous ces composés.

Les synthèses des aminoxy acides et des amidoxy peptides décrites dans les différentes publications citées ci-dessus ne semblent pas présenter de difficultés. Notre travail a consisté, dans un premier temps, à mettre en œuvre différents modes de synthèses proposés dans la littérature et ainsi déterminer au mieux les conditions opératoires. Nous avons mené une étude structurale sur les pseudodipeptides synthétisés, en les comparant aux hydrazide peptides. Dans un second temps, nous avons préparé et testé biologiquement les analogues amidoxy des inhibiteurs hydrazide peptides de l'ELH.

b) Oxime peptides et ligation chimique :

La réaction entre un α -amino aldéhyde et un α -aminoxyle donne naissance à une nouvelle famille de pseudopeptides : les oxime peptides. Le lien oxime est étudié depuis

quelques années en relation avec la ligation chimique, c'est-à-dire le couplage chimiosélectif en phase aqueuse de deux fragments peptidiques non protégés (91-95). Des peptides longs peuvent ainsi être synthétisés ou des séquences immunogènes être greffées sur des "porteurs". La ligation a donc de nombreuses applications dans le domaine des vaccins synthétiques, par exemple, mais aussi en thérapie génique. L'influence sur la structure des peptides de l'introduction d'un lien oxime n'a jamais encore été examinée.

c) Amidoxy peptides réduits :

Il est possible de réduire la liaison oxime en hydroxylamine : un aminoxy acide donne alors naissance à une troisième famille de pseudopeptides, les amidoxy peptides réduits. On ne trouve aucun exemple de tels composés dans la littérature. Les amidoxy peptides réduits, comme les peptides réduits, constituent des mimes potentiels de l'intermédiaire réactionnel de l'hydrolyse enzymatique de la liaison amide (*figure I-5*).

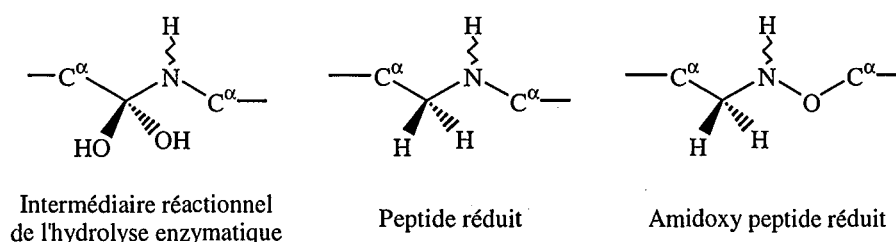


Figure I-5 : Des mimes de l'intermédiaire réactionnel de l'hydrolyse enzymatique

L'atome d'azote du lien méthylène amino conserve un certain caractère basique et se trouve partiellement sous forme protonée au pH physiologique. La présence du site donneur de proton -NH_2^+ modifie les interactions intramoléculaires et rigidifie la structure. La forme protonée des peptides réduits ne mime plus efficacement l'intermédiaire dihydroxyméthylène amino (45). L'insertion d'un atome d'oxygène entraîne une diminution du pK_a du groupement NH : nous avons, en effet, montré par spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) que les amidoxy peptides réduits ne sont pas protonés à un pH voisin de 7.

Nous avons mené parallèlement à l'étude des amidoxy peptides, celle des deux autres familles de pseudopeptides, les oxime peptides et les amidoxy peptides réduits, nous intéressant à la fois à la synthèse et aux propriétés structurales.

I-2 : SYNTHÈSE

I-2-1 : Synthèse des aminoxy acides

Les premières synthèses d'aminoxy acides ont été décrites par Werner en 1893 (96, 97). Les travaux sur ces molécules ont repris dans les années 60 quand des chercheurs ont découvert la cyclosérine (*figure I-6*), un antibiotique, contenant la fonction amidoxy (98-102).

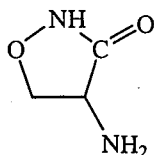


Figure I-6 : la cyclosérine

Deux étapes sont nécessaires pour transformer un acide α -aminé en α -aminoxy acide. La fonction amine est d'abord substituée par un atome de brome. Il suffit, pour cela, de former un sel de diazonium (action de l'acide nitreux) en présence de bromure de potassium. L' α -bromo acide est ensuite converti en *N*-alkyloxycarbonylaminoxy acide au cours d'une substitution par une *N*-alkyloxycarbonylhydroxylamine, préalablement déprotonée (*Schéma I-4*).

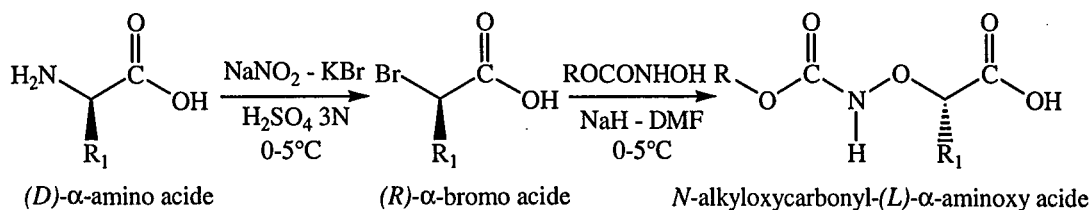


Schéma I-4 : Synthèse des α -aminoxy acides

La dernière étape permet d'obtenir directement l' α -aminoxy acide sous forme *N*-protégée. La *N*-benzyloxycarbonylhydroxylamine introduit le groupement protecteur Z et la *N*-*tert*-butyloxycarbonylhydroxylamine le groupement Boc. Testa *et coll.* (99) ont réalisé la réaction sur le dérivé α -bromé de la leucine à reflux d'éthanol (EtOH) en présence de potasse

(KOH). Ces conditions opératoires ont été appliquées avec succès pour d'autres acides aminés par Kisfaludy *et coll.* (83). Briggs et Morley (84) ont proposé une amélioration en utilisant comme base l'hydrure de sodium dans la diméthylformamide (DMF). Cette modification par rapport à la potasse éthanolique supprime toute possibilité de transestérification en *N*-éthoxycarbonylaminoxy acide. C'est le mode opératoire aujourd'hui suivi.

La synthèse décrite précédemment permet d'obtenir des composés optiquement purs. La configuration absolue des α -aminoxy acides a été déterminée après hydrogénation catalytique (rupture de la liaison N-O) par analyse du pouvoir rotatoire des α -hydroxyacides obtenus (103). La première étape se déroule avec rétention de configuration. La deuxième est une SN_2 , avec inversion de configuration du centre asymétrique. Pour obtenir un α -aminoxy acide de configuration absolue L, il est donc nécessaire de partir d'un (*D*)-acide α -aminé.

Nous avons préparé trois aminoxy acides Boc-protégés : les analogues de la glycine, de l'alanine et de la valine. Dans le commerce, on trouve l'hémichlorhydrate d'*O*-carboxyméthylhydroxylamine ($HCl_{1/2}.H_2N-O-CH_2-COOH$) et depuis peu l'aminoxy analogue de la glycine Boc-protégé ($Boc\psi[CO-NH-O]Gly-OH$). Nous avons cependant synthétisé ce dernier composé en acylant l'hémichlorhydrate d'*O*-carboxyméthylhydroxylamine par l'anhydride d'acide Boc_2O ou à partir d'acide bromoacétique. $Boc\psi[CO-NH-O]Ala-OH$ a été également préparé à partir du (*R*)-acide bromopropionique commercial. Les deux étapes du mode opératoire décrit par Briggs et Morley ont, en revanche, dû être mis en œuvre pour transformer la (*D*)-valine en $Boc\psi[CO-NH-O]Val-OH$.

L' α -bromo acide (*R*)- $Br-CH(Pr)-COOH$, obtenu avec un rendement de 83 %, peut être purifié par distillation sous pression réduite. Cette purification n'est pas indispensable. Quant aux aminoxy acide Boc-protégés, ils sont traités par la dicyclohexylamine. Le sel de dicyclohexylammonium précipite dans le diéther (Et₂O). Il peut alors être recristallisé dans l'acétate d'éthyle (AcOEt). La fonction acide carboxylique est régénérée par un traitement acide [solution aqueuse à 5 % massique d'hydrogènesulfate de potassium ($KHSO_4$)], suivi d'extractions. Il est indispensable d'obtenir un Boc-aminoxy acide pur pour les étapes ultérieures de couplage. Le rendement de la substitution nucléophile sur l' α -bromo acide ne dépasse pas en moyenne 50 %. La *tert*-butyloxycarbonylhydroxylamine est un composé sensible à l'humidité. Sa qualité influe peut-être sur la valeur du rendement. La méthode de purification utilisée, la recristallisation, entraîne de plus une perte de produit dans les eaux-mères et la chromatographie sur colonne de silice est difficilement réalisable avec des acides carboxyliques.

I-2-2 : Synthèse des amidoxy peptides

Les méthodes classiques de couplage peptidique sont applicables aux α -aminoxy acides. Il faut noter que les valeurs des pK_a de la fonction acide carboxylique d'un aminoxy acide et d'un acide aminé sont voisines. L'atome d'oxygène adjacent diminue cependant la basicité de la fonction amine (83).

a) Généralités sur la synthèse peptidique en phase liquide :

La première réaction de couplage respectant la chiralité des acides aminés a été mise au point par Curtius (*Schéma I-5*) (104). La méthode aux azotures n'est plus guère utilisée de nos jours : la réaction est lente et génère de nombreux produits secondaires.

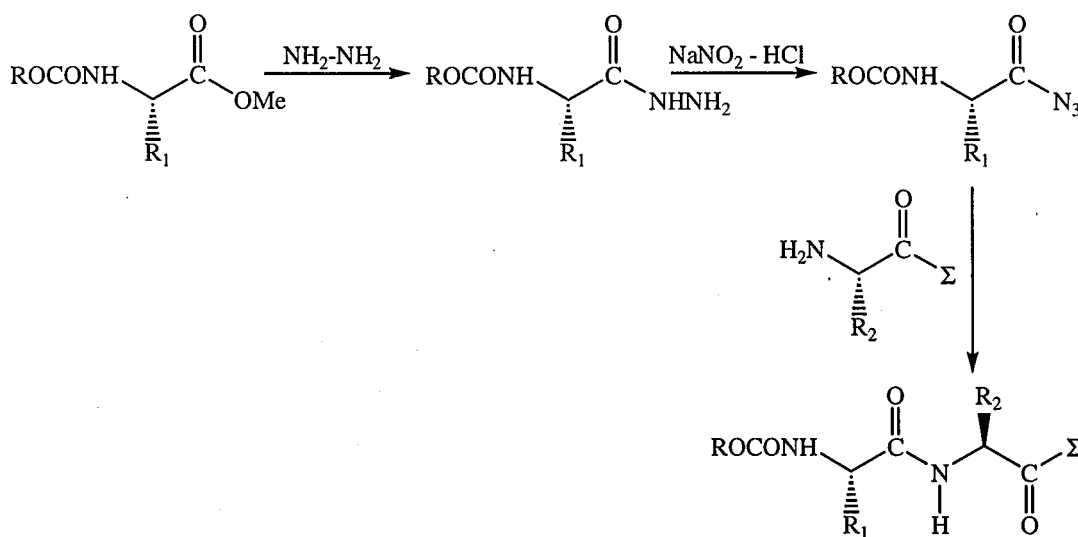


Schéma I-5 : Méthode de couplage aux azotures

Le carbonyle de la fonction acide carboxylique peut également être activé sous forme d'anhydride d'acide. Les chloroformiates, le plus utilisé d'entre eux étant l'isobutylchloroformiate (ICF), conduisent, en présence d'une base comme la *N*-méthylmorpholine (NMM) aux anhydrides mixtes. Ces derniers ne sont pas isolés et réagissent *in situ* avec les fonctions amine (*Schéma I-6*) (105, 106). C'est une méthode de couplage efficace et propre. Elle nécessite cependant d'être réalisée à -18°C pour la stabilité des anhydrides. A plus haute température, on observe la formation irréversible d'ester.

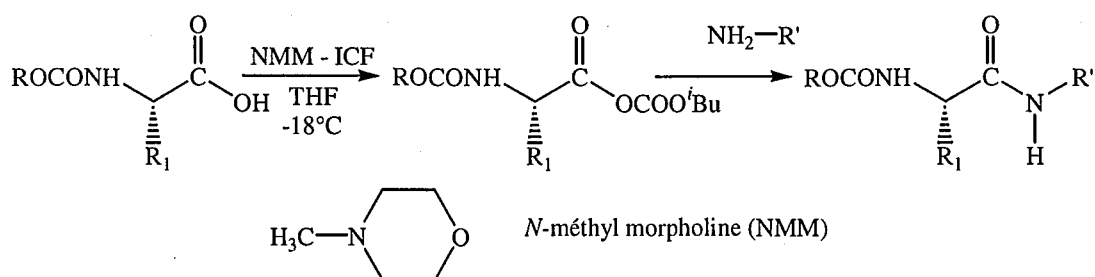


Schéma I-6 : Méthode aux anhydrides mixtes (THF = tétrahydrofurane)

Les carbodiimides sont des agents de couplage très employés en synthèse peptidique. La plus connue est la dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) (*Figure I-7*) (107). Cette dernière génère cependant une urée insoluble dans l'eau, la dicyclohexylurée, qui ne s'élimine pas aisément. Pour cette raison, son utilisation en phase liquide se trouve restreinte. La DCCI est alors parfois remplacée par la 1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide [EDC ou WSC (Water Soluble Carbodiimide)] (*Figure I-7*) (108) dont l'urée formée est soluble dans l'eau et peut être éliminée par lavages.

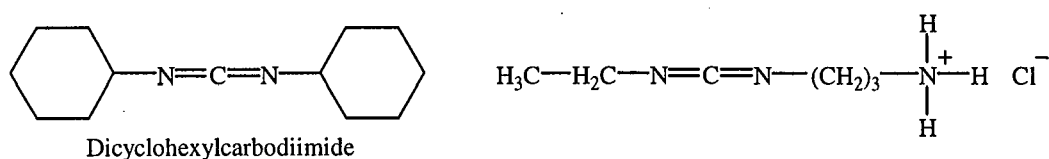


Figure I-7: Exemple de carbodiimides

Les carbodiimides interviennent dans de nombreuses méthodes de couplage. La DCCI en présence de deux équivalents d'acide aminé *N*-protégé conduit aux anhydrides symétriques (*Schéma I-7*) (109). Ces derniers constituent des intermédiaires très réactifs. Cette méthode très efficace présente cependant l'inconvénient d'engager 2 équivalents d'acide aminé. Un couplage peut être également réalisé par l'introduction simultanée des deux partenaires et de la DCCI. Cette dernière réagit alors sur l'acide aminé *N*-protégé (110). La *O*-acylisourée ainsi formée est attaquée par la fonction amine libre pour établir le lien amide. Une réaction parasite se produit parallèlement aboutissant à une *N*-acylurée (*Schéma I-7*) (111).

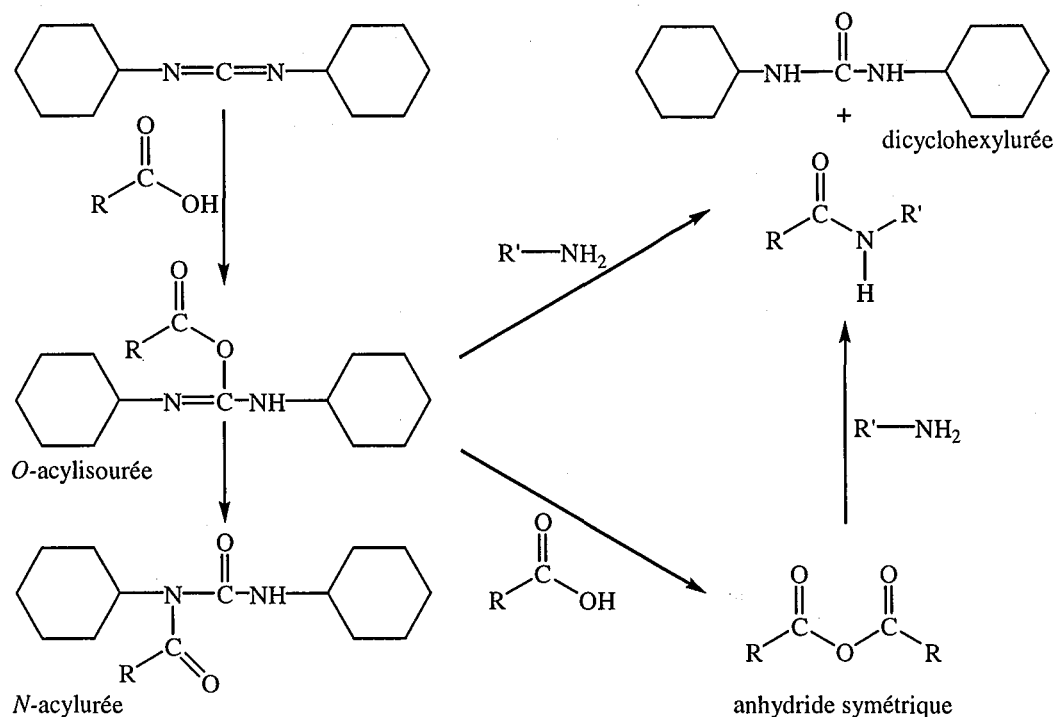


Schéma I-7: Méthode à la DCCI et aux anhydrides symétriques

Pour la minimiser, il convient d'ajouter des composés, comme le *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt) qui vont réagir avec la *O*-acylisourée dès sa formation pour donner naissance à des intermédiaires moins réactifs (112). Ces derniers peuvent parfois être isolés et purifiés ; certains sont même des produits commerciaux. On parle alors de méthode de couplage aux esters activés. Parmi les réactifs les plus couramment employés, on peut citer la *N*-hydroxysuccinimide (HOSu) (113), le *p*-nitrophénol (114) et le pentachlorophénol (115) (Figure I-8).

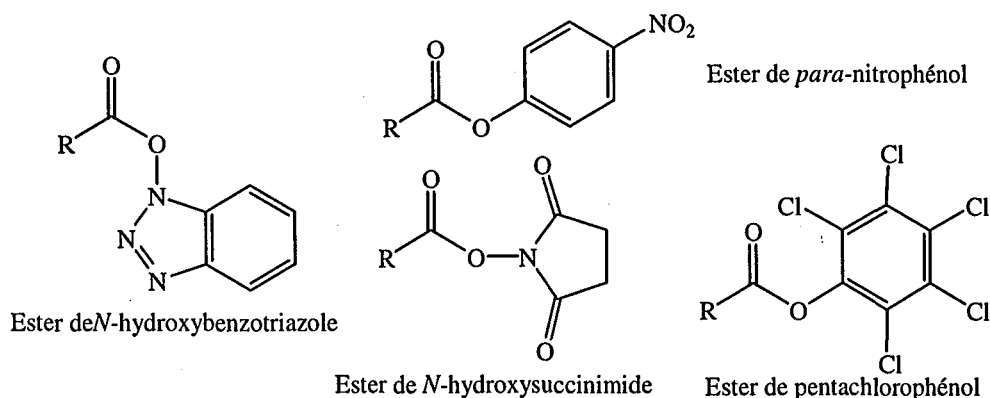


Figure I-8: Les esters activés les plus courants

Il est enfin possible de générer *in situ* ces esters activés sans faire intervenir de carbodiimides. Les agents de couplage utilisés sont des sels de phosphonium ou d'uronium (116). Le plus connu est très certainement le réactif développé par B. Castro, l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium ou BOP (*Figure I-9*) (117-119). Au cours du couplage, de l'hexaméthylphosphorotriamide (HMPT) est libéré. Ce dernier est un excellent solvant, à température d'ébullition élevée, qui est difficilement éliminé. Il est aussi connu comme étant un possible agent cancérigène. L'utilisation du BOP est donc proscrite pour tout produit destiné à un usage thérapeutique. Il peut être substitué par plusieurs autres réactifs dont le tétrafluoroborate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium ou TBTU (*Figure I-9*) (120). La tétraméthylurée remplace alors le HMPT. Elle ne s'élimine pas beaucoup plus facilement. Si elle reste soluble dans l'eau, les seuls lavages ne suffisent pas. La chromatographie sur colonne seule, ne permet pas non plus d'obtenir un produit pur. Un pic fin à 2,88 ppm dû aux 12 hydrogènes équivalents est souvent observé sur les spectres RMN. La lyophilisation est certainement la technique la plus efficace. Malgré les inconvénients décrits ci-dessus, la méthode au TBTU, même en phase liquide homogène, est une méthode de couplage très facilement mise en œuvre, qui ne demande pas de précaution particulière et qui permet le plus souvent d'atteindre des rendements satisfaisants avec des produits bruts relativement propres.

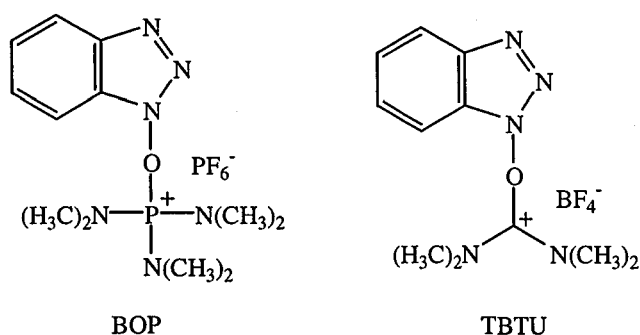


Figure I-9: Le BOP et le TBTU

b) Synthèses d'amidoxy peptides : étude bibliographique et résultats

Nous avons principalement synthétisé des amidoxy dipeptides de la forme $R_1\text{-CO-Prop[CO-NH-O]Xaa-NHR}$ (avec $R_1 = \text{'Bu}$ ou O'Bu ; Xaa = Gly ou Ala ; R = Me ou 'Pr) suivant le schéma I-8. L'étude structurale présentée ultérieurement a orienté le choix des composés.

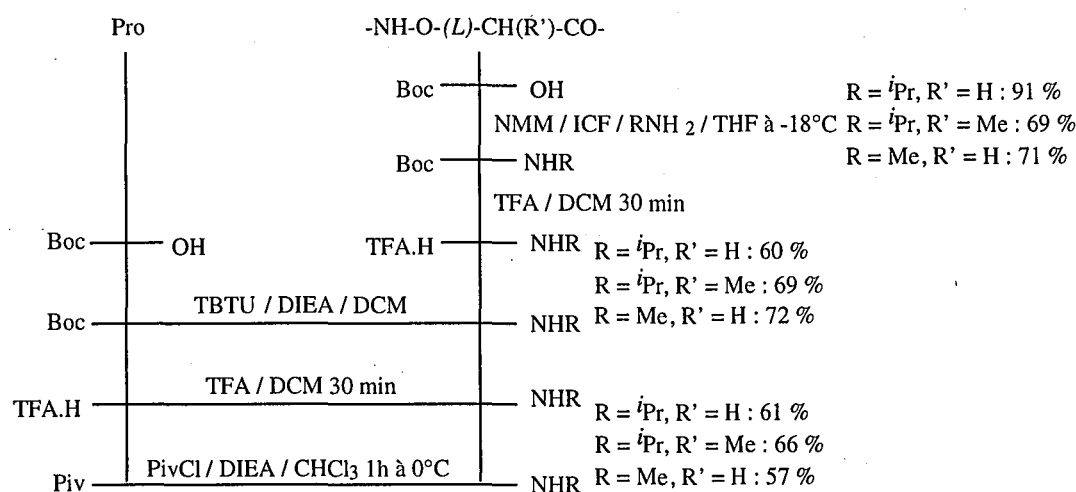


Schéma I-8 : Schéma de synthèse des amidoxy dipeptides

Dans la littérature, le couplage C-terminal d'un aminoxy acide *N*-protégé est effectué par la méthode à la DCCI, seule (83) ou en présence de HOBt (90), par la méthode aux anhydrides mixtes (86, 88, 89) et par la méthode aux esters activés de pentachlorophénol (85, 86) et de *N*-hydroxysuccinimide (88). Nous avons retenu la méthode aux anhydrides mixtes pour faire réagir le Bocψ[CO-NH-O]Gly-OH et le Bocψ[CO-NH-O]Ala-OH avec l'isopropylamine (ⁱPrNH₂) ou la méthylamine pure (MeNH₂), sous forme de gaz condensé. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice. Le rendement en produit isolé atteint parfois 90 %. Malgré les bons résultats obtenus, nous avons quelquefois préféré utiliser le TBTU pour la facilité de la manipulation.

L'élimination du groupement Boc est réalisée en milieu acide. L'acide trifluoroacétique (TFA) soit pur, soit en solution dans le dichlorométhane (DCM) ou le chloroforme (CHCl₃) est souvent employé (83, 85, 86, 90). On trouve également des exemples d'utilisation de chlorure d'hydrogène (HCl) gazeux dissous dans l'AcOEt (86). Salvadori *et coll.* préconisent d'ajouter du tris(trifluoroacétate de bore (B(TFA)₃) dans le TFA afin de raccourcir la durée de la réaction de déprotection et de minimiser la formation de produits secondaires (88). Le groupement Z est habituellement éliminé par hydrogénation catalytique (palladium sur carbone). Dans le cas des amidoxy peptides, cette méthode n'est pas applicable à cause de la fragilité de la liaison N-O. La fonction aminoxy est alors déprotégée par une solution d'acide bromhydrique (HBr_{aq}) dans l'acide acétique (AcOH). Pour ôter le groupement Boc, nous avons utilisé deux méthodes : le plus souvent le mélange TFA/DCM 40/60 en volume et, pour les premières synthèses la solution de HCl dans l'AcOEt. Le HCl en excès est aisément éliminé. Par ailleurs, les chlorhydrates sont en majorité

cristallins. Les trifluoroacétates sont en revanche des huiles et du TFA résiduel demeure après lyophilisation. Les inconvénients présentés ci-dessus n'ont pas de conséquence pour l'étape suivante de couplage. La méthode au TFA a donc été retenue car elle est commodément mise en œuvre.

La DCCI (86), le mélange DCCI/HOBt (84), la méthode aux esters activés de *N*-hydroxysuccinimide (80, 86, 88-90) ont été utilisés pour le couplage *N*-terminal de la fonction aminoxy avec un acide aminé *N*-protégé. Nous avons commencé par essayer la méthode aux anhydrides mixtes. Le rendement ne dépasse pas les 30 %. Nous avons ensuite envisagé l'utilisation du TBTU dans le DCM, la base choisie étant la diisopropyléthylamine (DIEA). Le rendement atteint alors 60 %. Il est indispensable de contrôler le pH du milieu réactionnel : la quantité de base introduite doit être suffisante pour amener le pH autour de 9-10 et ainsi neutraliser le TFA restant après la lyophilisation. Le produit brut est aisément purifié par chromatographie sur colonne de silice. L'atome d'azote de la fonction aminoxy est moins nucléophile que celui d'un groupement amine. Le couplage nécessite donc une forte activation de la fonction acide carboxylique et dans ce cas, un réactif comme le TBTU convient parfaitement.

Le groupement pivaloyle (Piv) [(CH₃)₃C-CO-] est introduit, après un traitement acide avec le mélange TFA/DCM, par le chlorure de pivaloyle (PivCl), en présence de base (DIEA), dans CHCl₃. La température doit être abaissée vers 0°C afin de minimiser les réactions secondaires. Les rendements obtenus avoisinent les 60 % suivant les réactions.

Les spectres RMN des amidoxy dipeptides R₁-CO-Proψ[CO-NH-O]Ala-NH^tPr (avec R₁ = ^tBu ou O^tBu) synthétisés ne présentent pas les dédoublements de signaux que génère un mélange de deux diastéréoisomères. L'aminoxyl acide Bocψ[CO-NH-O]Ala-OH préparé suivant le schéma de Briggs et Morley est donc optiquement pur. Nous avons pu vérifier que les aminoxy acides et les amidoxy peptiques ne posent pas de difficultés particulières de synthèse contrairement aux hydrazino acides et aux hydrazide peptides.

I-2-3 : Synthèse des oxime peptides

Les oxime peptides sont obtenus par couplage entre le carbonyle d'un α-amino aldéhyde *N*-protégé et la fonction aminoxy. Nous avons synthétisé des oxime peptides de la forme R-CO-Proψ[CH=N-O]Gly-Σ (avec R = ^tBu ou O^tBu ; Σ = OMe ou NH^tPr) ainsi que les composés Boc-Alaψ[CH=N-O]Gly-NH^tPr et Piv-Valψ[CH=N-O]Ala-NH^tPr.

a) Préparation des α -amino aldéhydes *N*-protégés :

Pour les besoins de la ligation chimique, diverses méthodes, introduisant une fonction aldéhyde dans la chaîne peptidique, ont été développées. On peut citer la réaction de Malaprade (oxydation par l'acide periodique) sur un résidu sérine ou l'utilisation de l'aminoacétaldéhyde-diméthylacétal qui permet de facilement obtenir sur support solide (voir II-2-2-a) une fonction aldéhyde protégée sous forme d'acétal (95). Toutes ces méthodes ne sont pas applicables à la synthèse des oxime peptides car elles ne sont pas suffisamment générales pour permettre la seule substitution d'une liaison amide donnée par un lien oxime sans aucune autre modification par rapport au peptide parent.

La première étape de la synthèse d'oxime peptides est donc la préparation de l' α -amino aldéhyde *N*-protégé. La réduction de la fonction acide carboxylique d'un acide aminé doit prendre en compte deux impératifs : arrêter la réduction à l'aldéhyde et ne pas poursuivre la réaction jusqu'à l'alcool ainsi qu'éviter l'épimérisation du carbone α de l'amino aldéhyde. Weinreb a proposé de préalablement transformer les acides carboxyliques en *N,O*-diméthylhydroxamide avant de procéder à la réduction par l'hydrure mixte d'aluminium et de lithium (LiAlH_4) (121). Un complexe de lithium se forme alors bloquant la réaction. L'hydrolyse en milieu acide permet d'obtenir l'aldéhyde. Cette méthode a été transposée aux acides aminés par Fehrentz et Castro (*Schéma I-9*) (122).

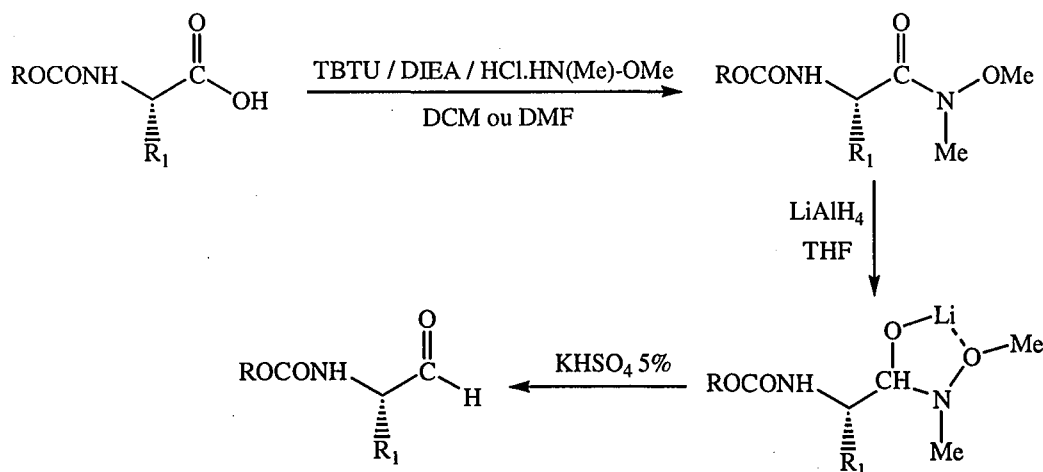


Schéma I-9: Préparation des α -amino aldéhydes par l'intermédiaire d'amide de Weinreb

Le couplage peptidique entre l'acide aminé *N*-protégé et la *N,O*-diméthylhydroxylamine [$\text{HN}(\text{Me})\text{-OMe}$] est réalisé suivant les méthodes classiques. Pour la synthèse de Boc-Pro-N(Me)-OMe, nous avons employé la méthode aux anhydrides mixtes

avec un rendement décevant de 37 %. Nous avons ensuite changé de méthode pour un couplage avec la DCCI à laquelle nous avons ajouté un catalyseur d'acylation : la 4-(diméthylamino)pyridine (DMAP). Le rendement atteint alors 78 %. Nous avons également utilisé le TBTU avec un rendement de 83 %. Cette dernière méthode a été par la suite appliquée à la synthèse de Boc-Ala-N(Me)-OMe et Boc-Val-N(Me)-OMe. La réduction par LiAlH_4 s'effectue dans le THF à -15°C . Elle est suivie d'une hydrolyse par une solution aqueuse à 5 % en masse de KHSO_4 . Le rendement de cette étape dépasse les 80 %. L'aldéhyde est purifié seulement par lavages et utilisé aussitôt pour le couplage. Afin d'éviter l'épimérisation, nous n'avons pas mis en œuvre de chromatographie sur gel de silice. Cette technique semble cependant applicable aux amino aldéhyde si l'on ajoute 0,1 % de pyridine à l'éluant (123).

Un problème que nous avons rencontré lors de notre étude est la préparation de Piv-Pro-H et de Piv-Val-H. Comme nous le verrons plus loin, ces composés étaient nécessaires en tant qu'intermédiaires dans la synthèse respectivement de Piv-Pro ψ [CH=N-O]Gly-NH^tPr et de Piv-Val ψ [CH=N-O]Ala-NH^tPr. La méthode de Fehrentz et Castro ne permet pas l'obtention directe des Piv-amino aldéhydes à partir des Piv-amino acides. La réduction par LiAlH_4 des amides de Weinreb de la forme Piv-Xaa-N(Me)-OMe (avec Xaa = Pro, Val) affecte en effet la liaison amide entre le groupement Piv et l'acide aminé. Il faut, par ailleurs, noter que si la méthode de Fehrentz et Castro est décrite dans la littérature comme compatible avec la plupart des groupements protecteurs : Boc, Z, Fmoc (9-fluorénylméthylèneoxycarbonyle) (*Figure I-10*) (124), elle ne s'applique pas à la synthèse de Fmoc-Pro-H. Nous avons, en effet, constaté une rupture de la liaison uréthane Fmoc-Pro.

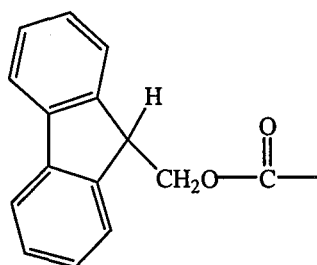


Figure I-10: Le groupement Fmoc

Pour obtenir Piv-Pro-H et Piv-Val-H, trois méthodes de synthèse restaient à notre disposition. Fehrentz *et coll.* ont également mis au point une première méthode basée sur la réduction de *N*-carboxyanhydrides *N*-protégés (UNCAs), produits aujourd'hui commerciaux

(125). Elle s'applique aux principaux groupements protecteurs de la fonction amine (Boc, Z, Fmoc). Les réducteurs utilisés sont le tris(*tert*-butoxy)hydrure d'aluminium et de lithium ($\text{LiAlH}(\text{O}^t\text{Bu})_3$) et le tris[(3-éthyl-3-pentyl)oxy]hydrure d'aluminium et de lithium (LTEPA). Ce dernier, disponible en solution 0,5 M dans le THF, fournit les meilleurs résultats (*Schéma I-10*).

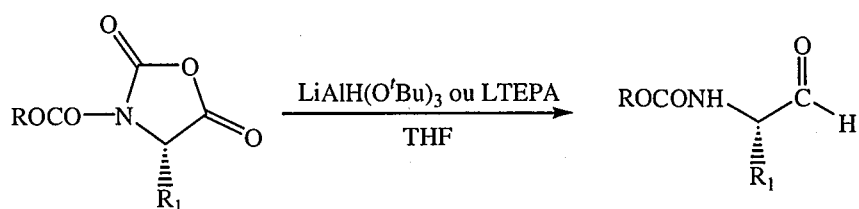


Schéma I-10: Synthèse d'amino aldéhydes N-protégés à partir d'UNCAs

Une seconde méthode consiste à transformer les acides aminés Fmoc-protégés en thioesters benzyliques. Ces derniers sont réduits en amino aldéhyde Fmoc-protégés par le triéthylsilane en présence de palladium sur charbon actif (*Schéma I-11*) (123).

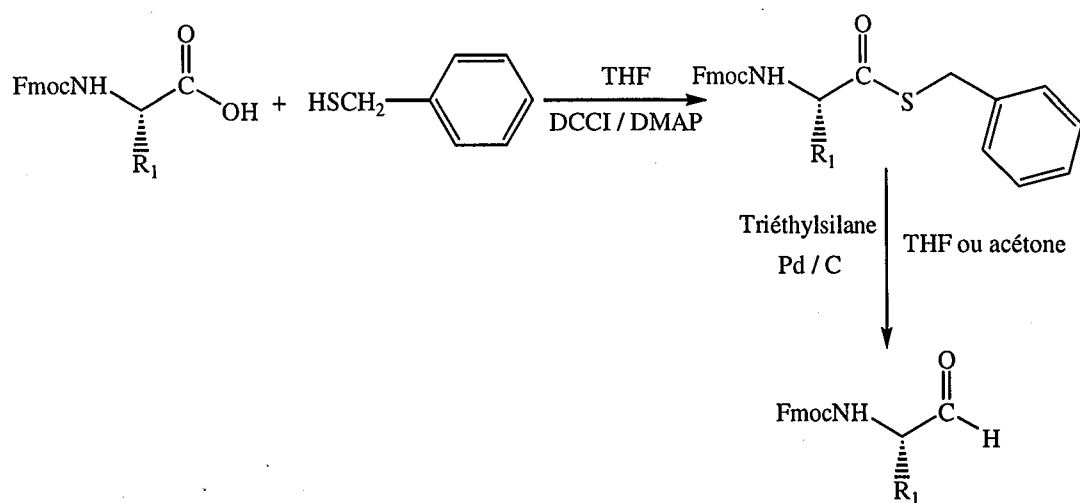


Schéma I-11: Préparation de N-Fmoc amino aldéhydes au moyen de thioesters benzyliques

Une dernière méthode consiste à réduire les acides aminés en β -amino alcools (126) qui sont ensuite oxydés en α -amino aldéhydes (*Schéma I-12*) (127). Elle est compatible avec les groupements Fmoc, Boc, et Z.

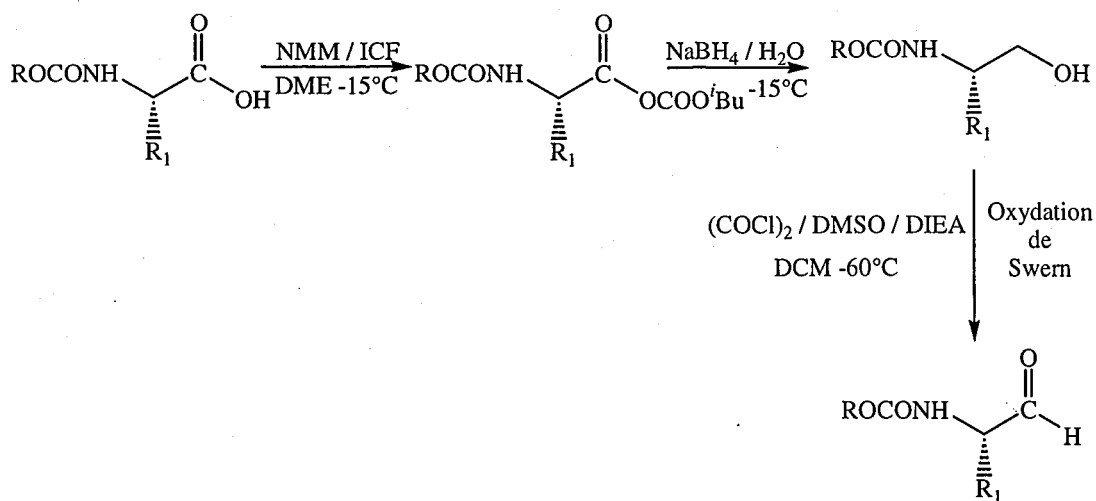


Schéma I-12 : Synthèse d'aldéhydes via les β -amino alcools

Un anhydride mixte est préalablement formé dans le diméthoxyéthane (DME) à -15°C par action de l'ICF sur un acide aminé *N*-protégé. Il est immédiatement réduit par une solution aqueuse de borohydrure de sodium (NaBH_4) à -15°C (126). Le β -amino alcool ainsi formé peut être purifié. Il est oxydé selon la méthode de Swern (*Schéma I-13*) (127, 128) : oxydation en amino aldéhyde par le couple DMSO/chlorure d'oxalyle $[(\text{COCl})_2]$ en solution dans le DCM et en présence de DIEA.

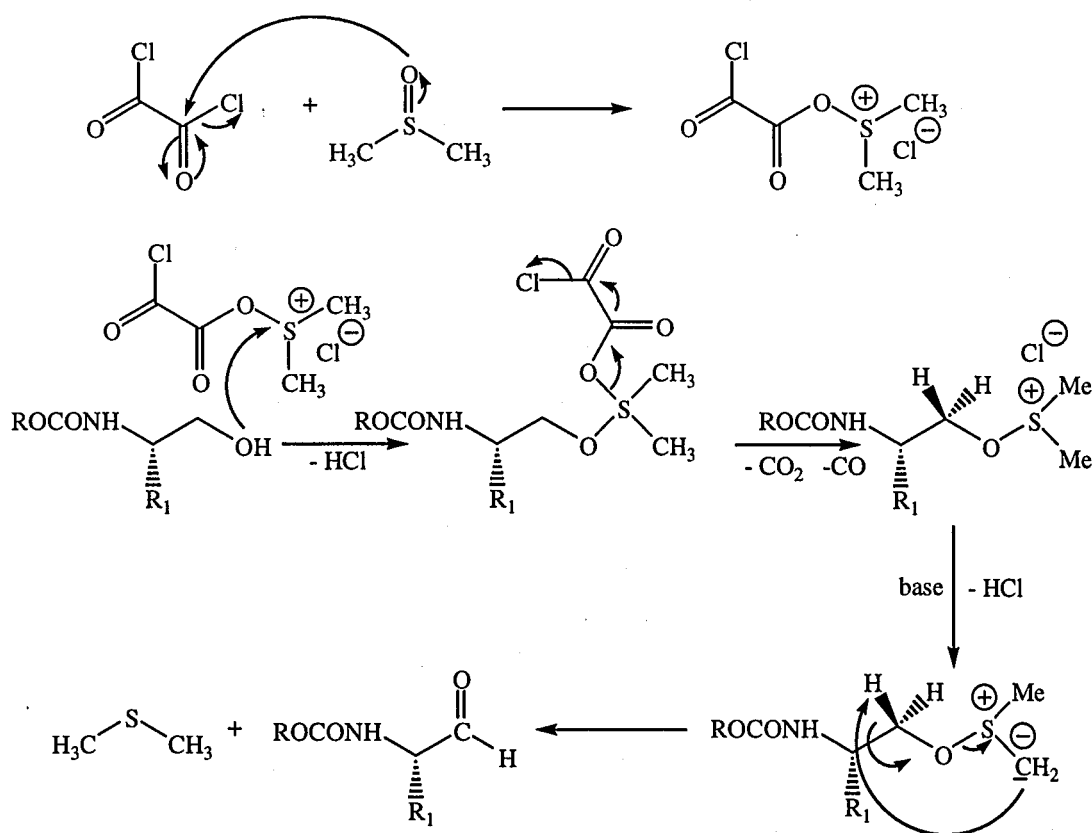


Schéma I-13: Mécanisme de l'oxydation par la méthode de Swern

Nous avons opté pour cette troisième méthode car elle devait nous permettre, en principe, d'obtenir directement Piv-Pro-H à partir de Piv-Pro-OH et Piv-Val-H à partir de Piv-Val-OH.

Les Piv-amino acides ont, par ailleurs, été préparés suivant le *schéma I-14*. Pour la pivaloylation des acides aminés, nous avons préféré estérifier la fonction acide carboxylique. Les acides aminés sous forme de zwitterion sont en effet peu solubles dans la plupart des solvants organiques. Il faut noter que les réactions d'estérification ont été réalisées sur des acides aminés ou des aminoxy acides non protégés dans une solution de chlorure de thionyle (SOCl_2) dans le méthanol (MeOH), préparée à -15°C , le mélange réactionnel étant ultérieurement chauffé à 45°C . L'utilisation de la méthode au diazométhane s'est toujours soldée par un échec qui s'explique en partie par les difficultés rencontrées pour solubiliser les acides aminés Boc-protégés. Le diazométhane est généré à partir de précurseurs comme le *N*-méthyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine en milieu aqueux basique. Il est ensuite extrait par des solvants organiques comme l'AcOEt et aussitôt utilisé en solution dans ces même solvants. La réaction de saponification qui suit la pivaloylation est effectuée dans l'acétone. La quantité de soude introduite, sous forme de solution aqueuse molaire, est limitée à 1,05 équivalent et la température est abaissée à 0°C durant la première heure de réaction pour éviter l'épimérisation du carbone α . Pour la même raison, le suivi par chromatographie sur couche mince (ccm) de l'avancement permet d'ajuster au mieux la durée de la saponification.

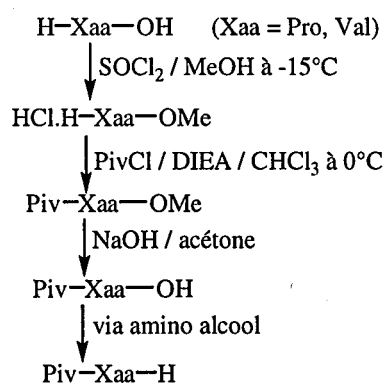


Schéma I-14: Schéma de synthèse de Piv-Xaa-H (avec Xaa = Pro, Val)

Le Piv-Prolinol a été obtenu avec un rendement acceptable sans optimisation des conditions opératoires. Le rendement de l'oxydation de Swern atteint 88 %. Suivant la méthode aux β -amino alcools, nous avons également préparé Piv-Val-H. On peut comparer

les rendements obtenus avec la méthode de Fehrentz et Castro (préparation de Boc-Pro-H) et la méthode aux β -amino alcools (synthèse de Piv-Pro-H). Dans le premier cas, le rendement global de la réduction atteint 73 % alors qu'il n'est que de 35 % dans le second. Dans la littérature, les rendements relatifs à l'étape de formation du β -amino alcool dépassent souvent les 80 %. Une optimisation des conditions opératoires aurait peut-être permis de se rapprocher de telles valeurs et ainsi obtenir des rendements semblables pour les deux voies de synthèse.

b) Synthèse des oxime peptides : les résultats

Dans le schéma I-15, nous avons représenté les étapes de la synthèse de différents oxime dipeptides.

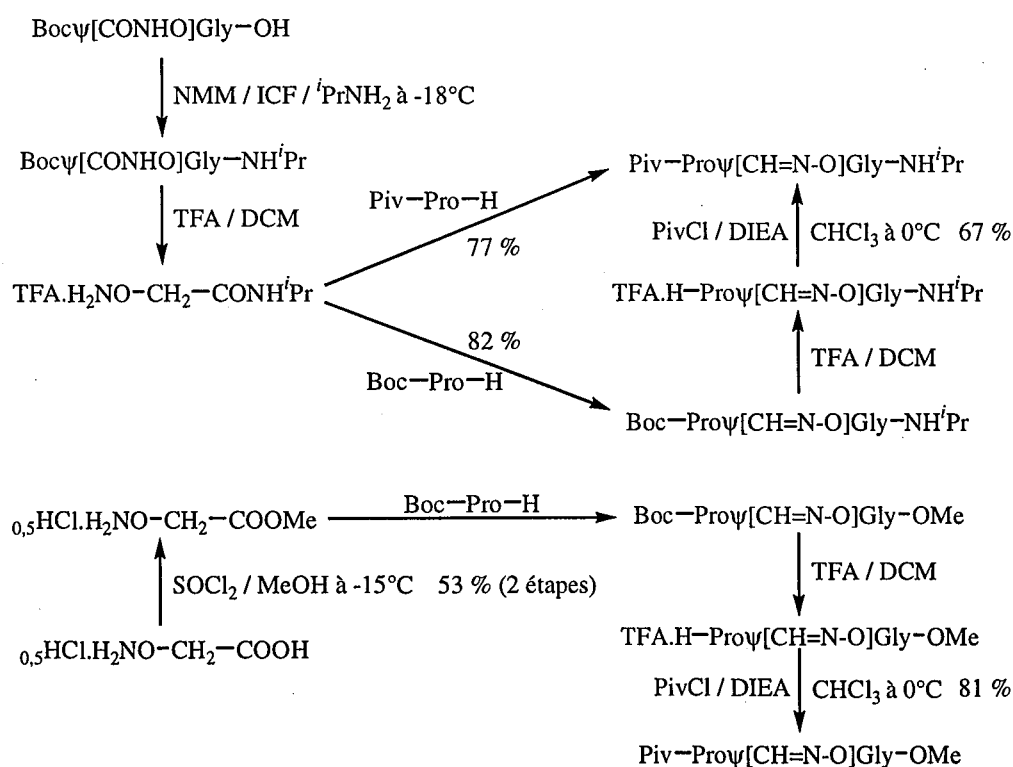


Schéma I-15: Schéma de synthèse des oxime dipeptides de la forme $R\text{-CO-Pro}\psi[\text{CH=N-O}]\text{Gly}-\Sigma$ (avec $R = {}^i\text{Bu}$ ou $O^i\text{Bu}$; $\Sigma = \text{OMe}$ ou NH^iPr)

De la même manière que Boc-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr, nous avons synthétisé Boc-Alaψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr et Piv-Valψ[CH=N-O]Ala-NHⁱPr qui a été directement préparé à partir de Piv-Val-H.

Pour le couplage entre l'amino aldéhyde et la fonction aminoxy, nous avons repris un mode opératoire classique, déjà employé avec succès au laboratoire pour la synthèse des imino azapeptides (44). La fonction aminoxy est régénérée par un équivalent de NMM et additionnée à deux équivalents d'amino aldéhyde et à quatre équivalents d'acétate de sodium (AcONa) dans l'EtOH. L'équilibre est déplacé par adjonction de tamis moléculaire. La durée de la réaction est d'environ 12 heures et le rendement en oxime peptide est d'environ 80 % pour toutes les condensations réalisées.

c) Synthèse de cétoximes :

Nous avons envisagé de greffer sur la liaison oxime des chaînes latérales qui peuvent constituer des mimes d'acides aminés. Pour des raisons de commodité de synthèse, nous avons uniquement introduit des chaînes alkyles mais il semble possible de greffer des chaînes fonctionnalisées moyennant des groupements protecteurs adaptés. La voie de synthèse présentée ci-dessous et qui aboutit à des cétoxime peptides permet, non plus de réaliser des modifications pseudopeptidiques, mais des modifications peptidomimétiques.

Comme décrit dans la publication de Weinreb (121), il est possible de faire réagir sur la *N,O*-diméthylhydroxamide un organomagnésien à la place du réducteur LiAlH_4 . Le produit alors obtenu est une cétone. Par couplage ultérieur, avec une fonction aminoxy, on forme une cétoxime. Nous avons ainsi synthétisé les trois composés $\text{R-CO-Pro}\psi[\text{C}(\text{Pr})=\text{N-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ (avec $\text{R} = \text{'Bu}$ ou O'Bu) et $\text{Boc-Pro}\psi[\text{C}(\text{Me})=\text{N-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ (Schéma I-16).

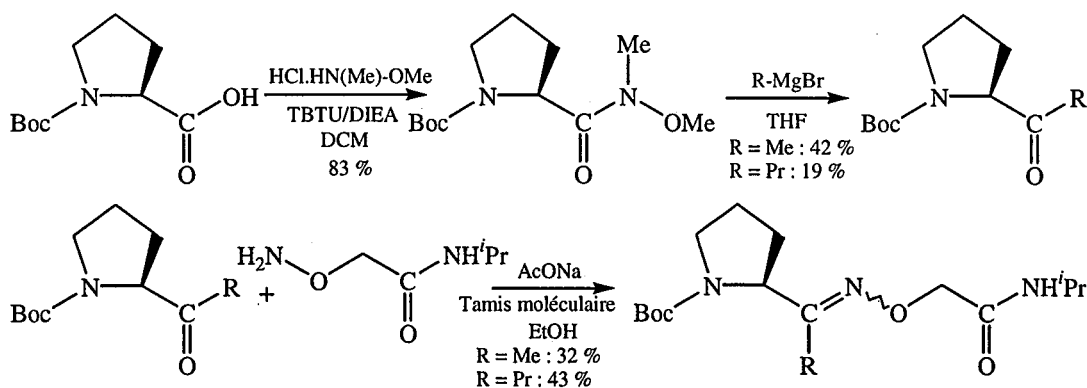


Schéma I-16: Synthèse des cétoxime peptides (avec $\text{R} = \text{Me}$ ou Pr)

Nous avons préparé le bromure de propylmagnésium dans le THF que nous avons ensuite fait réagir sur $\text{Boc-Pro-N}(\text{Me})\text{-OMe}$. L'organomagnésien est introduit goutte à goutte

sur la solution refroidie de *N,O*-diméthylhydroxamide dans le THF. Pendant toute la durée de la réaction (2 heures), la température est maintenue autour de -15°C.

La cétone ainsi synthétisée, Boc-Pro-Pr, est purifiée par chromatographie sur colonne. Le rendement non optimisé de la réaction est de 20 %. Cette manipulation n'était qu'une étude préalable de faisabilité de telles molécules. Du bromure de méthylmagnésium commercial dans le THF a été utilisé pour la synthèse de Boc-Pro-Me. Ce dernier, après chromatographie, est isolé avec un rendement de 42 %.

Le couplage de la cétone avec la fonction aminoxy a été réalisé suivant le mode opératoire de la synthèse des aldoximes. Le rendement atteint 43 %. La réaction est plus difficile avec les cétones qu'avec les aldéhydes, ce résultat étant attendu. Le couplage cétonique demande en particulier un temps de réaction plus important.

I-2-4 : Synthèse des amidoxy peptides réduits

Les amidoxy peptides réduits sont préparés par réduction de la fonction oxime. Notre travail a consisté à déterminer les conditions opératoires optimales (nature du solvant, du réducteur, pH du milieu, durée de la réaction). Elles doivent être suffisamment douces pour ne pas rompre la liaison N-O mais suffisamment performantes pour former l'hydroxylamine avec un rendement satisfaisant.

Nous avons synthétisé les amidoxy dipeptides réduits suivants : R-CO-Proψ[CH₂-NH-O]Gly-Σ (avec R = ^tBu ou O^tBu ; Σ = OMe ou NHⁱPr) et Boc-Alaψ[CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr. Seyden-Penne préconise l'utilisation comme réducteur du cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN) en présence d'AcOH (129). Nous avons suivi un mode opératoire appliqué à la synthèse des peptides réduits. La réaction, effectuée sur Boc-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr dans le MeOH avec 1 % en volume d'AcOH, 4 équivalents de NaBH₃CN pendant 12 heures n'a pas permis d'isoler le produit souhaité.

Nous avons essayé l'hydrogénation catalytique (130, 131) (Palladium sur carbone) en présence d'AcOH pendant 96 heures. Cette méthode avait été appliquée avec succès à la préparation des imino azapeptides réduits (45). Dans le cas de la liaison oxime, elle a entraîné la rupture de la liaison N-O, résultat cohérent avec les observations de la littérature (103). Nous avons testé plusieurs borohydrures. Le borohydrure de sodium (NaBH₄) dans le THF a également dégradé la dipeptide. Le MeOH est connu pour atténuer le pouvoir réducteur de NaBH₄. Le changement de solvant n'a pas modifié le résultat. Le triacétoxyborohydrure de sodium (NaBH(CH₃CO₂)₃) est un réducteur doux très utilisé pour les aminations réductrices

(132). La réaction a été réalisée dans le 1,2-dichloroéthane (DCE) en présence d'un équivalent d'AcOH. Le dipeptide n'a pas été réduit et nous avons récupéré l'oxime de départ. Il fallait donc trouver un réducteur intermédiaire entre NaBH_4 et $\text{NaBH}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3$. Nous avons alors pensé à utiliser LiBH_3CN (133). Nous avons finalement repris NaBH_3CN en modifiant les conditions opératoires par rapport à la manipulation initiale. Une réaction à $\text{pH}=6$ s'est soldée par un échec. Borch *et coll.* abaissent le pH à 3 pour la réduction des aldoximes par NaBH_3CN (134). Il décrit, en effet, à un pH voisin de 4, la formation d'un produit secondaire : une *N,N*-dialkylhydroxylamine (Schéma I-17).

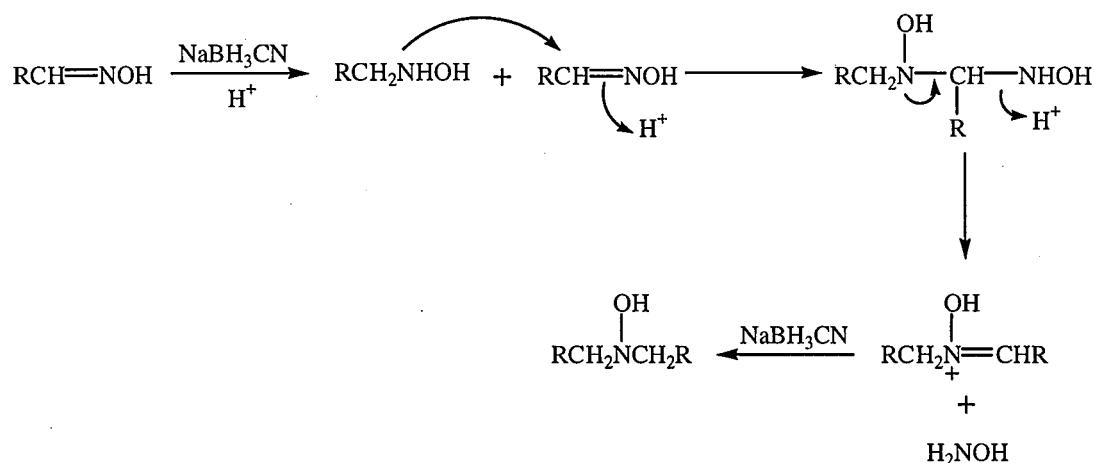


Schéma I-17: Mécanisme de formation des dialkylhydroxylamines

Le pH du milieu réactionnel est contrôlé par un indicateur coloré (orangé de méthyle) et ajusté avec de l'AcOH. Une étude systématique a montré qu'avec 4 équivalents de NaBH_3CN , le rendement est de 18 % après 12 heures de réaction et de 50 % après 72 heures et qu'il faut ajouter plus de 10 équivalents de réducteur par portions sur 6 jours pour accéder à un rendement supérieur à 80 %.

La réduction des oxime peptides par NaBH_3CN est donc une réaction lente mais propre qui devient quantitative après une semaine avec un large excès de réducteur. L'amidoxy dipeptide réduit est purifié par chromatographie sur gel de silice après traitement basique par une solution aqueuse saturée de carbonate de potassium et extractions par le DCM.

Amidoxy, oxime et amidoxy dipeptides réduits ayant été synthétisés (*tableau I-2*), une étude structurale a été menée pour déterminer l'influence conformationnelle des modifications chimiques réalisées.

	<u>Divers</u>	<u>Monopeptides</u>	<u>Dipeptides</u>
<u>Hydrazide peptides</u>	CH ₃ CO-NH-NMe ₂ (145) CH ₃ CO-NH-NPh ₂ (146) (CH ₃) ₃ CCO-NH-NMe ₂ (145)	Boc-Pro-NH-NMe ₂ (154) Piv-Pro-NH-NMe ₂ (155)	
<u>Amidoxy peptides</u>		Bocψ[CONHO]Gly-NH ^t Pr (142) Bocψ[CONHO]Ala-NH ^t Pr (143) Bocψ[CONHO]Gly-NHMe (143) Pivψ[CONHO]Gly-NHMe (156) Boc-Pro-NH-OMe (153) Boc-Pro-N(Me)-OMe (148) Piv-Pro-NH-OMe (154) Piv-Pro-N(Me)-OMe (155)	Boc-Proψ[CONHO]Gly-NH ^t Pr (158) Boc-Proψ[CONHO]Ala-NH ^t Pr (159) Boc-Proψ[CONHO]Gly-NHMe (159) Piv-Proψ[CONHO]Gly-NH ^t Pr (160) Piv-Proψ[CONHO]Ala-NH ^t Pr (161) Piv-Proψ[CONHO]Gly-NHMe (161)
<u>Oxime peptides</u>		Pivψ[CH=NO]Gly-NH ^t Pr (157) Pivψ[CH=NO]Gly-NMe ₂ (157)	Boc-Proψ[CH=NO]Gly-NH ^t Pr (162) Boc-Proψ[CH=NO]Gly-OMe (163) Boc-Alaψ[CH=NO]Gly-NH ^t Pr (162) Boc-Proψ[C(Pr)=NO]Gly-NH ^t Pr (164) Boc-Proψ[C(Me)=NO]Gly-NH ^t Pr (163) Piv-Proψ[CH=NO]Gly-NH ^t Pr (164) Piv-Proψ[CH=NO]Gly-OMe (165) Piv-Valψ[CH=NO]Ala-NH ^t Pr (165) Piv-Proψ[C(Pr)=NO]Gly-NH ^t Pr (166)
<u>Amidoxy peptides réduits</u>		Pivψ[CH ₂ NHO]Gly-NH ^t Pr (158)	Boc-Proψ[CH ₂ NHO]Gly-NH ^t Pr (166) Piv-Proψ[CH ₂ NHO]Gly-NH ^t Pr (167) Piv-Proψ[CH ₂ NHO]Gly-OMe (167)

Tableau I-2 : Récapulatif des composés synthétisés et étudiés

(Les nombres entre parenthèses indiquent la page de la partie expérimentale à laquelle le composé est caractérisé)

I-3 : ETUDE STRUCTURALE

I-3-1 : Généralités

a) Notation et description du squelette peptidique :

L'activité biologique des peptides dépend en grande partie de leur structure secondaire. Ce sont les liaisons hydrogène intra et intermoléculaire qui contribuent principalement à cette structuration.

Un certain nombre de conventions ont été établies pour décrire la disposition dans l'espace des atomes constituant les peptides. La formule développée s'écrit en plaçant à gauche l'extrémité *N*-terminale et à droite l'extrémité *C*-terminale. Trois angles dièdres, notés Φ , Ψ et ω permettent de définir complètement la géométrie du squelette peptidique. Ils représentent respectivement les angles de torsion autour des liaisons $N-C^\alpha$, $C^\alpha-CO$, $CO-N$ (Figure I-11). Ils sont comptés positivement lorsque l'observateur, situé du côté *N*-terminal voit la partie *C*-terminale tourner dans le sens des aiguilles d'une montre. L'angle nul correspond à une disposition éclipée des atomes.

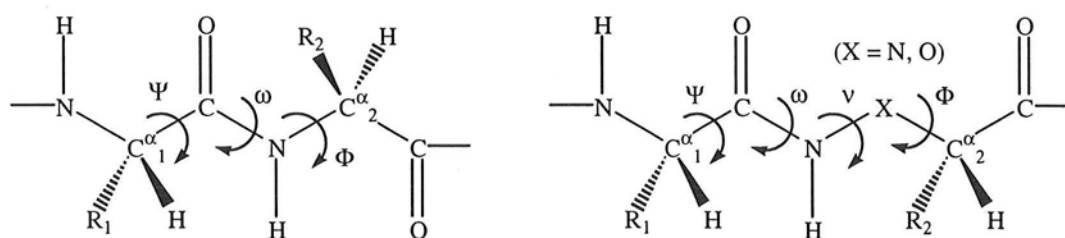


Figure I-11 : Représentation des angles dièdres caractérisant la structure du squelette peptidique et pseudopeptidique

La liaison amide se comporte en effet comme une double liaison. Les six atomes C^α_1 , O, C, N, H et C^α_2 sont sensiblement situés dans un même plan. La valeur de l'angle ω est donc voisine soit de 0° , soit de 180° selon que la liaison peptidique est dite respectivement *cis* ou *trans*. Il faut noter que la forme *trans* est thermodynamiquement favorisée sauf dans le cas où le partenaire *C*-terminal est une proline, un acide aminé *N*-alkylé ou encore un acide aminé cyclique. Pour les motifs amidoxy et hydrazide, nous noterons ν l'angle de torsion autour des liaisons N-O ou $N^\beta-N^\alpha$, la notation Φ correspondant alors aux liaisons O- C^α ou $N^\alpha-C^\alpha$. Enfin,

l'état rotationnel des liaisons $C^\alpha-C^\beta$, $C^\beta-C^\gamma$... des chaînes latérales est désigné par χ_1 , χ_2 ... l'orientation de la chaîne latérale étant définie par rapport à l'atome d'azote du squelette peptidique.

b) Liaisons hydrogène et éléments de structure secondaire :

Une liaison hydrogène s'établit entre un site donneur de proton, un NH amide par exemple, et un site accepteur comme un groupement carbonyle. Dans les peptides, une liaison hydrogène entre le CO d'un résidu i et le NH d'un résidu j se manifeste par une distance $N...O$ comprise entre 2,8 et 3,3 Å et un angle (N-H, O) dont la valeur varie entre -20 et $+20^\circ$. Elle ferme alors un pseudocycle à n atomes, noté C_n , qui caractérise les différents types de structure secondaire (*Figure I-12*).

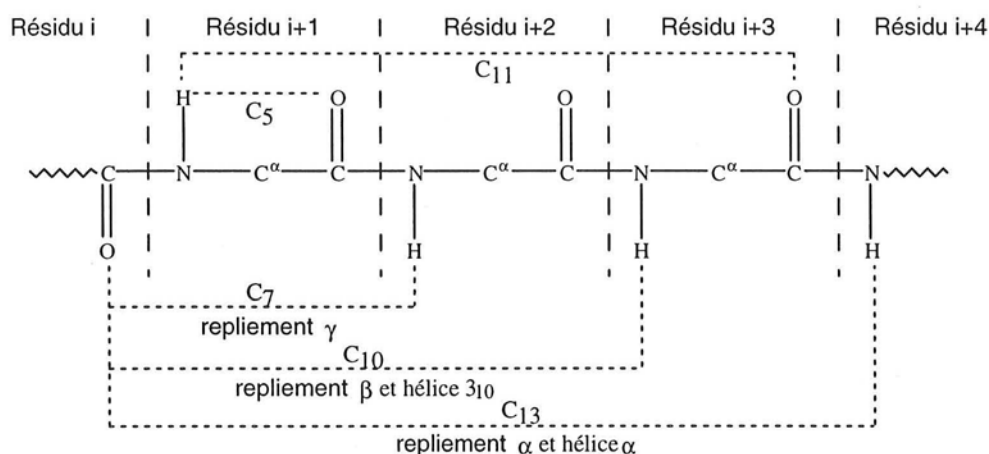


Figure I-12: Représentation des principales interactions à courte distance dans les peptides

Formé par une liaison hydrogène interne à un résidu, le pseudocycle à 5 atomes (C_5) est caractéristique d'une structure étirée.

Le repliement γ est stabilisé par une liaison hydrogène de type $i+2 \rightarrow i$, fermant un pseudocycle à 7 atomes (C_7). Il a été mis en évidence lors d'études de dipeptides en solution (135, 136) et de protéines (137). La chaîne latérale du résidu $i+1$ peut occuper une position pseudo-axiale ou pseudo-équatoriale par rapport au plan moyen du cycle, cette dernière étant la plus stable (*Figure I-13*).

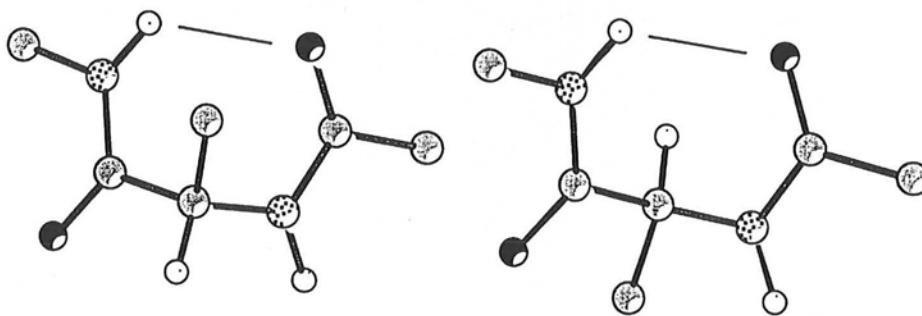


Figure I-13: Repliement γ avec chaîne latérale en position pseudo-axiale (à gauche) et pseudo-équatoriale (à droite)

Une liaison hydrogène entre le CO d'un résidu i et le NH d'un résidu $i+3$, fermant un pseudocycle à 10 atomes (C_{10}), donne naissance à un repliement de type β dont plusieurs familles ont été identifiées (*Figure I-14*) (138). Les principales caractéristiques des différents sous-types connus à ce jour sont rassemblées dans le *tableau I-3*. Par la suite, le terme de repliement β a été étendu à toute forme repliée, stabilisée ou non par liaison hydrogène, dont la distance entre les C^α des résidus i et $i+3$ reste inférieure à 7 Å. Diverses études ont montré que le repliement C_{10} conduit à une conformation très stable du squelette peptidique, fréquemment présente, qui est en particulier responsable de la structure tridimensionnelle des protéines globulaires (139, 140).

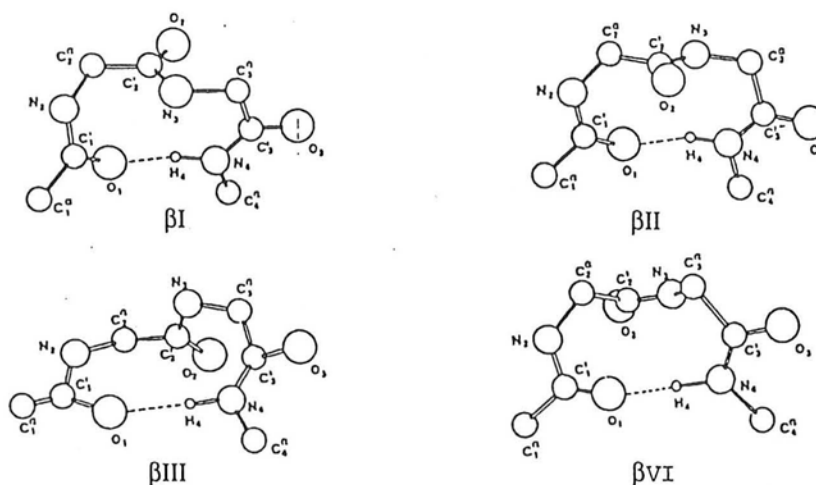


Figure I-14: Repléments de type β

Type de repliement	Résidu i+1		Résidu i+2	
	Φ (°)	Ψ (°)	Φ (°)	Ψ (°)
βI	-60	-30	-90	0
$\beta I'$	60	30	90	0
βII	-60	120	80	0
$\beta II'$	60	-120	-80	0
βIII	-60	-30	-60	-30
βVI ($\omega=0$)	-60	120	-120	60

Tableau I-3: Valeurs des angles de torsion caractéristiques des principaux types de repliement β (la liaison amide entre le résidu i+1 et i+2 (souvent une proline) est de forme cis dans un repliement βVI)

La répétition d'un repliement de type βIII conduit à une hélice, appelée hélice 3_{10} car chaque tour se compose de trois résidus (*Figure I-15*). Cette structure se rencontre principalement dans des peptides trop courts pour adopter une structure en hélice α ou contenant des résidus acide α -aminobutyrique (Aib) (141).

Le repliement α est stabilisé par une liaison hydrogène $i+4 \rightarrow i$ fermant un pseudocycle à 13 atomes (C_{13}). Cette conformation prise isolément se rencontre peu (142). Une succession de ce repliement conduit en revanche à une structure tridimensionnelle très fréquente : l'hélice α (*Figure I-15*). Cette dernière contient 3,6 résidus par tour.

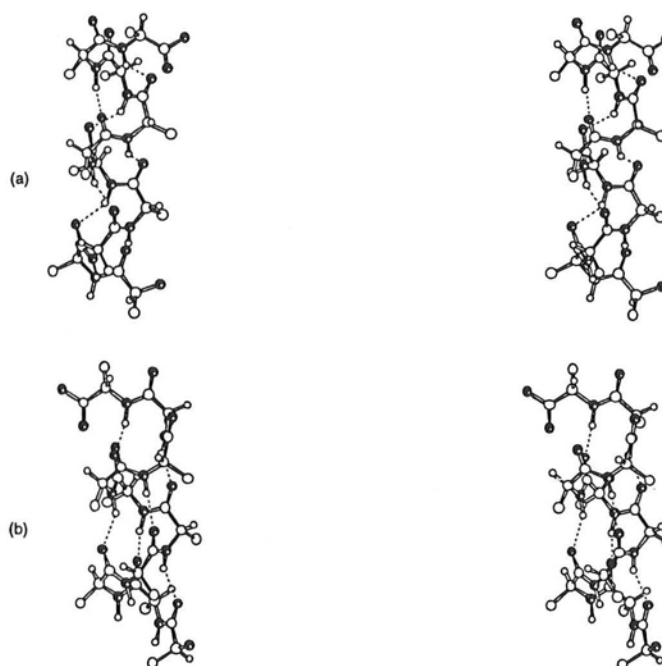


Figure I-15: Représentation stéréoscopique d'une hélice 3_{10} (a) et d'une hélice α (b)

Quand la chaîne peptidique comporte un résidu i aspartique ou asparagine, une liaison hydrogène peut s'établir entre le C=O de la chaîne latérale de ce résidu et le NH amide du résidu i+2 (143). Elle donne alors naissance à un repliement noté Asx, un pseudocycle à 10 atomes (*Figure I-16*). Ce dernier a été mis en évidence au sein de protéines mais aussi de peptides (144, 145). Il faut noter qu'il est compatible avec un repliement β contigu qu'il initie par ailleurs souvent.

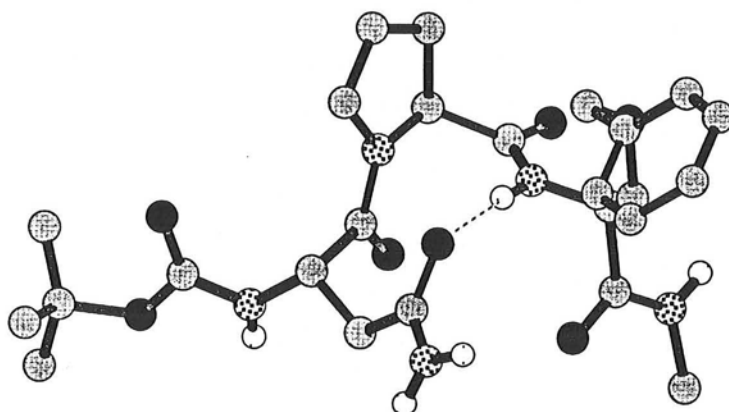


Figure I-16 : Repliement Asx dans la structure cristalline du peptide Boc-Asn-Pro-Ser(Bzl)-NHMe

Enfin, des liaisons hydrogène intramoléculaires peuvent se former à plus longue distance dans l'enchaînement peptidique entre atomes d'oxygène et d'hydrogène amidiques de plusieurs chaînes adjacentes étirées. Cette structure tridimensionnelle porte le nom de feuillet β parallèle, lorsque les chaînes adjacentes sont orientées dans le même sens, et de feuillet β antiparallèle quand elles sont orientées en sens inverse (*Figure I-17*).

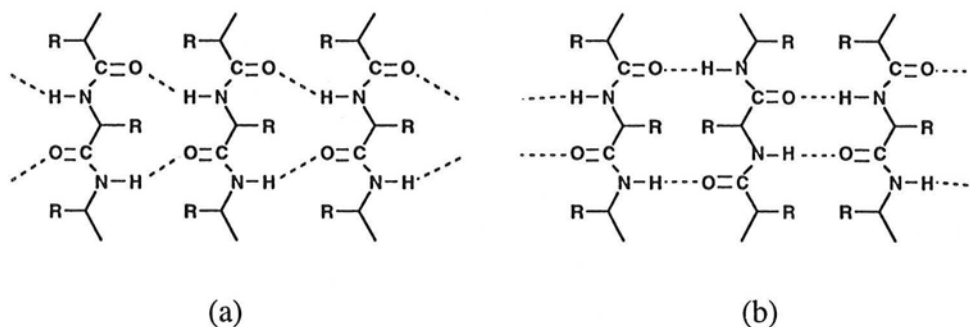


Figure I-17: Feuillet β parallèle (a) et antiparallèle (b)

c) Méthodes et techniques d'étude :

Diverses techniques peuvent être envisagées pour l'étude structurale de peptides de petite taille comme les dipeptides. On en dénombre principalement trois : la diffraction des rayons X, la spectroscopie infrarouge (IR) et RMN.

La diffraction des rayons X est une méthode qui permet d'accéder avec certitude à une conformation privilégiée au sein d'une molécule. Elle fournit des informations sur les paramètres géométriques (longueur et angle des liaisons) et sur la présence d'interactions inter ou intramoléculaires comme les liaisons hydrogène. Cette méthode *a priori* très performante connaît cependant des limites. Son utilisation reste d'abord conditionnée par l'obtention de monocristaux de bonne qualité. Tous les produits ne cristallisent pas et certains demeurent des huiles. Par ailleurs, dans un cristal, les forces d'empilement et de cohésion peuvent s'exercer au détriment des interactions intramoléculaires. La conformation déterminée par radiocristallographie ne correspond donc pas forcément à celle du composé en solution très diluée ou sous sa forme bioactive.

La spectroscopie IR est une technique fondée sur les mouvements de vibration des atomes qui s'accompagnent d'une modification en amplitude ou en direction du moment dipolaire des liaisons et qui sont à l'origine d'une absorption dans le domaine de l'IR. Elle contribue à la caractérisation des produits par l'identification de groupements fonctionnels. L'analyse des composés en solution à des concentrations comprises entre 5 et 10 millimolaires (mM) permet également d'accéder à des informations sur la structure des molécules. L'étude des peptides s'appuie sur les mouvements d'élongation et de déformation des deux vibreurs C=O et N-H du lien amide. Parmi les nombreuses bandes de la liaison amide, nous avons principalement examiné le domaine $3500-3100\text{ cm}^{-1}$ de l'élongation de la liaison N-H, (bande amide A, notée $\nu(\text{N-H})$) et le domaine $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ de l'élongation de la liaison C=O, (bande amide I, notée $\nu(\text{C=O})$). Ces deux vibreurs constituent des sondes spectroscopiques qui permettent de mettre en évidence des liaisons hydrogène intramoléculaires. Ces dernières entraînent en effet une diminution de la fréquence d'absorption des vibreurs concernés. Un échange rapide entre deux conformères dont la durée de vie excède la picoseconde peut être ainsi détecté en IR et se traduit par un éclatement des bandes $\nu(\text{N-H})$ et $\nu(\text{C=O})$. Si la spectroscopie IR apporte de précieuses informations sur la structure des peptides, son champ d'application est restreint par diverses difficultés. Il convient de choisir un solvant qui n'absorbe pas dans les zones du spectre étudiées et dans lequel les produits à analyser sont solubles. Nous avons réalisé nos spectres dans deux solvants : le DCM, au pouvoir solvant compatible avec la présence de liaisons hydrogène intramoléculaires, et le DMSO dans lequel

seule les fortes interactions demeurent. Ce dernier est un solvant très hygroscopique pour lequel il est difficile d'évaluer la quantité d'eau absorbée. Les corrections effectuées ne permettent pas toujours d'obtenir des spectres de bonne qualité dans le domaine $3500\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$. Il faut ensuite s'assurer qu'à la concentration choisie dans un milieu donné le produit étudié ne s'auto-associe pas. L'interprétation des spectres n'est pas immédiate. L'attribution des bandes nécessite parfois la synthèse de plusieurs composés obtenus en faisant varier la nature chimique des substituants adjacents aux vibreurs dont on cherche à déterminer la fréquence d'absorption. La multiplication du nombre d'oscillateurs complique rapidement le traitement des spectres : l'étude IR n'est plus guère applicable à des peptides de plus de trois résidus, surtout dans le cas d'équilibre conformationnel. Il faut enfin remarquer que certains phénomènes comme des résonances de Fermi font apparaître des bandes supplémentaires qui ne doivent pas être prises en compte.

La RMN est certainement la technique la plus utilisée et celle qui a connu, ces dernières années, le plus fort développement pour la caractérisation et l'étude structurale des molécules. Les moments magnétiques de spin non nul des noyaux atomiques placés dans un champ magnétique intense et homogène subissent un mouvement de rotation, appelé précession. Chaque noyau peut alors absorber des radiations de fréquence radio caractéristique, dont la valeur dépend de son environnement électronique. Les informations sur la structure des molécules sont apportées par la mesure des déplacements chimiques, sensibles à la présence de liaisons hydrogène et la solvation, mais également par la mesure des constantes de couplage, qui dépendent des angles de torsion autour des liaisons, et enfin par les effets Overhauser nucléaires. Ces derniers signalent la présence de deux protons dont la distance à travers l'espace est inférieure à 4 Å . Les expériences de RMN à deux dimensions (voir II-3-2-a) n'ont pas été mises en œuvre pour l'étude structurale des dipeptides. La recherche des liaisons hydrogène en RMN se fait indirectement en évaluant la sensibilité au solvant des protons amide NH. Deux méthodes sont principalement utilisées : les effets de température et les effets de solvant. Cette dernière méthode consiste à réaliser une série d'expériences en maintenant la concentration en produit à étudier constante mais en faisant varier la composition du solvant. Nous avons utilisé des mélanges de chloroforme deutérié (CDCl_3) et de DMSO deutérié ($\text{DMSO-}d_6$). Quand la proportion de $\text{DMSO-}d_6$ augmente, la polarité du milieu croît également. Les NH libres, très accessibles au solvant, sont alors fortement solvatés dès qu'apparaissent des traces de $\text{DMSO-}d_6$; leurs signaux en RMN glissent rapidement et notablement vers les champs faibles (valeur élevée des déplacements chimiques). Les protons engagés dans une liaison hydrogène forte qui subsiste dans le $\text{DMSO-}d_6$ sont insensibles à la solvation : leurs signaux n'évoluent pas. Un NH engagé dans

une liaison hydrogène faible rompue par le DMSO- d_6 a un comportement intermédiaire : le signal commence à se déplacer quand la proportion de DMSO- d_6 devient importante. Il faut signaler le cas particulier qui se rencontre rarement où un proton NH possède un déplacement chimique sensiblement équivalent engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire ou solvaté. Un proton dont le déplacement chimique est indépendant de la composition du solvant n'est donc pas forcément engagé dans une liaison hydrogène forte qui subsiste dans le DMSO- d_6 . Enfin, à la différence de l'IR, la RMN ne permet pas de mettre en évidence des équilibres rapides. Pour une vitesse d'échange inférieure à la milliseconde, le signal observé est un signal moyenné, pondéré par les pourcentages des différents conformères.

I-3-2 : Structure des amidoxy peptides

Nous avons tenté de déterminer la structure des dipeptides $R\text{-CO-Pro}[\text{CO-NH-O}]\text{Xaa-NHR'}$ (avec Xaa = Gly, Ala ; $R = \text{'Bu}$ ou O'Bu ; $R' = \text{Me}$ ou 'Pr). L'enchaînement Pro-Gly est connu pour favoriser les repliements de type β , comme par exemple, dans le dipeptide Piv-Pro-Gly-NHMe (135). Le groupement NH'Pr terminal constitue l'amorce d'un résidu supplémentaire. Il a été très utilisé au laboratoire ; il nous permet donc de disposer d'un grand nombre de données comparatives. La substitution du groupement Boc par un groupement Piv supprime l'isomérisie cis/trans de la liaison Boc-Pro souvent observée. De plus, l'introduction d'un groupe pivaloyl permet souvent l'obtention plus aisée de monocristaux.

Avant l'étude structurale des dipeptides proprement dites, nous avons analysé des composés plus simples de la forme $R\text{-CO}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Xaa-NHR'}$ et de la forme $R\text{-CO-Pro-N(R'')-OMe}$ (avec Xaa = Gly, Ala ; $R = \text{'Bu}$ ou O'Bu ; $R' = \text{Me}$ ou 'Pr ; $R'' = \text{H}$ ou Me).

a) Etude des composés $R\text{-CO}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Xaa-NHR'}$ (avec Xaa = Gly ou Ala ; $R = \text{'Bu}$ ou O'Bu ; $R' = \text{Me}$ ou 'Pr) :

Une étude par radiocristallographie a pu être réalisée sur le monopeptide $\text{Boc}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NH'Pr}$ (Figure I-18). Deux conformères, de structure très voisine, sont présents par maille. Un pseudorepliement γ est stabilisé par une liaison hydrogène intramoléculaire bifide entre le NH'Pr amide et à la fois le carbonyle (C_8) et l'oxygène sp^3 du lien amidoxy (C_5). Le BocNH d'un conformère interagit par ailleurs avec le CONH'Pr de l'autre et *vice versa*.

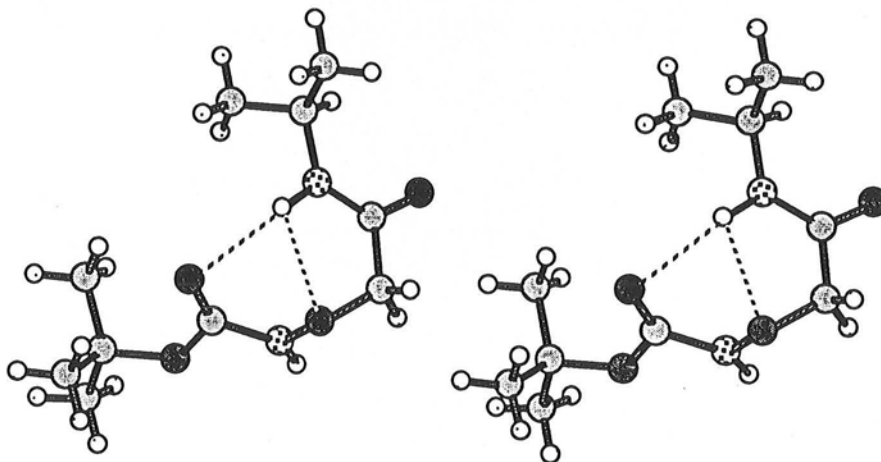


Figure I-18: Vues stéréoscopiques de la structure moléculaire d'un des deux conformères présents dans le cristal de Bocψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr

Le spectre IR dans le DCM de Bocψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr entre 3500 et 3100 cm⁻¹ présente deux bandes : l'une à 3418 cm⁻¹ de faible intensité, et l'autre à 3339 cm⁻¹ large et dissymétrique, résultant de la superposition d'au moins deux signaux (*Figure I-19*). Sur le spectre du composé Bocψ[CO-NH-O]Gly-NHMe, la bande de faible intensité se retrouve vers 3441 cm⁻¹ et l'allure de la bande large est modifiée (*Figure I-19*). Il est donc possible d'attribuer deux bandes au groupement fonctionnel NHR' (avec R' = Me ou ⁱPr) : celle aux environs de 3400 cm⁻¹ correspondant au vibreur libre et celle aux alentours de 3340 cm⁻¹ au vibreur engagé dans une liaison hydrogène. A cette dernière, se superpose la bande d'absorption du NHO amidoxy. L'équilibre conformationnel ainsi mis en évidence est fortement déplacé en faveur de la forme repliée.

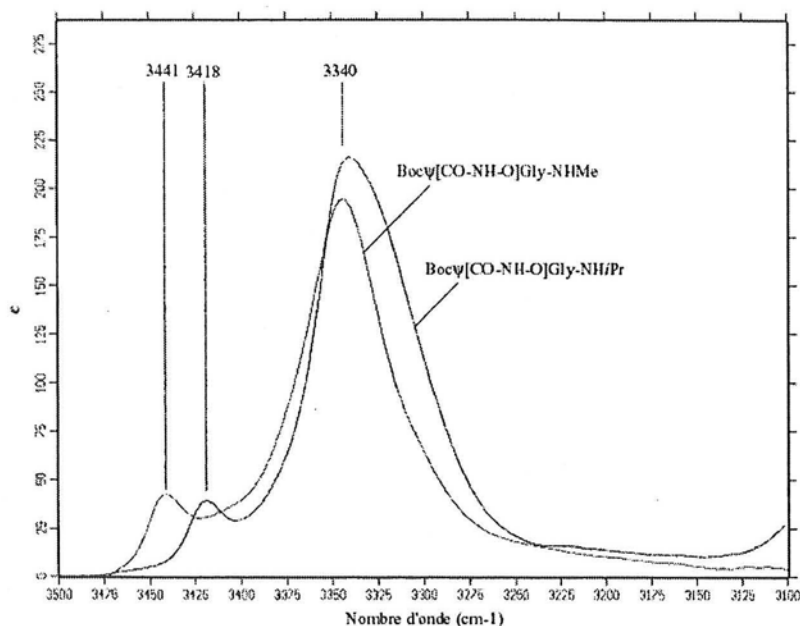


Figure I-19 : Domaine 3500-3100 cm⁻¹ du spectre IR dans le DCM de Bocψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr et de Bocψ[CO-NH-O]Gly-NHMe

Nous avons également cherché à identifier par IR l'accepteur de proton. Dans le domaine 1800-1500 cm^{-1} , nous observons deux bandes amide I à 1740 et vers 1670 cm^{-1} . Pour identifier la fréquence d'absorption du Boc, nous avons réalisé le spectre du dérivé $\text{Piv}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NHMe}$. La bande à 1740 cm^{-1} glisse vers 1677 cm^{-1} . On peut donc attribuer au Boc la fréquence d'absorption de 1740 cm^{-1} et au groupement CONHMe la valeur 1677 cm^{-1} (1669 cm^{-1} pour CONH^iPr). Dans le DMSO, nous ne constatons pas d'éclatement de la bande correspondant au CONHR' (avec $\text{R}' = \text{Me}$ ou ^iPr), éclatement qui s'expliquerait par l'orientation syn ou anti du carbonyle par rapport à l'hétéroatome en β , l'atome d'oxygène et qui caractérise une structure étirée. Cela signifie que l'interaction forte dans laquelle le NHR' est engagé subsiste dans le DMSO. Nous ne remarquons également pas de remontée de la fréquence du Boc dans le DMSO. On ne peut cependant pas conclure que le carbonyle du Boc n'est pas engagé dans la liaison hydrogène et que seul l'oxygène sp^3 du lien amidoxy est l'accepteur de proton. En effet, dans le DCM, la fréquence du vibreur NHMe lié est de 3306 cm^{-1} pour le dérivé pivaloylé contre 3344 cm^{-1} pour le dérivé Boc. La basicité plus marquée du Piv par rapport au Boc influe sur la force de la liaison hydrogène. Les résultats de l'étude IR sont rassemblés dans le *tableau I-4*. Il faut également remarquer que les spectres des composés $\text{Boc}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ et $\text{Boc}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Ala-NH}^i\text{Pr}$ sont similaires.

(R' = Me ou ^iPr)	NH (en cm^{-1})				CO (en cm^{-1})			
	NHO		NHR'		Boc/Piv		CONHR'	
	DCM	DMSO	DCM	DMSO	DCM	DMSO	DCM	DMSO
$\text{Boc}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$	3339	3150	3418 ^f (libre) / 3339 ^F (lié)	3289	1739	1723	1669	1668
$\text{Boc}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Ala-NH}^i\text{Pr}$	3342	3135	3418 ^f (libre) / 3342 ^F (lié)	3314	1740	1723	1666	1666
$\text{Boc}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NHMe}$	3344	3136	3441 ^f (libre) / 3344 ^F (lié)	3309	1739	1732	1677	1674
$\text{Piv}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NHMe}$	3388	3185	3443 ^f (libre) / 3306 ^F (lié)	3276	1677	1675	1677	1675

Tableau I-4: Fréquence d'absorption IR des mono-peptides de la forme $\text{R-CO}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Xaa-NHR}'$ (avec Xaa = Gly, Ala ; R = ^iBu ou O^iBu ; R' = Me ou ^iPr) (intensité : ^f = faible, ^F = forte)

En RMN, l'effet de solvant réalisé sur le composé $\text{Boc}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ vient confirmer les résultats de l'étude par IR (Figure I-20). En effet, le proton NH-O amidoxy est très sensible au solvant et glisse fortement de 2,92 ppm. Le déplacement chimique du NH^iPr est en revanche constant caractérisant une liaison hydrogène forte qui subsiste dans le $\text{DMSO-}d_6$. On peut enfin comparer le comportement du NH^iPr dans les produits $\text{Boc}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ et $\text{MeO-CH}_2\text{-CO-NH}^i\text{Pr}$ (Figure I-20). Pour ce dernier, la sensibilité au solvant est plus grande : on observe en effet un glissement à partir de 10 % de $\text{DMSO-}d_6$. L'oxygène sp^3 amidoxy n'est donc pas le seul accepteur de proton. L'interaction conjuguée du carbonyle amidoxy et de l'oxygène sp^3 avec le NH^iPr confère une grande stabilité au pseudorepliement γ qui a ainsi pu être observé à l'état solide par radiocristallographie.

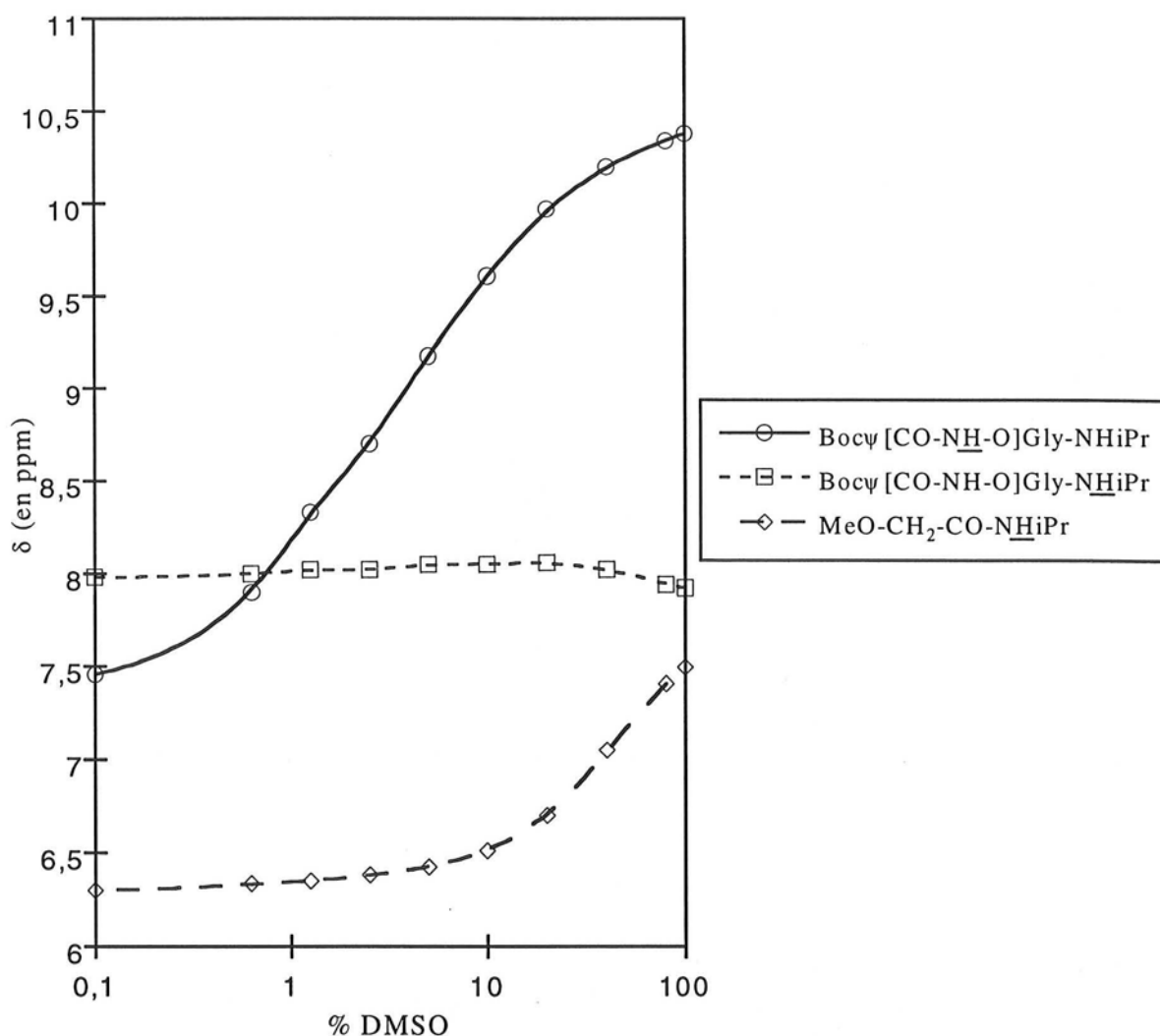


Figure I-20 : Effet de solvant de $\text{Boc}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ et $\text{MeO-CH}_2\text{-CO-NH}^i\text{Pr}$

b) Etude des composés R-CO-Pro-N(R'')-OMe (avec R = ^tBu ou O^tBu ;
R'' = H ou Me) :

Le spectre du composé Boc-Pro-NH-OMe dans le DCM est constitué entre 3500 et 3100 cm⁻¹ de deux bandes d'intensité quasi égale : l'une fine à 3392 cm⁻¹ correspondant au vibreur NH libre et une large à 3255 cm⁻¹ correspondant au vibreur NH lié (*Figure I-21*). Boc-Pro-NH-OMe donne lieu à un équilibre conformationnel entre une forme étirée et une forme repliée. Le spectre du dérivé pivaloylé dans le domaine des NH est similaire.

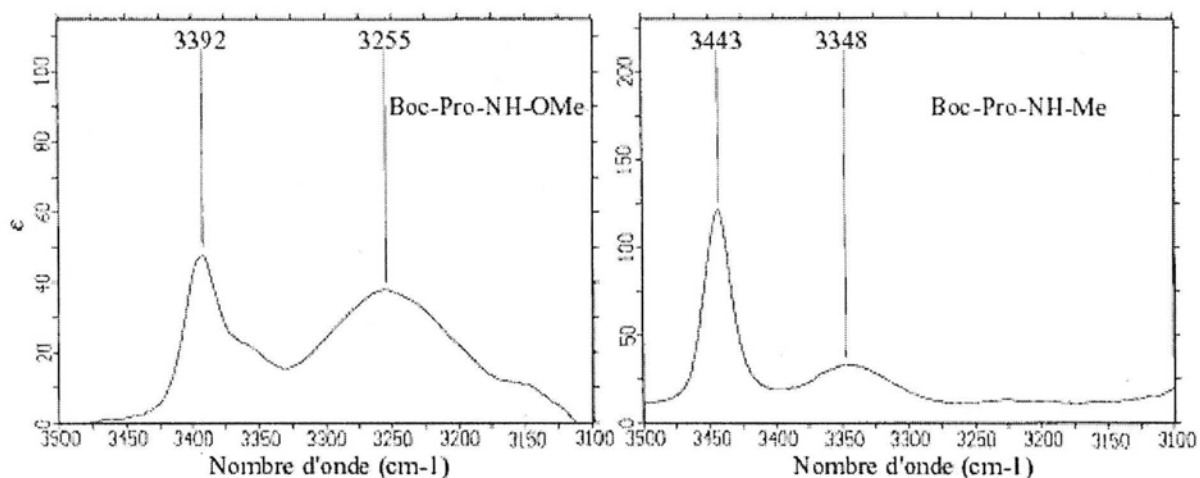


Figure I-21 : Bandes amide A de Boc-Pro-NH-OMe et Boc-Pro-NH-Me dans le DCM

La bande amide I du composé Boc-Pro-NH-OMe à 1696 cm⁻¹, dans le DCM, présente un épaulement à 1669 cm⁻¹. Ce dernier disparaît sur le spectre de Piv-Pro-NH-OMe, remplacé par un pic à 1605 cm⁻¹, tandis que la bande à 1698 cm⁻¹ subsiste. Cet épaulement à 1669 cm⁻¹ peut donc être attribué au CO(Boc). Quant au vibreur CONHO, il absorbe vers 1696 cm⁻¹. Dans le DMSO, la fréquence du CO(Boc) remonte vers 1693 cm⁻¹, soit une différence de 24 cm⁻¹. Le spectre ne présente alors qu'une seule bande dissymétrique (*Figure I-22*).

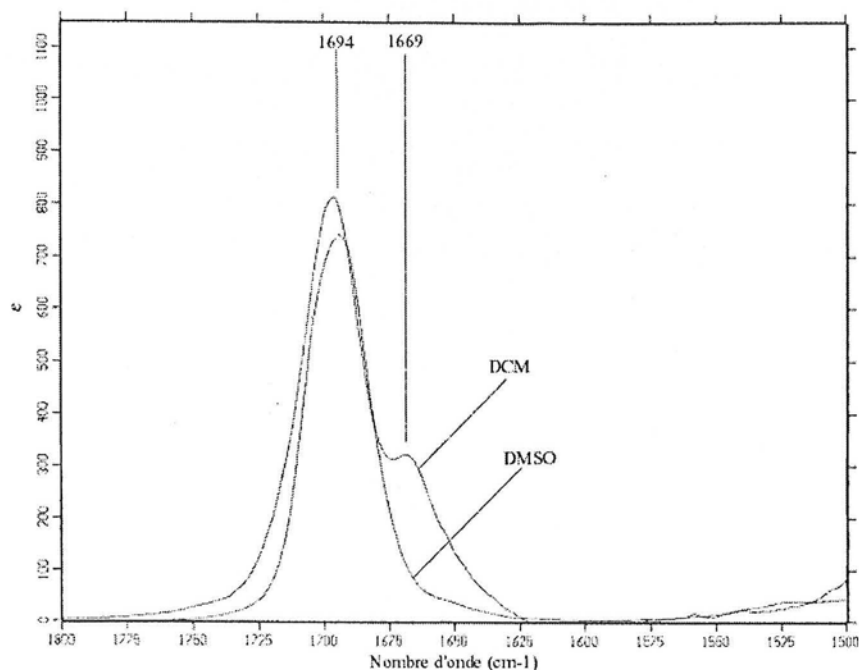


Figure I-22 : Bandes amide I du dérivé Boc-Pro-NH-OMe dans le DCM et le DMSO

Le pic du groupement pivaloyle glisse également dans le DMSO avec une augmentation de 14 cm^{-1} . Une liaison hydrogène faible entre le carbonyle Boc ou Piv et le NHO amidoxy ferme un pseudocycle à 7 atomes stabilisant ainsi un repliement γ . Ce résultat a été confirmé par l'étude des amides de Weinreb R-CO-Pro-N(Me)-OMe (avec R = t Bu ou O^t Bu) qui ne possèdent pas de proton. Le vibreur CO(Boc) absorbe donc autour de 1691 cm^{-1} dans le DCM comme dans le DMSO. Aucun abaissement de fréquence du Boc et du Piv n'a ainsi été constaté avec un azote amidoxy *N*-méthylé. Les résultats de l'étude IR des composés R-CO-Pro-N(R'')-OMe (avec R = t Bu ou O^t Bu ; R'' = H ou Me) sont rassemblés dans le *tableau I-5*.

	NH (en cm^{-1})		CO (en cm^{-1})			
	<u>NHO</u>		Boc/Piv		<u>CONHO</u>	
	DCM	DMSO	DCM	DMSO	DCM	DMSO
Boc-Pro-NH-OMe	3392 ^m (libre) / 3255 ^m (lié)	3173	1669	1693	1696	1693
Boc-Pro-NMe-OMe			1691	1693	1667	1667
Piv-Pro-NH-OMe	3389 ^m (libre) / 3232 ^m (lié)	3175	1605	1619	1698	1699
Piv-Pro-NMe-OMe			1613	1616	1667	1667

Tableau I-5: Fréquence d'absorption IR des mono-peptides de la forme R-CO-Pro-N(R'')-OMe (avec R = t Bu ou O^t Bu ; R'' = H ou Me)

La RMN met en évidence un équilibre conformationnel lent du composé Boc-Pro-NH-OMe : une isomérisie cis/trans de la liaison Boc-Pro. Les deux signaux NH se comportent différemment vis à vis de la solvation. L'un d'entre eux glisse fortement quand la proportion en DMSO- d_6 augmente. Ce NH peut être attribué à la forme cis, incompatible avec le repliement. Le déplacement chimique du NH trans reste constant avant de croître à partir de 10 % de DMSO- d_6 confirmant ainsi la présence d'une liaison hydrogène faible rompue par le DMSO- d_6 (Figure I-23). Il faut enfin noter que la proportion de forme cis, de faible dans le DCM, atteint environ 70 % dans le DMSO- d_6 , l'équiproportionalité se situant aux alentours de 10 % de DMSO- d_6 .

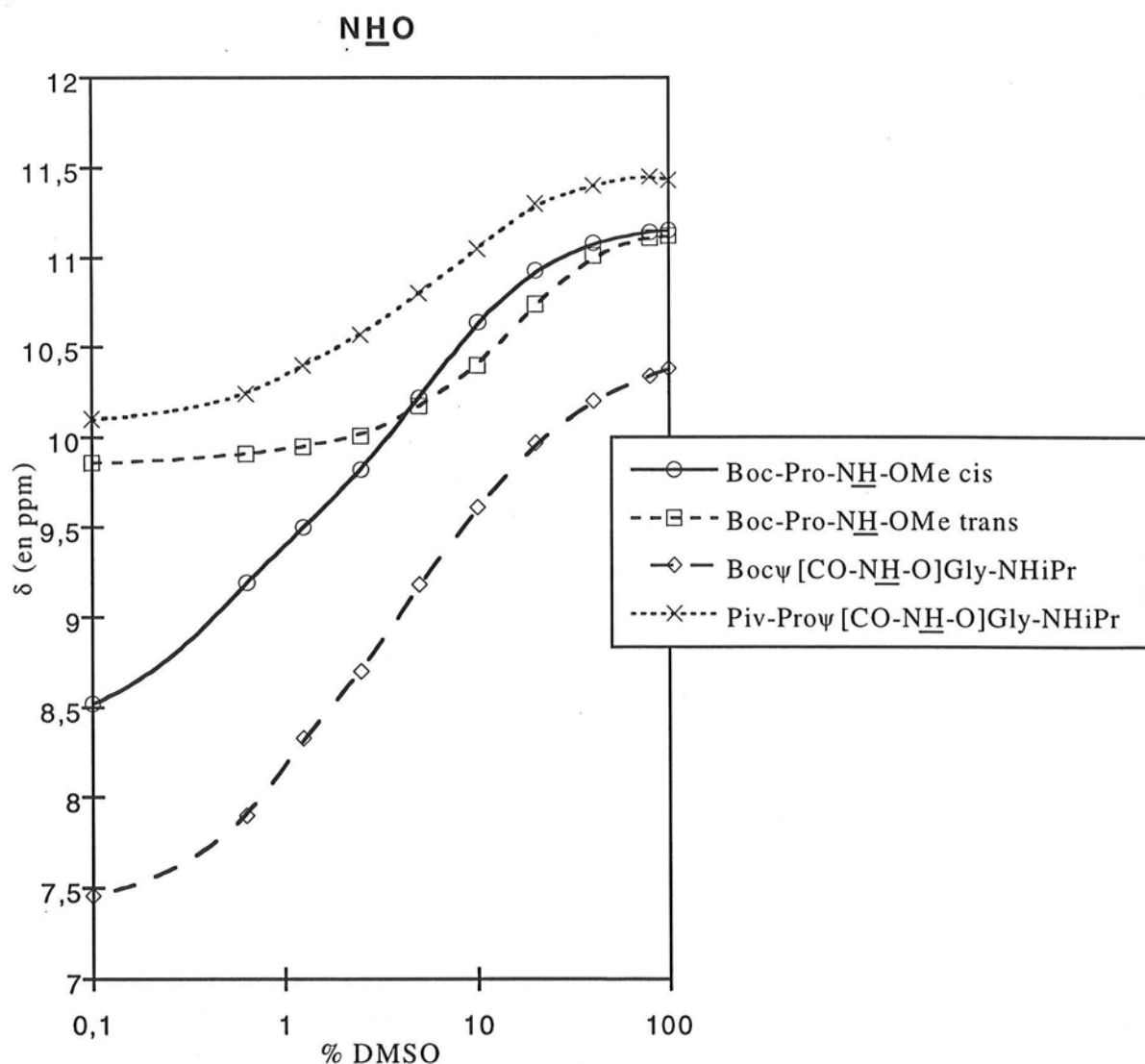


Figure I-23 : Effet de solvant des protons amidoxo $\underline{\text{NH}}$ O des composés Bocψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr, Boc-Pro-NH-OMe et Piv-Proψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr

RMN et IR ont donc mis en évidence un repliement γ (C_7) stabilisé par une liaison hydrogène intramoléculaire entre le proton amidoxo et les groupements Boc ou Piv qui ne subsiste pas dans le DMSO.

c) Etude des dipeptides $R\text{-CO-Pro}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Xaa-NH}^i\text{Pr}$ (avec Xaa = Gly ou Ala ; $R = ^i\text{Bu}$ ou O^iBu ; $R' = \text{Me}$ ou ^iPr) :

Le spectre IR dans le DCM du composé $\text{Boc-Pro}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ entre 3500 et 3100 cm^{-1} est la superposition des spectres des deux mono-peptides Boc-Pro-NH-OMe et $\text{Boc}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ (Figure I-24). On peut, en effet, identifier quatre bandes : le pic fin de faible intensité à 3416 cm^{-1} correspondant au vibreur NH^iPr libre, la bande large intense à 3304 cm^{-1} du NH^iPr lié et les deux bandes d'intensité moyenne à 3350 et 3230 cm^{-1} correspondant au vibreur NHO respectivement libre et lié.

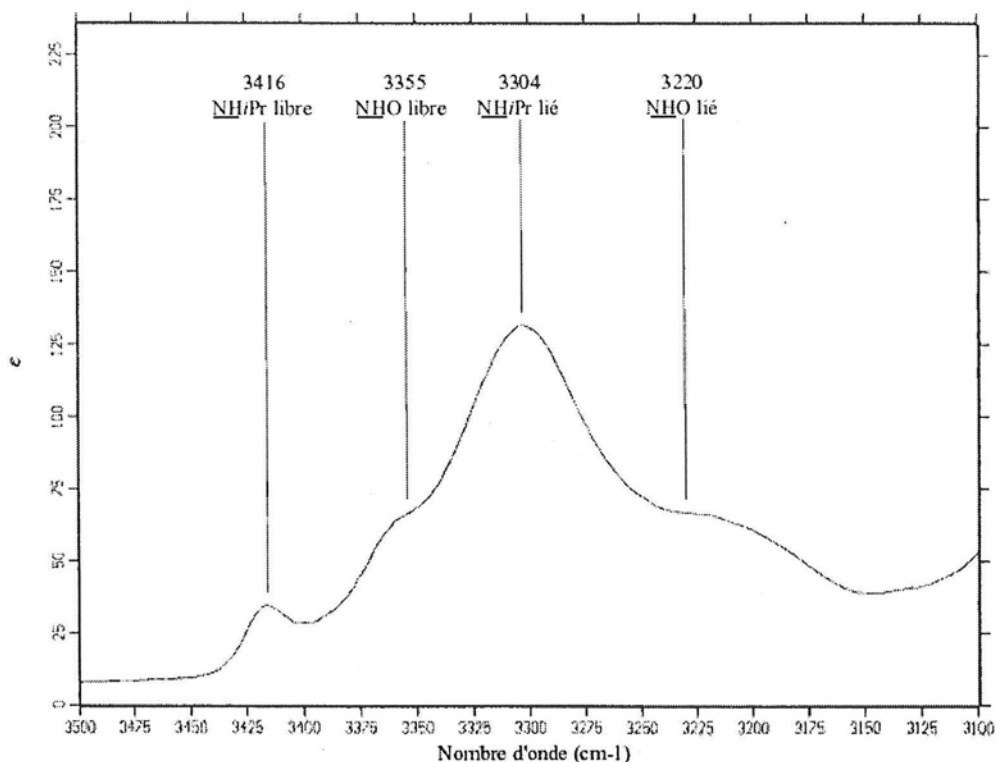


Figure I-24 : Bandes amide A du dérivé $\text{Boc-Pro}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ dans le DCM

Dans le domaine des carbonyles, le spectre de $\text{Boc-Pro}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ dans le DCM présente deux bandes amide I. La bande à 1668 cm^{-1} a été attribuée lors de l'étude du mono-peptide $\text{Boc}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ à l'oscillateur CONH^iPr . Ce résultat est confirmé par le glissement de ce pic à 1677 cm^{-1} lorsque l'on substitue le groupement isopropyle par un groupement méthyle. Le spectre du composé Boc-Pro-NH-OMe a permis de déterminer la

fréquence d'absorption du CO amidoxy : vers 1697 cm^{-1} . Quant au groupement Boc ou Piv, on retrouve également les valeurs déterminées sur les spectres des mono-peptides R-CO-Pro-NH-OMe (avec R = t Bu ou i Bu) avec l'abaissement de fréquence d'environ 20 cm^{-1} dans le DCM. Les résultats de l'IR ont été rassemblés dans le *tableau I-6*. Les résultats obtenus sont cohérents.

Nous avons comparé par RMN la sensibilité au solvant du proton amidoxy NHO dans les composés Boc ψ [CO-NH-O]Gly-NH i Pr, Boc-Pro-NH-OMe et Piv-Pro ψ [CO-NH-O]Gly-NH i Pr (*Figure I-23*). L'évolution du déplacement chimique du NHO du dipeptide est parallèle à celle de la forme trans du mono-peptide Boc-Pro-NH-OMe. De même, l'inaccessibilité au solvant du proton amide NH i Pr est similaire dans le dipeptide et le composé Boc ψ [CO-NH-O]Gly-NH i Pr (*Figure I-25*).

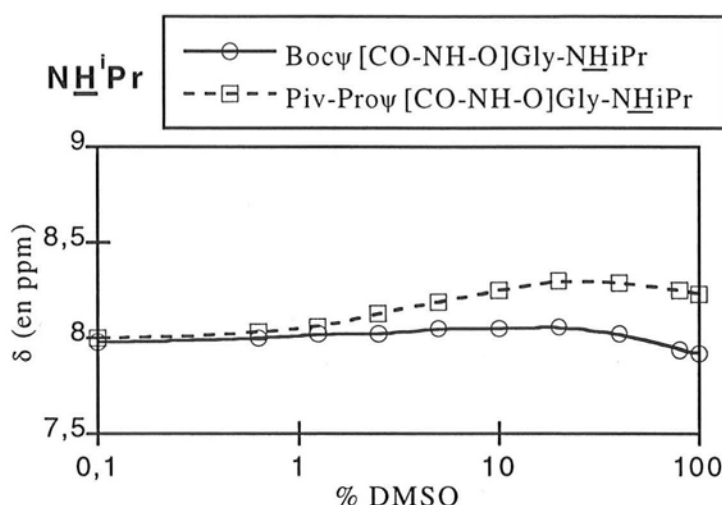


Figure I-25 : Effet de solvant des protons amide NH^iPr des composés Boc ψ [CO-NH-O]Gly-NH i Pr et Piv-Pro ψ [CO-NH-O]Gly-NH i Pr

Les résultats de l'IR et de la RMN montrent que la structure des amidoxy dipeptides étudiés comporte deux repliements. Un pseudorepliement γ est fortement stabilisé par une liaison hydrogène bifide entre le proton amide C-terminal et à la fois le carbonyle (C_8) et l'oxygène sp^3 (C_5) du lien amidoxy. A l'extrémité N-terminale, le proton amidoxy interagit avec le carbonyle du Boc ou du Piv pour former un repliement γ (C_7). L'insertion d'un atome d'oxygène supplémentaire dans le squelette peptidique modifie fondamentalement la structure des dipeptides : le repliement β présent dans des molécules du type Piv-Pro-Gly-NHMe est remplacé par deux repliements γ et pseudo γ (*Figure I-26*). Il faut également noter que les deux parties de la molécule semblent se structurer indépendamment l'une de l'autre.

(R' = ⁱ Pr ou Me)	NH (en cm ⁻¹)				CO (en cm ⁻¹)					
	<u>NHO</u>		<u>NHR'</u>		Boc/Piv		<u>CONHO</u>		<u>CONHR'</u>	
	DCM	DMSO	DCM	DMSO	DCM	DMSO	DCM	DMSO	DCM	DMSO
Boc-Proψ[CO-NH-O]Gly-NH ⁱ Pr	3355 ^m (libre) / 3220 ^m (lié)	3155	3416 ^f (libre) / 3304 ^F (lié)	3271	1668	1692	1697	1692	1668	1670
Boc-Proψ[CO-NH-O]Ala-NH ⁱ Pr	3350 ^m (libre) / 3240 ^m (lié)	3149	3417 ^f (libre) / 3313 ^F (lié)	3273	1667	1692	1694	1692	1667	1670
Boc-Proψ[CO-NH-O]Gly-NHMe	3350 ^m (libre) / 3233 ^m (lié)	3148	3441 ^f (libre) / 3319 ^F (lié)	3282	1676	1691	1695	1691	1676	1680
Piv-Proψ[CO-NH-O]Gly-NH ⁱ Pr	3335 ^m (libre) / 3215 ^m (lié)	3156	3415 ^f (libre) / 3304 ^F (lié)	3271	1600	1620	1696	1690	1668	1667
Piv-Proψ[CO-NH-O]Ala-NH ⁱ Pr	3350 ^m (libre) / 3226 ^m (lié)	3154	3416 ^f (libre) / 3315 ^F (lié)	3272	1601	1620	1689	1690	1667	1665
Piv-Proψ[CO-NH-O]Gly-NHMe	3350 ^m (libre) / 3225 ^m (lié)	3137	3440 ^f (libre) / 3322 ^F (lié) ^F	3296	1602	1619	1690	1690	1677	1675

Tableau I-6 : Fréquence d'absorption IR des dipeptides de la forme R-CO-Proψ[CO-NH-O]Xaa-NHR'

(avec R = ⁱBu ou OⁱBu ; Xaa = Gly ou Ala ; R' = Me ou ⁱPr)

(intensité : ^f = faible, ^F = forte, ^m = moyenne)

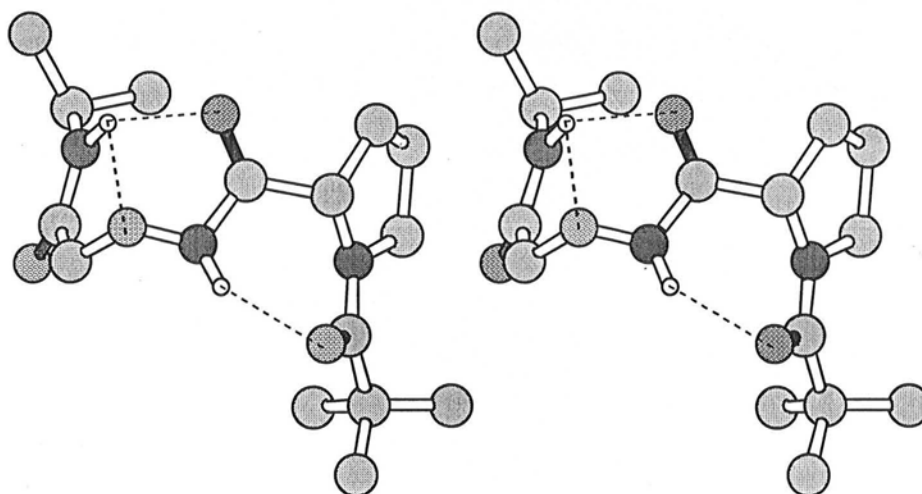


Figure I-26 : Vues stéréoscopiques d'une conformation obtenue par modélisation moléculaire (MOPAC) du composé Piv-Proψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr

I-3-3 : Discussion

a) Comparaison avec les résultats de la littérature :

Parallèlement à notre travail, une étude structurale sur les amidoxy peptides a été menée par Yang *et coll.* Ces derniers se sont intéressés à cette famille de pseudopeptides espérant, en remplaçant le CH₂ d'un acide β-aminé par un atome d'oxygène, conserver les propriétés biologiques de résistance aux protéases tout en rigidifiant la structure. Leur travail a principalement consisté dans un premier temps à mettre en évidence le pseudorepliement γ par RMN et IR. Ils ont en particulier analysé le composé Pivψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱBu. Le spectre IR dans le domaine des NH et dans le DCM est similaire à celui que nous avons obtenu avec le dérivé Pivψ[CO-NH-O]Gly-NHMe. Il en est de même pour le déplacement chimique des deux protons en RMN (*Tableau I-7*) (146).

(R' = ^t Bu ou Me)	Fréquence d'absorption IR (en cm ⁻¹)		RMN ¹ H dans CD ₂ Cl ₂ ⁽¹⁾ ou CDCl ₃ ⁽²⁾ δ(en ppm)	
	<u>NHO</u>	<u>NHR'</u>	<u>NHO</u>	<u>NHR'</u>
Pivψ[CO-NH-O]Gly-NH ^t Bu ⁽¹⁾ (146)	3384	3427 (libre) / 3294 (lié)	8,63	8,28
Pivψ[CO-NH-O]Gly-NHMe ⁽²⁾	3388	3443 (libre) / 3306 (lié)	8,78	8,40

Tableau I-7: Données IR et RMN comparées des composés Pivψ[CO-NH-O]Gly-NH^tBu et Pivψ[CO-NH-O]Gly-NHMe

Par ailleurs, la conformation de plus basse énergie du composé Acψ[CO-NH-O]Gly-NH₂, où Ac désigne le groupement acétyle (CH₃CO-), obtenue par modélisation moléculaire et proposée par Yang *et coll.*, est voisine de celle de Bocψ[CO-NH-O]Gly-NH^tPr déterminée par radiocristallographie (Tableau I-8) (148).

	Boc / Pro (°)	-NH-O-C [*] -CO- / -N ^β H-N ^α H-C [*] -CO- (°)			
	ω ₁	ν ₂	Φ ₂	Ψ ₂	ω ₂
Bocψ[CO-NH-O]Gly-NH ^t Pr (a)	-162	-135	74	18	176
Bocψ[CO-NH-O]Gly-NH ^t Pr (b)	-158	-128	89	-5	-179
Acψ[CO-NH-O]Gly-NH ₂		-127,5	83	13	
Piv-Proψ[CO-NH-NH]Ala-NH ^t Pr	-172	-116	87	12	180

*Tableau I-8: Valeurs des angles de torsion des liaisons dans les structures cristallines de Bocψ[CO-NH-O]Gly-NH^tPr (conformère **a** et **b**), de Piv-Proψ[CO-NH-NH]Ala-NH^tPr et dans la structure de Acψ[CO-NH-O]Gly-NH₂ obtenue par modélisation moléculaire*

L'interprétation de ces résultats diffère cependant. En effet, la liaison hydrogène intramoléculaire stabilisant le pseudorepliement γ est décrite par Yang *et coll* avec le carbonyle amidoxy comme seul accepteur de proton. Ils ont envisagé une interaction avec le seul oxygène sp³. Le conformère C₅ obtenu par modélisation moléculaire a été écarté car de plus haute énergie. Ils justifient la grande stabilité du repliement C₈ par un angle dièdre O-C^α-C(sp²)-N voisin de 0°, par l'effet électronique inductif attracteur de l'atome d'oxygène sp³ et par la rigidité de la liaison N-O. Nous pensons que le pseudorepliement γ est favorisé par le caractère bifide de la liaison hydrogène, les pseudocycles C₅ et C₈ étant simultanément

présents. Nos résultats RMN et IR ont en effet montré la double interaction avec le carbonyle et l'oxygène sp^3 de la liaison amidoxy. C'est, par ailleurs, cette dernière qui peut expliquer la valeur proche de 0° de l'angle dièdre $O-C^\alpha-C(sp^2)-N$.

Yang *et coll.* ont synthétisé des polyamidoxy peptides. L'établissement d'une succession de liaisons hydrogène entre les résidus aminoxy, chacune fermant un pseudocycle à 8 atomes aboutit à un nouveau type d'hélice, appelé hélice $1,8_8$, contenant 1,8 résidus par tour (147). A la différence de Yang *et coll.*, nous nous sommes intéressé aux modifications structurales, sur le peptide dans son ensemble, qu'entraîne l'introduction d'un seul motif amidoxy. Nous avons ainsi mis en évidence un repliement γ avec la participation du $NH\cdots O$. L'effet inductif attracteur auquel font allusion Yang *et coll.* accroît l'acidité du proton amidoxy. Quand, en IR, on compare les bandes amide A des composés Boc-Pro-NHMe et Boc-Pro-NH-OMe dans le DCM, on constate que le pourcentage de forme repliée est nettement plus important dans le cas du dérivé amidoxy (Figure I-21). Il est cependant possible que ce repliement γ observé dans des dipeptides, moins stable que le conformère C_8 , ne subsiste pas dans des peptides de plus grande taille.

b) Comparaison entre amidoxy et hydrazide peptide :

Nous avons également comparé la structure des amidoxy et celle des hydrazide peptides. Nous pouvons en premier lieu comparer les structures cristallines. Le pseudorepliement γ stabilisé par la liaison intramoléculaire bifide est présent dans la structure cristalline de Piv-Pro ψ [CO-NH-NH]Ala-NHⁱPr (Figure I-27) (149). Les valeurs des angles de torsion sont de plus du même ordre de grandeur (Tableau I-8).

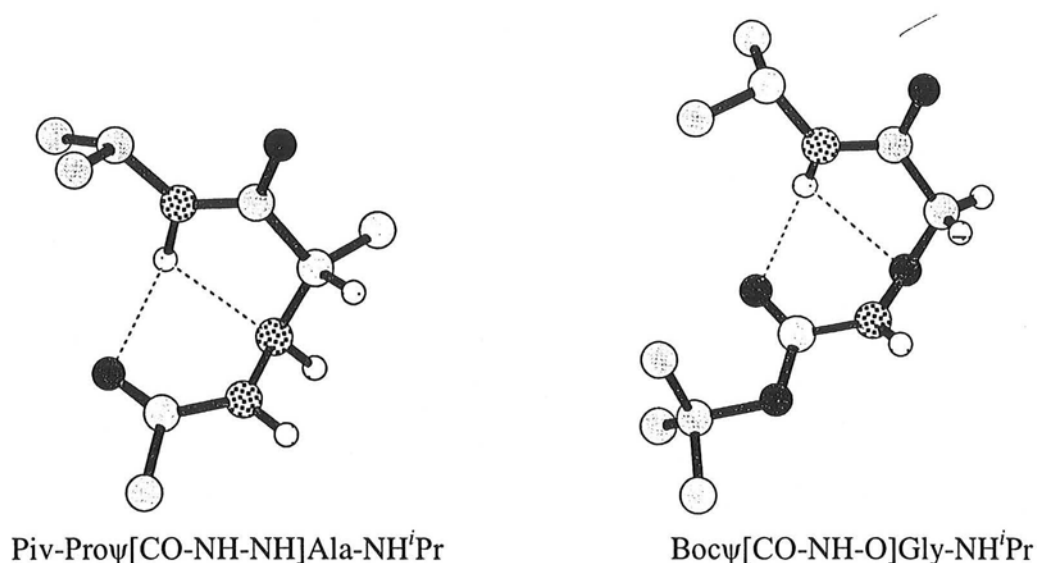


Figure I-27 : Comparaison des structures cristallines de Piv-Pro ψ [CO-NH-NH]Ala-NHⁱPr (représentation partielle) et de Boc ψ [CO-NH-O]Gly-NHⁱPr

Les fréquences d'absorption IR d'amidoxy et d'hydrazide peptides dans le DCM sont rassemblées dans le *tableau I-9*. En solution, les deux familles de pseudopeptides ont un comportement similaire. Le vibreur NH^iPr donne naissance à deux bandes : l'une correspondant au vibreur libre et l'autre au vibreur engagé dans la liaison hydrogène à l'origine du pseudorepliement γ . La présence du conformère C_7 entraîne l'éclatement dans les dipeptides de la bande amide A des liaisons amidoxy et hydrazide. Elle est par ailleurs confirmée par l'abaissement de fréquence du groupement Piv. Des différences apparaissent cependant quand on compare la stabilité des deux repliements observés dans les dipeptides. La bande correspondant au vibreur NH^iPr lié des hydrazide peptides est moins intense que celle des amidoxy peptides. Si le conformère C_8 / C_5 hydrazide semble donc moins stable, le repliement γ paraît en revanche plus fortement stabilisé dans les hydrazide que dans les amidoxy peptides.

	NH (en cm^{-1})		CO (en cm^{-1})		
	$\text{NHO} / \text{N}^\beta\text{H}$	NH^iPr	Boc / Piv	Pro	CONH^iPr
Boc ψ [CO-NH-O]Ala-NH ⁱ Pr	3342	3418 ^f (libre) / 3342 ^F (lié)	1740		1666
Boc ψ [CO-NH-NH]Ala-NH ⁱ Pr (149)	3422 ^m / 3388 ^m	3422 ^m (libre) / 3328 ^m (lié)	1726		1665
Piv-Pro ψ [CO-NH-O]Ala-NH ⁱ Pr	3350 ^m (libre) / 3226 ^m (lié)	3416 ^f (libre) / 3315 ^F (lié)	1601	1689	1667
Piv-Pro ψ [CO-NH-NH]Ala-NH ⁱ Pr (149)	3424 ^m / 3388 ^m (libre) / 3315 ^m (lié)	3424 ^m (libre) / 3315 ^m (lié)	1606	1690	1668
Piv-Pro ψ [CO-NH-O]Gly-NH ⁱ Pr	3335 ^m (libre) / 3215 ^m (lié)	3415 ^f (libre) / 3304 ^F (lié)	1600	1696	1668
Piv-Pro ψ [CO-NH-NH]Gly-NH ⁱ Pr (71)	3426 ^m / 3386 ^m (libre) / 3311 ^F (lié)	3426 ^m (libre) / 3311 ^F (lié)	1606	1690	1671

Tableau I-9 : Valeurs des fréquences d'absorption IR dans le DCM des analogues amidoxy et hydrazide du mono peptide Boc-Ala-NHⁱPr et des dipeptides Piv-Pro-Xaa-NHⁱPr (avec Xaa = Gly ou Ala) (intensité : ^f = faible, ^F = forte, ^m = moyenne)

Nous avons également comparé les effets de solvant des dipeptides Piv-Proψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr et Piv-Proψ[CO-NH-NH]Gly-NHⁱPr (71) ainsi que des monopectides Bocψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr et Bocψ[CO-NH-NH]Ala-NHⁱPr (149) (Figure I-28). Les deux repliements mis en évidence dans l'amidoxy dipeptides se retrouvent dans l'hydrazide dipeptide. Le NHⁱPr de l'hydrazide peptide semble plus sensible au solvant indiquant une stabilité moindre du pseudorepliement γ. Le glissement du proton hydrazide porté par l'azote β en revanche paraît moins important.

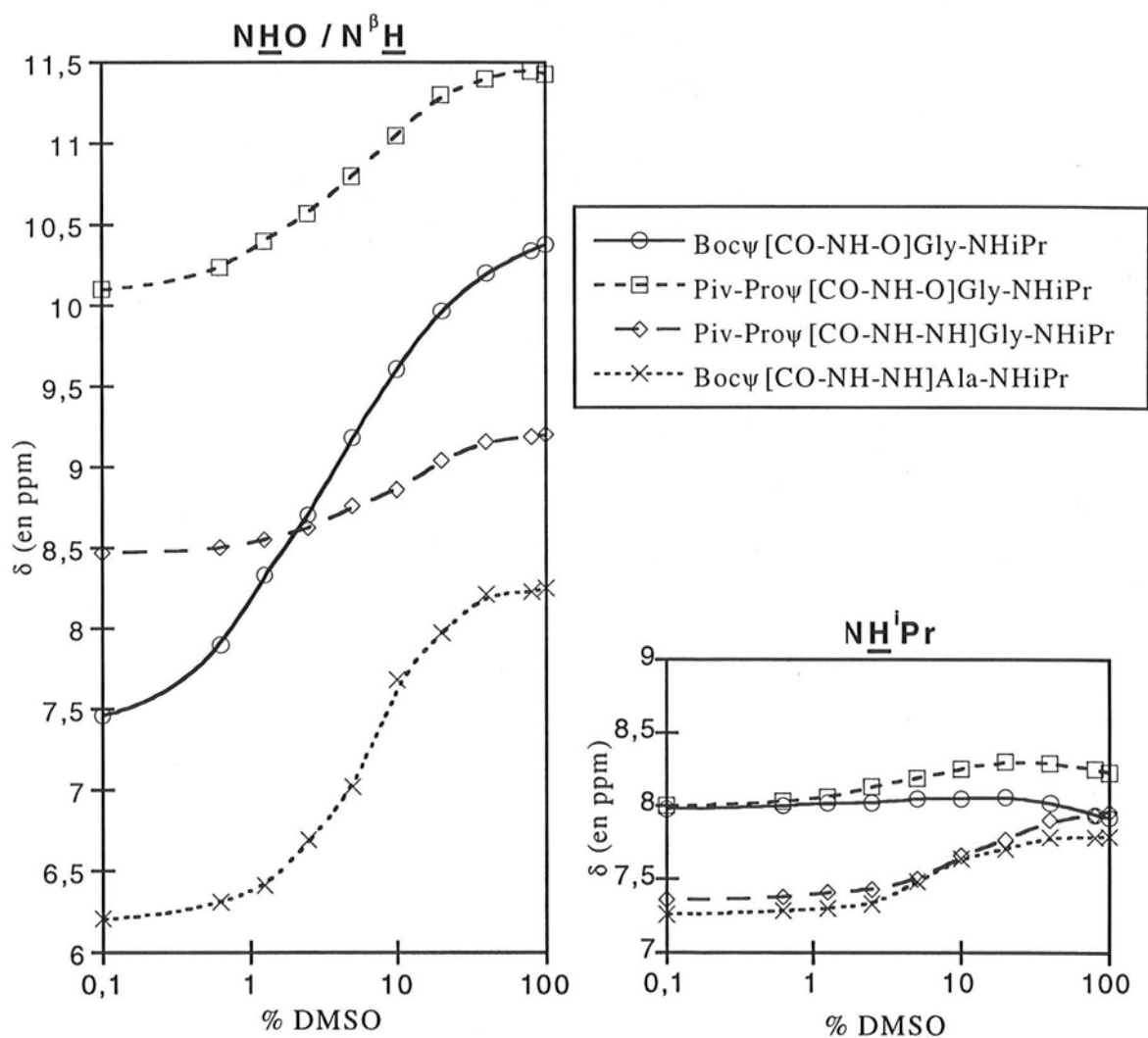


Figure I-28: Effet de solvant des dipeptides Piv-Proψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr et Piv-Proψ[CO-NH-NH]Gly-NHⁱPr ainsi que des monopectides Bocψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr et Bocψ[CO-NH-NH]Ala-NHⁱPr

Les observations réalisées à partir des données RMN confirment les résultats fournis par la comparaison des fréquences d'absorption IR. L'acidité accrue du NH^β par rapport au proton amidoxy ne peut s'expliquer en comparant l'électronégativité des atomes d'oxygène et d'azote. La plus grande stabilité du pseudorepliement γ dans les dérivés amidoxy peut en revanche se justifier par une plus grande disponibilité des doublets non liants de l'oxygène sp^3 favorisant le pseudocycle C_5 .

c) Isomérisation Z/E de la liaison hydrazide :

Afin d'établir des comparaisons avec les mono-peptides R-CO-Pro-NH-OMe , nous avons synthétisé les dérivés R-CO-Pro-NH-NMe_2 (avec $\text{R} = \text{'Bu}$ ou O'Bu). Les spectres RMN de ces derniers font apparaître un équilibre conformationnel lent. On observe en effet un éclatement des principaux signaux. Quant à leurs spectres IR, nous avons observé plusieurs bandes amide A qui peuvent difficilement être attribuées.

Le spectre RMN dans CDCl_3 du composé $\text{CH}_3\text{O-CO-NH-NMe}_2$ ne présente pas d'éclatement de signaux. En IR, en revanche, la bande amide A dans le DCM possède deux composantes à 3430 cm^{-1} et à 3333 cm^{-1} (149). Ce phénomène a été expliqué par un basculement du doublet non liant de l'azote α : un équilibre conformationnel rapide s'établirait entre une forme où l'hydrogène porté par l'azote β et le doublet non liant de l'azote α se trouveraient en position anti et une autre où ils se trouveraient en position syn (Figure I-29). Il faut noter que ce même phénomène a été observé dans le cas des dérivés $\text{Boc}\psi[\text{CO-NH-NH}]\text{Ala-NH}^i\text{Pr}$, $\text{Piv-Pro}\psi[\text{CO-NH-NH}]\text{Ala-NH}^i\text{Pr}$ et $\text{Piv-Pro}\psi[\text{CO-NH-NH}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ (Tableau I-9).

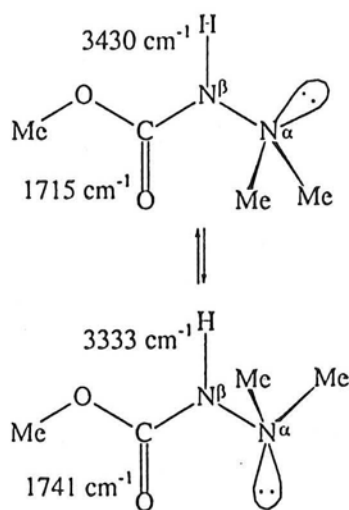
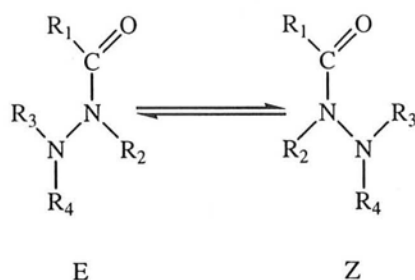


Figure I-29: Equilibre rotationnel autour de la liaison $\text{N}^\alpha\text{-N}^\beta$ dans le composé $\text{CH}_3\text{O-CO-NH-NMe}_2$ avec fréquences IR des vibreurs $\text{N}^\beta\text{-H}$ et C=O

Nous avons synthétisé le composé $\text{CH}_3\text{-CO-NH-NMe}_2$ par action du chlorure d'acétyl sur la *N,N*-diméthylhydrazine. En RMN, dans CDCl_3 , tous les pics sont éclatés. En effet le méthyle du groupement acétyl se trouve à 1,62 ppm (forme a) et 2,02 (forme b) ppm, les 6 protons méthyliques portés par l'azote α résonnent respectivement à 2,44 et 2,50 ppm. Quant au proton hydrazide, son déplacement chimique est de 6,92 (forme a) et 7,15 ppm (forme b). Le dédoublement de signaux n'est pas dû à la tautomérie déjà observée sur des hydrazide peptidiques comme Piv-Pro-Gly-NH-NHMe entre la forme hydrazide et la forme "énolisée". Nous avons en effet réalisé un spectre RMN-2D de corrélation ^1H - ^{15}N pour nous assurer que les deux protons autour de 7 ppm étaient bien portés par deux atomes d'azote et non par un atome d'oxygène comme dans la forme "énolisée". Le phénomène s'explique en fait par une isomérisation *Z/E* de la liaison hydrazide C-N^β (Figure I-30).



*Figure I-30: Représentation de l'isomérisation *Z/E* de la liaison hydrazide*

Cet équilibre lent, visible en RMN, se trouve décrit dans plusieurs publications (150-152). La constante d'équilibre dépend de la nature des substituants R_1 , R_2 , R_3 et R_4 . Un groupement R_1 volumineux diminue, par exemple, le pourcentage de l'isomère de configuration E par gêne stérique avec R_3 . L'encombrement stérique généré par les groupements R_3 et R_4 volumineux au voisinage de l'atome d'oxygène de la liaison hydrazide défavorise, par ailleurs, l'isomère de configuration Z. L'équilibre *Z/E* est également influencé par la nature des solvants utilisés.

Nous avons essayé d'attribuer aux signaux RMN la configuration Z ou E de l'hydrazide. Pour cela, nous disposons d'un certain nombre de critères (152) :

- dans le cas où $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{H}$, seuls les protons $\underline{\text{H}}\text{-CO-NH-NR}_3\text{R}_4$ de l'isomère E sont couplés avec une constante proche de 11 Hz ;

- dans le benzène, les signaux des substituants en position *trans* par rapport à l'oxygène sont les plus déplacés vers les champs forts ;

- les solvants polaires déplacent l'équilibre vers la forme Z.

Nous avons appliqué ce dernier critère. Nous avons synthétisé alors un certain nombre d'hydrazide et évalué par RMN le pourcentage respectif des différentes formes dans divers solvants. Les résultats obtenus ont été comparés avec les données de la littérature et rassemblés dans le *tableau I-10* (152).

	E/Z (CDCl ₃)		E/Z (DMSO- <i>d</i> ₆)		E/Z (D ₂ O)
	Mesuré	Littérature	Mesuré	Littérature	Mesuré
CH ₃ -CO-NH-NMe ₂	55/45	65/35	45/55	40/60	8/92
CH ₃ -CO-NH-NPh ₂	60/40	65/35	20/80	30/70	
Piv-NH-NMe ₂	Pas d'isomérisation				
Piv-Pro-NH-NMe ₂	66/34		45/55		

Tableau I-10: Rapport des pourcentages en isomères E et Z d'hydrazides évalués dans différents solvants et comparés avec les valeurs de la littérature

En résumé, la substitution du N^αH par un atome d'oxygène n'entraîne pas de modification importante de la structure des peptides. Tout au plus, on observe une modulation de la force des différentes interactions intramoléculaires. Des différences plus importantes sont ponctuellement apparues entre amidoxy et hydrazide peptides dans lesquels nous avons pu identifier des conformations particulières résultant de l'orientation privilégiée du doublet non liant de l'azote α ou une isomérie Z/E de la fonction hydrazide.

I-3-4: Structure des oxime peptides

Nous avons cherché à déterminer la structure des dipeptides R-CO-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr (avec R = ⁱBu ou OⁱBu).

a) Mise en évidence d'une isomérisation Z/E de la liaison oxime :

Le composé Piv-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr a été traité après purification par chromatographie sur gel de silice et caractérisation par RMN, avec le mélange utilisé pour éliminer le groupement protecteur Boc, une solution de 40 % en volume de TFA dans le DCM. Le spectre RMN réalisé après évaporation des solvants fait apparaître un mélange de deux produits. La plupart des signaux sont, en effet, éclatés. Nous avons en priorité envisagé un réarrangement de Beckmann (*Schéma I-18*).

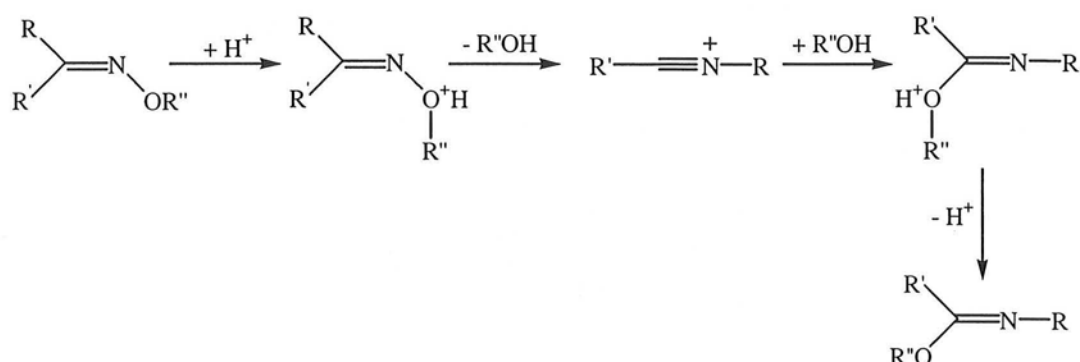


Schéma I-18 : Mécanisme du réarrangement de Beckmann

Les signaux RMN apparus ne peuvent pas être attribués aux deux imino-éthers susceptibles de se former. En effet le doublet correspondant au CH oxime glisse dans le CDCl₃ de 7,5 à 6,4 ppm et conserve sa multiplicité. La transposition réalisée en milieu acide a été identifiée comme étant une isomérisation Z/E de la liaison oxime. Cette dernière se trouve, en effet, mentionnée dans diverses publications, comme par exemple, celle traitant de l'influence des conditions opératoires sur la vitesse d'isomérisation des alkyl phényl cétooximes et donc sur la nature du produit de réarrangement de Beckmann (153), ou celle traitant de la O-alkylation des benzaldoximes (154).

Les spectres RMN des deux diastéréoisomères présentent de nombreuses différences (*Figure I-31*). A l'écart de 1,1 ppm des signaux du CH oxime, s'ajoutent un proton NH à 6,3 ppm contre 7,9 ppm pour le diastéréoisomère nouvellement formé, une différence de 0,5 ppm des pics correspondant au C^αH de la proline ainsi que l'apparition d'un signal AB pour le CH₂ de la glycine. La non équivalence magnétique de ces deux hydrogènes s'explique par une structure rigide qui restreint la libre rotation autour des liaisons simples, l'asymétrie du carbone α de la proline se faisant ainsi ressentir à longue distance.

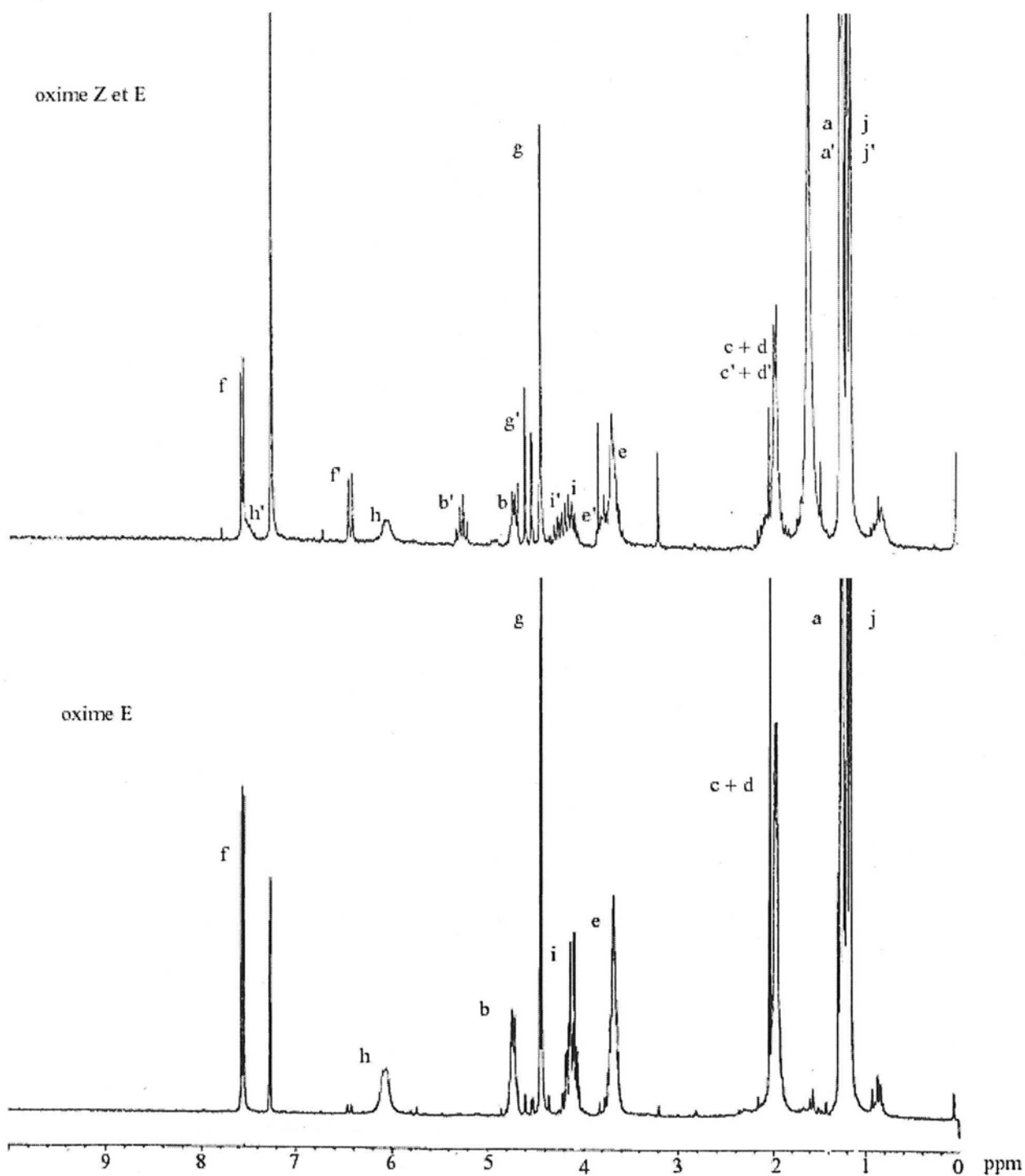
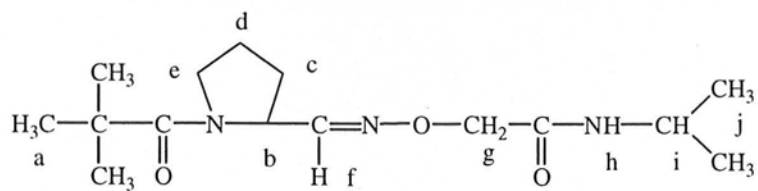


Figure I-31 : Spectres RMN 200 MHz de Piv-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr de configuration E et du mélange des deux diastéréoisomères (La notation ' correspond à l'isomère Z.)

b) Etude par spectroscopie IR :

Les différentes fréquences d'absorption IR des oxime peptides sont rassemblées dans le *tableau I-11*. Nous nous intéresserons en premier lieu au diastéréoisomère de Piv-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr, isolé avant traitement acide, que nous identifierons comme étant de configuration E.

(Σ = NH ⁱ Pr, NMe ₂ ou OMe)	NH (en cm ⁻¹)		CO (en cm ⁻¹)			
	<u>NH</u> ⁱ Pr		Boc/Piv		<u>CO</u> Σ	
	DCM	DMSO	DCM	DMSO	DCM	DMSO
Pivψ[CH=N-O]Gly-NH ⁱ Pr	3422	3279			1674	1676 / 1664
Pivψ[CH=N-O]Gly-NMe ₂					1666 / 1651	1666 / 1649
Boc-Proψ[CH=N-O]Gly-NH ⁱ Pr	3422	3277	1687	1689	1676	1689 / 1664
Piv-Proψ[CH=N-O]Gly-NH ⁱ Pr*	3421	3285	1616	1613	1666	1675 / 1664
Piv-Proψ[CH=N-O]Gly-OMe			1617	1617	1759 / 1740	1757 / 1738

Tableau I-11 : Valeurs des fréquences d'absorption IR des oxime peptides

* configuration E

Les spectres IR dans le domaine 3500-3100 cm⁻¹ des composés Pivψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr et R-CO-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr (avec R = ^tBu ou O^tBu) comportent dans le DCM une bande fine unique aux environs de 3420 cm⁻¹. Cette fréquence correspond au vibreur NHⁱPr libre comme nous avons pu le mettre en évidence dans l'étude structurale des amidoxo peptides. Aucune liaison hydrogène intramoléculaire ne semble donc *a priori* présente. Dans le DMSO, la fréquence d'absorption du NHⁱPr vers 3280 cm⁻¹ est caractéristique d'un proton solvato.

La bande correspondant à la fonction C=N, de faible intensité, n'est pas visible sur des spectres dont l'échelle a été définie sur la base de l'absorption des carbonyles. La bande amide I du CONHⁱPr se situe, dans le DCM, aux alentours de 1675 cm⁻¹ à l'exception du composé Piv-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr où un abaissement de fréquence de 10 cm⁻¹ est observé. On observe un éclatement de la bande amide I du CONHⁱPr dans le DMSO : une composante de plus basse fréquence (1664 cm⁻¹) apparaît. Comme expliqué précédemment, cet éclatement a pour origine l'orientation syn ou anti du carbonyle par rapport à l'atome d'oxygène en β. La valeur 1689 cm⁻¹ de la composante de haute fréquence du composé Boc-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr peut être due à un artéfact de déconvolution, cette dernière étant

rendue nécessaire par la superposition du signal du Boc. Par ailleurs, l'éclatement décrit précédemment dans le DMSO se manifeste également dans le DCM avec les vibreurs CONMe_2 et COOMe . Les composés $\text{Piv}\psi[\text{CH}=\text{N}-\text{O}]\text{Gly}-\text{NMe}_2$ et $\text{Piv-Prop}\psi[\text{CH}=\text{N}-\text{O}]\text{Gly}-\text{OMe}$, qui ne possèdent pas de proton NH amide, ne sont en effet pas structurés, y compris dans le DCM. Dans le domaine $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, les fréquences d'absorption des groupement Boc et Piv se situent respectivement autour de 1685 et 1615 cm^{-1} .

L'exploitation des spectres IR apporte peu d'informations sur la structure des oxime peptides étudiés. Nous avons ensuite examiné le spectre IR dans le DCM du mélange équimolaire des deux diastéréoisomères de $\text{Piv-Prop}\psi[\text{CH}=\text{N}-\text{O}]\text{Gly}-\text{NH}^i\text{Pr}$. Il comporte deux bandes amide A d'intensité équivalente : l'une à 3421 cm^{-1} et l'autre à 3342 cm^{-1} , caractéristique d'un vibreur engagé dans une liaison hydrogène forte. Cette dernière bande a été attribuée au diastéréoisomère apparu après traitement acide.

c) Etude par spectroscopie RMN :

L'effet de solvant du mono peptide $\text{Piv}\psi[\text{CH}=\text{N}-\text{O}]\text{Gly}-\text{NH}^i\text{Pr}$ et du diastéréoisomère de $\text{Piv-Prop}\psi[\text{CH}=\text{N}-\text{O}]\text{Gly}-\text{NH}^i\text{Pr}$, isolé avant traitement acide, indique que le déplacement chimique du NH^iPr reste constant puis glisse à partir de 10 % de $\text{DMSO}-d_6$ (Figure I-32).

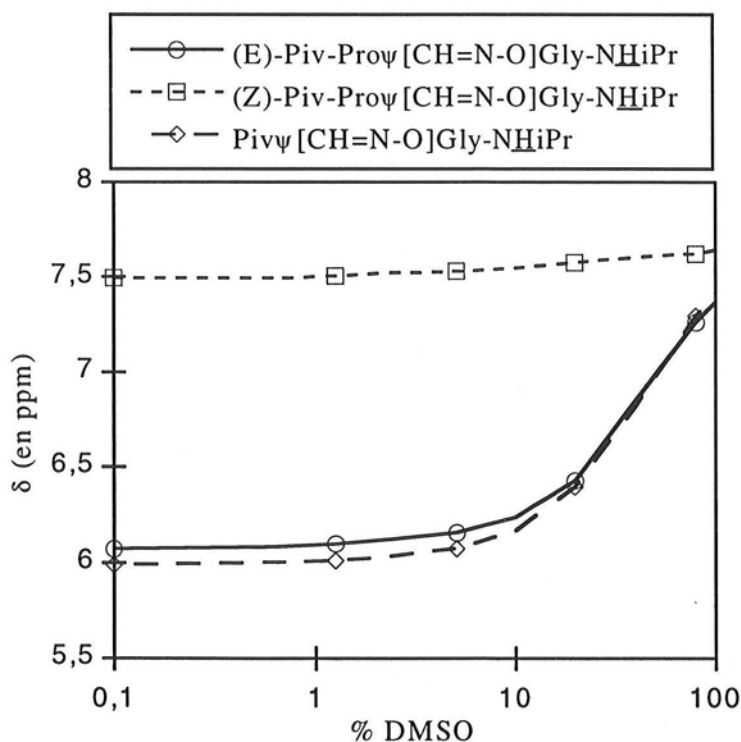


Figure I-32: Effet de solvant de $\text{Piv}\psi[\text{CH}=\text{N}-\text{O}]\text{Gly}-\text{NH}^i\text{Pr}$ et des deux diastéréoisomères de $\text{Piv-Prop}\psi[\text{CH}=\text{N}-\text{O}]\text{Gly}-\text{NH}^i\text{Pr}$

Le proton NH^iPr est engagé dans une liaison hydrogène faible avec l'oxygène sp^3 oxime qui ferme un pseudocycle à 5 atomes. Si on compare la sensibilité au solvant du proton NH^iPr dans le dipeptide et le mono-peptide, on constate que l'extrémité *N*-terminale du dipeptide ne modifie pas l'accessibilité au solvant du proton amide. Les deux courbes correspondant aux composés $\text{Piv}\psi[\text{CH}=\text{N}-\text{O}]\text{Gly}-\text{NH}^i\text{Pr}$ et $(E)\text{-Piv-Prop}\psi[\text{CH}=\text{N}-\text{O}]\text{Gly}-\text{NH}^i\text{Pr}$ sont, en effet, quasiment superposées.

Nous avons également comparé la sensibilité au solvant du proton NH^iPr des deux diastéréoisomères (*Figure I-32*). Le déplacement chimique du proton le plus déblindé est quasiment constant. Les résultats obtenus par spectroscopie IR et RMN indiquent que la liaison hydrogène entre l'oxygène sp^3 oxime et le proton amide NH^iPr est plus forte dans le diastéréoisomère apparu après traitement acide. Le repliement C_5 est stabilisé par une deuxième interaction avec le carbonyle du Piv, fermant un pseudocycle à 11 atomes. Par modélisation moléculaire, nous avons pu vérifier que c'est le diastéréoisomère *Z* qui favorise le pseudorepliement β (*Figure I-33*). Il faut, par ailleurs, noter que ce dernier est également stabilisé dans les (*Z*)-oxime peptide par la rigidité de la double liaison $\text{C}=\text{N}$.

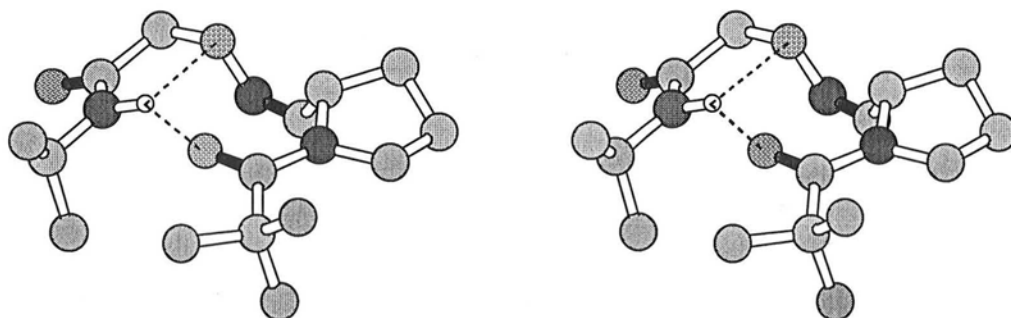


Figure I-33 : Vues stéréoscopiques d'une conformation obtenue par modélisation moléculaire (MOPAC) du composé (Z)-Piv-Propψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr

d) L'équilibre entre les formes *Z* et *E* de la liaison oxime :

Nous avons cherché à déterminer les différents facteurs influençant l'apparition du diastéréoisomère *Z*.

Les couplages de TFA.H₂N-O-CH₂-CO-NHⁱPr avec respectivement les aldéhydes Boc-Pro-H et Piv-Pro-H aboutissent très majoritairement aux composés Boc-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr et Piv-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr de configuration E. Quand, en revanche, on synthétise le dérivé pivaloylé à partir du dérivé Boc, préalablement traité par le mélange TFA/DCM, le diastéréoisomère E est isolé pur puis en quelques heures évolue vers la configuration Z. Une quantité même infime de TFA résiduelle est suffisante pour provoquer l'isomérisation. Le même résultat est obtenu en remplaçant le TFA/DCM par une solution de HCl gazeux dissous dans l'AcOEt. Quelles que soient la durée du contact des composés Piv-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr et Piv-Proψ[C(Pr)=N-O]Gly-NHⁱPr avec le milieu acide et la concentration de TFA dans le DCM, il n'est pas possible de dépasser un certain pourcentage d'isomère Z, respectivement 70% et 80 %. Aldoximes et cétoximes ont un comportement quasi semblable. En milieu acide, un équilibre s'établit donc entre les deux diastéréoisomères.

Après couplage avec respectivement les aldéhydes Boc-Ala-H et Piv-Val-H, les dérivés Boc-Alaψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr et Piv-Valψ[CH=N-O]Ala-NHⁱPr isolés contiennent seulement 70 % d'isomère E. La formation de l'oxime perd en diastéréosélectivité quand le prolinal est remplacé par le valinal ou l'alaninal. L'encombrement stérique du cycle de la proline favorise la formation de l'isomère E. Quand, en revanche, Piv-Valψ[CH=N-O]Ala-NHⁱPr est placé en milieu acide, l'équilibre s'établit en faveur de la forme E (80 %). Ce résultat, *a priori* surprenant, se justifie par le fait que la proline, résidu connu pour favoriser le repliement β par exemple dans l'enchaînement Pro-Gly, permet de stabiliser le conformère C₁₁. C'est la liaison hydrogène entre le proton amide NHⁱPr et le carbonyle du Piv qui déplace l'équilibre entre les deux diastéréoisomères vers la configuration Z. Cette interprétation est confirmée par l'étude de l'oxime dipeptide Piv-Proψ[CH=N-O]Gly-OMe, dans lequel aucune liaison hydrogène intramoléculaire ne peut s'établir. A l'équilibre, on évalue à 63 % la proportion d'isomère E. De plus, le signal du CH₂ de la glycine de l'isomère Z n'est plus de la forme AB.

Les applications des propriétés structurales de l'isomère Z des oxime peptides ainsi mises en évidence restent, pour l'instant, limitées par les difficultés d'isoler l'isomère Z pur.

I-3-5: Structure des amidoxy peptides réduits

Nous avons cherché à déterminer la structure des dipeptides R-CO-Proψ[CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr (avec R = ^tBu ou O^tBu).

a) Etude par spectroscopie IR :

Les différentes fréquences d'absorption IR des amidoxy peptides réduits sont rassemblées dans le *tableau I-12*.

$(\Sigma = \text{NH}^i\text{Pr ou OMe})$	NH (en cm^{-1})		CO (en cm^{-1})			
	<u>NH</u> ⁱ Pr		Boc/Piv		<u>CO</u> Σ	
	DCM	DMSO	DCM	DMSO	DCM	DMSO
Piv Ψ [CH ₂ -NH-O]Gly-NH ⁱ Pr	3417	3259			1673	1676 / 1663
Boc-Pro Ψ [CH ₂ -NH-O]Gly-NH ⁱ Pr	3417	3251	1676	1685	1676	1685 / 1661
Piv-Pro Ψ [CH ₂ -NH-O]Gly-NH ⁱ Pr	3416	3270	1608	1611	1667	1675 / 1664
Piv-Pro Ψ [CH ₂ -NH-O]Gly-OMe			1613	1613	1753 / 1740	1753 / 1740

Tableau I-12 : Valeurs des fréquences d'absorption IR de dérivés amidoxy réduits

On peut constater que, globalement, les données relatives aux amidoxy peptides réduits sont similaires à celles relatives aux oxime peptides (*Tableau I-11*). En effet, les spectres IR dans le domaine 3500-3100 cm^{-1} des composés Piv Ψ [CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr et R-CO-Pro Ψ [CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr (avec R = ⁱBu ou OⁱBu) comportent également dans le DCM une bande fine unique aux environs de 3420 cm^{-1} et dans le DMSO, une bande large vers 3280 cm^{-1} , correspondant au vibreur NHⁱPr. Il faut également noter que la bande de l'oscillateur NH hydroxylamine est peu intense. Ce vibreur absorbe à 3269 cm^{-1} dans le DCM et à 3225 cm^{-1} dans le DMSO. Ces valeurs ont été déterminées sur le spectre du composé Piv-Pro Ψ [CH₂-NH-O]Gly-OMe. La fonction hydroxylamine est sensible à la carbonatation. Les spectres IR évoluent rapidement : apparaissent des bandes larges et intenses vers 3460 cm^{-1} et 3330 cm^{-1} .

Dans le domaine 1800-1500 cm^{-1} , comme dans le cas des oxime peptides, la bande amide I du CONHⁱPr se situe, dans le DCM, aux alentours de 1675 cm^{-1} avec un abaissement de fréquence de 10 cm^{-1} pour le composé Piv-Pro Ψ [CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr. On observe l'éclatement de la bande amide I du CONHⁱPr dans le DMSO et, pour le composé Piv-Pro Ψ [CH₂-NH-O]Gly-OMe également dans le DCM. Il faut noter que les fréquences d'absorption des groupement Boc et Piv, dans le DCM, sont plus basses pour les dérivés comportant une liaison hydroxylamine que pour les dérivés possédant un lien oxime.

b) Etude par spectroscopie RMN :

Nous avons réalisé différents effets de solvant. Les protons amide des composés $\text{MeO-CH}_2\text{-CO-NH}^i\text{Pr}$, $\text{Piv}\psi[\text{CH=N-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ et $\text{Piv}\psi[\text{CH}_2\text{-NH-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ présentent une sensibilité au solvant similaire. Le déplacement chimique reste constant puis glisse à partir de 10 % de $\text{DMSO-}d_6$ (Figure I-34).

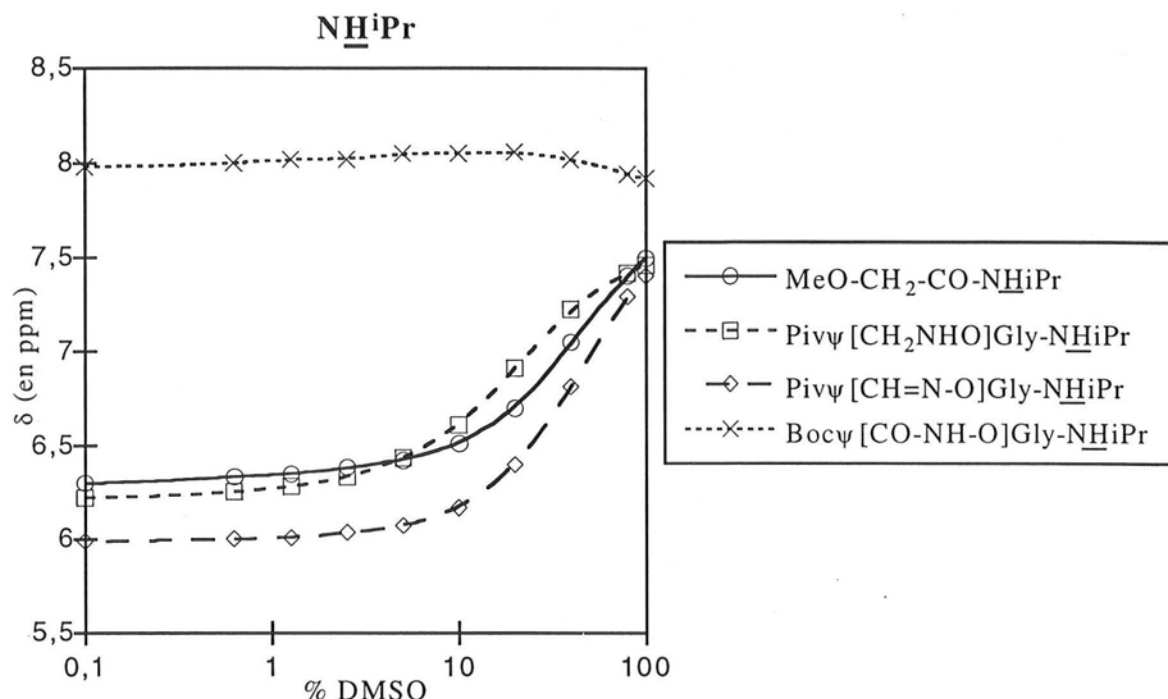


Figure I-34: Effet de solvant des monopectides $\text{MeO-CH}_2\text{-CO-NH}^i\text{Pr}$, $\text{Piv}\psi[\text{CH}_2\text{-NH-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$, $\text{Piv}\psi[\text{CH=N-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$ et $\text{Boc}\psi[\text{CO-NH-O}]\text{Gly-NH}^i\text{Pr}$

Dans les amidoxy peptides réduits, le proton NH^iPr est engagé dans une liaison hydrogène faible avec l'oxygène sp^3 hydroxylamine. A la différence des amidoxy peptides, le repliement C_5 ainsi formé n'est pas stabilisé par une deuxième liaison hydrogène. En effet, le carbonyle de la liaison amidoxy, qui joue le rôle de deuxième accepteur de proton, n'est plus présent dans les amidoxy peptides réduits, comme par ailleurs dans les oxime peptides.

Nous avons ensuite comparé la sensibilité au solvant du proton NH^iPr dans les dipeptides et les monopectides (Figure I-35).

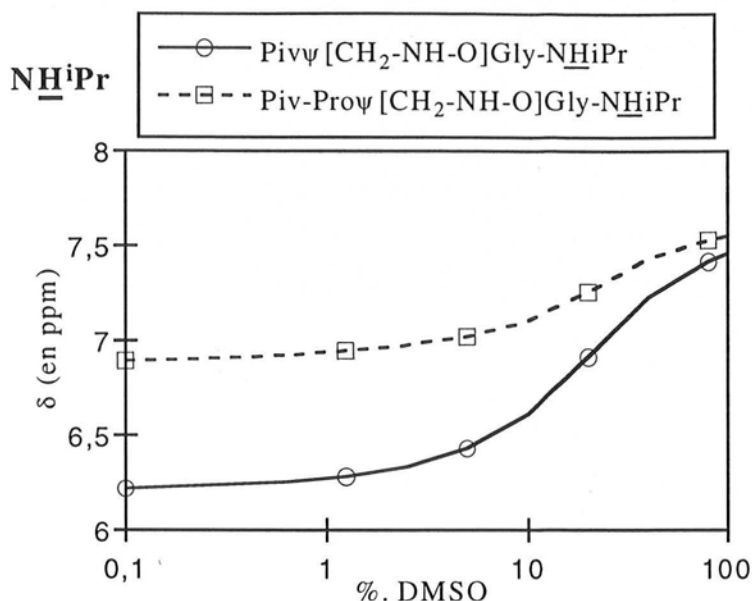


Figure I-35 : Effet de solvant de Pivψ[CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr et de Piv-Proψ[CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr

A la différence des oxime peptides, on note une sensibilité moindre au solvant du proton NHⁱPr dans l'amidoxy dipeptide réduit que dans le mono peptide. Le carbonyle du groupement Piv participe à une liaison hydrogène de faible intensité. La forme repliée serait alors stabilisée par une liaison hydrogène intramoléculaire bifide entre le NHⁱPr amide et à la fois l'oxygène sp³ (C₅) du lien hydroxylamine et le carbonyle du Piv (C₁₁). Ce pseudorepliement β ne présente cependant pas la stabilité du pseudorepliement γ des amidoxy peptides, ni même celle du pseudorepliement β des Z-oxime peptides. Le conformère C₁₁ pourrait expliquer le faible abaissement de fréquence du Boc et du Piv des amidoxy dipeptides réduits observé en IR dans le DCM (*tableau I-12*). Une conformation de basse énergie du composé Piv-Proψ[CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr, générée par modélisation moléculaire, comporte également la liaison hydrogène bifide (*Figure I-36*).

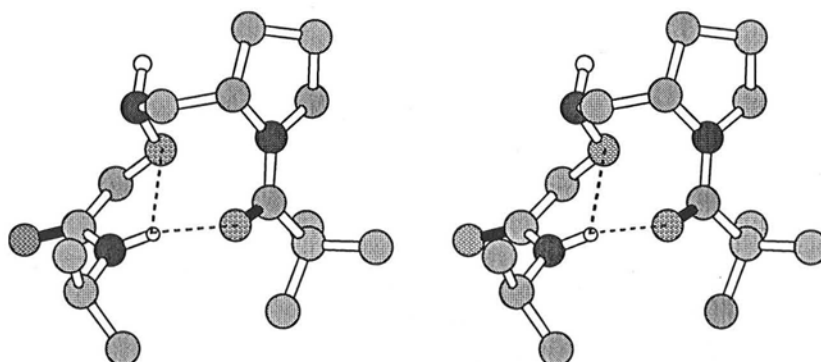


Figure I-36 : Vues stéréoscopiques d'une conformation obtenue par modélisation moléculaire (MOPAC) du composé Piv-Proψ[CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr

c) Etude du composé Piv-Proψ[CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr par
radiocristallographie :

Le dérivé Piv-Proψ[CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr a cristallisé sous forme de monocristaux. La structure obtenue par diffraction des rayons X est étirée. Une seule liaison hydrogène intramoléculaire est établie entre le NHⁱPr et l'oxygène de la fonction hydroxylamine (*Figure I-37*). Chaque NHⁱPr interagit également avec le carbonyle de la fonction amide C-terminale de la molécule voisine. Le pseudorepliement β mis en évidence par l'étude structurale en solution par RMN et IR ne subsiste pas dans le cristal. Cette observation confirme sa moindre stabilité comparée au pseudorepliement γ des amidoxy peptides.

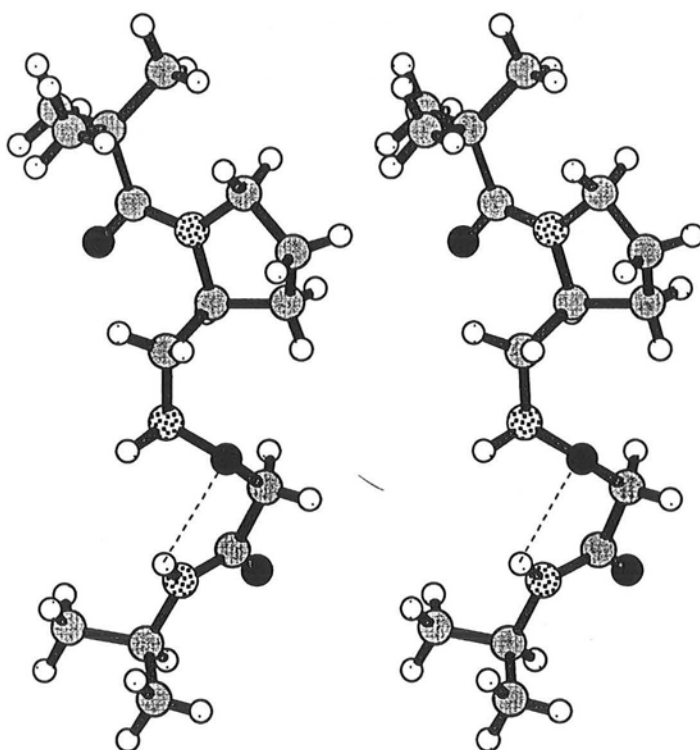


Figure I-37 : Vues stéréoscopiques de la structure moléculaire dans le cristal de Piv-Proψ[CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr

I-3-6 : Conclusion

L'insertion d'un atome d'oxygène dans le squelette peptidique entraîne d'importantes modifications structurales. Une liaison hydrogène intramoléculaire entre cet oxygène sp³ et le

proton du lien amide suivant ferme un pseudocycle à 5 atomes. Dans les amidoxy peptides, cette conformation se trouve considérablement stabilisée par une deuxième liaison hydrogène entre le même proton amide et le carbonyle de la fonction amidoxy (C₈). Le pseudorepliement γ ainsi mis en évidence est similaire et sensiblement plus stable que celui observé dans les hydrazide peptides. L'oxygène sp^3 accroît par ailleurs l'acidité du proton amidoxy, qui est alors engagé dans une liaison hydrogène d'intensité moyenne avec le proton du lien amide précédent. Ce repliement γ (C₇) se forme également dans les hydrazide peptides et semble plus stable que dans les amidoxy peptides.

Les deux familles de pseudo-peptides, hydrazide et amidoxy, présentent donc de nombreuses similarités structurales. La préparation des aminoxy acides et leurs couplages ultérieurs ne présentent en revanche pas les difficultés de synthèse rencontrées avec les hydrazides peptides. Les aminoxy acides sont en effet obtenus sous forme *N*-protégée par substitution nucléophile d'une *N*-alkyloxycarbonylhydroxylamine sur un α -bromo acide, lui-même formé après diazotation d'un acide aminé. Les méthodes de couplage classiques, suffisamment activantes, comme celle au TBTU, peuvent être ensuite utilisées.

Les oxime peptides sont obtenus par couplage de l'aminoxy acide avec un amino aldéhyde *N*-protégé. La réduction ultérieure de la liaison oxime en hydroxylamine aboutit aux amidoxy peptides réduits. Le réducteur utilisé est NaBH₃CN en large excès. La durée de la réaction excède 96 heures. Ces deux autres familles de pseudo-peptides ne présentent pas de propriétés structurales très intéressantes. Le seul conformère C₅ est aisément rompu dans des solvants polaires. Un pseudorepliement β très stable a, en revanche, été mis en évidence dans les oxime peptides dont la liaison oxime est de configuration *Z*. Cette dernière permet en effet au carbonyle de la liaison amide précédente d'interagir avec le proton de la fonction amide suivant fermant ainsi un pseudocycle à 11 atomes. Il est cependant difficile d'isoler le seul diastéréoisomère *Z*.

Tous ces résultats ont été obtenus sur des dipeptides de référence. Nous avons inséré ces trois modifications pseudo-peptidiques dans des peptides de plus grande taille et d'intérêt biologique. Nous voulions dans un premier temps, nous assurer que les méthodes de synthèse décrites dans ce chapitre étaient applicables à un grand nombre de dérivés. Nous avons ensuite cherché à évaluer les conséquences, dans des peptides de plusieurs résidus, des modifications structurales mises en évidence par l'étude des dipeptides.

**CHAPITRE II - ETUDE D'INHIBITEURS
DE L'ELASTASE LEUCOCYTAIRE
HUMAINE**

CHAPITRE II – ETUDE D'INHIBITEURS DE L'ELASTASE

LEUCOCYTAIRE HUMAINE

II-1 : INTRODUCTION

II-1-1 : L'élastase leucocytaire humaine

a) Les enzymes : les protéases à sérine

Les enzymes sont des protéines dont le rôle est de catalyser les réactions biochimiques. Leur activité présente également une très grande spécificité. Les protéases constituent une classe importante d'enzymes qui hydrolysent de façon irréversible les liaisons peptidiques CO-NH. On distingue plusieurs types de protéases selon l'entité chimique intervenant dans le mécanisme catalytique : les protéases à sérine comme par exemple la chymotrypsine ou la trypsine, les protéases à cystéine, à acide aspartique et les métalloprotéases. Ces dernières doivent le plus souvent leur activité à la présence d'un ion Zn^{2+} .

Les différentes étapes de la catalyse enzymatique se déroulent dans une zone parfaitement délimitée. Dans les protéases à sérine, ce site actif comporte toujours les trois résidus sérine, histidine et acide aspartique. En premier lieu, un complexe enzyme-substrat se forme (*Figure II-1*). Par différentes interactions, le carbonyle de la liaison amide à hydrolyser s'oriente de façon à rapprocher son atome de carbone de l'oxygène de la chaîne latérale de la sérine. L'acide aspartique interagit avec l'histidine qui peut alors déprotoner le groupement hydroxyle de la sérine. L'attaque de l'alcoolate ainsi formé sur le carbonyle amide aboutit à un intermédiaire tétraédrique. La liaison C-N se rompt ensuite. Après que l'atome d'azote a reçu un proton de l'ion imidazolium de l'histidine, une extrémité de la protéine clivée, qui comporte une fonction amine, est donc libérée. L'autre extrémité se trouve alors liée de manière covalente à l'enzyme, le résidu sérine ayant été acylé. De l'eau pénètre dans le site catalytique. Elle est préalablement transformée en ion hydroxyde par l'histidine qui capte de nouveau un proton et attaque le carbonyle ester de l'acylsérine. Un second intermédiaire tétraédrique se forme. La partie de la protéine hydrolysée restée fixée sur l'enzyme se détache alors, avec une

fonction acide carboxylique terminale. Parallèlement, la chaîne latérale de la sérine arrache un proton à l'histidine. L'enzyme, de nouveau libre, peut participer au cycle catalytique suivant.

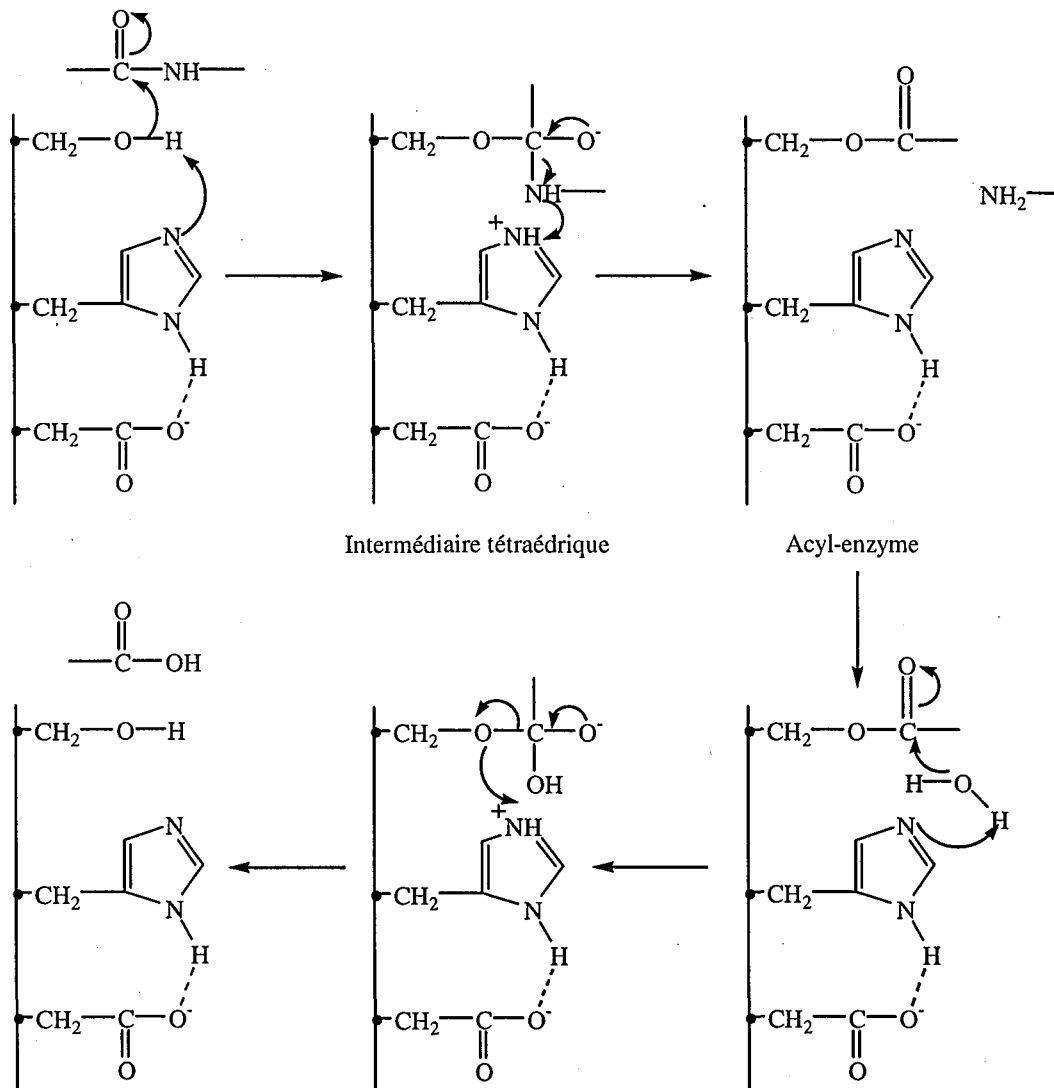


Figure II-1: Mécanisme catalytique des protéases à sérine

La spécificité des enzymes est, par ailleurs, assurée par des sous-sites, notés S_i et S'_i qui reconnaissent un ou des acides aminés particuliers, désignés par P_i et P'_i , présents de part et d'autre de la liaison peptidique à hydrolyser (155).

b) L'élastase leucocytaire humaine :

Parmi les protéases à sérine, figurent les élastases comme l'élastase pancréatique porcine (EPP) et l'élastase leucocytaire humaine (ELH). Cette dernière, véhiculée par les globules blancs, est située dans les lysosomes, organites qui constituent les sites principaux de

la digestion intracellulaire. Lors de certaines inflammations, elle peut cependant être excrétée et libérée dans le sang. Son activité est alors principalement régulée par un inhibiteur : l' α 1-PI.

L'élastase hydrolyse diverses protéines dont l'élastine. Lorsque le gène codant l' α 1-PI est muté, la concentration plasmatique de cet inhibiteur diminue. L'activité de l'élastase n'est plus régulée et le processus de dégradation de l'élastine qui est présente dans la paroi des alvéoles pulmonaires s'accélère. La surface alvéolaire se trouve alors restreinte, entraînant des difficultés respiratoires. Cette pathologie, d'origine génétique ou fonctionnelle, porte le nom d'emphysème pulmonaire (156). L'élastase est également responsable d'autres processus dégénératifs et dégradatifs comme la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose ou la dissémination des métastases.

Le traitement actuel de l'emphysème pulmonaire génétique consiste à administrer de l' α 1-PI extrait du plasma. Des recherches ont été menées pour concevoir des inhibiteurs non naturels dans un but non seulement thérapeutique mais aussi pour une meilleure compréhension des mécanismes catalytiques. En particulier, bien que le positionnement d'inhibiteurs non réactifs dans le site catalytique ait été étudié par RMN (157, 158) ou par cristallographie (158-162), la disposition du substrat dans le site actif n'est toujours pas connue avec précision et les résultats publiés sont contradictoires.

Plusieurs familles d'inhibiteurs de l'élastase sont connues à ce jour (163). Des β -lactames, les *N*-arylazétidin-2-ones, sont des inhibiteurs suicides spécifiques des élastases (164-167). Leur activité résulte de l'alkylation de l'histidine 57 de l'élastase. On peut également citer les dérivés coumariniques substitués en position 3 par un groupement ester (168, 169), des trifluorométhylalcools peptidiques (170), des dérivés de 5-aminothiazole et de 4-amino-4*H*-1,2,4-triazole (171) ou encore des anilides peptidiques trifluoroacétylées (172) (Figure II-2).

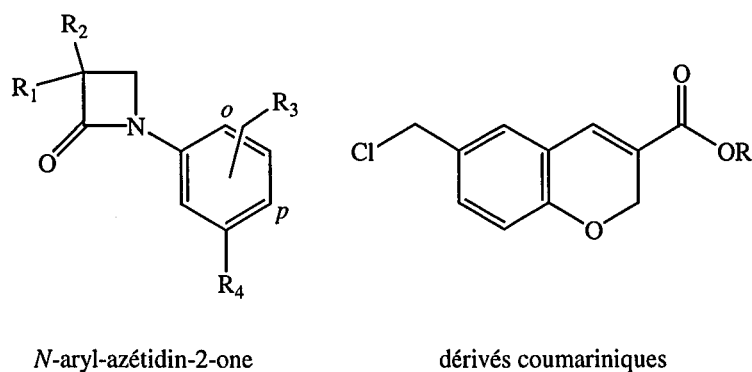


Figure II-2 : Exemples d'inhibiteurs non peptidiques d'élastase

II-1-2 : Les inhibiteurs hydrazide peptides de l'ELH

L'approche pseudopeptidique a été envisagée pour concevoir de nouveaux inhibiteurs de l'ELH. Dans des tripeptides de référence, des acides aminés ont été substitués par des azo amino acides (173, 174). Si l'affinité pour l'ELH est peu modifiée, l'activité catalytique de cette dernière est en revanche fortement réduite. Les azapeptides sont donc à la fois des inhibiteurs efficaces de l'ELH et de puissants agents acylants des protéases à sérine. Une autre famille de pseudopeptides a été également étudiée : les hydrazide peptides (74, 175).

a) Choix de la séquence :

Un fragment de l'inhibiteur α 1-PI reconnu par l'ELH est la séquence Ala-Ile-Pro-Met-Ser-Ile-Pro-Pro (176). L'hydrolyse se produit entre les résidus méthionine et sérine. De nombreux dérivés de cet octapeptide ont été synthétisés (177). La proline est le résidu préférentiellement positionné dans le sous-site S_2 de l'ELH. Zimmerman et Asche avaient préalablement montré en examinant des tétrapeptides de la forme Ac-Ala-Ala-Pro-Xaa-NH-PhNO₂ que la valine est l'acide aminé qui se fixe le mieux dans le sous-site S_1 de l'élastase (178). Amour et coll. ont donc retenu la séquence Ala-Ala-Pro-Val pour une bonne reconnaissance des sous-sites S_1 - S_4 . Ils ont, lors d'une première étude, synthétisé l'hexapeptide Z-Ala¹-Ala²-Pro³-Val⁴-Ile⁵-Leu⁶-OMe et le dérivé hydrazide Z-Ala-Ala-Pro-Valψ[CO-NH-NH]Ile-Leu-OMe (175). Le groupement protecteur benzyloxycarbonyle (Z) a été introduit à l'extrémité N-terminale dans le but d'accroître l'absorbance ultraviolet (UV) de la molécule. L'enchaînement Ile⁵-Leu⁶ a été ensuite remplacé par la séquence Ala⁵-Ala⁶ pour diminuer l'hydrophobie et ainsi obtenir une meilleure solubilité dans l'eau lors de la réalisation des tests biologiques. Cette substitution a également pour effet de restreindre l'encombrement stérique autour du site de clivage attendu, la liaison peptidique Val⁴-Ala⁵. Enfin, la fonction ester COOMe a été remplacée par le lien amide CONHⁱPr afin de limiter les éventuelles complications liées à l'hydrolyse de la liaison ester.

Six hexapeptides et pseudo-hexapeptides ont donc été synthétisés en phase liquide homogène et étudiés (74).

- 1 : Z-Ala-Ala-Pro-Val-Ile-Leu-OMe
- 2 : Z-Ala-Ala-Pro-Valψ[CO-NH-NH]Ile-Leu-OMe
- 3 : Z-Ala-Ala-Pro-Valψ[CO-NH-NH]Ala-Ala-NHⁱPr
- 4 : Z-Ala-Ala-Proψ[CO-NH-NH]Val-Ala-Ala-NHⁱPr
- 5 : Z-Ala-Alaψ[CO-NH-NH]Pro-Val-Ala-Ala-NHⁱPr
- 6 : Z-Ala-Ala-Pro-Val-Ala-Ala-NHⁱPr

b) Les résultats :

Les hexapeptides **1**, **2**, **3** et **6** sont hydrolysés par l'ELH. Le clivage se produit après le résidu valine. Si l'insertion d'un lien hydrazide entre Val⁴ et Ile⁵ ou entre Val⁴ et Ala⁵ ne permet pas l'obtention d'inhibiteurs, elle entraîne cependant une diminution de l'efficacité catalytique de l'élastase d'environ un facteur 2 et de l'affinité d'environ un facteur 5. A la différence des azapeptides, les hydrazide peptides ne sont pas des dérivés acylants de l'ELH.

Les composés **4** et **5** ne sont en revanche pas clivés par l'élastase. Leur inhibition est par ailleurs réversible. L'activité catalytique de l'ELH est, en effet, régénérée après séparation de l'enzyme et de l'inhibiteur. Il faut également noter que l'hydrazide peptide **5** est un meilleur inhibiteur que le dérivé **4**.

L'étude structurale n'a pas permis d'expliquer le comportement biologique des différents hydrazide peptides. L'évaluation par RMN de la sensibilité au solvant des protons amide a mis en évidence le pseudorepliement γ , stabilisé par la liaison hydrogène bifide, dans les composés **3** (substrat) et **5** (inhibiteur) mais pas dans le dérivé **4** (inhibiteur).

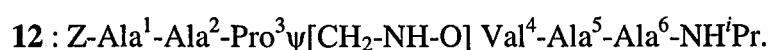
II-1-3 : Présentation de notre étude

Nous avons montré dans le chapitre précédent qu'une grande similitude existe entre la structure des hydrazide peptides et celle des amidoxy peptides. Nous avons alors envisagé la synthèse d'inhibiteurs potentiels amidoxy peptides de l'ELH.

A la différence des hydrazino acides, il n'est pas envisageable de substituer le résidu proline par son analogue aminoxy. Nous avons donc synthétisé les deux amidoxy peptides :



Souhaitant poursuivre notre étude sur les oxime peptides et les amidoxy peptides réduits, nous avons également préparé les quatre pseudohexapeptides :



Ce travail a pour but, au-delà de la conception de nouveaux inhibiteurs de l'ELH, de mieux comprendre le mécanisme de la catalyse enzymatique. L'approche pseudopeptidique paraît en effet adapter pour moduler les interactions enzyme-substrat. Nous avons également cherché à compléter les résultats obtenus sur des dipeptides et à poursuivre la comparaison entre amidoxy et hydrazide peptides. La séquence Ala-Ala-Pro-Val-Ala-Ala présente, par ailleurs, l'avantage de ne pas comporter d'acides aminés à chaîne latérale fonctionnalisée, ce qui, dans un premier temps, permet de limiter les difficultés de la synthèse.

Après l'exposé des différentes méthodes de synthèses employées, seront présentés l'évaluation de l'activité biologique des six pseudohexapeptides ainsi que les résultats de leur étude structurale par RMN.

II-2 : SYNTHESE

II-2-1 : Synthèse des amidoxy peptides en phase liquide homogène

a) Synthèse de Z-Ala-Ala-Pro-Val ψ [CO-NH-O]Ala-Ala-NH^tPr [7] :

Lors de la synthèse récurrente d'un peptide, les acides aminés sont introduits en commençant par l'extrémité C-terminale pour terminer par la partie N-terminale ; on fait réagir la fonction amine du peptide en croissance avec la fonction acide carboxylique libre d'un acide aminé N-protégé. Si le carbonyle carboxylique d'un peptide se trouve activé, il peut, en effet, être attaqué intramoléculairement, en milieu basique, par l'énolate d'imine (forme tautomère déprotonée de la liaison amide adjacente) pour former une oxazolone. Cette dernière, en présence de base, donne naissance à un carbanion stabilisé par résonance. Après protonation et ouverture du cycle, l'acide aminé de l'extrémité C-terminale est épimérisé (*Schéma II-1*) (179, 180).

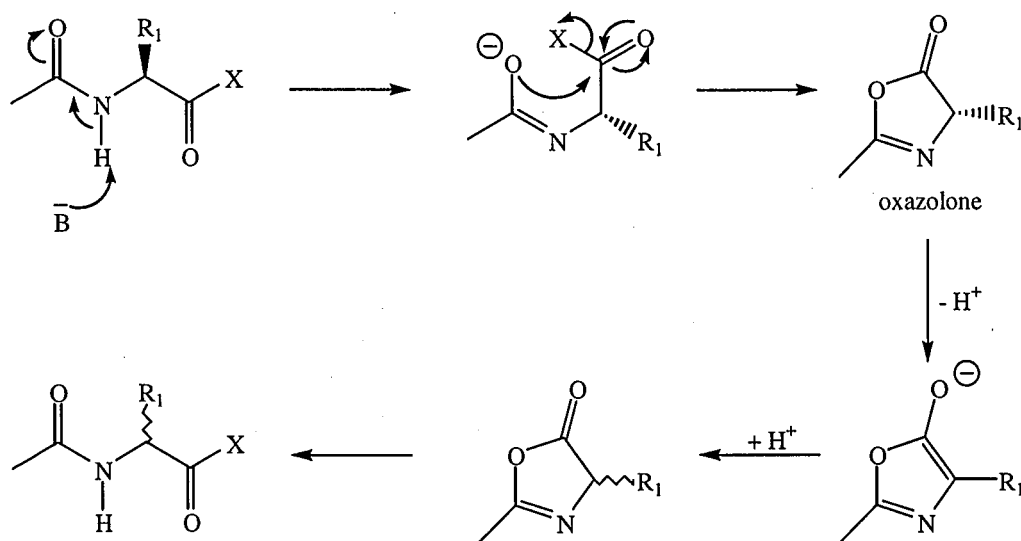


Schéma II-1 : Epimérisation d'un peptide via la formation d'une oxazolone

Une synthèse par fragment peut être envisagée en présence d'une glycine, résidu ne comportant pas de carbone asymétrique, ou d'une proline. Dans ce dernier cas, l'énol d'imine ne peut pas se former. L'hexapeptide **7** possédant une proline en position 3, nous avons donc synthétisé les deux tripeptides Z-Ala-Ala-Pro-OMe et Boc-Valψ[CO-NH-O]Ala-Ala-NHⁱPr (Schéma II-2).

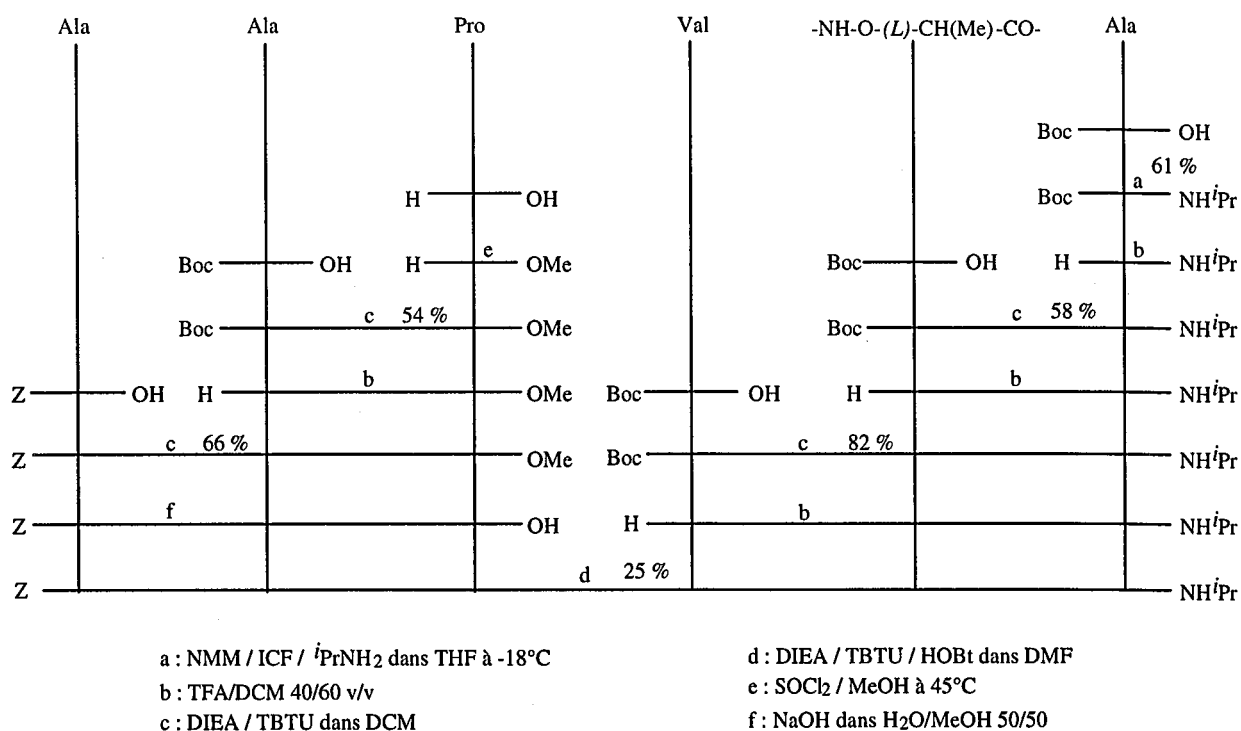


Schéma II-2 : Schéma de synthèse du composé 7

Le couplage de Boc-Ala-OH avec l'isopropylamine a été réalisé suivant la méthode aux anhydrides mixtes. Boc-Ala-NHⁱPr est purifié par lavages. L'analogue aminoxy de l'alanine a été préparé à partir de l'acide (*R*)-(+)-2-bromopropionique. Le mélange classique TFA/DCM 40/60 en volume a été employé pour l'élimination du groupement protecteur Boc. La méthode au TBTU a été retenue pour tous les couplages suivants. Elle avait en effet donné des résultats satisfaisants lors de la synthèse des différents dipeptides. Le caractère hydrophobe des composés synthétisés autorise par ailleurs des lavages par des solutions aqueuses qui permettent d'éliminer en grande partie la tétraméthylurée formée. Bocψ[CO-NH-O]Ala-Ala-NHⁱPr est obtenu avec un rendement de 58 % après purification par recristallisation dans l'AcOEt. Enfin, Boc-Valψ[CO-NH-O]Ala-Ala-NHⁱPr est isolé par précipitation dans l'eau. Le rendement du couplage atteint 82 %.

HCl.H-Pro-OMe a été préparé par estérification de la proline dans un mélange MeOH-SOCl₂. Le chlorhydrate a ensuite été couplé à Boc-Ala-OH pour former le dipeptide Boc-Ala-Pro-OMe avec un rendement voisin de 54 %. Après déprotection de ce dernier et réaction avec Z-Ala-OH, Z-Ala-Ala-Pro-OMe a été obtenu. Il est recristallisé dans un mélange AcOEt/EtOH. Le rendement en produit isolé atteint 66 %.

Z-Ala-Ala-Pro-OMe n'est pas soluble dans l'acétone. La réaction de saponification a été réalisée dans un mélange eau/MeOH 50/50 en volume en présence de 1,05 équivalent de soude. La réaction dure 4 heures ; elle est suivie par ccm. Des extractions par du DCM permettent d'éliminer l'ester qui n'a pas été saponifié.

Le carboxylate a enfin été couplé avec le tripeptide Boc-Valψ[CO-NH-O]Ala-Ala-NHⁱPr, préalablement déprotégé. La faible solubilité des réactifs exige le remplacement du DCM, solvant utilisé lors des couplages précédents, par la DMF. Au TBTU, du HOBt a été ajouté pour améliorer le couplage. La durée de la réaction excède 3 jours. Malgré les précautions prises, le rendement ne dépasse pas 25 %. La difficulté de couplage des deux fragments s'explique en partie par les repliements qui peuvent se former et qui gênent l'approche des deux fonctions réactives. Pour améliorer le rendement, un mélange de solvants polaires DMSO/DMF 50/50 en volume permettrait peut-être de rompre ces repliements. Le TBTU pourrait également être remplacé par un agent de couplage plus réactif comme l'hexafluorophosphate de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (HATU), le 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) étant utilisé à la place du HOBt (*Figure II-3*) (181-183).

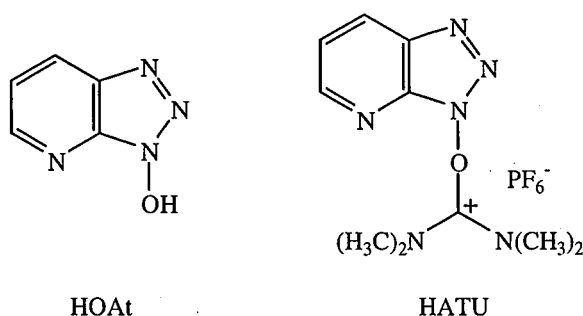


Figure II-3 : Structures du HOAt et du HATU

L'hexapeptide **7** est isolé par précipitation dans l'eau et lavé par du DCM. Il est insoluble dans de nombreux solvants organiques comme le CHCl_3 ou l'acétonitrile.

b) Synthèse de Z-Ala-Ala-Prov[CO-NH-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr [**8**] :

Le schéma de synthèse du composé **8** est semblable à celui du composé **7** (Schéma II-3).

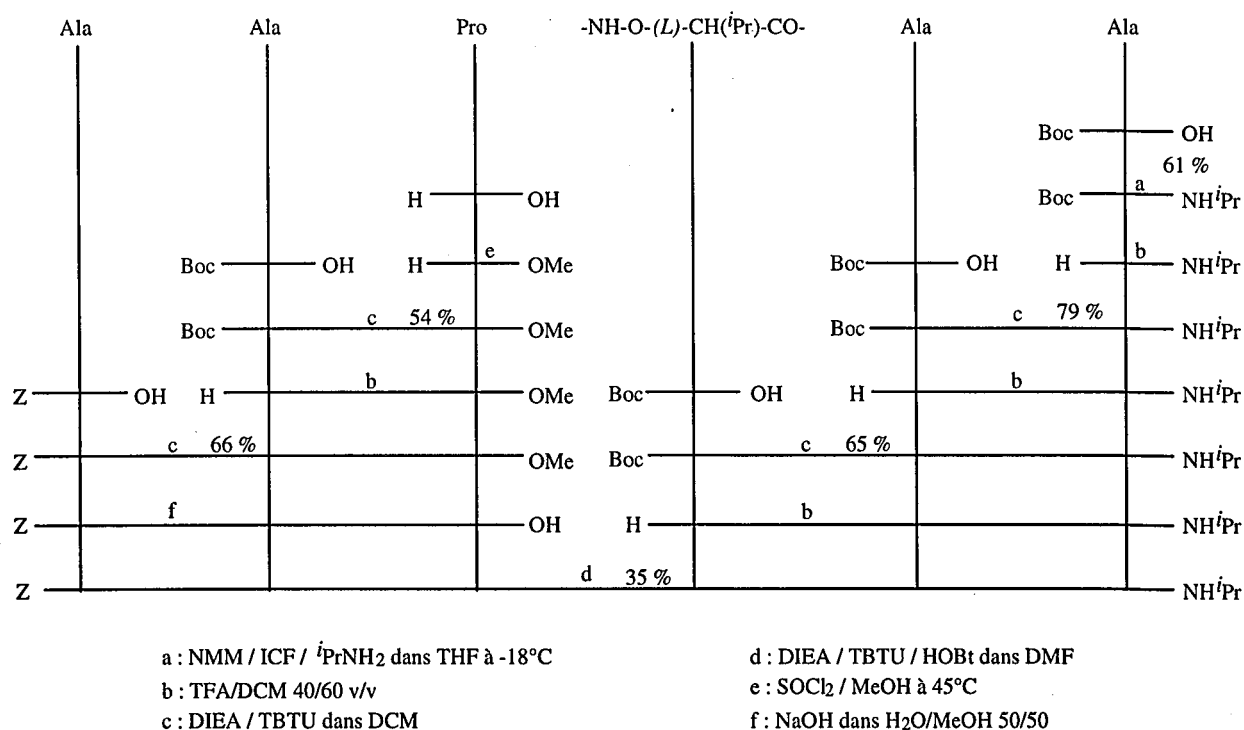


Schéma II-3 : Schéma de synthèse du composé 8

L'analogue aminoxy de la valine est obtenu à partir de la (D)-valine. Comme expliqué dans le chapitre précédent, il est important de purifier l'aminoxy acide par recristallisation

sous forme de sel de dicyclohexylammonium. Boc-Ala-Ala-NH^tPr est isolé après lavages. Le rendement excède 75 %. A la différence de Boc-Valψ[CO-NH-O]Ala-Ala-NH^tPr, Bocψ[CO-NH-O]Val-Ala-Ala-NH^tPr ne précipite pas dans l'eau. Il est purifié par extractions. Le rendement atteint 65 %.

Pour le couplage des deux fragments Bocψ[CO-NH-O]Val-Ala-Ala-NH^tPr, préalablement déprotégé, et Z-Ala-Ala-Pro-OH, la méthode au TBTU dans la DMF a été utilisée. Le rendement dépasse 35 %. Cette faible valeur reste cependant satisfaisante comparée aux 25 % de la synthèse du composé 7. En effet, à la difficulté liée aux couplages de deux tripeptides, s'ajoute la présence d'une fonction aminoxy, moins nucléophile qu'une fonction amine. Le pseudoheptapeptide obtenu est soluble dans l'eau. Il est isolé après chromatographie sur colonne, l'éluant étant composé d'un mélange EtOH/AcOEt/éther de pétrole (EP) 20/50/30 en volume. Le changement de position du motif hydroxamide au sein du peptide modifie considérablement la solubilité. Le composé 8 est soluble dans divers solvants organiques et en particulier dans le CHCl₃.

II-2-2 : Synthèse des amidoxy peptides sur support solide

Le pseudoheptapeptide 8 a également été synthétisé en phase solide. Le motif amidoxy ne présente un intérêt que s'il peut, entre autre, être inséré dans des peptides de grande taille. Pour la préparation de ces derniers, la synthèse sur support solide s'avère indispensable. Nous avons donc vérifié que cette technique pouvait s'appliquer à la synthèse des amidoxy peptides.

a) Généralité sur la synthèse sur support solide :

La synthèse de peptides en phase solide (SPPS) a été mise au point par Merrifield en 1963. Elle consiste à construire un peptide lié d'une manière covalente à un support insoluble, un polymère composé de polystyrène réticulé par 1 % de divinylbenzène.

La première étape consiste à greffer le premier acide aminé sur la résine. On trouve dans le commerce, un certain nombre de résines contenant déjà le premier résidu. Il convient ensuite de déprotéger la fonction amine de ce premier acide aminé. Le deuxième résidu est introduit sous forme *N*-protégée. La croissance du peptide se poursuit ainsi par une succession de couplages et de déprotections. Lors de l'ultime étape, le peptide est coupé de la résine (Figure II-4).

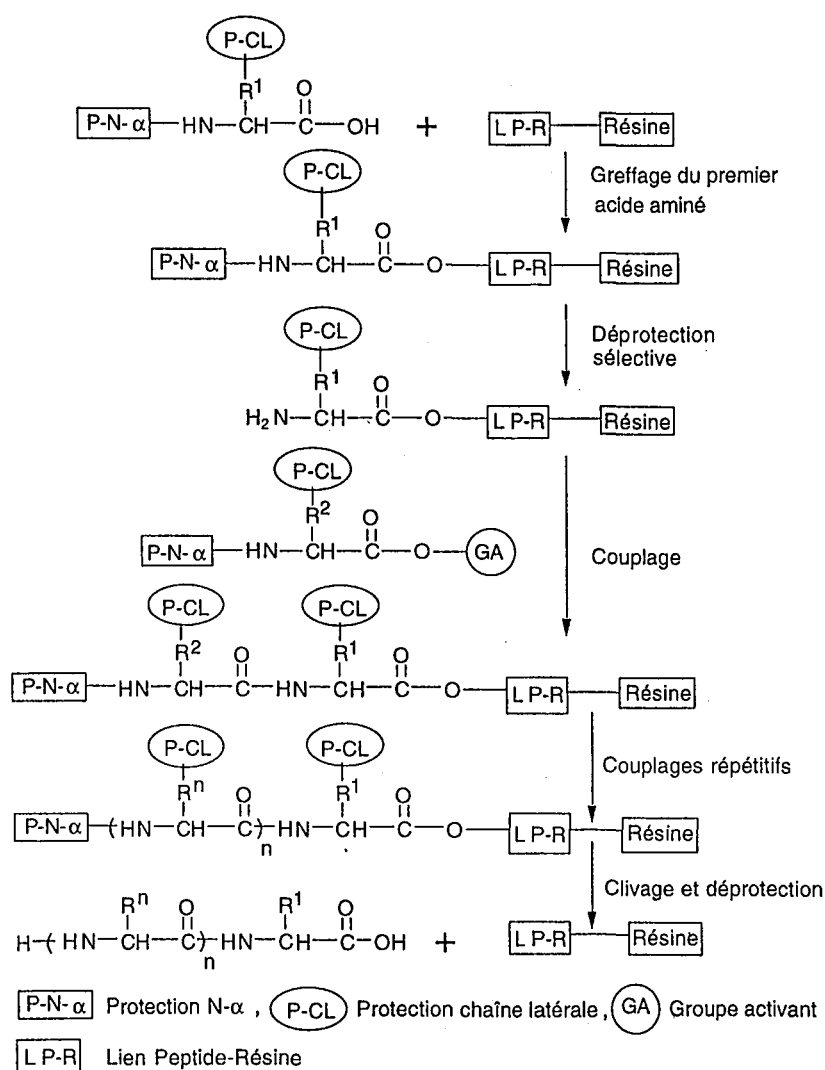


Figure II-4 : Schéma de principe de la synthèse peptidique sur support solide

Le produit brut peut être purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur gel de Séphadex® ou, plus fréquemment, par chromatographie liquide haute performance (HPLC) préparative sur phase C₁₈ polaire inverse. Cette silice greffée retient les différents composés à séparer par ordre inversement proportionnel à leur polarité. L'éluant est constitué d'un mélange d'une solution de 0,1 % en volume de TFA dans l'eau et d'une solution de 20 % d'eau et 0,08 % de TFA dans l'acétonitrile. Sa composition varie au cours du temps. Le gradient ainsi programmé est adapté à chaque peptide purifié.

La SPPS est une technique qui présente de nombreux avantages par rapport à la synthèse "classique" en phase liquide. Les manipulations sont, tout d'abord, considérablement facilitées. L'ensemble des réactions de couplage et de déprotection sont réalisées dans un unique réacteur. Un certain nombre de composés, comme les réactifs de déprotection ou les solvants peuvent être introduits automatiquement (184). Toutes les étapes de purification

après chaque couplage en phase liquide sont remplacées par une unique purification du peptide après son clivage de la résine. Plus d'une dizaine d'acides aminés peuvent être ajoutés par jour. Le gain de temps est donc très important. Il est d'autant plus grand que la durée des réactions elles-mêmes est raccourcie. Les réactifs peuvent en effet être introduits en large excès, ce qui, par ailleurs, permet d'atteindre des rendements proches de 100 %. De simples lavages automatisés éliminent les réactifs qui n'ont pas réagi ainsi que certains produits secondaires formés.

La SPPS présente cependant un certain nombre d'inconvénients. Si une seule étape de déprotection est mise en œuvre, elle peut s'avérer fort délicate. Les réactions parasites et autres délétions se produisant au cours de différents couplages peuvent conduire à un mélange complexe de peptides parfois difficilement purifiables. Le rendement de chaque étape doit donc avoisiner les 100 %. La SPPS est, par ailleurs, une technique coûteuse. Aux réactifs introduits en large excès, s'ajoute une consommation importante en solvants. Enfin, certaines réactions, comme l'hydrogénation catalytique, peuvent difficilement être réalisées en phase solide. Cette technique ne présente pas la souplesse de mise en œuvre de la synthèse en phase liquide. Il n'est, par exemple, pas possible dans les réacteurs utilisés de faire varier la température du milieu réactionnel. Si les synthons sont préalablement préparés par les méthodes classiques en phase homogène, tous les pseudopeptides ne sont pas aisément synthétisés sur support solide.

Les solvants jouent un rôle très important en SPPS (185, 186). Ils doivent, en premier lieu, parfaitement gonfler les billes de polymère pour permettre ensuite aux différents réactifs de pénétrer et d'atteindre les chaînes de peptide en croissance. Le DCM, solvant aprotique peu polaire est utilisé pour expander la résine et pour les lavages. Il est également important de solvater correctement aussi bien les réactifs que les peptides accrochés sur le polystyrène. Les couplages sont donc réalisés dans un solvant aprotique dipolaire, la DMF. Le MeOH, solvant protique, est enfin uniquement employé lors des lavages car il rétracte la résine.

La SPPS a nécessité le développement de méthodes de couplage fortement activante permettant d'atteindre rapidement de très bons rendements. La formation de produits secondaires comme le HMPT ou la tétraméthylurée n'est pas gênante car ces derniers sont facilement éliminés par les lavages successifs. Le TBTU est un réactif qui a été initialement conçu pour une utilisation en phase solide (187). Les méthodes de couplage doivent également être aisément mises en œuvre. L'emploi de la méthode aux anhydrides mixtes, qui exige une température de -18°C , est par exemple difficilement réalisable sans un équipement spécial. Lors d'une réaction de couplage, sont introduits 3 équivalents de TBTU, 3 équivalents de HOBt, pour accroître le rendement et limiter les risques d'épimérisation, 3 équivalents

d'acide aminé *N*-protégé ainsi que 9 équivalents de base, de la DIEA, le tout dissous dans le minimum de DMF. Il est préférable pour fixer chaque acide aminé de réaliser un double couplage dont la durée varie de 10 minutes à plusieurs heures pour les réactions lentes. Des tests sont disponibles pour mettre en évidence les fonctions amine libres. Les billes de polymère prélevées doivent se colorer après l'étape de déprotection mais rester incolores après un couplage correctement effectué. Le test de Kaiser, un mélange constitué de ninhydrine et de phénol en solution dans l'EtOH et d'une solution aqueuse de cyanure de potassium dans la pyridine entraîne l'apparition, le plus souvent, d'une couleur violette (188). Avec le test à l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBSA), la résine se colore en orange (*Figure II-6*) (189).

b) Synthèse de Z-Ala-Ala-Prov[CO-NH-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr [8] :

Seulement quelques motifs pseudopeptidiques ont été insérés sur support solide. A ce jour, aucun amidoxy peptide n'a été ainsi préparé. En phase homogène, un aminoxy acide est couplé de la même manière qu'un acide aminé. La synthèse du composé **8** en phase solide ne doit pas *a priori* poser de difficultés.

Lors des couplages, les acides aminés ont été introduits sous forme Boc-protégée. Le choix de la stratégie de synthèse Boc conditionne en particulier le type de résine utilisé. Le groupement C-terminal NHⁱPr constitue une autre contrainte. En effet, le clivage du peptide sur la résine génère habituellement une fonction acide carboxylique. Nous avons dû choisir une résine particulière, une résine oxime ou résine de Kaiser sur laquelle le peptide est clivé par un nucléophile (*Figure II-5*) (190).

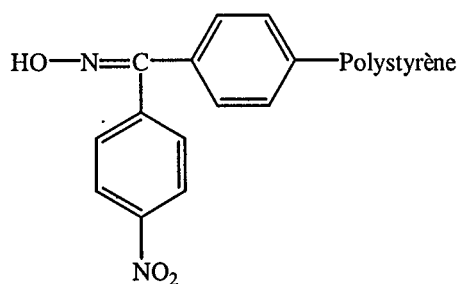


Figure II-5: Représentation de la résine oxime ou résine de Kaiser

La première étape consiste à accrocher le premier acide aminé, une alanine dans notre cas. 1,6 équivalents de Boc-Ala-OH et de DCCI sont agités dans le DCM pendant une nuit en présence d'un équivalent de résine oxime (191). Cette dernière est ensuite lavée par du DCM et un mélange DCM/MeOH 50/50 en volume et de nouveau par du DCM. Nous n'avons pas

pu mettre en évidence la fixation de l'alanine par simple pesée et ainsi nous n'avons pas pu déterminer le taux de substitution de la résine. Nous avons, lors des synthèses suivantes, modifié ce mode opératoire. Pour améliorer la réaction avec la fonction oxime et limiter le risque d'épimérisation, nous avons, en effet, ajouté aux 3 équivalents de Boc-Ala-OH et aux 3 équivalents de DCCI, 6 équivalents de 2-(hydroxyimino)-2-cyanoacétate d'éthyle (EACNOx) (*Figure II-6*), réactif préconisé à la place du HOBt (192, 193). Les fonctions oxime libres doivent être bloquées pour éviter qu'elles réagissent lors des étapes ultérieures de couplage, aboutissant ainsi à des peptides délétés. Nous avons donc effectué un *capping* de la résine par un mélange d'anhydride acétique (Ac_2O) et de DIEA dans la DMF (191).

La liaison oxime liant le peptide en croissance au polystyrène est sensible aux acides forts. Le TFA pur habituellement utilisé (184) en stratégie Boc pour les étapes de déprotection est remplacé par un mélange 25 % en volume de TFA dans le DCM (190). Le temps de réaction est alors porté à 30 minutes. Il faut également noter que le nombre d'étapes de déprotection est limité à une dizaine environ.

L'apparition d'une couleur violette lors de la réalisation du test de Kaiser a mis en évidence la fixation du résidu alanine. Pour les étapes de couplage, à la méthode aux anhydrides symétriques initialement préconisée (190, 191), nous avons préféré la méthode au TBTU/HOBt (194, 195). La durée du premier couplage a été de 20 minutes, celle du second d'une heure. La difficulté prévue de la réaction de la Boc-proline sur la fonction aminoxy a conduit à augmenter le temps du couplage à 4 heures pour le premier et à 9 heures pour le second. Nous avons également remplacé l'association TBTU/HOBt par les réactifs HATU/HOAt. Nous avons, enfin, employé un mélange de solvant DMF/DMSO 50/50 en volume afin de supprimer d'éventuels repliements du peptide en croissance induits par le résidu aminoxy acide.

Ni la fonction amine secondaire de la proline, ni la fonction aminoxy ne sont mises en évidence avec les tests de Kaiser et au TNBSA. Deux résidus successifs sont introduits sans pouvoir contrôler l'avancement des réactions de couplage et de déprotection. Nous avons alors utilisé le test à la 2,3,5,6-tétrachloro-1,4-benzoquinone, ou test au chloranil (*Figure II-6*) (196). Ce dernier, en solution dans le toluène, permet d'identifier les fonctions amine secondaire en présence d'acétone et les fonctions amine primaire en présence d'acétaldéhyde. Un test positif se caractérise par l'apparition d'une coloration bleutée. Les fonctions aminoxy libres ne réagissent pas nettement. Il a donc été difficile de suivre l'avancement du couplage de la proline sur l'analogue aminoxy de la valine.

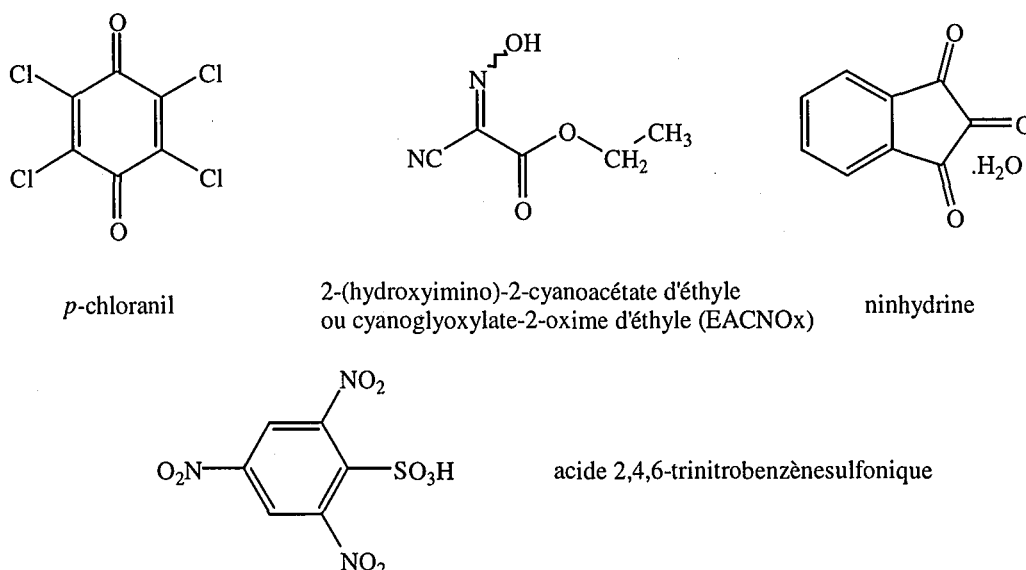


Figure II-6: Structure de différents composés utilisés en SPPS

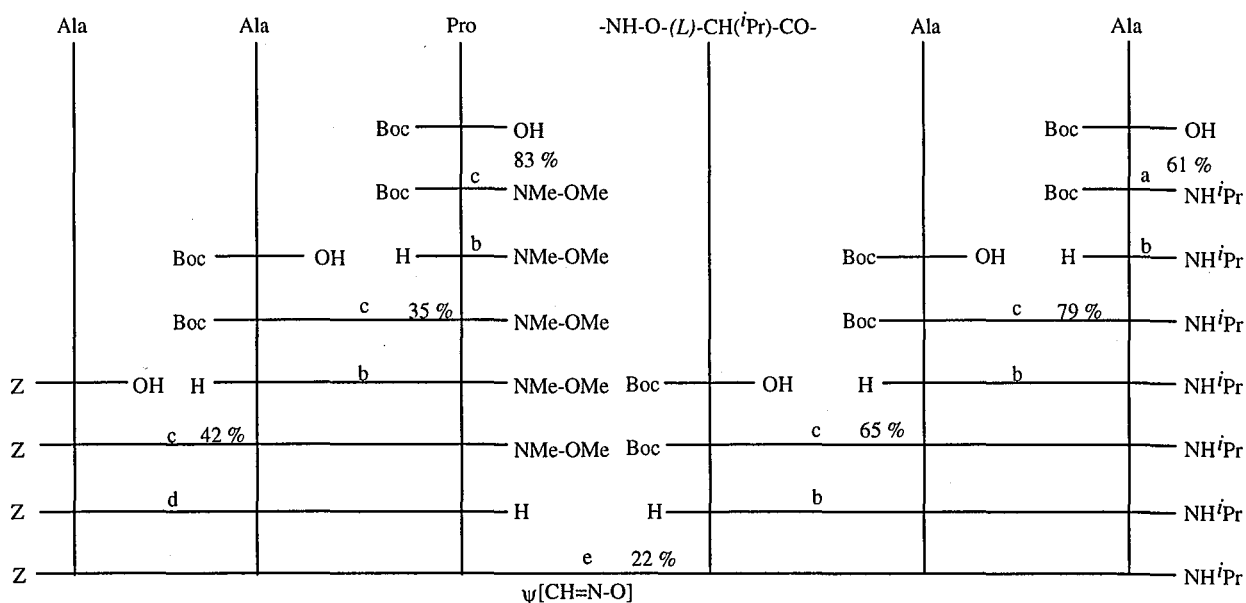
Une fois la synthèse du peptide terminée, la dernière étape consiste à couper le peptide de la résine. La nature oxime du lien entre le peptide et le polymère a été retenue pour permettre un clivage par un nucléophile, comme une alkylamine (191) ou un acide aminé C-protégé (190, 197, 198). Dans un premier temps, nous avons synthétisé le peptide Z-Ala-Ala-Proψ[CO-NH-O]Val-Ala-Ala-résine qui a ensuite été clivé par une solution d'isopropylamine dans le DCM. Lors d'une deuxième synthèse, nous avons préparé Z-Ala-Ala-Proψ[CO-NH-O]Val-Ala-résine qui a alors été clivé dans le DCM par H-Ala-NHⁱPr. Les deux méthodes donnent des résultats comparables. La résine a été filtrée puis traitée par du TFA pour décrocher d'éventuelles chaînes peptidiques restées fixées sur le polymère. Nous avons ainsi pu vérifier le caractère total du clivage.

Le produit brut est purifié par HPLC. Le pseudohexapeptide attendu a été isolé.

II-2-3 : Synthèse des oxime peptides et des amidoxy peptides réduits

a) Synthèse de Z-Ala-Ala-Proψ[CH=N-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr [10] :

Nous avons synthétisé le peptide aldéhyde Z-Ala-Ala-Pro-H pour le coupler avec le tripeptide Bocψ[CO-NH-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr (Schéma II-4).



a : NMM / ICF / ⁱPrNH₂ dans THF à -18°C

b : TFA/DCM 40/60 v/v

c : DIEA / TBTU dans DCM

d : LiAlH₄ dans THF à -15°C puis KHSO₄ 5 %

e : AcONa / tamis moléculaire dans EtOH

Schéma II-4 : Schéma de synthèse du composé 10

Pour cela, l'amide de Weinreb Boc-Pro-N(Me)-OMe est isolée après purification par lavages. La méthode au TBTU a été mise en œuvre pour tous les couplages peptidiques. Le dipeptide Boc-Ala-Pro-N(Me)-OMe et le tripeptide Z-Ala-Ala-Pro-N(Me)-OMe ont été ensuite synthétisés ; ils sont purifiés respectivement par lavages et par recristallisation dans un mélange AcOEt/EP. Z-Ala-Ala-Pro-N(Me)-OMe a été réduit par LiAlH₄ à -15°C dans le THF. L'aldéhyde est seulement purifié par lavages pour éviter toute épimérisation. Le spectre RMN indique la présence avec l'aldéhyde de faibles quantités de Z-Ala-Ala-Pro-N(Me)-OMe qui n'a pas réagi ainsi que d'un peptide ne comportant pas de résidu proline. La formation de Z-Ala-Ala-Pro-H est une étape délicate. Elle requiert, en effet, un réducteur efficace du carbonyl hydroxamide qui ne réagit pas avec le carbonyl de la fonction amide disubstituée de la proline. Le tripeptide aldéhyde est obtenu avec un rendement satisfaisant mais il pourrait être envisagé pour sa formation une réduction en alcool suivie d'une oxydation de Swern.

Le tripeptide Bocψ[CO-NH-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr a préalablement été préparé lors de la synthèse du composé 8. Après déprotection, il a été couplé avec le fragment aldéhyde. La purification par chromatographie sur gel de silice permet de séparer le pseudohepta-peptide 10 attendu. Quelques traces de l'amide de Weinreb Z-Ala-Ala-Pro-N(Me)-OMe ont cependant été mises en évidence par RMN dans le pseudohepta-peptide final, le rapport frontal (R_f) des deux composés étant, en effet, très proche. Le faible rendement de la formation de l'oxime, seulement 22 %, est en partie la conséquence de l'étape de réduction.

b) Synthèse de Z-Ala-Ala-Pro-Val ψ [CH=N-O]Ala-Ala-NHⁱPr [9]:

Le composé **9** a été synthétisé suivant le schéma réactionnel de la *Schéma II-5*.

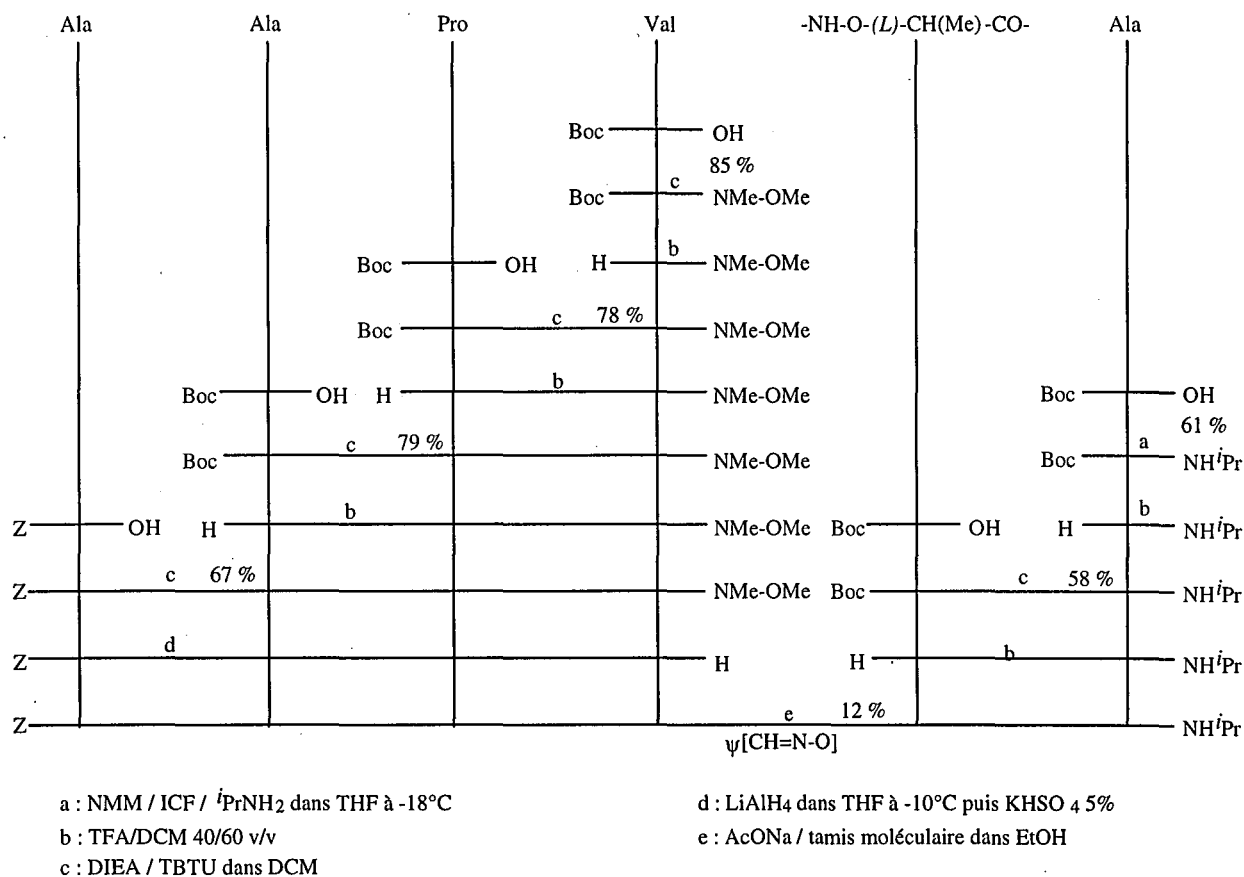


Schéma II-5 : Schéma de synthèse du composé 9

Nous avons préparé le dipeptide Boc ψ [CH=N-O]Ala-Ala-NHⁱPr et le tétrapeptide Z-Ala-Ala-Pro-Val-N(Me)-OMe.

La réduction de ce dernier a posé un certain nombre de difficultés. En effet, Z-Ala-Ala-Pro-Val-N(Me)-OMe n'est pas soluble dans le THF. Nous avons alors choisi le DME dans lequel l'amide de Weinreb n'est que partiellement soluble à basse température. Après une première réduction de 2 heures à -30°C, nous avons majoritairement récupéré le produit de départ. Nous avons alors élevé la température vers -10°C et une deuxième réduction a permis de former du peptide aldéhyde ainsi que de nombreuses impuretés. Nous avons cependant réalisé le couplage avec Boc ψ [CH=N-O]Ala-Ala-NHⁱPr, préalablement déprotégé. Nous avons pu mettre en évidence trois produits : le pseudohexapeptide **9** attendu, l'amide de

Weinreb résiduelle et un peptide ne comportant aucun résidu valine et aucun résidu proline, lequel peut, par ailleurs, être éliminé par précipitation dans le MeOH ou dans l'acétonitrile. Le faible rendement de 12 % s'explique par l'attaque préférentielle de l'hydrure sur la fonction amide disubstituée de la proline et par la faible solubilité de l'amide de Weinreb de départ. Cette dernière difficulté pourrait être surmontée par l'ajout de HMPT dans le milieu réactionnel ou par le remplacement du DME par un solvant comme le dioxane. La mise en œuvre de la méthode de réduction via les β -amino alcool n'est pas envisageable. Le résidu valine risquerait en effet de racémiser après activation sous forme d'anhydride mixte. Après chromatographie sur gel de silice, des traces de Z-Ala-Ala-Pro-Val-N(Me)-OMe résiduel ont pu être mises en évidence par RMN.

c) Synthèse des amidoxy peptides réduits :

Les oxime hexapeptides ont été réduits par NaBH_3CN dans le MeOH à un pH de 3. La durée de la réaction est de 6 jours. Le réducteur est introduit par portions en très large excès.

La réaction est quasi quantitative. Le rendement en produit isolé dépasse 80 % et 90 % respectivement pour les dérivés **11** et **12**. Les chromatographies sur gel de silice permettent aisément d'éliminer les traces d'amide de Weinreb présentes avec les oxime peptides.

II-2-4 : Conclusion

Les amidoxy peptides ont aisément été préparés suivant les méthodes classiques en phase liquide. Le rendement du couplage des deux fragments tripeptidiques reste faible mais les valeurs obtenues sont voisines de celles de la synthèse des hydrazide peptides qui ont été publiées (74). Nous avons également montré que la synthèse des amidoxy peptides était transposable à la phase solide. Quant aux oxime peptides, la présence d'un résidu proline rend délicate l'étape de réduction. Les conditions opératoires mises au point pour la synthèse des amidoxy peptides réduits ont en revanche abouti à des réactions quasi quantitatives.

Les synthèses n'ont pas été optimisées. Nous avons cherché dans un premier temps à isoler les différents pseudohexapeptides afin de commencer l'étude structurale et surtout pour évaluer l'activité biologique des différents inhibiteurs potentiels.

II-3 : ETUDE DES PSEUDOHXAPEPTIDES SYNTHETISES

Nous avons évalué l'activité biologique des six pseudohexapeptides synthétisés : leur pouvoir inhibiteur et leur affinité pour l'ELH. Nous avons parallèlement mené une étude structurale afin de mieux comprendre le mécanisme de la catalyse et d'essayer d'interpréter les résultats des tests biologiques.

II-3-1 : Tests biologiques

Ils ont été réalisés au Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire et Fonctionnelle (Institut Jacques Monod de Jussieu) par N. Boggetto, T. Tran et M. Reboud-Ravaux.

Dans un premier temps, nous avons recherché l'effet inhibiteur des pseudohexapeptides. Lorsque l'ELH est incubée en présence d'un substrat chromogène (MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-NH-PhNO₂) (*Figure II-7*), la concentration en *para*-nitroaniline évolue linéairement pendant 1 minute, ce qui permet d'évaluer l'activité de l'enzyme.

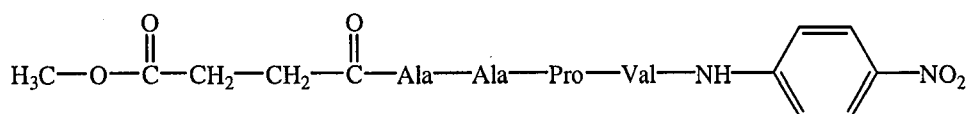


Figure II-7 : Structure de MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-NH-PhNO₂

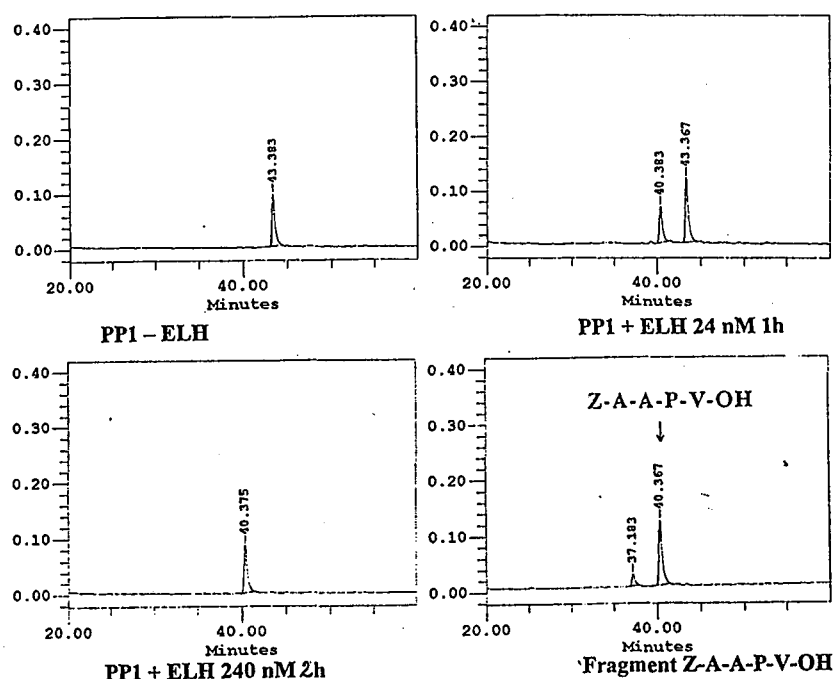
L'influence sur l'activité de l'ELH des six inhibiteurs potentiels synthétisés a été recherchée après 1 minute et 10 minutes d'incubation de l'enzyme en présence du pseudohexapeptide dont la concentration a été fixée à 225 μM et à 450 μM. Ces valeurs ont été imposées par les limites de solubilité des pseudohexapeptides. Les composés **10**, **11** et **12** n'ont pas présenté de caractère inhibiteur. Le dérivé **8** ne provoque qu'une faible inhibition. Quant aux composés **7** et **9**, ils induisent une inhibition plus significative. Les résultats sont rassemblés dans le *tableau II-1*.

Composés	225 μ M		450 μ M	
	1 min	10 min	1 min	10 min
7	25 %	23 %	46 %	37 %
8	–	–	17 %	16 %
9	18 %	19 %	32 %	28 %

Tableau II-1 : Pourcentage d'inhibition des différents pseudohexapeptides ($T = 25^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 8,0$; $[\text{ELH}] = 20 \text{ nM}$; $[\text{S}]_0 = 40 \mu\text{M}$; 10 % (v/v) DMSO)

Il convenait ensuite de rechercher si les composés testés précédemment étaient hydrolysés par l'ELH. Pour cela, le pseudohexapeptide est incubé en présence d'enzyme. Les molécules de peptides sont séparées de l'ELH par filtration-centrifugation à l'aide d'un Centricon 10. La solution de petites molécules ainsi obtenue est chromatographiée par HPLC et les composés séparés sont détectés en sortie de colonne par spectroscopie d'absorption UV.

Aucune hydrolyse des pseudohexapeptides **8-12** n'a été observée. Quant au composé **7** ($t_R = 43,4 \text{ min}$), après 1 heure d'incubation en présence d'ELH à la concentration de 24 nM, un nouveau pic apparaît à $t_R = 40,4 \text{ min}$. Ce pic correspond au fragment d'hydrolyse Z-Ala-Ala-Pro-Val-OH synthétisé par ailleurs. Après 2 heures d'incubation du pseudohexapeptide avec l'ELH de concentration 240 nM, le pic du composé **7** a complètement disparu (*Figure II-8*).



*Figure II-8 : Chromatogrammes HPLC du composé **7** (colonne : C18 phase inverse ; éluant : eau + 0,1 % TFA / acétonitrile + 0,07 % TFA ; débit : 0,75 mL/min ; détection : 220 nm)*

Le composé **7** est donc un substrat de l'ELH avec un site de coupure enzymatique situé entre la valine et le résidu analogue aminoxy de l'alanine. Seuls les composés **8** et **9** dont la modification pseudopeptidique se trouve entre les résidus proline et valine, sont des inhibiteurs.

Une étude structurale par RMN des six pseudoheptaptides a également été entreprise.

II-3-2 : Etude structurale

a) Caractérisation et expériences de RMN à deux dimensions :

Nous avons, en premier lieu, cherché à déterminer le déplacement chimique en RMN des différents protons constituant les pseudoheptaptides. Ce travail préliminaire de caractérisation permet d'évaluer la pureté des composés. L'attribution des signaux est également indispensable pour exploiter ultérieurement les résultats des effets de solvant et de température qui apportent les informations sur la structure des produits étudiés.

La RMN à une dimension utilisée pour l'étude des dipeptides ne suffit pas. Les spectres obtenus trop complexes ne peuvent en effet être attribués. Nous avons dû mettre en œuvre des expériences de RMN à deux dimensions. Ces dernières se répartissent en deux catégories : les COSY (**C**ORrelation **S**pectroscop**Y**) (199) ou les TOCSY (**T**otal **C**orrelation **S**pectroscop**Y**), encore appelées HOHAHA (**H**OMonuclear **H**Artmann-**H**Ahn) (200, 201) qui mettent en évidence les couplages entre protons au travers de liaisons covalentes (couplages scalaires) et les NOESY (**N**uclear **O**verhauser **E**nhanced **S**pectroscop**Y**) (202, 203) ou ROESY (**R**otating frame **n**OE **S**pectroscop**Y**) (204, 205) qui mettent en évidence les corrélations des protons, dans l'espace, distants de moins de 4 angströms (couplage dipolaire).

La différence entre l'expérience COSY et l'expérience TOCSY à un temps de mélange de 70 ms, réside dans la détection des couplages respectivement directs entre protons portés par des atomes vicinaux (3J) et relayés entre protons d'un même système de spin. Ainsi, dans les spectres TOCSY, le proton amide est couplé avec chacun des protons de l'acide aminé auquel il appartient. Ces deux seules expériences ne sont encore pas suffisantes pour l'attribution des signaux. Les pseudoheptaptides étudiés comportent en effet quatre résidus alanine qu'il est alors impossible de distinguer. Sur les spectres NOESY et ROESY, le proton amide d'un résidu *i* est, le plus souvent, couplé avec le proton du carbone α de l'acide aminé *i-1*. Les effets Overhauser permettent de déterminer les enchaînements entre les acides aminés et donc de séquencer les peptides.

L'expérience NOESY ne donne pas toujours des résultats satisfaisants. Selon la flexibilité des molécules étudiées, en grande partie liée à leur taille, dont dépend leur temps de corrélation (τ_c) et suivant la puissance du spectromètre utilisé (ω), les effets NOE peuvent s'annuler ($\omega\tau_c \approx 1$). Les cartes NOESY des pseudohepta-peptides réalisées sur un spectromètre 200 MHz ne comportent quasiment aucune tache de corrélation. Ces dernières apparaissent avec un spectromètre 600 MHz. Quand la NOESY s'avère inadaptée, elle est remplacée par l'expérience ROESY. Si les effets Overhauser sont généralement de plus faible intensité en ROESY qu'en NOESY, ils ne s'annulent cependant jamais. L'expérience ROESY permet également de distinguer les taches de couplage entre protons différents qui sortent en négatif des taches d'échange entre mêmes protons de deux conformations en équilibre qui sortent en positif.

Les spectres ont été réalisés dans le DMSO- d_6 sur un spectromètre 400 MHz (composé **7**) et à 600 MHz (composé **8-12**). Les pseudohepta-peptides **10** et **12** ont également été étudiés dans $CDCl_3$ respectivement sur spectromètre 200 MHz et 600 MHz.

b) Mise en évidence de différentes isoméries :

Aux pics intenses du peptide attendu, s'ajoutent un certain nombre de signaux correspondant à des composés minoritaires. Ces derniers ont été identifiés comme étant des isomères des pseudohepta-peptides. En effet, des taches d'échange relient entre-elles les différentes formes d'un même acide aminé. Il est également parfois possible d'identifier les couplages entre protons d'un isomère minoritaire.

La première isomérisie mise en évidence se situe au niveau de l'enchaînement Ala²-Pro³. La proline est en effet connue pour permettre l'existence de liaison amide cis. Sur les cartes NOESY ou ROESY une tache de corrélation apparaît entre le C ^{α} H de l'alanine 2 et les C ^{δ} H₂ de la proline de la forme trans alors que, pour la forme cis, une tache relie les C ^{α} H de l'alanine 2 et de la proline (*Figure II-9*).

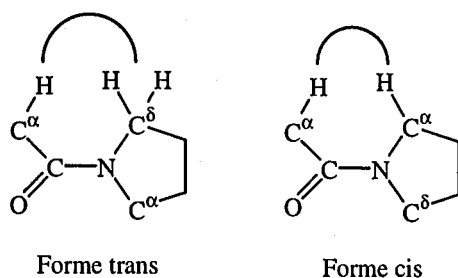


Figure II-9 : Représentation des effets Overhauser observés dans les formes trans et cis de la liaison Ala²-Pro³

Le pourcentage respectif des formes cis et trans varie d'un pseudoheptapeptide à l'autre avec la nature du solvant utilisé pour la RMN. Dans le DMSO- d_6 , la forme cis est minoritaire dans les deux amidoxy peptides et dans les deux autres familles de pseudoheptapeptides quand la modification chimique se situe entre les résidus Val⁴ et Ala⁵. La proportion, dans le DMSO- d_6 , de la forme cis croît avec la présence d'une liaison oxime entre Pro³ et Val⁴. Quant au composé **12**, la proportion de forme cis passe de moins de 10 % dans CDCl₃ à 40 % environ dans le DMSO- d_6 .

L'étude des spectres RMN montre, par ailleurs, une isomérisation de la liaison uréthane Z-Ala¹. Ainsi les résidus Ala¹ et Ala² donnent naissance à trois séries de signaux correspondant aux formes trans/trans, cis/trans et trans/cis des liaisons amide Z-Ala¹/Ala²-Pro³. La forme cis/cis n'apparaît que dans le composé **12**.

Il faut, enfin, noter que la possible isomérisation Z/E de la liaison oxime n'a pas été observée sur les pseudoheptapeptides isolés après chromatographie sur gel de silice. Le composé **10** a été traité par un mélange 40/60 DCM/TFA pendant 2 heures. Les spectres alors réalisés dans CDCl₃ et dans le DMSO- d_6 mettent en évidence la formation d'un isomère dont l'un des NH est peu solvatoché dans le DMSO- d_6 et pour lequel on peut attribuer la configuration Z à la liaison oxime. Le diastéréoisomère Z ainsi obtenu est très minoritaire et ne peut être isolé.

c) Méthodes employées pour l'étude structurale :

Nous nous sommes intéressés à la structure des pseudoheptapeptides de forme trans/trans. Les autres isomères sont présents en trop faible proportion pour pouvoir être étudiés.

Les expériences RMN ROESY et NOESY ne sont pas uniquement utiles pour l'attribution des signaux. Elles peuvent également fournir des informations sur la structure des composés. L'indication d'une distance inférieure à 4 Å entre deux protons est une contrainte qui, introduite dans un logiciel de modélisation moléculaire, permet de générer des structures de basse énergie. Les pseudoheptapeptides étant des peptides de taille modeste trop flexibles, les données NOESY ou ROESY sont insuffisantes pour mener une étude structurale.

Les liaisons hydrogène intramoléculaires ont été mises en évidence en RMN par des effets de solvant. L'influence de la solvation sur le déplacement chimique des protons amide a été examinée dans des mélanges croissants CDCl₃/DMSO- d_6 pour tous les pseudoheptapeptides à l'exception des amidoxy peptides car le composé **7** n'est pas soluble dans le CDCl₃. Nous avons alors retenu des mélanges acétonitrile- d_3 /DMSO- d_6 , la proportion

minimale en volume de DMSO- d_6 nécessaire étant de 20 %. Les résultats des effets de solvants ont été complétés par des effets de température dans le DMSO- d_6 entre 23°C et 55°C. Quand la température augmente, le déplacement chimique décroît faiblement (-2 ppb/K) pour les protons engagés dans une liaison hydrogène et plus fortement (-6 ppb/K) pour les protons libres. Cependant, dans le DMSO- d_6 , solvant très polaire, la plupart des NH sont solvatés. Les résultats des effets de température ne sont donc pas significatifs, la majeure partie des repliements pouvant être mis en évidence par les effets de solvant ne subsistant pas dans le DMSO- d_6 .

Bien que les composés étudiés soient de taille restreinte, ils sont trop complexes pour envisager une étude par infrarouge sans marquage isotopique des carbonyles par exemple.

Dans le *tableau II-2*, nous avons rassemblé les écarts entre les déplacements chimiques des protons NH des composés **7-12** dans le CDCl₃ ou dans le mélange acétonitrile- d_3 /DMSO- d_6 80/20 (v/v) et dans le DMSO- d_6 .

n° des composés	Ala ¹	Ala ²	Val ⁴	Ala ⁵	Ala ⁶	NH ⁱ Pr
7 (a)	0,54	0,39	0,43	0,13	0,15	0,52
8 (a)	0,51	0,42	0,07	0,16	0,29	0,55
9 (b)	1,80	0,59	0,67	–	0,68	1,56
10 (b)	1,81	0,96	–	1,22	1,06	1,34
11 (b)	1,88	0,52	0,75	0,55	1,14	0,42
12 (b)	1,76	0,39	0,27	0,50	0,79	1,18

Tableau II-2 : Ecart des déplacements chimiques des protons NH dans les composés 7-12 entre le DMSO- d_6 et le CDCl₃ (b) ou le mélange acétonitrile- d_3 /DMSO- d_6 80/20 (v/v) (a) (les valeurs correspondant au NH $\underline{O}$ amidoxy ou hydroxylamine sont indiquées en gras)

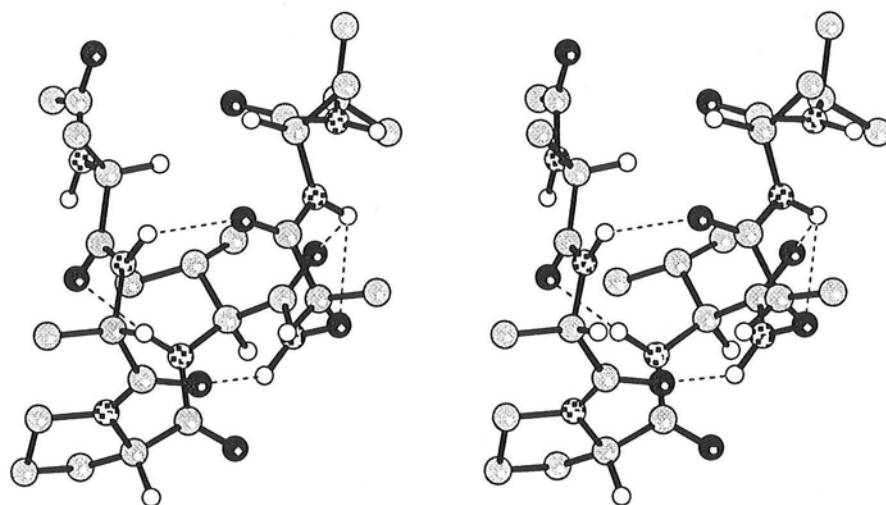
Quelles que soient la nature et la position de la modification chimique, le proton amide du résidu Ala² est le proton le moins accessible au solvant. Ce résultat ainsi que la présence au milieu de la séquence d'un résidu proline, acide aminé connu pour favoriser les repliements au détriment des hélices, nous a permis d'imaginer des conformères sur la base d'une structure de type feuillet β antiparallèle. Les structures obtenues par modélisation moléculaire avec le programme MM2 tiennent compte des informations apportées par la RMN. Il faut noter que, dans aucun des six pseudohexapeptides étudiés, le NH(Ala¹) n'est engagé dans une liaison hydrogène. A l'exception du composé **11**, le NHⁱPr est également fortement solvaté dans le

DMSO- d_6 . Les extrémités *N*- et *C*-terminales sont donc flexibles. Leur orientation ne peut être connue avec précision.

d) Structure du composé **7** :

L'effet de solvant dans des mélanges acétonitrile- d_3 /DMSO- d_6 du composé **7** (tableau II-2) montre une grande accessibilité au solvant des protons $\text{NH}(\text{Ala}^1)$ et du groupement NH^iPr . Inversement, le proton amide du résidu Ala^6 ainsi que le proton amidoxy NHO présentent une quasi insensibilité au solvant et semblent engagés dans des liaisons hydrogène fortes. Les deux autres groupements NH amide ont un comportement intermédiaire vis à vis de la solvation.

Dans la structure obtenue par modélisation moléculaire (Figure II-10), les $\text{NH}(\text{Ala}^1)$ et du groupement NH^iPr sont libres. Le $\text{NH}(\text{Ala}^6)$ est engagé dans la liaison hydrogène bifide à l'origine du pseudorepliement γ caractéristique des amidoxy peptides. L'acidité accrue du proton amidoxy NHO par rapport à un proton amide nous permet de postuler l'existence d'une liaison hydrogène avec le $\text{CO}(\text{Ala}^2)$ qui génère un repliement de type βI comme l'indique les valeurs des angles de torsion (tableau II-3). La modélisation moléculaire met en évidence deux autres liaisons hydrogène, *a priori* plus faibles, d'une part entre le NH du résidu Ala^2 et le $\text{CO}(\text{Ala}^5)$ et d'autre part entre le $\text{NH}(\text{Val}^4)$ et le $\text{CO}(\text{Ala}^1)$. Cette dernière interaction stabilise un repliement de type $\beta\text{II}'$ (tableau II-3).



*Figure II-10 : Vues stéréoscopiques de la structure du composé **7** obtenue par modélisation moléculaire*

	Ala ²		Pro ³		Val ⁴			Ala ⁵		
	Φ (°)	Ψ (°)	Φ (°)	Ψ (°)	ν (°)	Φ (°)	Ψ (°)	ν (°)	Φ (°)	Ψ (°)
composé 7	63	-102	-46	-37	–	-83	23	107	-61	-40
composé 8	-133	59	-72	22	-114	60	20	–	56	-2
composé 9	-148	161	-75	25	–	-87	-8	177	-94	56
composé 11	-151	167	-56	87	–	148	-58	162	44	52
composé 12	-162	164	-72	58	-143	-49	-49	–	180	167

Tableau II-3: Valeurs des angles de torsion dans les structures des différents pseudohepta-peptides obtenues par modélisation moléculaire

e) Structure du composé **8** :

La solubilité du composé **8** autorise la réalisation de l'effet de solvant dans des mélanges CDCl₃/DMSO-*d*₆. Pour pouvoir comparer la structure des deux amidoxy hexapeptides, nous avons cependant conservé l'acétonitrile-*d*₃ à la place de CDCl₃ avec un volume minimum de DMSO-*d*₆ de 20 %. Les résultats sont rassemblés dans le *tableau II-2*.

Les NH amide du résidu Ala¹ et du NHⁱPr sont les plus exposés au solvant. Les protons NH(Ala⁵) et NHO(Val⁴) ont, en revanche, les différences de déplacements chimiques les plus faibles. Comme pour le composé **7**, ces résultats indiquent la présence du pseudorepliement γ amidoxy et confirment l'acidité du proton NHO. Dans la conformation obtenue par modélisation moléculaire (*Figure II-11*), c'est le CO(Ala²) qui interagit avec le proton amidoxy NHO fermant un pseudocycle à 7 atomes (repliement γ). La structure mise en évidence dans les amidoxy dipeptides comme Piv-Proψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr semble être conservée dans le composé **8**. Quant aux protons NH des résidus Ala⁶ et Ala², ils sont engagés dans des liaisons hydrogène avec respectivement les CO(Ala²) et CO(Ala⁶).

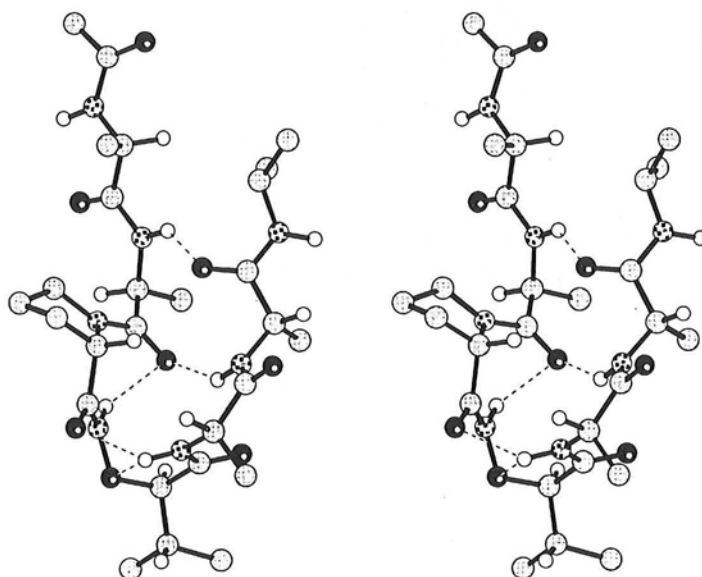
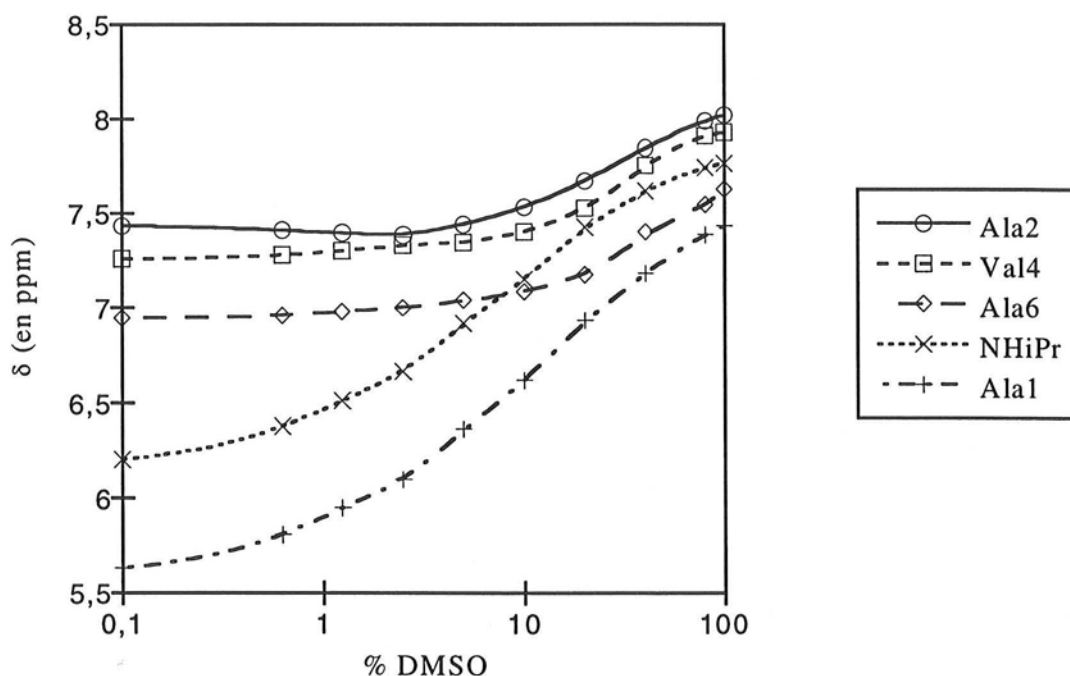


Figure II-11 : Vues stéréoscopiques de la structure du composé 8 obtenue par modélisation moléculaire

f) Structure du composé **9** :

L'effet de solvant indique que les protons amide du résidu Ala¹ et du groupement NHⁱPr sont fortement solvatés et ne sont donc pas engagés dans une liaison hydrogène (Figure II-12). Les NH(Ala²), NH(Val⁴) et NH(Ala⁶) restent insensibles au solvant jusqu'à des proportions en DMSO-*d*₆ de 10 %, puis ils sont progressivement solvatés. Ils participent à des interactions intramoléculaires rompues par le DMSO-*d*₆.



*Figure II-12 : Effet de solvant (mélange CDCl₃/DMSO-*d*₆) du composé 9*

Dans une conformation stable obtenue par modélisation moléculaire (*Figure II-13*), le proton NH du résidu Ala² interagit avec le CO(Ala⁶) et le NH(Ala⁶) avec le seul CO(Ala²). Le repliement C₅ avec l'oxygène sp³ du lien oxime présent dans les dipeptides étudiés au chapitre précédent ne semble pas subsister dans ce pseudohexapeptide. Du fait de la faible stabilité de cet élément de structure, ce résultat n'est, par ailleurs, pas surprenant. Il faut enfin noter l'existence d'un repliement γ autour de la proline, stabilisé par une liaison hydrogène entre le NH(Val⁴) et le CO(Ala²).

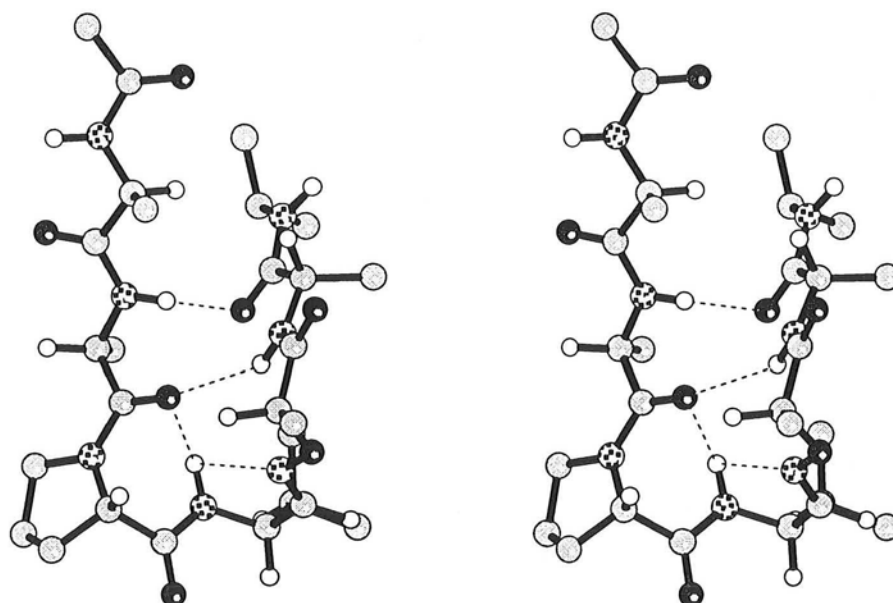


Figure II-13 : Vues stéréoscopiques de la structure du composé 9 obtenue par modélisation moléculaire

g) Structure du composé **10** :

Le composé **10** est peu structuré. Tous les protons amide sont à peu près identiquement sensibles au solvant : aucune interaction ne subsiste dans le DMSO-*d*₆ (*Figure II-14*). Aucune modélisation moléculaire n'a été tentée dans ce cas.

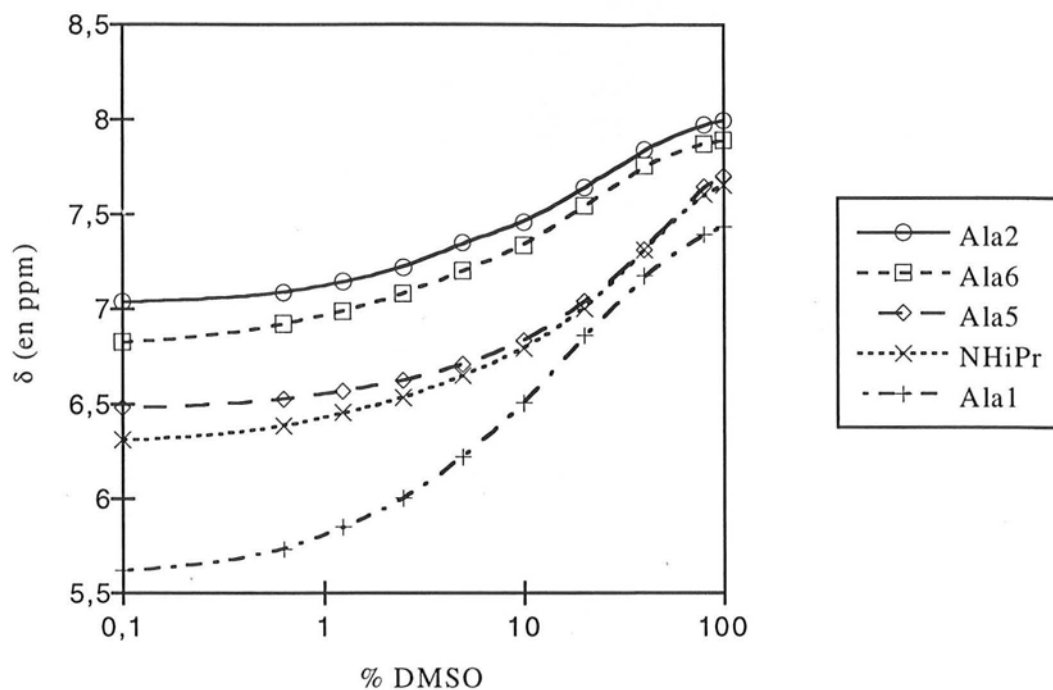


Figure II-14 : Effet de solvant (mélange $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$) du composé **10**

h) Structure du composé **11** :

L'effet de solvant montre que, dans le composé **11**, les protons $\text{NH}(\text{Ala}^1)$ et $\text{NH}(\text{Ala}^6)$ ne sont pas engagés dans une liaison hydrogène (Figure II-15). Les $\text{NH}(\text{Ala}^2)$, $\text{NH}(\text{Val}^4)$ et surtout du NH^iPr sont les moins accessibles au solvant.

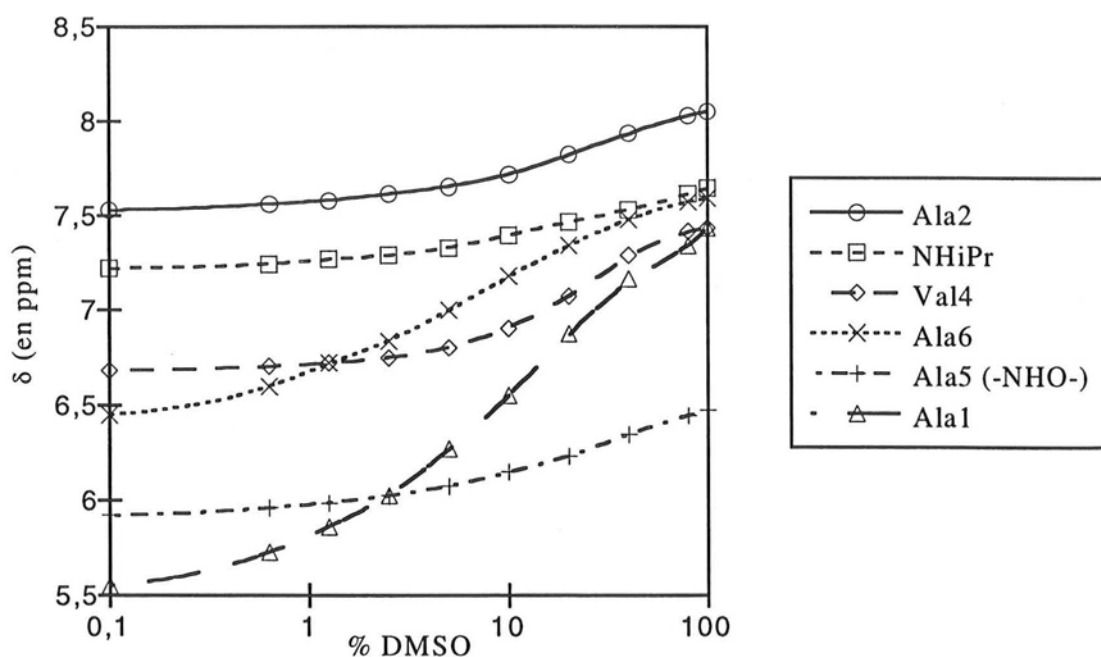
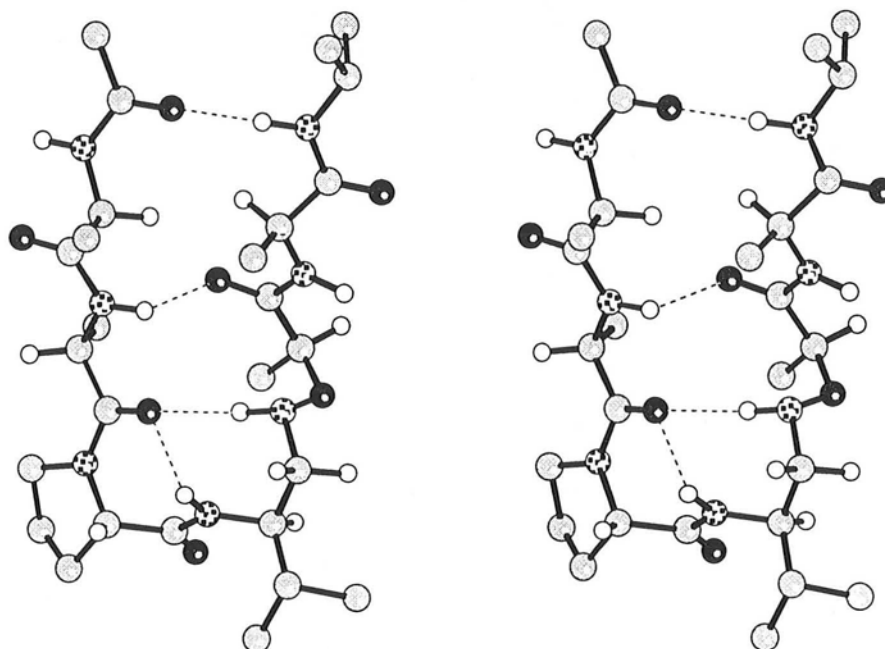


Figure II-15 : Effet de solvant (mélange $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$) du composé **11**

Nous avons obtenu par modélisation moléculaire une conformation stable en accord avec les observations décrites précédemment (*Figure II-16*).



*Figure II-16 : Vues stéréoscopiques de la structure du composé **11** obtenue par modélisation moléculaire*

Trois liaisons hydrogène entre les NH^iPr , $\text{NH}(\text{Ala}^2)$, $\text{NH}(\text{Ala}^5)$ et respectivement les $\text{CO}(\text{Z})$, $\text{CO}(\text{Ala}^5)$, $\text{CO}(\text{Ala}^2)$ confèrent au composé **11** une structure de type feuillet β antiparallèle. Il faut noter que le NH du résidu Ala^5 appartient à la liaison hydroxylamine. Nous n'avons pas conclu lors de l'étude des amidoxy dipeptides réduits à la possibilité pour un NHO hydroxylamine d'être engagé dans des liaisons hydrogène. Nous avons, dans le cas du composé **11**, envisagé sa participation à une interaction intramoléculaire (repliement type β) car sa sensibilité au solvant est nettement moindre dans le pseudohepta-peptide que dans les mono-peptides voire dans les dipeptides. Ce résultat peut se justifier par le fait qu'un NHO hydroxylamine est plus acide qu'un NH amine. Nous avons prédit un repliement γ autour de la proline.

i) Structure du composé **12** :

Dans le composé **12**, les $\text{NH}(\text{Ala}^1)$ et NH^iPr sont sensibles au solvant (*Figure II-17*). Les interactions intramoléculaires les plus fortes concernent les protons amide des résidus

Ala⁵ et Ala². Le proton hydroxylamine NHO est également protégé du solvant, par comparaison avec ce qui a été observé avec les amidoxy dipeptides réduits.

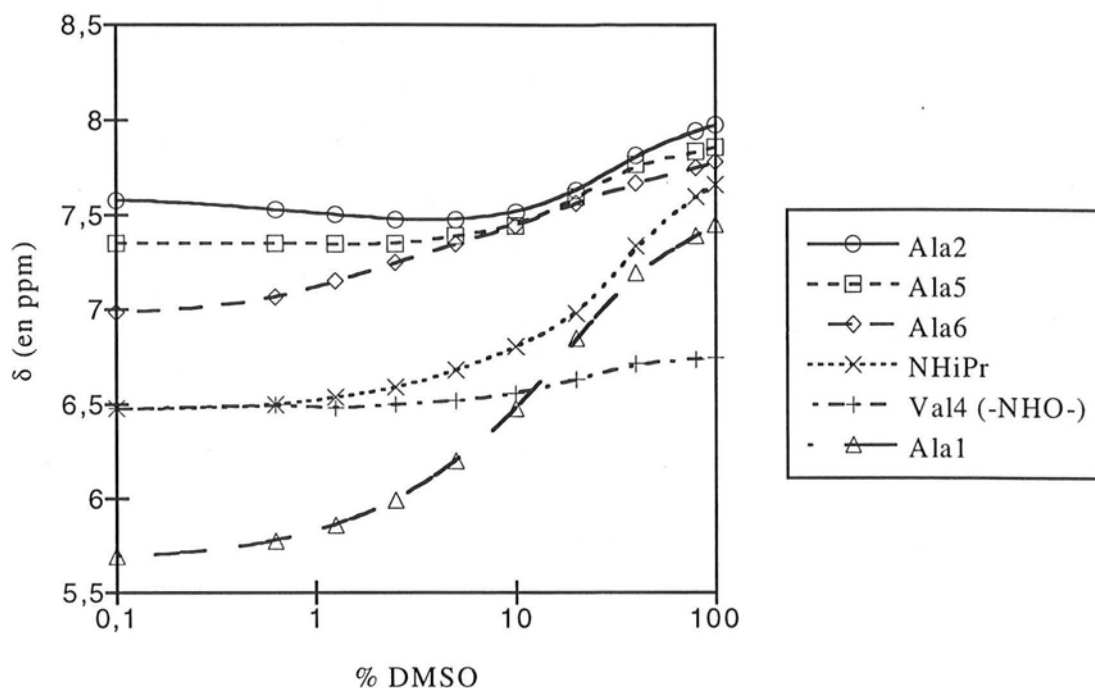


Figure II-17 : Effet de solvant (mélange $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) du composé 12

Comme pour les autres pseudohexapeptides, nous avons généré, par modélisation moléculaire une structure possible (Figure II-18).

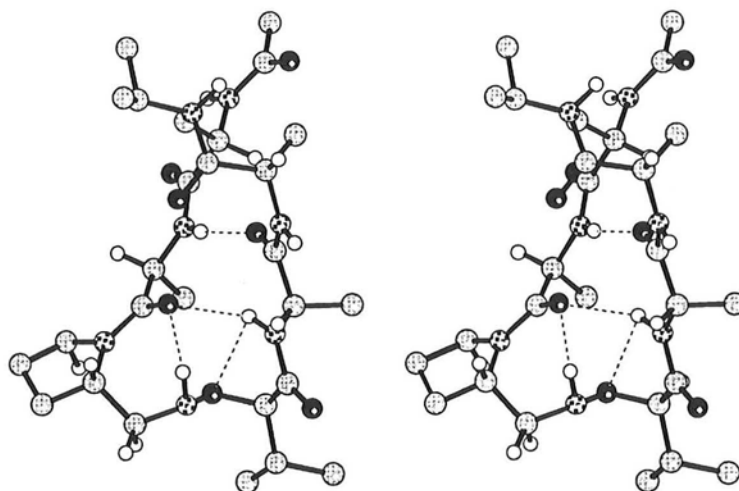


Figure II-18 : Vues stéréoscopiques de la structure du composé 12 obtenue par modélisation moléculaire

La structure mise en évidence dans Piv-Proψ[CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr semble présente dans le composé **12**. Le NH de la liaison amide suivant le lien hydroxylamine est en effet engagé dans une liaison hydrogène bifide avec l'oxygène sp³ (repliement C₅) et avec le carbonyle de la liaison amide précédente (pseudorepliement β). Par ailleurs, le NH(Ala²) interagit avec le CO(Ala⁵). Il faut enfin remarquer que comme dans le composé **11**, le NHO hydroxylamine est engagé dans une interaction avec le CO(Ala²) (repliement type γ).

II-3-3 : Discussion

a) Synthèse des résultats de l'étude structurale :

Le pseudorepliement γ observé dans les amidoxy dipeptides semble conservé dans les pseudohexapeptides. Le caractère acide du NHO amidoxy est, par ailleurs, à l'origine de repliements autour de la proline de type β (composé **7**) ou de type γ (composé **8**). Il faut également noter que le composé **7** a une structure fortement repliée. Cette donnée peut expliquer la faible solubilité du pseudohexapeptide dans de nombreux solvants organiques.

La liaison oxime de configuration E n'induit pas de structuration intrinsèque. Le composé **10** ne paraît pas structuré. Seul l'amidoxy peptide réduit **12** conserve probablement le repliement C₅ sur l'atome d'oxygène sp³, stabilisé par le pseudorepliement β, identifié dans les dipeptides étudiés au chapitre précédent. Nous avons, par ailleurs, constaté que les NHO hydroxylamine et amidoxy semblaient avoir un comportement semblable. Enfin, le NHⁱPr est protégé du solvant dans le composé **11** uniquement. Ce dernier possède vraisemblablement une structure de type feuillet β antiparallèle.

b) Relation structure-activité :

Le pseudorepliement γ caractéristique des amidoxy peptides ne permet pas d'interpréter les résultats des tests biologiques. Sa présence a, en effet, été mise en évidence par l'étude structurale des deux amidoxy peptides dont le comportement vis à vis de l'ELH diffère : le composé **7** est un substrat de l'ELH tandis que le pseudohexapeptide **8** est un inhibiteur. Il conviendrait d'examiner par *docking*, à partir de la structure cristalline de l'ELH et des conformations des composés **7** et **8** représentées dans les paragraphes précédents, les possibilités de fixation des pseudohexapeptides dans le site actif de l'ELH.

En ce qui concerne les deux autres familles pseudopeptidiques, les amidoxy peptides réduits ne présentent aucune affinité pour l'ELH et seul l'oxime peptide **9** est inhibiteur. L'atome d'oxygène supplémentaire inséré dans le squelette peptidique et les structurations

qu'il induit n'influent pas sur l'affinité pour l'ELH. Il semble, en revanche, que la présence d'un groupement carbonyle dans le motif pseudopeptidique positionné au niveau des liaisons Pro³-Val⁴ et Val⁴-Ala⁵ soit indispensable.

c) Comparaison avec les hydrazide peptides :

Les résultats obtenus avec les hydrazide peptides sont analogues à ceux des amidoxy peptides. La modification chimique doit être positionnée entre Pro³ et Val⁴ pour que le pseudohexapeptide ait un pouvoir inhibiteur. Ce résultat biologique ne semble pas s'expliquer par la présence ou l'absence du pseudorepliement γ caractéristique des hydrazide ou des amidoxy peptides. Il faut noter que l'étude structurale menée sur les hydrazide hexapeptides avait permis de conclure à l'absence du pseudorepliement γ dans le composé **4**.

Si on compare, par ailleurs, l'affinité des composés **3** et **7** pour l'ELH (*Tableau II-4*), on constate que celle de l'amidoxy peptide est deux fois plus forte que celle de l'hydrazide peptide.

	Séquences	K _m (en μ M)
Substrats	Z-Ala-Ala-Pro-Val-//-Ala-Ala-NH ^t Pr (6)	131
	MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-//-pNA	140
Hydrazide peptide	Z-Ala-Ala-Pro-Val// ψ [CO-NH-NH]Ala-Ala-NH ^t Pr (3)	712
Amidoxy peptide	Z-Ala-Ala-Pro-Val// ψ [CO-NH-O]Ala-Ala-NH ^t Pr (7)	382

Tableau II-4 : Comparaison de l'affinité pour l'ELH de différents substrats (// représente le site de coupure par l'ELH)

II-3-4 : Conclusion

En ce qui concerne l'activité biologique, hydrazide et amidoxy peptides ont un comportement similaire. La synthèse des deux amidoxy hexapeptides n'a pas posé de difficultés particulières que ce soit en phase liquide homogène ou sur support solide, illustrant ainsi l'intérêt de cette famille de pseudopeptides. Si les oxime peptides, à l'exception du composé **9**, et les amidoxy peptides réduits n'ont pas présenté d'activité biologique significative, notre étude constitue un exemple intéressant d'introduction de ces nouvelles modifications chimiques de la liaison peptidique.

L'étude devrait être poursuivie avec des motifs pseudopeptidiques conservant le groupement carbonyle comme le lien cétométhylène ou le lien cétométhylène amino. Pour limiter les problèmes de solubilité et diminuer le caractère hydrophobe de la séquence hexapeptidique, les pseudopeptides pourront être conçus, par exemple, à partir de l'enchaînement MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-Ala-Ser-NH₂. La synthèse de nouveaux inhibiteurs potentiels et leur étude par RMN et par radiocristallographie pourrait déboucher sur une meilleure connaissance de leur position dans le site catalytique de l'ELH.

**CHAPITRE III - ETUDE DES
INTERACTIONS ENTRE LES
PROTEINES REV ET TAP(P32) DU VIH**

CHAPITRE III – ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES PROTEINES REV ET TAP(P32) DU VIH

III-1 : INTRODUCTION

Parallèlement à l'étude présentée dans le chapitre précédent, nous nous sommes intéressé à un autre processus biologique : la régulation de l'épissage du VIH, le virus du SIDA. Pour cela, nous avons étudié l'interaction entre deux protéines, Rev et TAP(p32) qui jouent un rôle central dans le cycle de vie du virus. Ce travail nous a permis de synthétiser et d'étudier des peptides de taille plus importante comportant plus de 20 résidus dont certains à chaîne latérale fonctionnalisée.

III-1-1 : Généralités sur le VIH

a) Naissance d'une nouvelle épidémie à la fin du XX^e siècle :

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est responsable du Syndrome ImmunoDéficientaire Acquis (SIDA). Cette maladie a été identifiée au début des années 80. Le VIH-1 a été isolé par l'équipe du Professeur L. Montagnier en 1983 (206), et le VIH-2 en 1985. Depuis le début de l'épidémie, on dénombre 16,3 millions de décès dont 2,6 millions au cours de la seule année 1999. Au mois de décembre 1999, 33,6 millions de personnes étaient atteintes par le SIDA et le nombre de nouveaux cas s'élevaient à 5,6 millions (207).

Le VIH infecte les lymphocytes T4 ou T auxiliaires, cellules clés du système immunitaire. Au cours de l'infection, le taux de lymphocytes T4 décroît et les défenses immunitaires des malades s'affaiblissent. Après une période asymptomatique de 7 à 10 ans appelée séropositivité, des complications infectieuses ou tumorales apparaissent. Parmi elles, on peut citer la tuberculose, la mycobactériose atypique, le sarcome de Kaposi ou encore les lymphomes.

Depuis 1995, un nouveau traitement associant trois anti-rétroviraux est disponible (208). Cette trithérapie associe un inhibiteur de la protéase et deux inhibiteurs de la transcriptase inverse. Cette dernière est une enzyme qui permet de transformer l'information

génétique du virus, stockée sous forme d'acide ribonucléique (ARN), en acide désoxyribonucléique (ADN) qui est alors inséré dans le génome de la cellule infectée. Sa structure tridimensionnelle n'a été déterminée qu'en 1992 (209). Depuis 1985, l'AZT, molécule synthétisée en 1964 (210) qui inhibe la réplication des rétrovirus, a cependant montré son efficacité dans le traitement du SIDA. D'autres inhibiteurs de la transcriptase inverse ont ensuite vu le jour. Comme l'indique leur formule chimique, ce sont tous des terminateurs de chaîne d'ADN (*Figure III-1*).

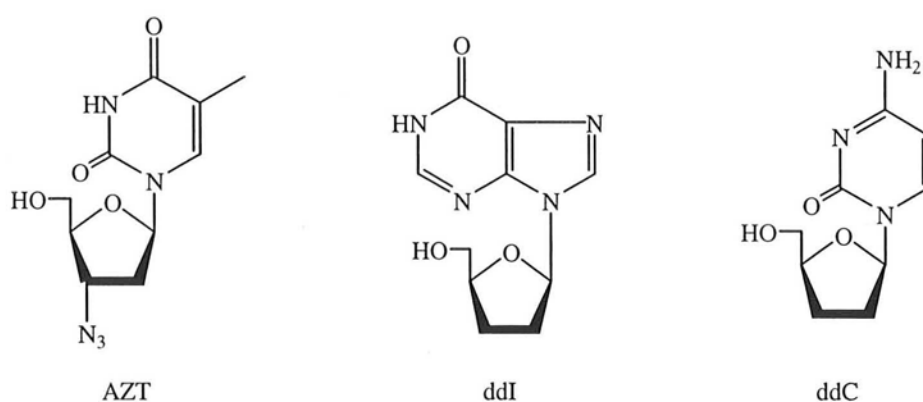


Figure III-1 : Principaux inhibiteurs de la transcriptase inverse utilisés en thérapie anti-VIH

La protéase du VIH appartient à la classe des protéases à acide aspartique. Elle permet de maturer un certain nombre de protéines virales synthétisées par la cellule hôte pour former des fragments fonctionnels nécessaires à la production de nouveaux virions. Les inhibiteurs ont été conçus pour mimer l'intermédiaire réactionnel tétraédrique, produit au cours de l'hydrolyse d'un substrat. Ils comportent le plus souvent un lien hydroxyéthylène amino (38, 39) ou dihydroxyéthylène (35). A partir de pharmacophores, les différents groupements situés autour du motif central ont été ajustés afin d'obtenir la meilleure affinité possible entre l'enzyme et l'inhibiteur. Les principaux inhibiteurs de la protéase du VIH ont été représentés dans la *figure III-2*.

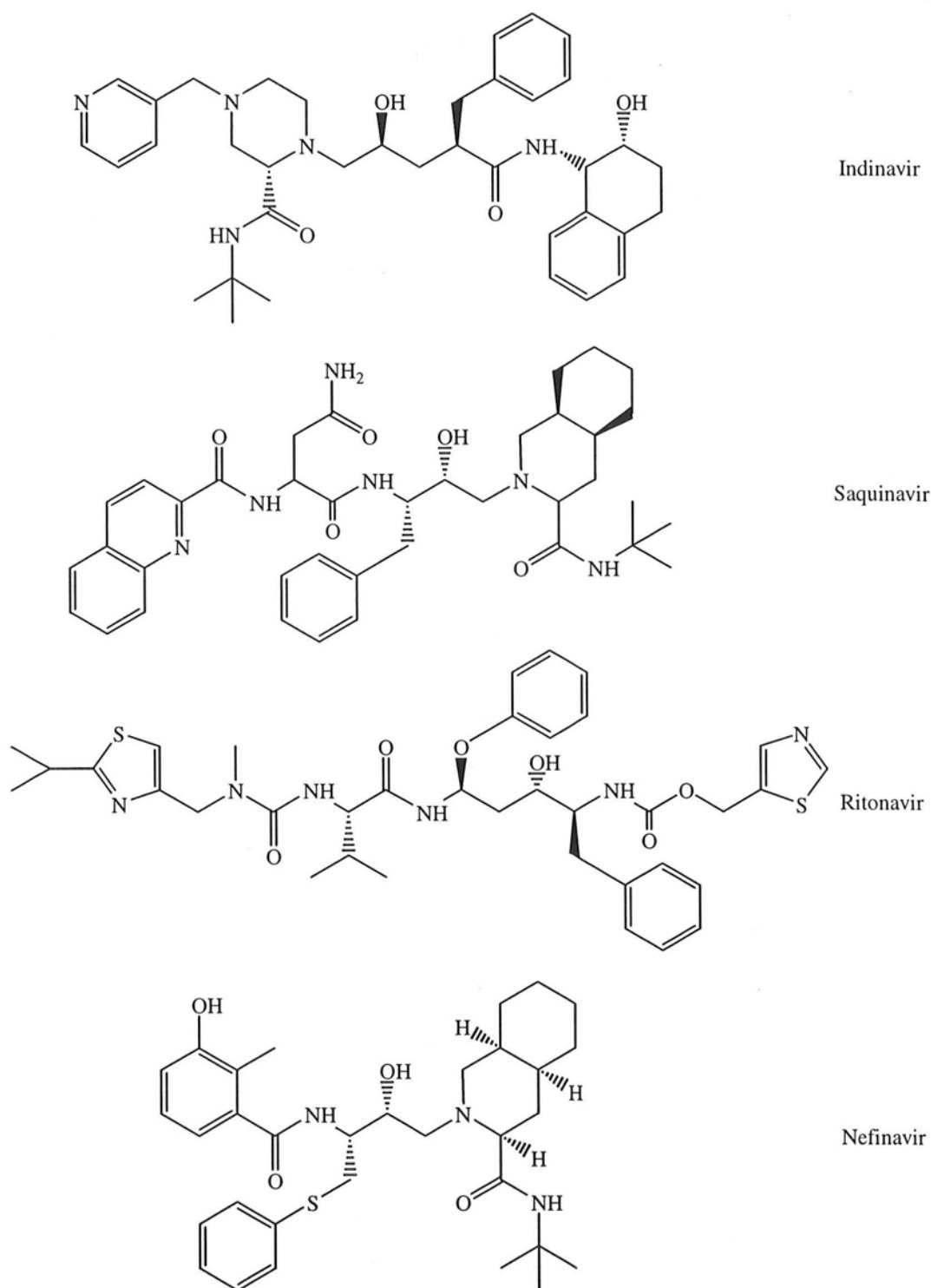


Figure III-2 : Principaux inhibiteurs de la protéase utilisés en thérapie anti-VIH

Si les nouveaux traitements ont rallongé l'espérance de vie des malades, le SIDA demeure une maladie mortelle. Les trithérapies constituent des traitements lourds, parfois mal supportés par les organismes, dont les effets secondaires peuvent en entraîner l'arrêt. Les nouvelles chimiothérapies donnent une fausse impression de guérison, faisant craindre une

augmentation des comportements à risque. Les personnes sous antirétroviraux restent en effet potentiellement contagieuses. Il faut également noter le coût élevé des trithérapies. Ces dernières ne sont pas accessibles aux malades résidents dans les pays en voie de développement. 23,3 millions de personnes recensées vivent actuellement avec le SIDA en Afrique subsaharienne, soient plus de 69 % des malades dans le monde. Pour l'immense majorité d'entre eux, leur vie est menacée à court terme. Dans un pays d'Afrique Australe comme le Zimbabwe, on estime que plus de 30 % de la population est séropositive. En 1997, dans la capitale Harare, 50 % des enfants examinés étaient infectés. L'espérance de vie moyenne dans ce pays ne dépasse pas 45 ans.

Toutes ces observations montrent combien les efforts de la recherche doivent être poursuivis pour aboutir à de nouveaux agents thérapeutiques qui agissent à d'autres stades de la réplication du virus. Ces études sont d'autant plus nécessaires que l'on ne peut pas exclure l'apparition de virus résistant aux inhibiteurs actuellement employés.

b) Le cycle de vie du VIH-1 :

Le VIH est un rétrovirus complexe. Le virion contient deux molécules d'ARN qui sont transcrites en deux molécules d'ADN et insérées dans le génome de la cellule infectée. C'est à ce niveau qu'agissent les inhibiteurs de la transcriptase inverse. Le transcrit primaire de cet ADN va, d'une part, servir d'ARN génomique pour la production de nouveaux virions et, d'autre part, après épissage, c'est-à-dire suppression des séquences introniques, devenir de l'ARN messager (ARNm) pour la synthèse de nombreuses protéines virales.

On dénombre au moins cinq protéines indispensables à la réplication du virus VIH-1 : Gag, Pol, Env, Tat et Rev. En phase précoce, après infection, le taux de transcription est faible. Les transcrits sont doublement épissés pour donner naissance à des ARNm de 1 ou 2 kb. Ces derniers permettent la production des protéines régulatrices Tat et Rev, ainsi qu'une autre protéine : Nef. La protéine Tat va se fixer sur TAR (**T**rans**A**ctivating **R**egion) pour accroître le taux de transcription tandis que la protéine Rev va limiter l'épissage. Les protéines Gag, Gag/Pol et Env seront produites en phase tardive de l'infection puis maturées pour donner naissance aux protéines de la capside virale et aux protéines insérées dans ces capsides. En phase tardive, sont également produites les protéines Vif, Vpu et Vpr. De l'ARN viral non épissé, transporté dans le cytoplasme, sera alors intégré dans ces capsides pour former de nouveaux virions. Le cycle de vie du VIH est résumé à la *figure III-3*.

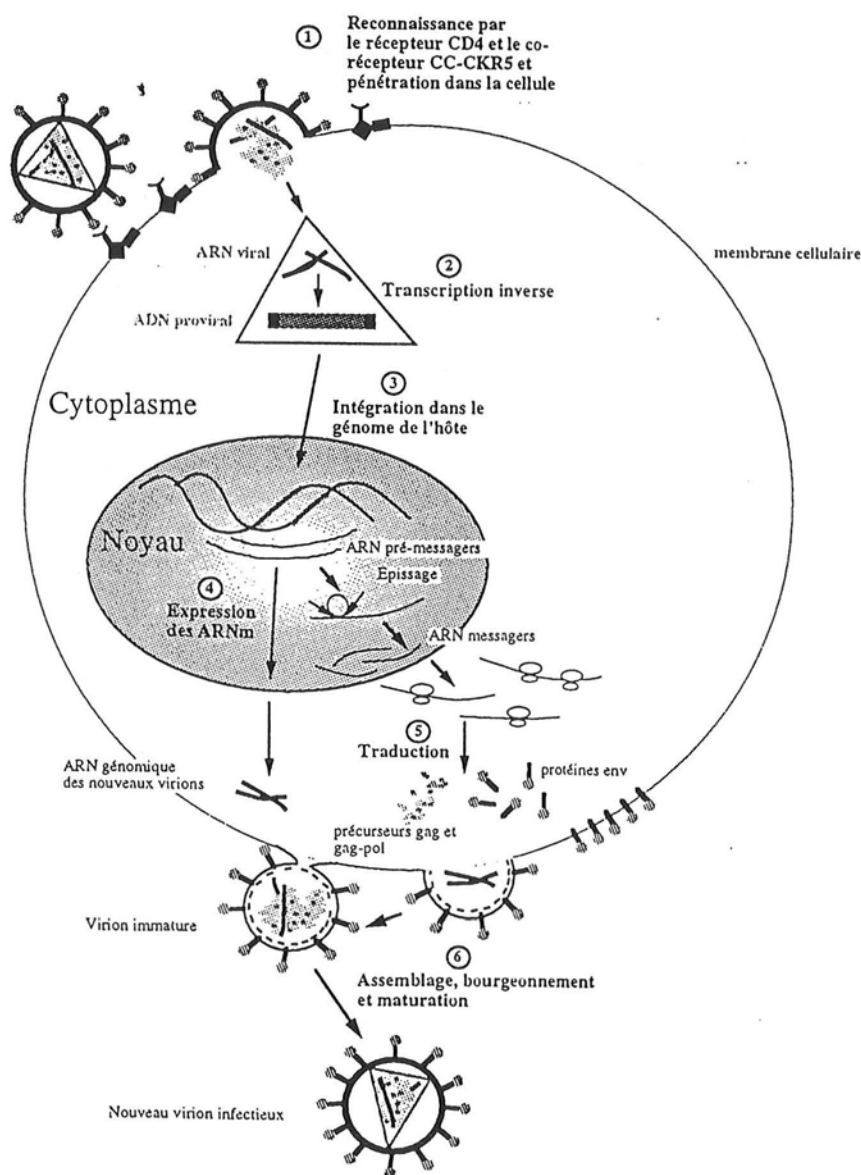


Figure III-3 : Le cycle de vie du VIH

Lors de la copie de l'ARN du virion en ADN, on dénombre en moyenne deux erreurs par transcription. Cette difficulté limite l'utilisation, en tant que médicaments, des antiprotéases. Cela nous a amené à nous intéresser à la protéine Rev qui joue un rôle majeur dans l'équilibre entre ARN épissé et ARN non épissé, donc dans l'augmentation de la charge virale et dans la progression de la maladie.

III-1-2 : Interaction Rev-TAP(p32)

a) La protéine Rev :

La protéine Rev se compose de 116 acides aminés. Deux domaines ont été mis en évidence : le fragment 34-50 basique, riche en arginine et le domaine de transactivation 78-83, riche en leucine (*Figure III-4*).

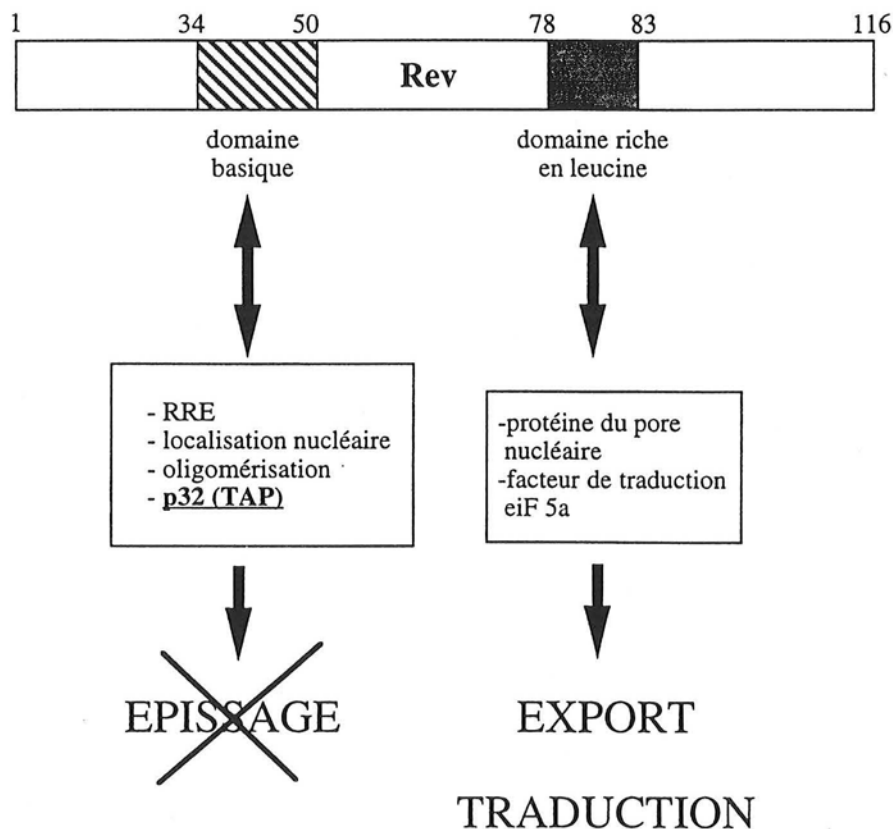


Figure III-4 : Les différentes régions fonctionnelles de la protéine Rev

Ce dernier est impliqué dans le transport des ARN non épissés dans le cytoplasme (211-214). Il constitue un fragment dénommé NES (Nuclear Export Signal) car il interagit avec des protéines associées aux nucléoporines pour permettre l'export des ARN.

Le domaine basique 34-50 se fixe sur un élément cible de l'ARN appelé RRE (**Rev** Response Element) (215). L'interaction de sa structure en hélice α avec la tige/boucle IIB du RRE a été étudiée par analyse avec des sondes de structure (216), par RMN (217) et par radiocristallographie (218). La formation de paires de bases purines non Watson-Crick a été

mise en évidence. Le modèle actuellement admis est que l'interaction entre l'élément RRE et un monomère de la protéine Rev serait suivi par la fixation coopérative d'autres monomères de Rev (219-221). Cette multimérisation serait nécessaire au mécanisme d'action de Rev. La structure 3D des fibres formées par les oligomères de protéine Rev a été étudiée par microscopie électronique et reconstitution d'image (222). A ce jour, aucune structure 3D de la protéine Rev entière n'a cependant encore été établie que ce soit par radiocristallographie ou par RMN. L'inhibition de l'épissage se ferait en interférant avec l'assemblage du spliceosome (Figure III-5) (223, 224).

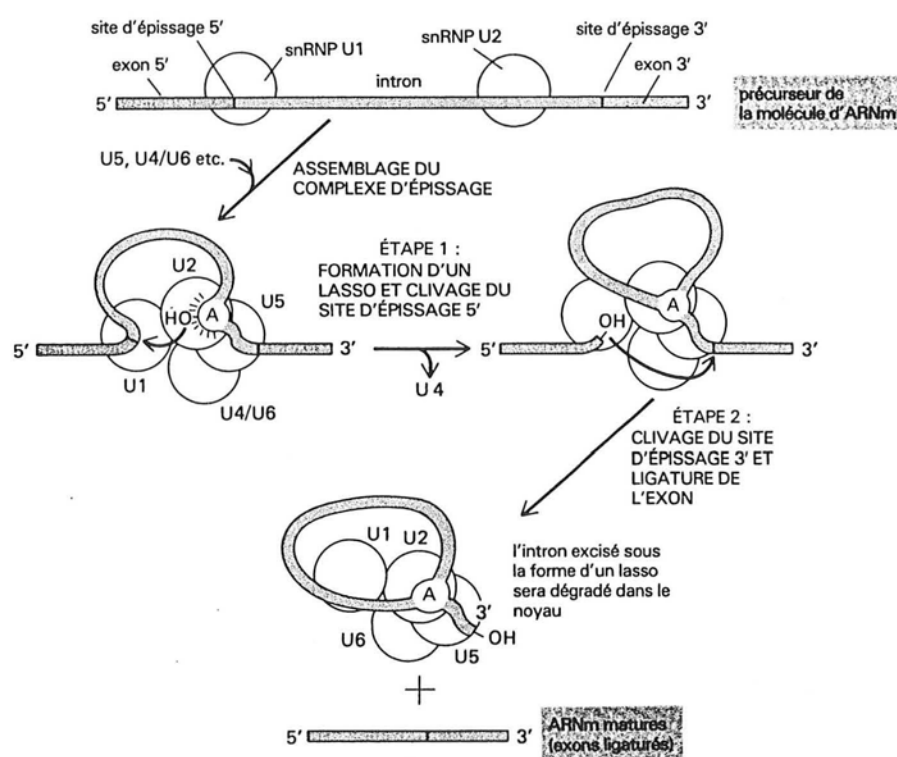


Figure III-5 : Mécanisme de l'épissage (Alberts, B. ; Brays, D. ; Lewis, J. ; Raff, M. ; Roberts, K. ; Watson, J. D. ; traduction de Minkowski, M. "Biologie moléculaire de la cellule" Flammarion Médecine-Sciences, 1989, 534)

Au moyen du système de double hybride, une protéine murine, YL2, interagissant avec le domaine basique de Rev, a été isolée (225). Il a, ensuite, pu être mis en évidence la forte interaction *in vitro* de Rev avec une protéine homologue à YL2, la protéine p32 (226).

b) La protéine p32 :

La p32 est une protéine acide, riche en acides aspartiques et en acides glutamiques mais pauvre en arginine. Son domaine de fixation sur Rev semble être situé entre les acides aminés 196 et 208 (226). La protéine p32 est copurifiée avec le facteur d'épissage ASF/SF2. La protéine Rev, en association avec p32 et ASF/SF2, renforcerait l'interaction de la snRNPU1 avec le site d'épissage 5' et empêcherait cette dernière de se déplacer. La tri-snRNP (U4/U6, U5) ne pourrait alors pénétrer dans le spliceosome (*Figure III-6*) (223). Récemment, p32 a été présenté comme un inhibiteur du facteur d'épissage ASF/SF2, en empêchant en particulier, la phosphorylation de ce dernier (227).

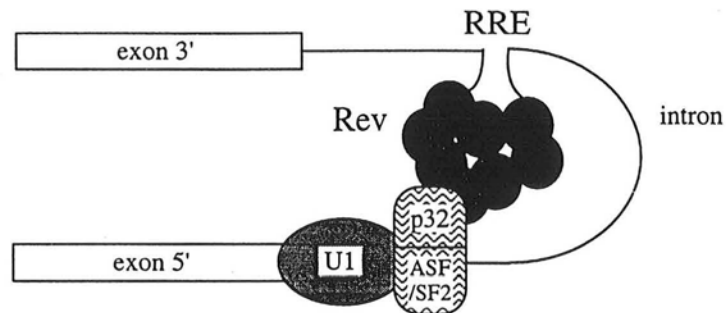


Figure III-6 : Schéma modélisant le complexe Rev-p32-ASF/SF2

La protéine TAP (**T**at-**A**ssociated **P**rotein) a été isolée sur la base de son affinité chromatographique avec Tat (228). Il s'est avéré qu'à l'exception de quelques acides aminés de son extrémité *N*-terminale, elle était identique à la protéine p32 (226). TAP(p32) est également un co-activateur de transcription : son domaine 247-282 interagit à la fois avec Tat et le facteur de transcription TFIIB (229). TAP(p32) joue donc un rôle multiple et central dans la réplication du VIH (*Figure III-7*).

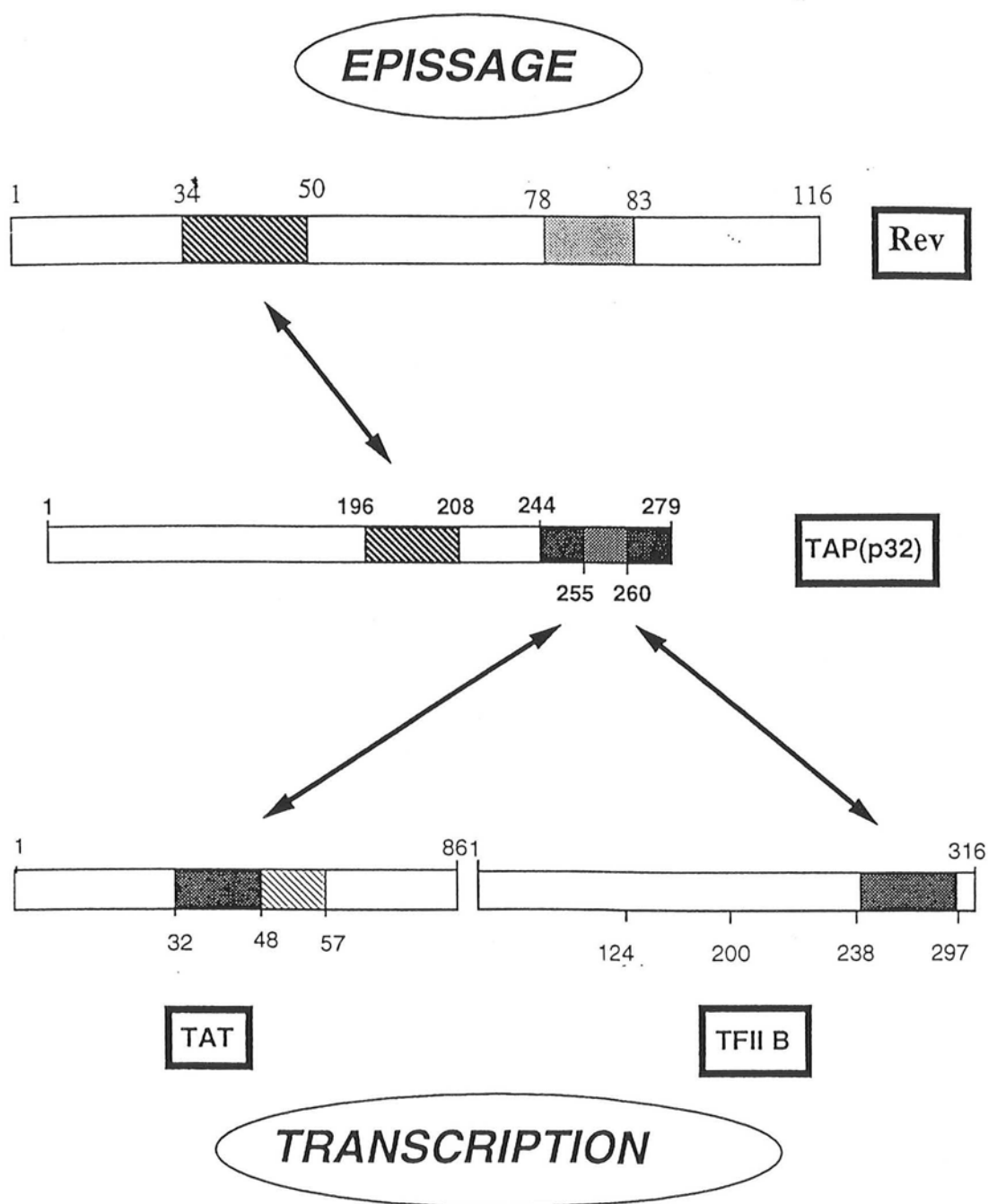


Figure III-7 : Le rôle central de la protéine TAP(p32) dans le cycle du VIH

La structure cristalline de la protéine humaine TAP(p32) a été déterminée (230). Elle comporte 7 feuillets β anti-parallèles successifs flanqués par une hélice α dans la partie N-terminale et deux autres à l'extrémité C-terminale. Trois monomères forment une structure quaternaire en "doughnut" avec une distribution asymétrique des charges à la surface (*Figure III-8*).

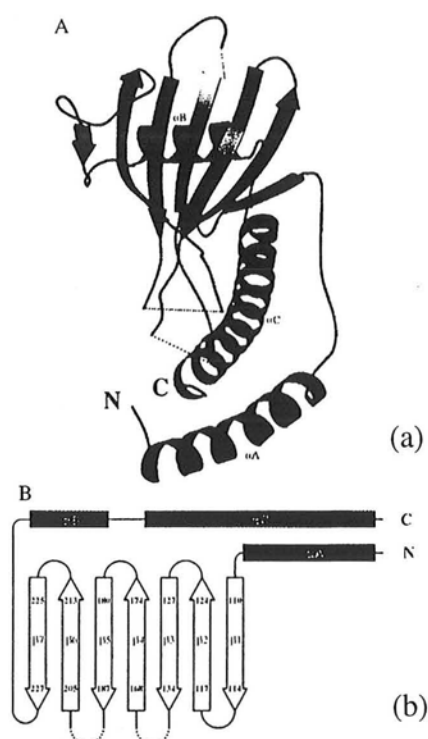


Figure III-8 : Structure cristalline de TAP(p32) (a) et représentation schématique (b)

III-1-3 : Objectifs des travaux

Nous nous sommes proposé de synthétiser le fragment de TAP(p32) susceptible d'interagir avec Rev et d'évaluer son affinité pour Rev par des tests biologiques. Nous avons comme objectif d'essayer de comprendre les mécanismes de reconnaissance entre Rev et TAP(p32). Pour cela, nous avons envisagé un ala-scan pour déterminer les résidus indispensables et des expériences de RMN à deux dimensions nous permettant d'accéder à la structure du fragment de TAP(p32) quand celui-ci se trouve au contact de Rev, le but ultime étant la synthèse de pseudo-peptides inhibant la fixation de Rev sur le RRE.

La séquence 196-208 a été décrite dans la littérature comme interagissant avec la protéine Rev (226). A l'aide d'un programme vectoriel de représentation des protéines, il a été réalisé à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) de Strasbourg une prédiction montrant qu'au sein du domaine C-terminal de TAP(p32), la région 197-212 devait se structurer sur elle-même (*Figure III-9*).

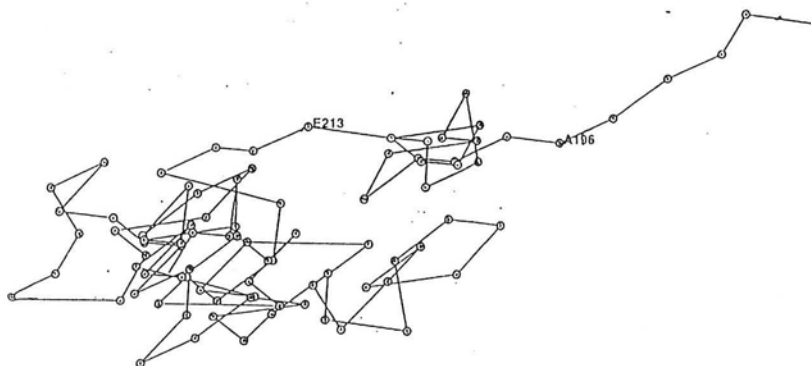


Figure III-9 : Repliement de la région 196-213 de TAP(p32)

Nous avons donc choisi de synthétiser, pour commencer, le fragment 196-213 de la protéine TAP(p32) :



III-2 : SYNTHÈSE

III-2-1 : Synthèse peptidique sur phase solide

La SPPS est une technique que nous avons précédemment décrite dans le paragraphe II-2-2 sur la synthèse du pseudopeptide Z-Ala-Ala-Proψ[CO-NH-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr. La synthèse de fragments de TAP(p32) ne justifie pas l'emploi d'une résine particulière comme la résine oxime puisque le groupement C-terminal est une fonction acide carboxylique. La présence dans la séquence d'acides aminés à chaîne latérale fonctionnalisée nécessite par contre le choix de groupements protecteurs adaptés suivant la stratégie Boc ou Fmoc envisagée.

a) La stratégie Boc :

Le groupement Boc est éliminé en milieu acide. Un traitement par un mélange de 55 % de TFA en volume dans du DCM pendant 30 minutes a été parfois préconisé (231). Nous avons cependant déprotégé les fonctions amines par la méthode classique : deux traitements au TFA pur de 1 et 3 minutes (184). Le lien entre le peptide et le polymère doit résister à toutes les étapes de déprotections. La résine, la plus courante, que nous avons

utilisée, est la PAM résine (PhénylAcétamidoMéthyle) (*Figure III-10*). Dans le commerce, elle est vendue avec le premier acide aminé fixé.

La synthèse terminée, il reste à couper le peptide de son support solide (232). Trois réactifs sont usuellement utilisés : l'acide trifluorométhanesulfonique (TFMSA) (233-235), le trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf) (236, 237) (*Figure III-10*) et le fluorure d'hydrogène anhydre (HF) (238).

Le clivage au TFMSA est recommandé dans le cas de peptides comportant un nombre restreint de résidus à chaîne latérale fonctionnalisée. Nous avons employé les méthodes au TMSOTf et au HF. Si ce dernier est un réactif plus efficace que le TMSOTf, son utilisation nécessite de nombreuses précautions. Tous les réactifs de clivage en stratégie Boc sont extrêmement corrosifs. Le HF présente les particularités d'attaquer le verre et de posséder un point d'ébullition de 19°C. La réaction de clivage se déroule donc dans une rampe étanche en Téflon. L'utilisation d'un tel matériel exige de la plus grande vigilance.

Le choix des protections des chaînes latérales des acides aminés dépend également de la méthode de clivage choisie. Ils doivent en effet être éliminés pendant la coupure du peptide de la résine. Nous avons retenu les groupements cyclohexyloxy (OcHex) pour les acides aspartique et glutamique, benzyle (Bzl) pour la sérine et la thréonine, tosylo (Tos) (239) pour l'arginine et xanthyle (Xan) pour la glutamine (*Figure III-10*). Le groupement OcHex et surtout Tos sont difficilement éliminés par le TMSOTf. Dans le HF, la présence d'un Tos exige également une durée de clivage plus grande.

Certains composés résultant de la déprotection des chaînes latérales peuvent réagir avec le peptide clivé et donc former des produits secondaires. Pour limiter les réactions parasites, il convient de piéger les carbocations par l'ajout de "scavengers". Le plus utilisé d'entre eux est le *para*-crésol.

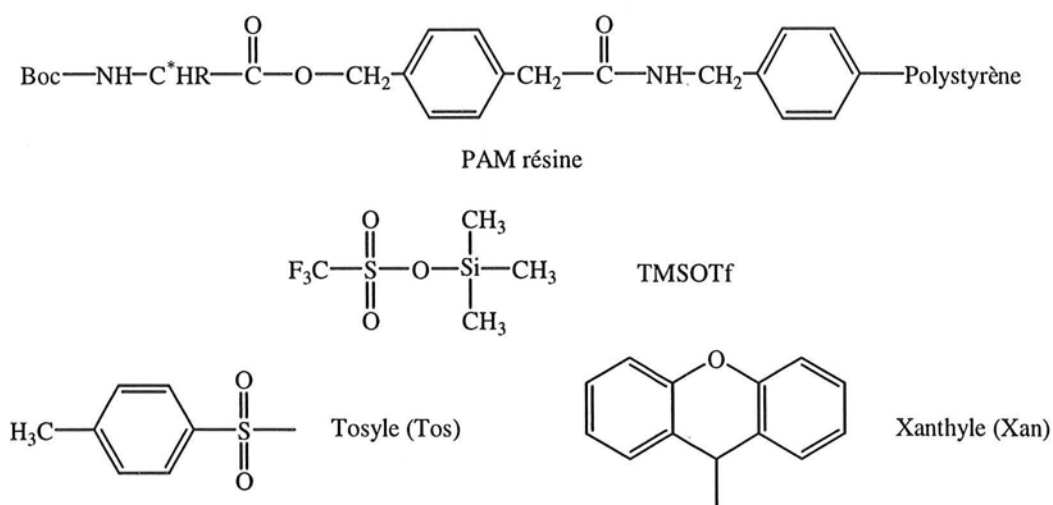


Figure III-10 : Structure de composés et groupements utilisés en SPPS (stratégie Boc)

b) La stratégie Fmoc :

Nous avons également choisi la stratégie Fmoc pour certaines synthèses de fragments de TAP(p32). Les fonctions amines sont déprotégées par une solution de 25 % en volume de pipéridine dans la DMF. L'étape comprend trois traitements d'une durée de 2, 5 et 8 minutes. Il est également possible de remplacer la pipéridine par une base plus forte : la 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-ène (DBU) (*Figure III-11*) (240). Le mélange alors employé se compose de 2 % de DBU et de 2 % de pipéridine dans la DMF. Les 2 % de pipéridine permettent de piéger le dibenzofulvène formé. L'emploi de DBU n'a pas permis d'obtenir un produit brut plus pur.

La résine utilisée en stratégie Fmoc est une résine de type Wang (*Figure III-11*). Le peptide est coupé du polymère par le TFA. Les protections des chaînes latérales des acides aminés sont acide-labiles. Nous avons retenu les groupements *tert*-butyloxy pour les acides aspartique et glutamique, *tert*-butyle pour la sérine et la thréonine, 2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulphonyle (Pmc) (241, 242) pour l'arginine et trityle (Trt) pour la glutamine (*Figure III-11*).

Le mélange de "scavengers" se compose d'eau, de thioanisole, de phénol et d'éthanedithiol (EDT) (243).

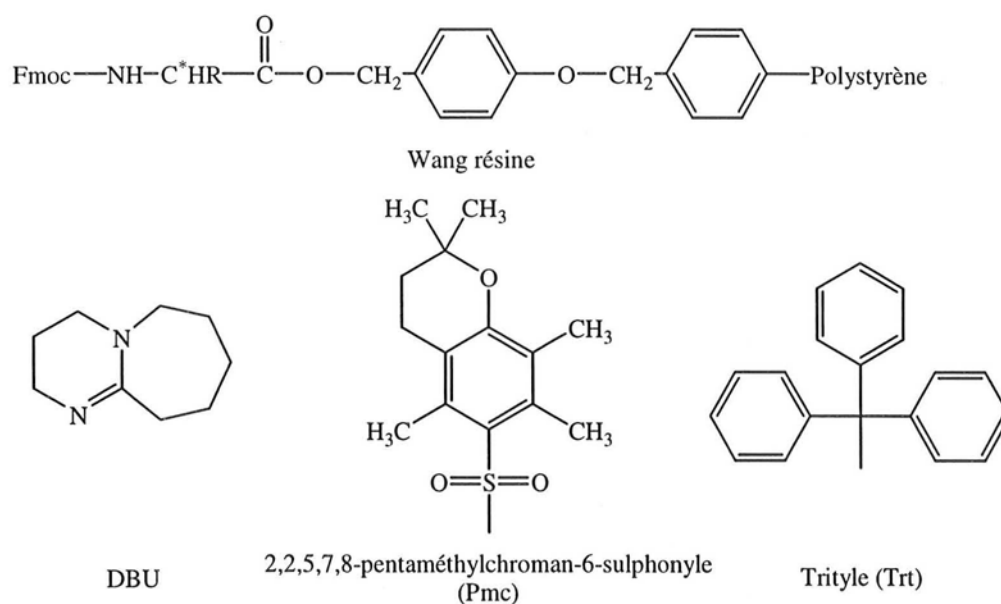


Figure III-11 : Structure de composés et groupements utilisés en SPPS (stratégie Fmoc)

III-2-2 : Les difficultés posées par la séquence

a) Problèmes rencontrés lors de l'élongation de la chaîne peptidique :

La première difficulté rencontrée est la formation d'une dicétopipérazine (244). La fonction amine libre du dipeptide en croissance peut en effet attaquer intramoléculairement le carbonyle ester du premier résidu fixé sur la résine. La dicétopipérazine se forme en régénérant la fonction hydroxyle sur le polymère. Le troisième acide aminé introduit peut alors se fixer sur la résine. Le peptide obtenu est donc tronqué de deux acides aminés à son extrémité C-terminale (*Schéma III-1*).

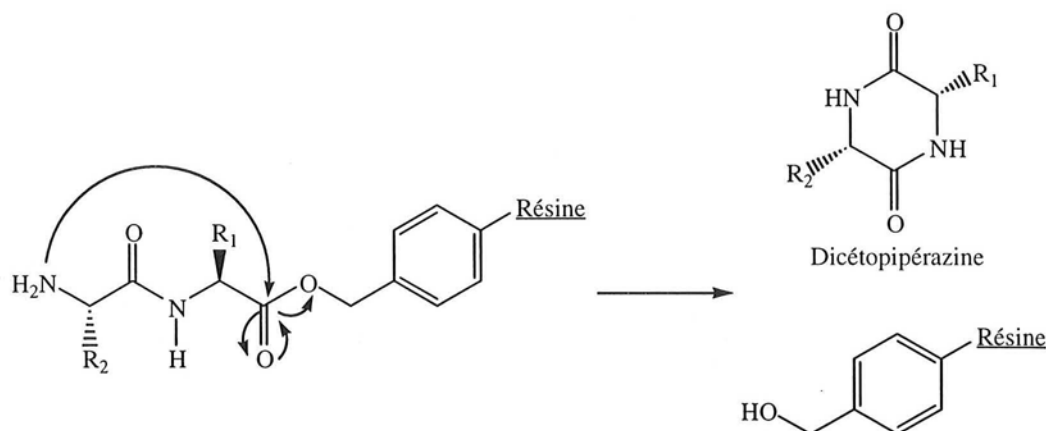


Schéma III-1 : Schéma de la formation des dicétopipérazines

La formation de dicétopipérazine dépend en priorité de la nature des deux premiers acides aminés, mais également du type de résine utilisé et de la méthode de couplage choisie. Nous avons observé une seule fois ce phénomène, en stratégie Boc, lors de la synthèse d'un fragment de TAP(p32).

La séquence comporte une glutamine. Une cyclisation intramoléculaire peut aboutir à la formation d'un résidu acide pyroglutamique (*Schéma III-2*) (245).

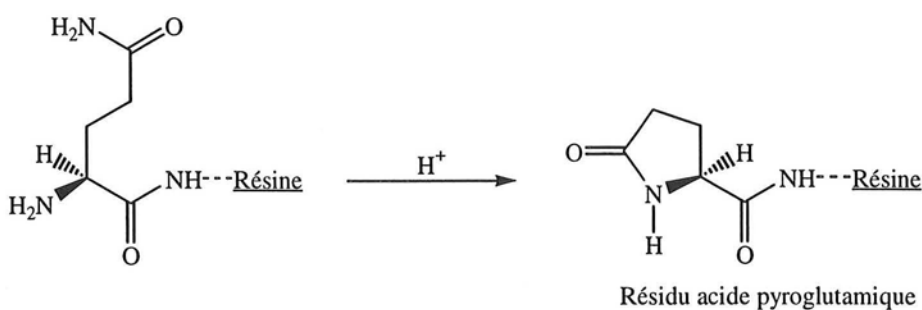


Schéma III-2 : Formation d'un résidu acide pyroglutamique

Elle se produit après élimination du Boc par le TFA ou, le plus souvent lors du couplage avec l'acide aminé *N*-protégé suivant. La réaction est catalysée par des acides faibles. L'emploi de HOBt n'est donc pas conseillé. Nous avons dans un premier temps utilisé la méthode préconisée de couplage aux anhydrides symétriques. Nous avons par la suite introduit la glutamine protégée par un groupement Xan en stratégie Boc (246).

Les aspartimides sont, par ailleurs, formés par cyclisation des résidus acide aspartique. Leur hydrolyse conduit au peptide attendu ainsi qu'à un composé appelé β -peptide (Schéma III-3) (247).

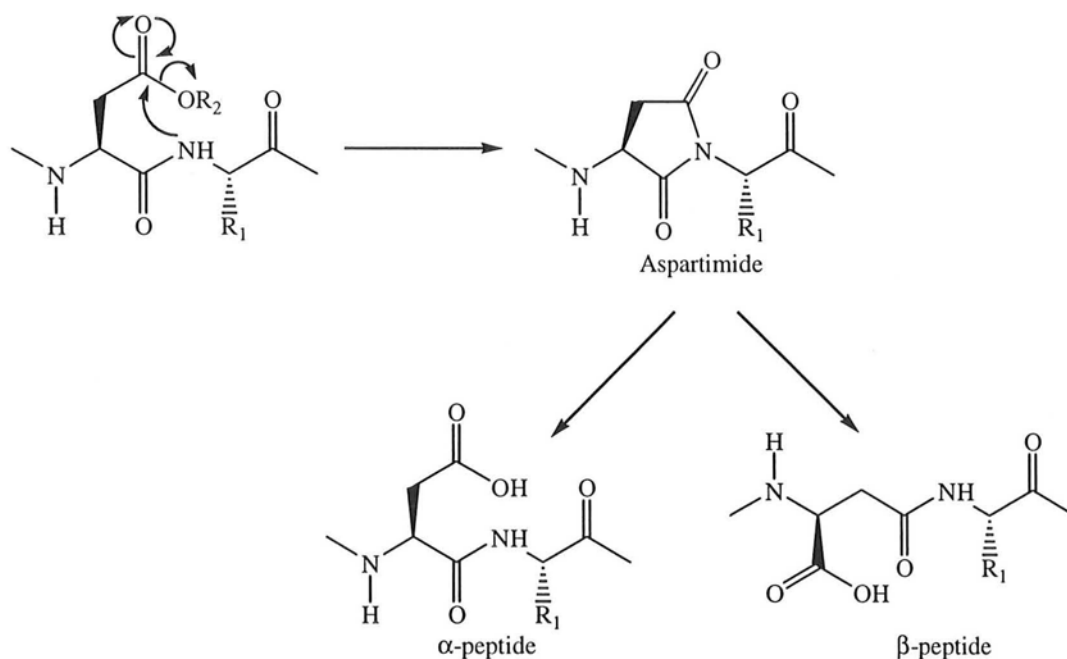


Schéma III-3 : Mécanisme de formation des aspartimides et conséquences

Les séquences Asp-Gly, Asp-Ala et Asp-Ser favorisent la cyclisation. En stratégie Fmoc, l'enchaînement Asp-Asn est également problématique. La protection de la fonction acide carboxylique sous forme de cyclohexyl ester en stratégie Boc (248) ou sous forme de

tert-butyl ester en stratégie Fmoc est le plus souvent suffisante pour empêcher la formation d'aspartimide.

Un certain nombre de séquences ont, enfin, été identifiées comme "difficiles" (249, 250). Le rendement des étapes de déprotection ou de couplage reste faible malgré une durée de réaction étendue. Le fragment 196-213 de TAP(p32) ne comporte pas de séquences dites "difficiles".

b) Problèmes rencontrés au cours du clivage :

En premier lieu, afin de limiter les réactions secondaires, les groupements Boc et Fmoc *N*-terminaux sont éliminés avant de détacher le peptide de la résine.

Le clivage en stratégie Boc est une étape délicate. Comme expliqué précédemment, tous les groupements protecteurs des chaînes latérales ne sont pas éliminés par le TMSOTf . Ce dernier nécessite, par ailleurs, un temps de réaction supérieur à 12 heures.

Nous avons introduit pour la première fois au laboratoire le clivage au HF. L'utilisation de la rampe nécessite de la pratique en particulier pour le transfert du HF de la bouteille au réacteur ainsi que son élimination ultérieure une fois le clivage terminé. La grande toxicité du HF n'autorise aucune erreur de manipulation. L'agressivité du milieu peut entraîner un grand nombre de réactions secondaires. Les profils HPLC des premiers peptides synthétisés comportaient un grand nombre de pics. La qualité du brut obtenu dépend fortement de la durée et de la température du clivage ainsi que de la nature des "scavengers" utilisés.

Les résidus Trp, Met, Cys et Tyr peuvent être alkylés. Dans le fragment 196-213 de TAP(p32) synthétisé, ce sont les acides aspartiques et glutamiques ainsi que les sérines et la thréonine qui peuvent donner lieu à des réactions secondaires. Les acides aspartiques peuvent, comme durant l'élongation du peptide, se transformer en aspartimides. La fonction carboxylique des résidus acide glutamique peut se protoner en milieu acide fort. Après départ d'une molécule d'eau, l'ion acylium formé peut soit être attaqué intramoléculairement pour conduire à une pyrrolidone soit réagir avec un "scavenger" comme l'anisole pour aboutir à une cétone (*Schéma III-4*) (251). Pour empêcher cette dernière réaction secondaire, l'anisole a été remplacé par le *para*-crésol.

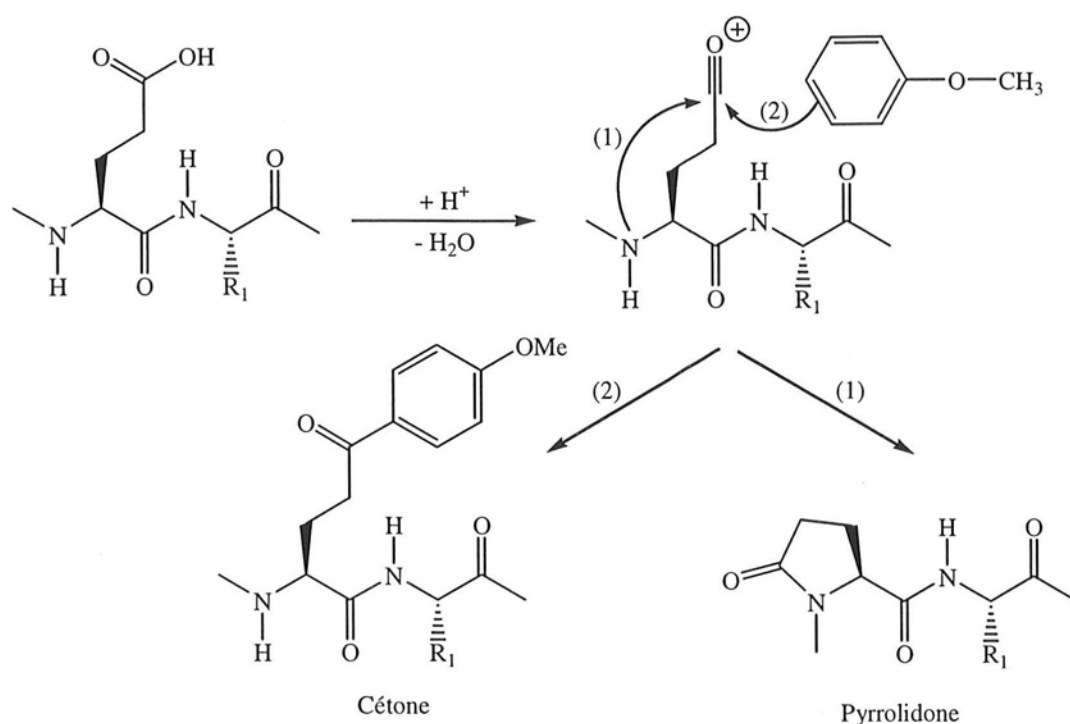


Schéma III-4 : Produits secondaires formés par clivage acide des résidus acide glutamique

Les réactions parasites sur les résidus acides aspartique et glutamique sont limitées par une diminution de température. Le clivage est réalisé aux environs de 0°C. L'élimination du groupement tosylé est alors lente et requiert des temps de réaction supérieurs à 2 heures. Une autre méthode permet de restreindre la formation de produits secondaires. Elle consiste à opérer en deux étapes (252). Dans un premier temps, le peptide sur la résine est traité par une solution de 10 % en volume de HF dans le diméthylsulfure (DMS). Dans ces conditions, seuls les groupements les plus sensibles au milieu acide sont éliminés. Le mécanisme des réactions de déprotection est alors de type SN_2 . Un mélange 9/1 en volume HF/*para*-crésol permet ensuite d'éliminer les groupes tosylé et cyclohexyloxy. Le clivage en deux étapes dit "low-high" a donné des résultats satisfaisants et a permis d'accroître la pureté du peptide brut.

Il est très important d'utiliser du HF parfaitement sec. Pour cela, nous l'avons séché sur du trifluorure de cobalt (CoF_3) anhydre (253). Cette précaution a permis de limiter considérablement la formation de produits secondaires.

Il faut enfin noter, que lors du clivage en milieu acide fort, un équilibre peut s'établir entre la forme *N*-acylée d'un résidu sérine ou thréonine (liaison peptidique) et une forme *O*-acylée (liaison ester) (Schéma III-5) (254, 255).

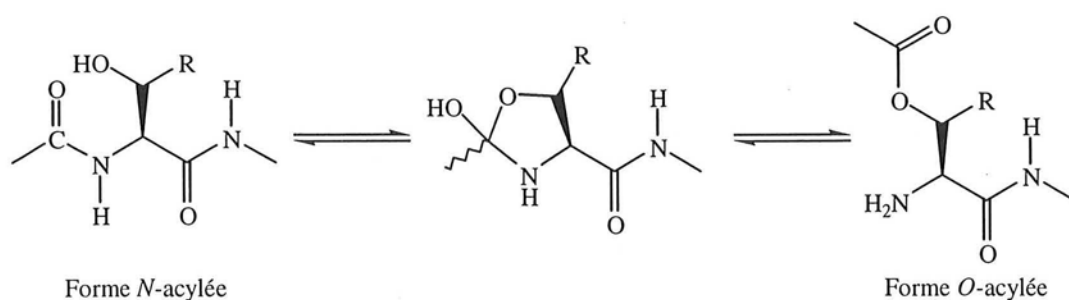


Schéma III-5 : Equilibre entre les formes N-acylées et O-acylées des résidus sérine ($R=H$) et thréonine ($R=Me$), après clivage en milieu acide

L'équilibre peut être déplacé vers la forme peptide, attendue, par traitement avec une solution aqueuse basique. La formation de dérivés O-acylés n'a pas été observée.

III-2-3 : Les peptides synthétisés

a) Synthèse du fragment 191-215 de TAP(p32) :

Le premier peptide synthétisé a été le fragment 196-213 de la protéine TAP(p32). Il a été aisément isolé avec une pureté qui a excédé 97 %. La rampe HF n'ayant pas encore été installée, l'étape de clivage n'a pas été réalisée au laboratoire. Le peptide a présenté une faible solubilité dans l'eau. Toute étude RMN et biologique ultérieure s'est donc trouvée compromise.

Les résidus voisins du domaine 196-213 de TAP(p32) possèdent un caractère hydrophile. Nous avons alors pensé étendre la séquence à synthétiser au domaine 192-215. Ce fragment a été préparé mais la glutamine N-terminale s'est au cours du temps transformée en acide pyroglutamique. Pour contourner cette difficulté, nous avons synthétisé le fragment 191-215 : $H-G^{191}-Q-E-D-E-A-E-S-D-I-F-S-I-R-E-V-S-F-Q-S-T-G-E-S-E^{215}-OH$.

Cette molécule est soluble dans l'eau en milieu basique ou neutre : le pH doit être supérieur à 5. Nous avons en particulier solubilisé ce peptide dans une solution 0,1 M d'hydrogénocarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3).

Pour la synthèse du fragment 191-215 de TAP(p32), les stratégies Boc et Fmoc ont été mises en œuvre. En ce qui concerne l'élongation de la chaîne peptidique, l'introduction des acides aminés Fmoc-protégés pose parfois des difficultés. Les durées des étapes de couplage et de déprotection sont plus longues. Il faut également noter le coût plus élevé des synthèses

Fmoc. Le clivage des peptides des résines de type Wang ne présente en revanche pas de problèmes particuliers. A la différence du HF, le TFA génère peu de produits secondaires.

La stratégie Fmoc n'a, cependant, pas permis d'isoler le fragment 191-215 pur. En HPLC, le pic correspondant au produit désiré est large et dissymétrique. Quels que soient la nature du gradient et le débit de l'éluant, il n'a pas été possible de séparer les différents constituants du mélange, formé par le peptide attendu et différents peptides présentant une ou plusieurs délétions dans la partie C-terminale. Ces difficultés ont été attribuées à une résine comportant un certain nombre de sites réactifs non bloqués. Quand, par exemple, le résidu Serine 214 est introduit, il se fixe à la fois sur l'acide glutamique 215 et sur la résine. Sont ainsi obtenus des peptides ne comportant pas le premier résidu, celui qui est vendu avec la résine. De même, l'acide glutamique 213 réagit avec la sérine 214 et avec les sites actifs encore libres de la résine. Le peptide privé des deux premiers résidus est également formé. On peut ainsi justifier le mélange des différents peptides obtenus après le clivage.

En stratégie Boc, l'utilisation d'un HF séché sur CoF_3 , suivant la méthode "Low-High" a permis d'obtenir le peptide avec une grande pureté sans grande difficulté de purification.

b) Autres peptides synthétisés :

La théorie HCA (**H**ydrophobic **C**luster **A**nalysis) a été développée par J. P. Mornon (256, 257). L'intérêt principal de cette méthode est de combiner la recherche de similitudes par identités de séquence à la visualisation de la structure secondaire de la protéine étudiée, au travers des amas hydrophobes, représentés sur un tracé dit tracé HCA. Une étude a montré que l'enchaînement Ile²⁰³-Gln²⁰⁹ constituait un domaine HCA. Nous avons donc synthétisé, en stratégie Fmoc, quatre fragments, respectivement positionnés avant le domaine HCA, comprenant la moitié et l'intégralité du domaine HCA et centré autour du domaine HCA (*Figure III-12*).

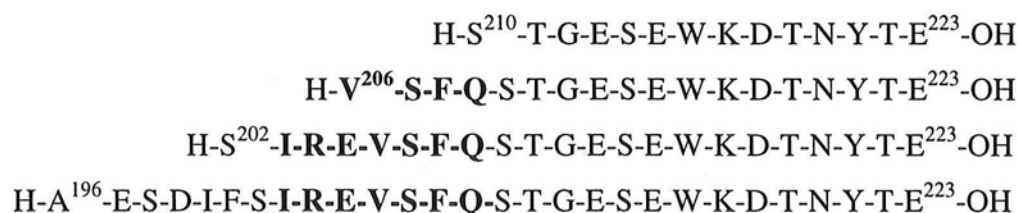


Figure III-12 : Peptides synthétisés en s'appuyant sur la théorie HCA

La fonction de la chaîne latérale du tryptophane et de la lysine a été protégée par un groupement Boc, celle de l'asparagine par un groupement trityle (Trt) et celle de la tyrosine par un groupement *tert*-butyle.

Si les quatre peptides représentés à la *figure III-12* ont été isolés, seul le fragment 210-223 présente une solubilité suffisante dans l'eau.

Il faut également noter, pour les besoins des tests biologiques, que nous avons synthétisé des peptides comportant un groupement biotine à l'extrémité *N*-terminale (*Figure III-13*). Le solvant utilisé pour l'introduction de la biotine est un mélange 50/50 en volume de DCM et de DMSO.

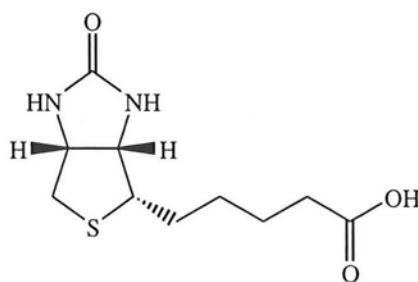


Figure III-13 : (+)-Biotine ou vitamine H

Tous les peptides obtenus ont été caractérisés par spectroscopie de masse et par RMN. Cette dernière technique a été mise en œuvre pour débiter l'étude structurale.

III-3 : ETUDE DES PEPTIDES SYNTHETISES

Les différents peptides dont la synthèse a été exposée précédemment ont fait l'objet de tests biologiques. Une étude structurale par RMN a été menée sur le fragment 191-215 de TAP(p32).

III-3-1 : Tests biologiques

Les tests ont été réalisés par V. Bourguignon et A. Méreau au laboratoire de Maturation des ARN et d'Enzymologie Moléculaire (MAEM) (université de Nancy-I).

a) Résultats obtenus avec un premier fragment 191-215 synthétisé :

Nous avons, dans un premier temps, cherché à évaluer l'influence des peptides synthétisés sur la fixation de la protéine Rev sur son élément cible, le RRE. Pour cela, le test n°1 a consisté à incuber le peptide avec Rev, puis à introduire du RRE radioactif. Les complexes formés ont été analysés par expérience sur gel retard (*Figure III-14*). La formation d'un complexe Rev/RRE se caractérise en effet par un retard de migration, par rapport au RRE libre, dépendant du nombre de molécules de Rev fixées.

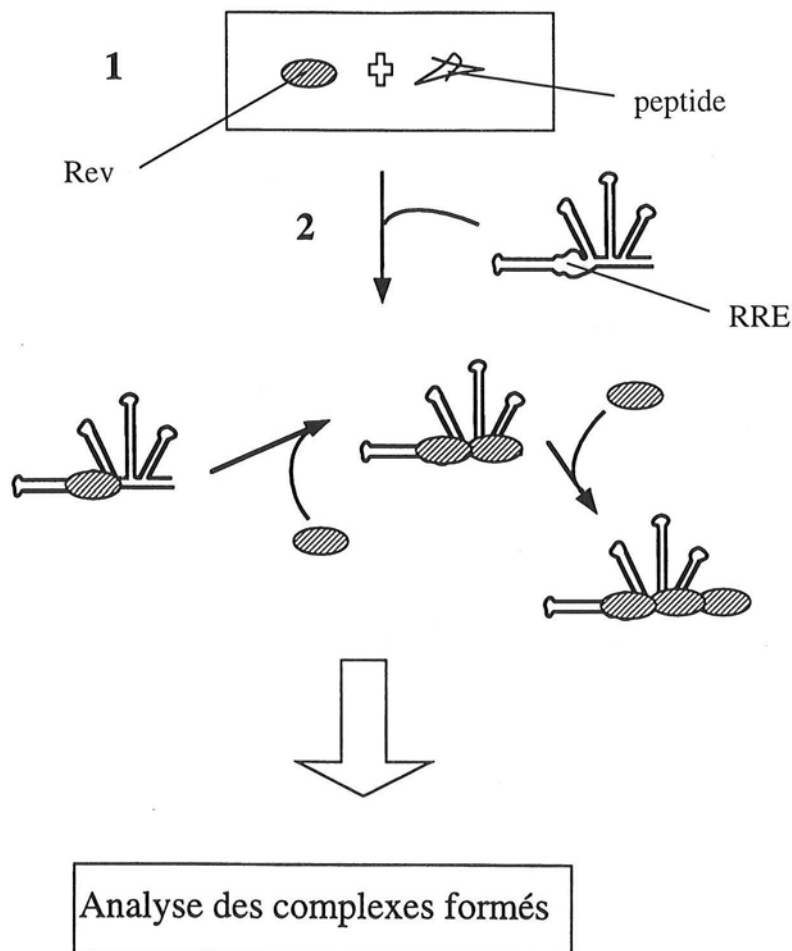


Figure III-14 : Schématisation du test n°1

Un premier fragment 191-215 de TAP(p32) synthétisé a présenté un effet important (*Figure III-15*).

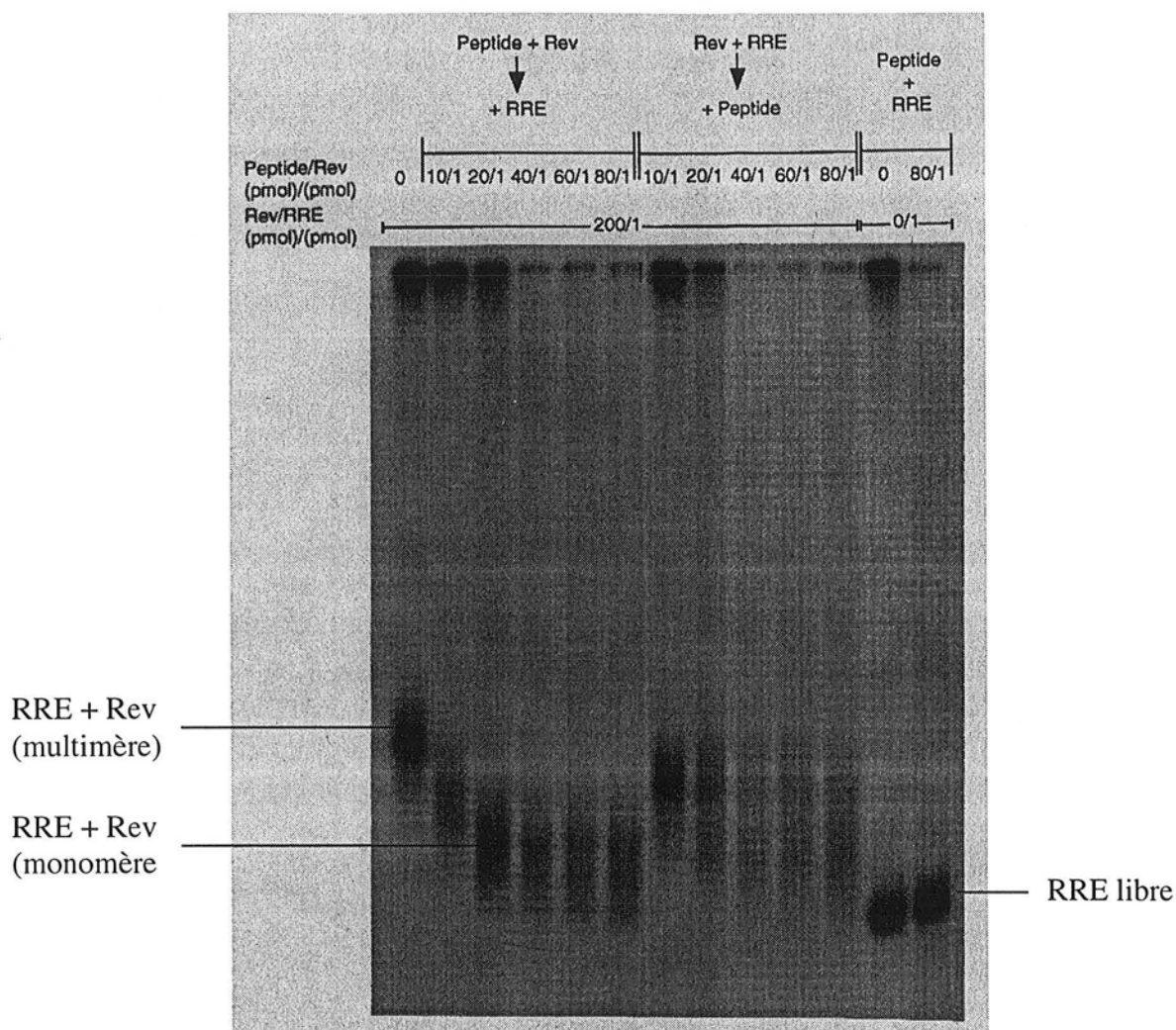


Figure III-15 : Radiographie des gels obtenus lors des tests n°1 et n°2

Dans les conditions où Rev peut se multimériser, c'est-à-dire quand le rapport molaire Rev/RRE a atteint une valeur de 200/1, la masse molaire du complexe a diminué à partir d'une proportion peptide/Rev de 10/1. Cette diminution s'est accentuée avec un rapport peptide/Rev de 20/1. La masse molaire du complexe est toujours restée supérieure à celle de RRE seul. Nous avons déduit de ces observations que le peptide avait une activité sur la multimérisation de Rev sur le RRE. Des résultats similaires ont été obtenus avec le peptide biotinylé issu de la même synthèse.

Nous avons également cherché à savoir si le peptide était capable de dissocier des complexes Rev-RRE préformés. Pour cela, nous avons préalablement incubé Rev avec le RRE puis introduit le peptide (test n°2). Comme précédemment, les complexes ont été analysés (*Figure III-16*).

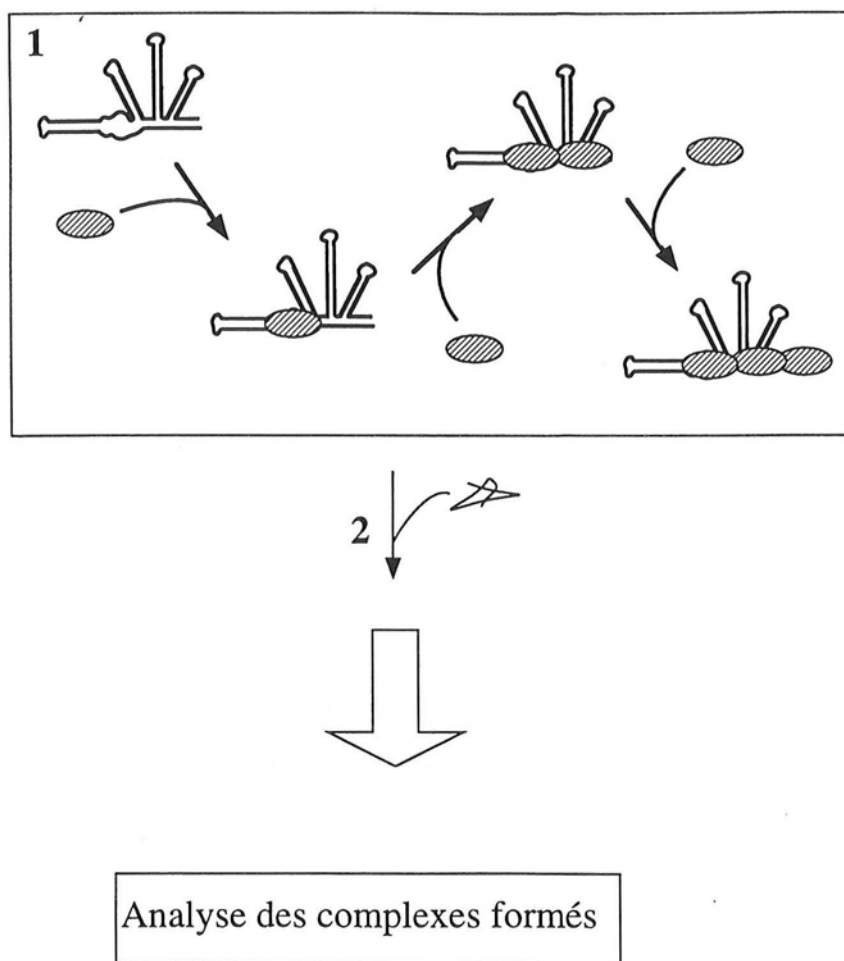


Figure III-16 : Schématisation du test n°2

Le peptide a présenté un effet de déstabilisation du complexe (*Figure III-15*).

La présence d'un groupement biotine permet de réaliser des précipitations par la streptavidine-agarose. Quand le peptide a préalablement été incubé avec Rev avant l'introduction du RRE radioactif, le précipité n'a présenté que quelques traces de radioactivité. Le peptide pourrait non seulement empêcher le multimérisation de Rev mais aussi gêner la fixation de la première molécule de Rev sur le RRE. Quand le peptide a été ajouté au mélange Rev-RRE, la présence de radioactivité dans le précipité a été plus importante : un complexe ternaire a donc été formé.

b) Tests des autres peptides synthétisés :

Nous avons ensuite cherché à confirmer les résultats précédents. Nous avons, tout d'abord, testé les mélanges de peptides obtenus lors des synthèses Fmoc du fragment 191-215 de TAP(p32). Les peptides ont eu peu d'effet sur l'interaction Rev-RRE. Il a fallu ajouter

jusqu'à 38 fois plus d'un mélange comportant environ 30 % de fragment 191-215 pour observer un effet similaire au premier fragment testé (*Figure III-17*).

TAP(p32)	fragment 191-215 (1 ^{ère} synthèse Boc) fragment 191-215 biotinylé (1 ^{ère} synthèse Boc)		Effet inhibiteur	Rapport peptide/REV
	G Q E D E A E S D I F S I R E V S F Q S T G E S E	100%	++	10/1
	fragment 191-215 biotinylé (1 ^{ère} synthèse Fmoc)			
	G _____ E	31 %	-	80/1
-1 aa	_____ S	36 %	+/-	240/1
-2 aa	_____ E	9 %	+	270/1
-5 aa	_____ S	9 %	++	380/1
-6 aa	_____ Q	5 %		
-7 aa	_____ F	10 %		
	fragment 191-215 biotinylé (2 ^{ème} synthèse Fmoc)			
	G _____ E	21 %	-	180/1
-1 aa	_____ S	26 %	+/-	270/1
-2 aa	_____ E	16 %		
	_____ Q	15 %		
-6 aa	_____ F	22 %		
-7 aa	_____ F	22 %		
	fragment 191-215 (1 ^{ère} synthèse Fmoc)			
	G _____ E	28 %	-	80/1 (non testé avec conc. + élevées)
-1 aa	_____ S	24 %		
-2 aa	_____ E	16 %		
-5 aa	_____ S	9 %		
-6 aa	_____ Q	16 %		
-7 aa	_____ F	7 %		
	fragment 191-215 (2 ^{ème} synthèse Fmoc)			
	G _____ E	43 %	++	60/1
-1 aa	_____ S	41 %		
-2 aa	_____ E	9 %		
???	_____	7 %		
	pic à 2470 Da			

Figure III-17 : Récapitulatif des résultats des tests, obtenus avec des fragments 191-215 de TAP(p32) provenant de différentes synthèses

Deux hypothèses ont alors été avancées : les peptides délétés pourraient avoir un effet inhibiteur. La seconde hypothèse qui, par la suite, a semblé se confirmer, envisageait la présence d'une impureté avec le premier peptide synthétisé, à l'origine des résultats positifs. Nous avons en effet testé un fragment 191-215 issu d'une nouvelle synthèse en stratégie Boc. Ce peptide, d'une grande pureté, n'a présenté aucun effet au niveau de la fixation de Rev sur le

RRE. Il faut noter que l'activité biologique du fragment 210-223 de TAP(p32) a, par ailleurs été examinée : les tests ont été négatifs.

c) Test par Biacore® X :

La technologie BIA (Biomolecular Interaction Analysis) permet de mesurer en temps réel la formation de complexes moléculaires sur une interface biospécifique. Elle apporte des informations sur la cinétique des interactions et sur la stœchiométrie de fixation.

Un ligand est retenu de manière spécifique sur une interface appelée *sensor chip*. Les autres partenaires de l'interaction sont injectés au contact de l'interface à un débit constant par un circuit microfluidique. Les *sensor chips* utilisés pour l'étude de molécules hydrosolubles sont le plus souvent constitués d'un support de verre recouvert d'une fine couche d'or et d'un hydrogel. La détection par résonance plasmodique de surface, plasmon étant le nom donné au nuage électronique du métal, permet de suivre, à tout moment les variations de masse à la surface du biocapteur.

Nous avons recherché par Biacore® X s'il existe une interaction directe entre le fragment 191-215 de TAP(p32) et la protéine Rev et dans l'affirmative, si de cette interaction dépend la fixation de Rev sur le RRE. Pour cela, la protéine Rev a été immobilisée sur un *sensor chip* et le premier peptide synthétisé, celui qui a donné lieu à des tests positifs, a été injecté. Sa fixation sur Rev a ainsi pu être détectée. Le RRE a ensuite été introduit et le sensorgramme est alors comparé au tracé obtenu après injection de RRE mais sans contact préalable entre Rev et le peptide (*Figure III-18*).

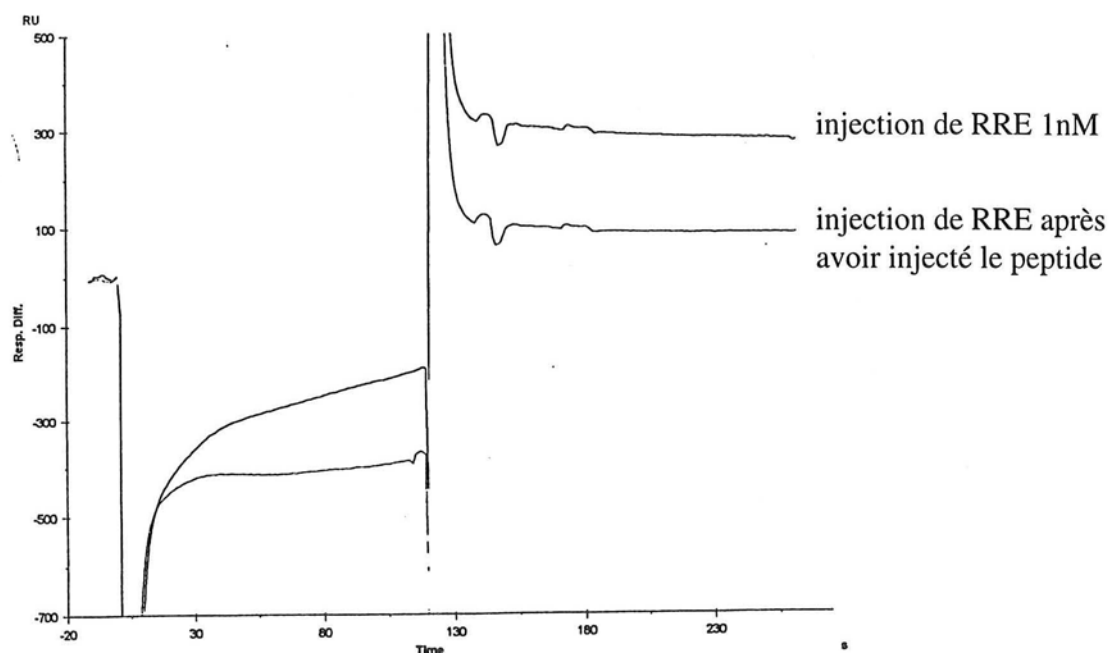


Figure III-18 : Sensorgramme illustrant l'effet du peptide inhibant la fixation du RRE sur Rev

On constate que la quantité de RRE fixée sur Rev est moindre en présence de peptide. Les résultats fournis par Biacore[®] X confirme donc les résultats obtenus par les analyses de complexes Rev-RRE sur gel retard. Nous ne pouvons cependant conclure à une activité du fragment 191-215 de TAP(p32), les résultats n'ayant pas été reproduits avec les mêmes peptides mais issus de synthèses différentes.

Nous avons, parallèlement, essayé de déterminer par RMN la structure du fragment 191-215 de TAP(p32).

III-3-2 : Présentation de l'étude structurale par RMN

a) Les informations apportées par la RMN-2D :

Le fragment 191-215 de TAP(p32) comportent 25 résidus. Ce nombre important d'acides aminés entraîne une superposition des signaux RMN des protons amide qui rend inexploitable les effets de solvant et de température. Les seules informations dont nous disposons sont apportées par l'expérience RMN-2D NOESY. Cette dernière met, en effet, en évidence des distances interprotoniques inférieures à 4 Å. La base de donnée ainsi constituée permet par l'intermédiaire de la modélisation moléculaire d'accéder à la structure tridimensionnelle des peptides.

Il est possible par la simple observation de l'intensité des corrélations et du nombre de résidus séparant deux protons corrélés d'identifier certaines structures secondaires. Les diagrammes ainsi réalisés caractéristiques d'une hélice α , d'une hélice 3_{10} , d'un feuillet β et de repliements β de type I ou II sont présentés sur la *figure III-19*.

	Hélice α 1 2 3 4 5 6 7	Hélice 3_{10} 1 2 3 4 5 6 7	Feuillet β 1 2 3 4 5 6 7	Coude β I 1 2 3 4	Coude β II 1 2 3 4
NN (i, i+1)	████████	████████	————	—█	—█
α N (i, i+1)	————	————	████████	——	—█
α N (i, i+3)	███ ███ ███	███ ███ ███		——	
$\alpha\beta$ (i, i+3)	███ ███ ███	███ ███ ███			
α N (i, i+2)		███ ███ ███		——	——
NN (i, i+2)	███ ███ ███	███ ███ ███		——	——
α N (i, i+4)	███ ███ ███				

Figure III-19 : Nature des corrélations NOESY en fonction du type de structure

b) Etude du fragment 191-215 de TAP(p32) dans le DMSO- d_6 :

Si le DMSO- d_6 est un solvant qui ne mime pas le milieu physiologique, il présente en revanche souvent l'avantage de parfaitement solvater les peptides et de permettre l'obtention de cartes RMN aux effets NOEs intenses.

Les spectres RMN du fragment 191-215 de TAP(p32) ont donc, en premier lieu, été réalisés dans le DMSO- d_6 (Figure III-20). Ils ont essentiellement permis de caractériser les peptides synthétisés et ainsi de compléter les informations apportées par la spectroscopie de masse.

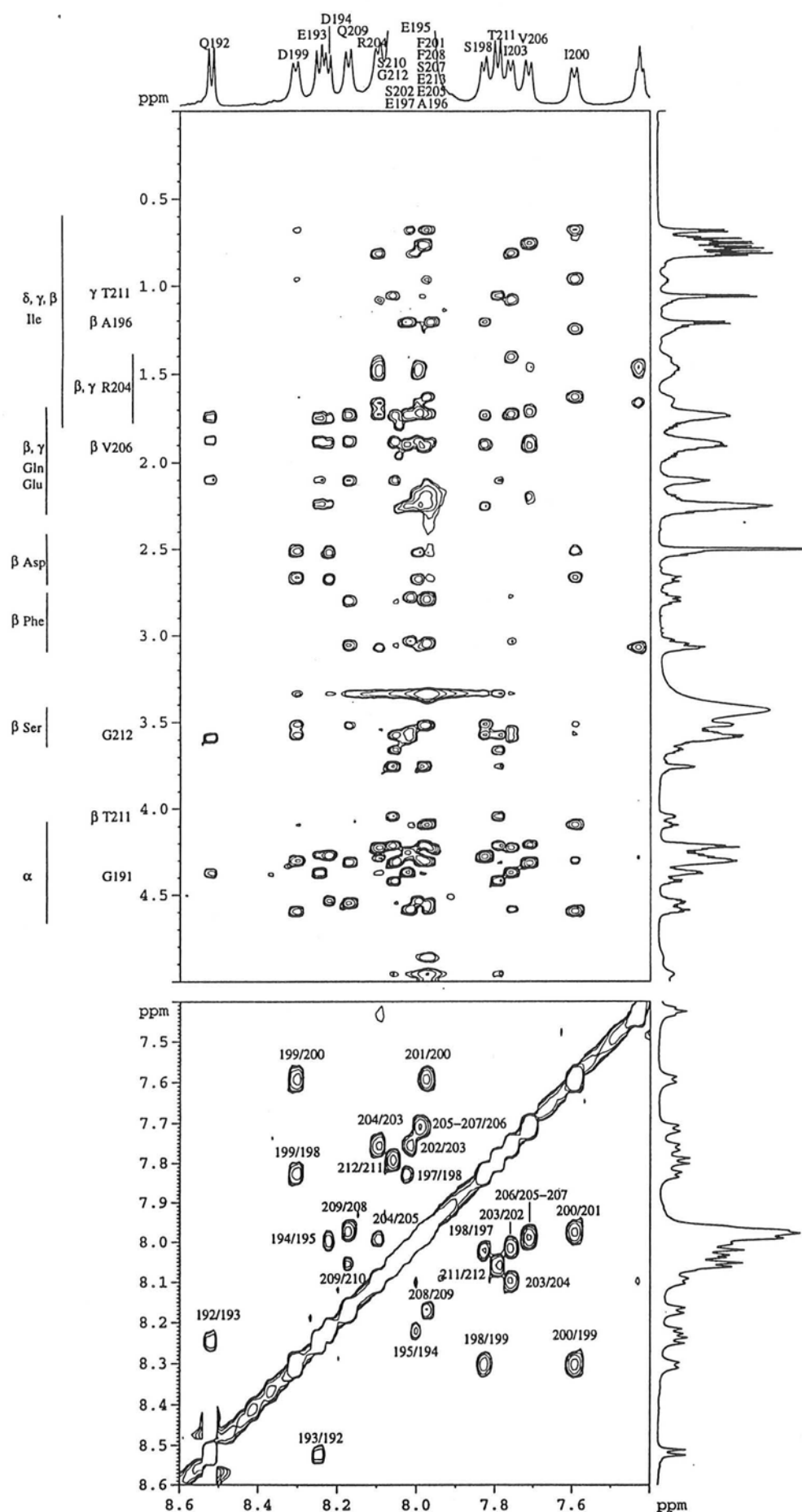


Figure III-20 : Spectre NOESY dans le DMSO- d_6 du fragment 191-215 de TAP(p32)

c) Etude du fragment 191-215 dans l'eau : expérience de NOEs transférés

La protéine Rev possède une masse molaire trop importante (19 kDa) pour pouvoir être directement étudiée par RMN. Le temps de corrélation trop long entraîne en effet un élargissement des signaux. Le phénomène de diffusion de spin rend, par ailleurs, la quantification des effets NOEs impossible.

Nous nous sommes donc intéressé à la structure du fragment 191-215 de TAP(p32) quand celui-ci se trouve complexé sur la protéine Rev. Pour cela, nous avons mis en œuvre une expérience de NOEs transférés (TR-NOESY) (258-260). Cette dernière diffère peu de l'expérience NOESY classique. Elle est basée sur le principe selon lequel l'intensité du signal NOE dépend du temps de corrélation τ_c pour un spectromètre de puissance donnée. Les effets NOEs relatifs aux peptides libres sont de faible intensité ($\omega\tau_c \approx 1$). Ils sont en revanche beaucoup plus intenses en ce qui concerne les peptides complexés sur la protéine. La carte RMN-2D ainsi obtenue caractérise la structure que le peptide prend au contact de la protéine.

Pour réaliser ce type de manipulation, il faut s'affranchir d'un certain nombre de contraintes. Il n'est, tout d'abord, pas possible de réaliser les spectres RMN dans l'eau lourde. Les protons amides, en effet, s'échangent avec le solvant et les signaux des NH seraient supprimés. Il faut donc utiliser une séquence impulsioneille qui irradie complètement le signal de l'eau. Notons cependant que 5 % en volume d'eau lourde sont ajoutés pour la calibration du spectromètre qui s'effectue à partir d'un canal deutérium. L'échange des protons amide étant catalysé par un milieu basique, le pH ne doit pas excéder 7 afin de conserver des signaux NH intenses. Il est imposé par des solutions tampons : nous avons utilisé un tampon phosphate à pH = 7. Se posent enfin, des problèmes de solubilité et de concentration des peptides et des protéines. Le fragment 191-215 de TAP(p32) est soluble dans l'eau si le pH est supérieur à 5. La protéine Rev présente, en revanche une solubilité très faible. Un mutant de Rev, nommé M₄, susceptible de ne pas se multimériser, a été préparé mais n'a pas donné satisfaction lors son utilisation. La protéine Rev employée dans les expériences de NOEs transférés a été fusionnée avec une autre protéine, dénommée malE. La solubilité dans une solution aqueuse de chlorure de sodium (NaCl) a alors atteint 150 nM.

L'expérience de NOEs transférés nécessite des conditions dans lesquelles l'échange entre le peptide et la protéine est rapide. Il est donc préférable de connaître les constantes cinétiques de formation et de dissociation du complexe peptide-protéine. Ne disposant pas de ces données, nous avons choisi une valeur courante voisine de 50/1 pour le rapport de la concentration en peptide sur celle en protéine. La carte NOESY est présentée à la *figure III-21*.

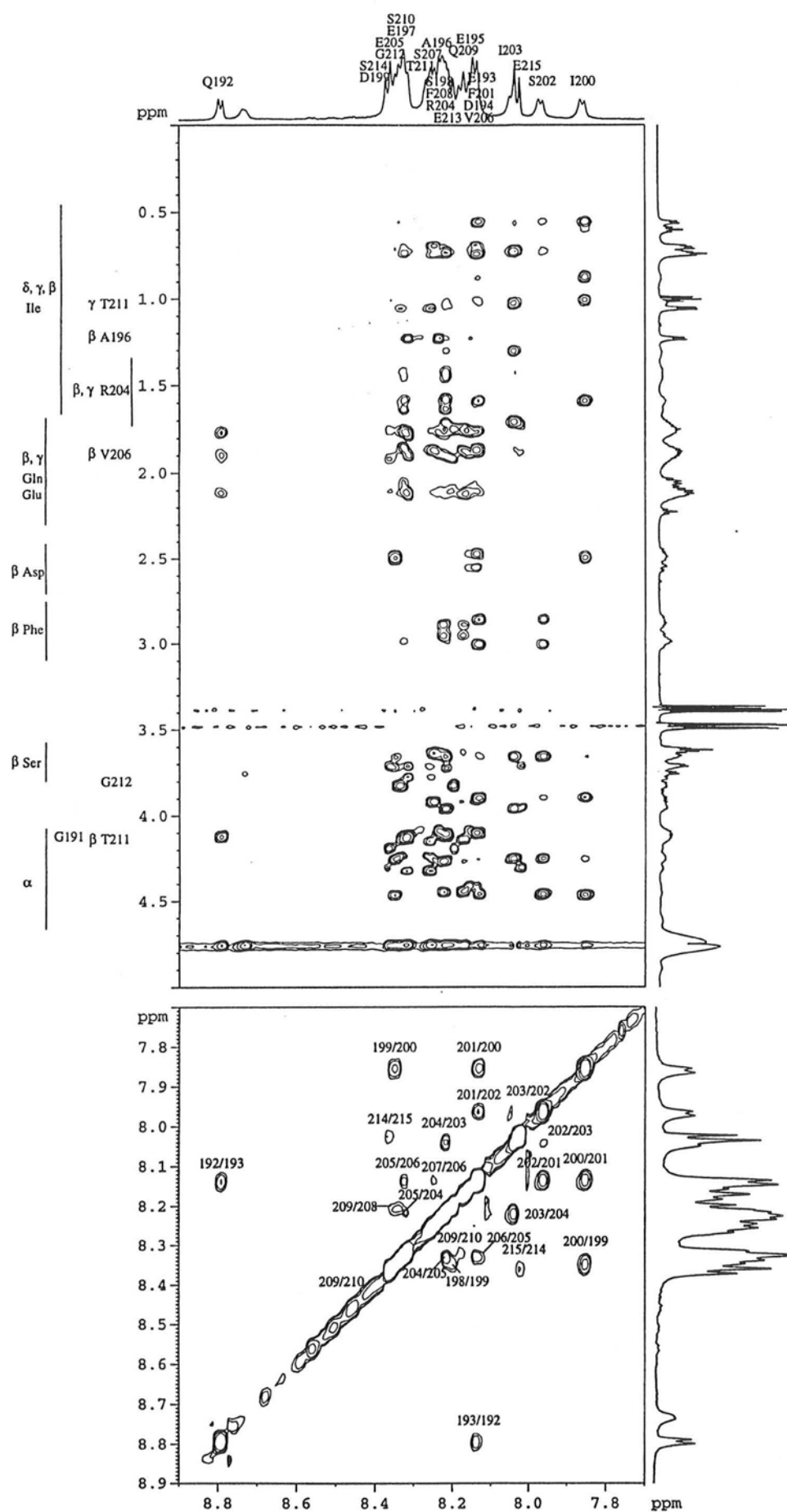


Figure III-21 : Spectre TR-NOESY dans l'eau du fragment de 191-215 en présence de Rev

III-3-3 : Résultats et discussion

a) Etude structurale dans le DMSO- d_6 :

DMSO-*d6* G Q E D E A E S D I F S I R E V S F Q S T G E S E

NN(i,i+1) — ■■■■■■■■■■ ■■■■■■■■■■ ■■■■■■■■■■ * ■■■■■■■■■■

α N(i,i+1) * ■■■■■■■■■■ * ■■■■■■■■■■ ■■■■■■■■■■ * ■■■■■■■■■■ * ■■■■■■■■■■ ■■■■■■■■■■

α N(i,i+2)

134

b) Etude structurale dans l'eau :

Dans l'eau, l'expérience de NOEs transférés n'a pas permis de mettre en évidence une structuration du fragment 191-215 de TAP(p32) au contact de la protéine Rev. Les cartes correspondant au peptide seul et au peptide en présence de Rev présentent les mêmes taches de corrélation et de même intensité relative. Deux conclusions peuvent être avancées : soit le peptide ne reconnaît pas la protéine Rev ; soit les conditions pour observer des transferts de NOEs n'étaient pas remplies.

Dans l'eau, tous les résidus du fragment 191-215 ont été identifiés sur la carte TR-NOESY. Le nombre de taches de corrélation est plus faible que dans le DMSO- d_6 . Les interactions NH/NH concernent principalement le domaine Ser¹⁹⁸-Ser²⁰⁷ et sont toutes du type (i,i+1). Les conclusions à l'issue de l'observation du diagramme des corrélations rejoignent celles de l'étude structurale dans le DMSO- d_6 (Figure III-23). Il faut, en particulier, noter la présence d'une interaction $\alpha N(i,i+2)$ entre Ile²⁰⁰ et Ser²⁰².

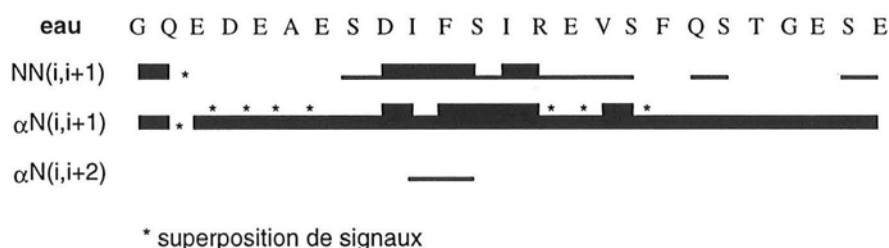


Figure III-23 : Diagramme des corrélations correspondant au spectre TR-NOESY du fragment 191-215 de TAP(p32) dans l'eau

c) Conclusion :

Pour continuer notre étude sur l'interaction entre les protéines TAP(p32) et Rev, une donnée expérimentale fondamentale manque : nous n'avons pas pu mettre en évidence la reconnaissance entre la protéine Rev et le fragment 191-215 de TAP(p32) synthétisé. Cette information connue, l'étude structurale par RMN et modélisation moléculaire devra être poursuivie. Les conditions opératoires pour la mise en œuvre d'expériences de NOEs transférés pourront alors être optimisées. Il conviendra également d'identifier la séquence minimale du peptide reconnu par Rev. Un Ala-scan deviendra alors envisageable et permettra de déterminer une position optimale probable de la modification pseudopeptidique. Des pseudopeptides comme par exemple des amidoxy analogues d'un fragment de TAP(p32) pourront alors être synthétisés.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les amidoxy peptides constituent une famille de pseudopeptides aux propriétés structurales intéressantes. Une liaison hydrogène bifide entre les deux atomes d'oxygène du lien hydroxamide et l'hydrogène de la liaison amide suivante induit, en effet, un pseudorepliement γ très stable. Le motif amidoxy est, par ailleurs, introduit par simple couplage peptidique en substituant un acide α -aminé par un α -aminoxycide. La synthèse de ce dernier ne pose pas non plus de difficulté particulière. Les amidoxy peptides sont donc *a priori* susceptibles de remplacer les hydrazide peptides quand les synthèses s'avèrent délicates en phase homogène comme sur support solide.

Un α -aminoxycide donne naissance à deux autres familles pseudopeptidiques : les oxime peptides obtenus par couplage de la fonction aminoxy avec un α -aminoaldéhyde et les amidoxy peptides réduits formés après réduction du lien oxime. Cette dernière réaction est quasi quantitative au bout de six jours à un pH maintenu à 3 et avec NaBH_3CN comme réducteur. Les difficultés de synthèse des oxime peptides se posent lors de la formation de la fonction aldéhyde : la liaison amide précédant le résidu proline risque en effet d'être rompue par un réducteur comme LiAlH_4 .

La liaison oxime peut exister sous les configurations Z et E. Seuls les (Z)-oxime peptides présentent une structure intrinsèque : le carbonyle de la liaison amide précédant le motif oxime interagit avec le NH de la liaison amide suivante pour stabiliser un pseudorepliement β . Les (Z)-oxime peptides ne seront susceptibles d'avoir des applications biologiques qu'à condition de pouvoir être séparés des isomères E : nous n'avons pas réussi à les isoler avec une pureté satisfaisante. Quant aux amidoxy peptides réduits, bien qu'ils soient peu structurés, ils présentent l'intérêt de ne pas être protonés au pH physiologique et constituent donc des mimes potentiels de l'intermédiaire réactionnel de l'hydrolyse enzymatique.

Nous avons travaillé sur deux processus biologiques. Nous avons d'une part synthétisé des inhibiteurs de l'élastase leucocytaire humaine (ELH), une enzyme dont l'activité non régulée entraîne des maladies comme l'emphysème pulmonaire. Cette étude a permis de préparer des amidoxy peptides, des oxime peptides et des amidoxy peptides réduits potentiellement bioactifs. Les tests biologiques ont pu confirmer le comportement semblable des hydrazide et des amidoxy peptides. Par ailleurs, parmi les six pseudohexapeptides synthétisés, seuls les amidoxy peptides et un des dérivés oxime ont présenté une activité

biologique significative. La présence du groupement carbonyle semble indispensable à la reconnaissance avec l'ELH. Par la suite d'autres pseudopeptides, comme les cétométhylène ou les cétométhylène amino, devraient donc être synthétisés. Afin d'obtenir des composés plus solubles, il conviendra également de modifier la nature de la séquence hexapeptidique parent. Les pseudopeptides pourraient être conçus, par exemple, à partir de l'enchaînement MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-Ala-Ser-NH₂. Des études par radiocristallographie de complexes enzyme-inhibiteur ou des expériences RMN de NOEs transférés de pseudopeptides en présence d'ELH pourraient également être envisagées.

Nous avons d'autre part étudié l'interaction entre deux protéines Rev et TAP(p32) qui jouent un rôle central dans le cycle du VIH, le virus responsable du SIDA. La protéine Rev constitue en effet une nouvelle cible thérapeutique car elle bloque le processus d'épissage et accroît donc la production de nouveaux virions. Nous avons synthétisé des fragments de TAP(p32) susceptibles d'interagir avec Rev pour empêcher cette dernière de se fixer sur son élément cible le RRE. Le fragment 191-215 obtenu a fait l'objet de tests biologiques et a été étudié par RMN seul et en présence de protéine Rev. Les résultats des tests sont contradictoires et ne permettent pas de conclure à une activité du peptide. Il faut, par ailleurs noter que les manipulations mettant en évidence *in vitro* l'interaction de la protéine TAP(p32) entière avec Rev n'ont pas pu être reproduites. En RMN, les expériences de NOEs transférés ne semblent pas indiquer une structuration particulière du peptide en présence de la protéine Rev. La poursuite de cette étude reste conditionnée par la mise au point de tests fiables. Si le fragment 191-215 s'avère actif, l'étude structurale par RMN et modélisation moléculaire devra être continuée. L'objectif ultime reste la synthèse de pseudopeptides, agents thérapeutiques potentiels.

**ANNEXE A : PARTIE
EXPERIMENTALE**

PARTIE EXPERIMENTALE

Les réactifs et produits de départ proviennent de différents fournisseurs (Aldrich, Fluka, Lancaster, Merck, Néosystem, Novabiochem, Senn...) et ont été utilisés sans purification préalable. Les solvants [acétate d'éthyle (AcOEt), éther de pétrole (EP), dichlorométhane (DCM)] ont été purifiés par distillation.

L'avancement des diverses réactions mises en jeu a été suivi par chromatographie sur couche mince (ccm). Les plaques de silice 60 F₂₅₄ (Merck) ont été révélées aux ultraviolets (UV) et au diode. Comme éluant, nous avons employé trois mélanges différents de solvants :

- A : AcOEt/EP (% en volume d'AcOEt précisé)
- B : Ethanol (EtOH)/AcOEt/EP (% d'EtOH précisé), 30 % d'EP
- C : Isopropanol (ⁱPrOH)/DCM (% d'ⁱPrOH précisé).

Les purifications par chromatographie ont été réalisées sur colonne de silice ouverte (Silice Merck Si 60, granulométrie 63-200 µm) ou sous pression (Silice Merck Si 60, granulométrie 40-63 µm) (261). Les rendements ont été calculés sur les produits isolés. Dans les cas où l'objet de la synthèse était uniquement l'obtention d'un produit pur pour l'étude physico-chimique, nous n'avons pas cherché à les optimiser. Les composés ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge (IR) (spectromètre Bruker IFS 25) en solution de concentration 10 mM dans le DCM et par résonance magnétique nucléaire (RMN) (spectromètre Bruker AC-200P, AM-400 ou AM-600) en solution dans le chloroforme deutérié (CDCl₃) ou dans le diméthylsulfoxyde deutérié (DMSO-*d*₆). Les températures de fusion ont été mesurées sur un banc Köepler.

1 : SYNTHESE DES INTERMEDIAIRES

1-1 : Synthèses des aminoxy acides Boc-protégés

a) Introduction d'un groupement Boc sur un aminoxy acide :

10 mmol (1,09 g) d'hémichlorhydrate d'*O*-carboxyméthylhydroxylamine (HCl_{0.5}.NH₂-O-CH₂-COOH) sont dissoutes dans 30 mL d'un mélange eau/dioxane 1/2 (v/v). La solution

est plongée dans un bain d'eau glacée pour abaisser sa température à 0°C. 15 mL d'une solution aqueuse de soude 0,1 N sont alors ajoutés. A température ambiante, 16 mmol (3,50 g) de ditert-butylpyrocarbonate (Boc₂O) sont introduites. On laisse réagir pendant la nuit tout en maintenant l'agitation. Le mélange réactionnel est concentré sous vide puis plongé de nouveau dans la glace. Le pH est abaissé vers 2-3 par addition d'une solution d'hydrogénosulfate de potassium (KHSO₄) 5 % en masse. Le produit attendu, Bocψ[CO-NH-O]Gly-OH, est extrait 5 fois par 10 mL de DCM. La phase organique est rassemblée puis lavée avec 10 mL d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium (NaCl) et enfin séchée sur sulfate de magnésium (MgSO₄). Le DCM est évaporé sous pression réduite. Bocψ[CO-NH-O]Gly-OH cristallise et est utilisé sans purification supplémentaire.

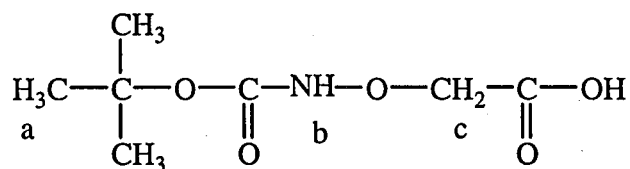
Bocψ[CO-NH-O]Gly-OH

Rendement = 70 %

Masse molaire = 191 g/mol

Aspect = solide blanc

Point de fusion = 120°C



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,51 (s, 9a) ; 4,50 (s, 2c) ; 7,92 (s, 1b)

b) Synthèses à partir des acides aminés ou des α-bromo acides :

α) Préparation des α-bromo acides :

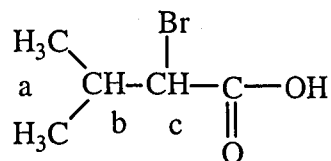
20 mmol (2,34 g) de (*D*)-valine et 66 mmol (7,86 g) de bromure de potassium (KBr) sont dissoutes dans 33 mL d'une solution aqueuse d'acide sulfurique 3 N. A une température comprise entre 0 et 5°C, 28 mmol (1,93 g) de nitrite de sodium (NaNO₂) sont ajoutées par portions sur 45 minutes. On laisse réagir sous agitation une heure à 0-5°C et 1 ½ heure à température ambiante. Le produit attendu est extrait 4 fois par 10 mL de diéthyléther (Et₂O). La phase organique est lavée 2 fois par 10 mL d'eau saturée en NaCl puis séchée sur MgSO₄. L'éther est évaporé sous vide. Le (*R*)-acide 2-bromoisovalérique ainsi préparé peut être distillé sous pression réduite ou utilisé en l'état sans purification supplémentaire.

(R)-Br-CH(ⁱPr)-CO₂H

Rendement = 83 %

Masse molaire = 181 g/mol

Aspect = huile



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,08 (d (J = 6,8 Hz), 3a) ; 1,12 (d (J = 6,7 Hz), 3a); 2,26 (m, 1b) ; 4,09 (d (J = 7,7 Hz), 1c)

β) Action de la N-tert-butyloxycarbonylhydroxylamine sur un α-bromoacide :

On dissout 10 mmol (1,33 g) de *N*-tert-butyloxycarbonylhydroxylamine (^tBu-O-CO-NH-OH) dans 50 mL de diméthylformamide (DMF). La solution est plongée dans un bain d'eau glacée pour y être refroidie à une température comprise entre 0 et 5°C. 20 mmol (0,8 g) d'hydruure de sodium (NaH) à 60 % dispersé dans de l'huile minérale sont ajoutées par petites fractions sur 30 minutes. A la même température, 10 mmol de (*R*)-α-bromo acide, préalablement dissoutes dans 2 mL de DMF sont introduites goutte à goutte pendant 15 minutes. En maintenant l'agitation, on laisse réagir toute la nuit à température ambiante. Le mélange réactionnel est dilué par 100 mL d'eau glacée. On réalise 2 extractions par 15 mL d'Et₂O. La phase étherée est lavée par 5 mL d'eau. La phase aqueuse et l'eau de lavage de la phase étherée sont rassemblées, refroidies par un bain de glace pour être acidifiées par une solution d'acide chlorhydrique (HCl_{aq}) 12 N. Le produit attendu est extrait 5 fois par 20 mL d'Et₂O. La phase organique est lavée 2 fois par 5 mL d'eau saturée en NaCl et séchée sur MgSO₄.

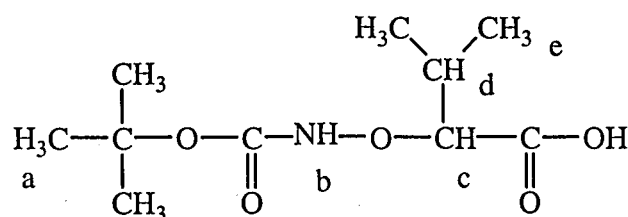
Elle est ensuite concentrée sous vide jusqu'à atteindre un volume de 20 mL. 2 mL de dicyclohexylamine sont alors introduits. Le sel de dicyclohexylammonium précipite. Il est filtré, lavé à Et₂O et recristallisé dans l'AcOEt. Le sel de dicyclohexylammonium ainsi purifié, 30 mL d'AcOEt, 5 mL d'eau glacée et 5 mL d'une solution à 5% de KHSO₄ sont introduits dans une ampoule à décanter et énergiquement mélangés. La phase organique est séparée, lavée 3 fois avec 5 mL d'eau saturée en NaCl et séchée sur MgSO₄. Le solvant est évaporé sous vide. Le Boc-aminoxy acide cristallise.

Bocψ[CO-NH-O]Val-OH

Rendement = 26 % (après recristallisation)

Masse molaire = 233 g/mol

Aspect = solide blanc



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 0,98 (d (J = 7,3 Hz), 3e) ; 1,09 (d (J = 6,9 Hz), 3e) ; 1,50 (s, 9a) ; 2,31 (m, 1d) ; 4,20 (d (J = 3,7 Hz), 1c) ; 7,74 (s, 1b)

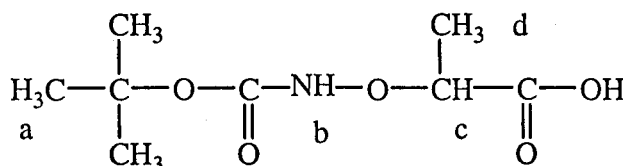
Bocψ[CO-NH-O]Ala-OH

Rendement = 53 % (avant recristallisation)

Masse molaire = 205 g/mol

Aspect = solide blanc

Point de fusion = 91°C



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,51 (s, 9a) ; 1,53 (d (J = 8,4 Hz), 3d) ; 4,47 (q, 1c) ; 7,67 (s, 1b)

Bocψ[CO-NH-O]Gly-OH

Rendement = 58 % (avant recristallisation)

Voir 1-1-a.

1-2 : Estérification et amidification de la fonction acide carboxylique

a) Préparation des esters méthyliques :

A -15°C, 20 mmol (1,5 mL) de chlorure de thionyle (SOCl₂) sont dissoutes dans 20 mL de méthanol (MeOH). 20 mmol d'acide aminé sont introduites par fraction. Le mélange réactionnel est ensuite chauffé à 45°C. La réaction se poursuit pendant 5 heures sous agitation. MeOH est évaporé sous vide. Le composé obtenu est lyophilisé et utilisé en l'état pour les étapes ultérieures.

Ont ainsi été synthétisés : *HCl.H-Pro-OMe*, *HCl.H-Val-OMe* et *HCl.H₂N-O-CH₂-COOMe*.

b) Amidification de la fonction acide carboxylique : méthode aux anhydrides mixtes

10 mmol de Boc-amino acide ou de Boc-aminoxy acide sont dissoutes dans 20 mL de tétrahydrofurane (THF). La solution est refroidie à -18°C . 10 mmol (1,10 mL) de *N*-méthylmorpholine (NMM) sont lentement ajoutées à la pipette. 10 mmol (1,30 mL) d'isobutylchloroformiate (ICF), diluées dans 2 mL de THF, sont introduites goutte à goutte à l'aide d'une ampoule de Mariotte. Les parois du ballon sont rincées avec au plus 5 mL de THF. L'agitation est maintenue pendant 15 minutes. 10 mmol d'isopropylamine également diluées dans 2 mL de THF sont alors ajoutées goutte à goutte. Il faut noter que la méthylamine et la diméthylamine sont des gaz et sont introduites en excès sous leur forme condensée. Après 10 minutes, à -18°C , on laisse revenir à température ambiante le mélange réactionnel. La réaction se poursuit sous agitation toute la nuit. 100 mL de DCM sont introduits. La phase organique est lavée 3 fois avec 15 mL d'une solution à 5% de KHSO_4 , 3 fois avec 15 mL d'une solution aqueuse à 5 % en masse d'hydrogénocarbonate de potassium (KHCO_3) et 3 fois avec 15 mL d'eau saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO_4 . Le DCM est évaporé sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice.

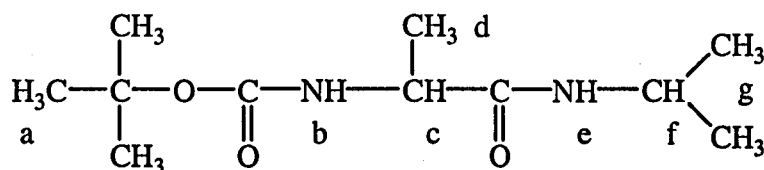
Boc-Ala-NHⁱPr

Rendement = 61 % (recristallisation dans un mélange EP / AcOEt)

Masse molaire = 230 g/mol

Aspect = solide blanc

Point de fusion = 123°C



RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ (en ppm) = 1,14 (d ($J = 6,6$ Hz), 6g) ; 1,33 (d ($J = 6,6$ Hz), 3d) ; 1,45 (s, 9a) ; 4,07 (m, 1c + 1f) ; 4,99 (d, 1b) ; 5,95 (d, 1e)

Bocψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr

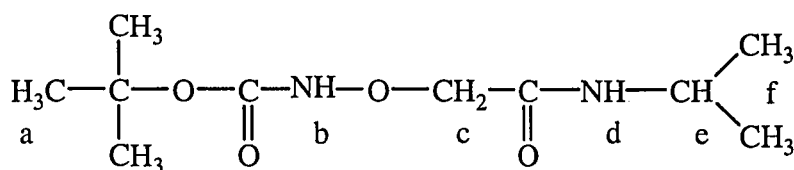
Rendement = 91 %

Masse molaire = 232 g/mol

Aspect = solide blanc

Rf (A, 60 %) = 0,58

Point de fusion = 77°C



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,19 (d (J = 6,6 Hz), 6f) ; 1,48 (s, 9a) ; 4,12 (m, 1e) ; 4,27 (s, 2c) ; 7,57 (s, 1b) ; 8,04 (d, 1d)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3418 (amide A : ν(N-H) du NH^ᶦPr libre) ; 3339 (amide A : ν(N-H) du NHO libre et du NH^ᶦPr lié) ; 1739 (amide I : ν(C=O) du Boc) ; 1669 (amide I : ν(C=O) du CONH^ᶦPr) ; 1555 (amide II : ν(C-N) et δ(N-H))

Bocψ[CO-NH-O]Ala-NH^ᶦPr

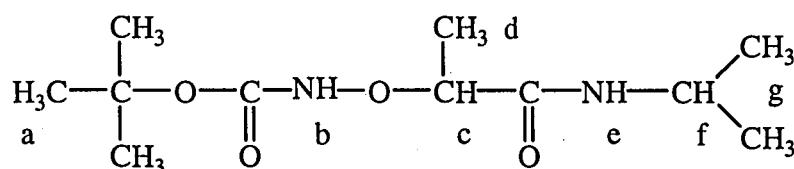
Rendement = 69 %

Masse molaire = 246 g/mol

Aspect = solide blanc

R_f (A, 70 %) = 0,65

Point de fusion = 84°C



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,16 (d (J = 6,3 Hz), 3g) ; 1,19 (d (J = 6,2 Hz), 3g) ; 1,42 (d (J = 7,0 Hz), 3d) ; 1,48 (s, 9a) ; 4,08 (m, 1f) ; 4,23 (q, 1c) ; 7,33 (s, 1b) ; 7,71 (d, 1e)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3418 (amide A : ν(N-H) du NH^ᶦPr libre) ; 3342 (amide A : ν(N-H) du NHO libre et du NH^ᶦPr lié) ; 1740 (amide I : ν(C=O) du Boc) ; 1666 (amide I : ν(C=O) du CONH^ᶦPr) ; 1555 (amide II : ν(C-N) et δ(N-H))

Bocψ[CO-NH-O]Gly-NHMe

Rendement = 71 %

Masse molaire = 204 g/mol

Aspect = solide blanc

R_f (B, 15 %) = 0,65

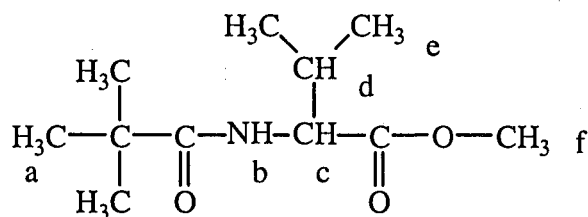
Point de fusion = 86°C

Piv-Val-OMe

Rendement = 47 % (purification par lavages)

Masse molaire = 215 g/mol

Aspect = huile incolore



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 0,93 (d (J = 6,0 Hz), 3e) ; 0,96 (d (J = 6,0 Hz), 3e) ; 1,25 (s, 9a) ; 2,18 (m, 1d) ; 3,78 (s, 3f) ; 4,56 (m, 1c) ; 6,15 (d, 1b)

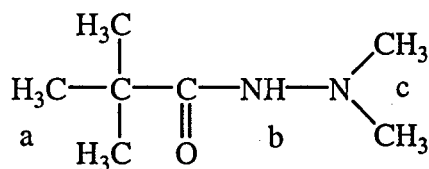
Piv-NH-NMe₂

Rendement = non donné (purification par lavages)

Masse molaire = 144 g/mol

Aspect = solide blanc

Point de fusion = 122°C



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,19 (s, 9a) ; 2,59 (s, 6c) ; 6,33 (s, 1b)

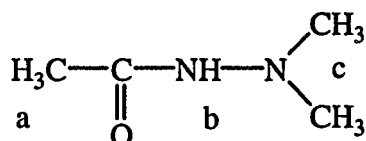
Ac-NH-NMe₂

Rendement = non donné

Masse molaire = 102 g/mol

Aspect = huile incolore

R_f (20 % EtOH / 80 % AcOEt) = 0,35



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = (E/Z = 55/45) 1,82 (s, 3aZ) ; 2,02 (s, 3aE) ; 2,44 (s, 6cE) ; 2,50 (s, 6cZ) ; 6,92 (s, 1bE) ; 7,15 (s, 1bZ)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3427 / 3331 / 3300 (amide A : ν(N-H)) ; 1691 / 1676 (amide I : ν(C=O))

Ac-NH-NPh₂

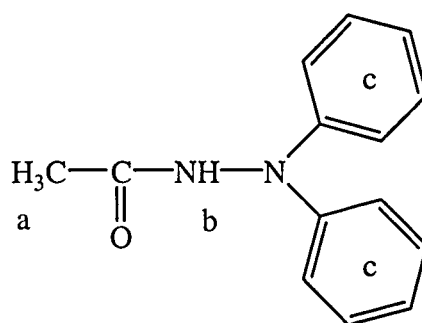
Rendement = 34 %

Masse molaire = 226 g/mol

Aspect = solide blanc qui devient violet à la lumière

R_f (A, 50 %) = 0,57

Point de fusion = 187°C



RMN-¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) : δ (en ppm) = (E/Z = 20/80) 1,70 (s, 3aE) ; 1,93 (s, 3aZ) ; 6,93-7,35 (m, 10c) ; 9,94 (s, 1bE) ; 10,48 (s, 1bZ)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3391 / 3367 / 3334 (amide A : ν(N-H)) ; 1706 / 1687 (amide I : ν(C=O)) ; 1592 / 1495 (ν(C=C) aromatique)

1-4 : Réaction de déprotection

a) Elimination du groupement Boc : méthode à l'acide trifluoroacétique

A température ambiante, au plus 10 mmol de composé dont on veut éliminer le groupement Boc sont dissoutes dans 10 mL d'un mélange DCM/acide trifluoroacétique (TFA) 3/2 (v/v). La réaction est suivie par ccm. L'agitation est maintenue pendant environ 35 minutes. On évapore sous vide le DCM et le TFA en excès. Le trifluoroacétate obtenu est dissous dans l'eau et lyophilisé.

b) Saponification des esters méthyliques :

10 mmol d'ester sont dissoutes dans 10 mL d'acétone. La solution est refroidie à 0°C. 10,5 mL d'une solution aqueuse de soude (NaOH) 1 N sont additionnés goutte à goutte. La réaction est suivie par ccm. La réaction se poursuit ½ heure à 0°C, puis 4 heures à température ambiante. L'acétone est évaporée sous vide. 10 mL d'eau sont ajoutés. L'ester qui n'a pas réagi est extrait par 2 fois 5 mL de DCM. Le carboxylate est lyophilisé et utilisé en l'état pour les étapes ultérieures.

Ont ainsi été préparés : *Piv-Pro-ONa* et *Piv-Val-ONa*.

Pour *Z-Ala-Ala-Pro-ONa*, l'acétone a été remplacée par un mélange eau/MeOH 1/1 (v/v).

1-5 : Préparation des α -amino aldéhydes et des cétones

a) Méthode de Fehrentz et Castro :

α) Synthèses des *N,O*-diméthylhydroxamides : méthode à la
DCCI

20 mmol (4,3 g) de Boc-Pro-OH sont dissoutes dans 20 mL de DCM. A une température de 0°C, sont successivement additionnées 20 mmol (3,42 mL) de DIEA, 20 mmol (2,44 g) de 4-diméthylaminopyridine (DMAP), 20 mmol (1,95 g) de chlorhydrate de *N,O*-diméthylhydroxylamine (HCl.NH(Me)-OMe) et 20 mmol (4,13 g) de dicyclohexylcarbodiimide (DCCI). Il convient de s'assurer que le pH du milieu réactionnel est basique. La réaction se poursuit sous agitation à 0°C pendant 1 heure et 4 heures à température ambiante. Une partie des sels de DIEA et de la dicyclohexylurée (DCHU) formés est filtrée. 80 mL de DCM sont ajoutés. La phase organique est lavée 3 fois avec 15 mL d'une solution à 5% de KHSO₄, 3 fois avec 15 mL d'une solution à 5 % de KHCO₃ et 3 fois avec 15 mL d'eau saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄. Le DCM est évaporé sous vide. Le produit attendu, Boc-Pro-N(Me)-OMe, est purifié par chromatographie sur colonne de silice.

Boc-Pro-N(Me)-OMe

Rendement = 78 %

Voir 1-5-a- β .

β) Synthèses des *N,O*-diméthylhydroxamide : méthodes au
TBTU

20 mmol de Boc-acide aminé sont dissoutes dans 50 mL de DCM ou de DMF. A température ambiante, sont successivement additionnées 40 mmol (6,85 mL) de DIEA, 22 mmol (7,06 g) de tétrafluoroborate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (TBTU) et 20 mmol (1,95 g) de HCl.NH(Me)-OMe. Il convient de s'assurer que le pH du milieu réactionnel est basique. La réaction se poursuit sous agitation à température ambiante pendant une nuit. 50 mL de DCM sont ajoutés (ou 100 mL si la réaction a été effectuée dans la DMF). La phase organique est lavée 3 fois avec 15 mL d'une solution à 5% de KHSO₄, 3 fois avec 15 mL d'une solution à 5 % de KHCO₃ et 3 fois avec 15 mL d'eau saturée en NaCl.

La phase organique est séchée sur MgSO_4 . Le DCM est évaporé sous vide. Le produit attendu est purifié par chromatographie sur colonne de silice.

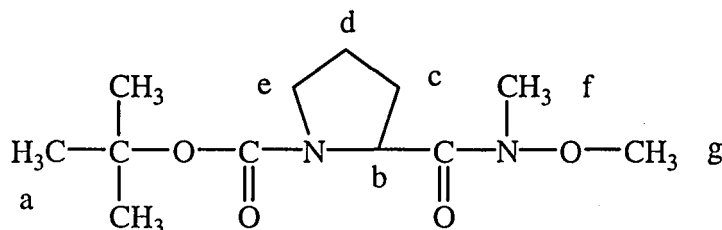
Boc-Pro-N(Me)-OMe

Rendement = 83 %

Masse molaire = 258 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (A, 70 %) = 0,52



RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ (en ppm) = (A/B = 1/1 isomérisie cis/trans de la liaison Boc-Pro) 1,40 (s, 9aB) ; 1,44 (s, 9aA) ; 1,88-2,16 (m, 2c + 2d) ; 3,18 (s, 3f) ; 3,41-3,53 (m, 2e) ; 3,70 (s, 3gA) ; 3,76 (s, 3gB) ; 4,58 (dd ($J = 3,6$ Hz ; $J = 8,3$ Hz), 1bA) ; 4,68 (dd ($J = 3,6$ Hz ; $J = 8,3$ Hz), 1bB)

IR (DCM) : (en cm^{-1}) 1691 (amide I: $\nu(\text{C}=\text{O})$ du Boc) ; 1667 (amide I: $\nu(\text{C}=\text{O})$ du CON(Me)O)

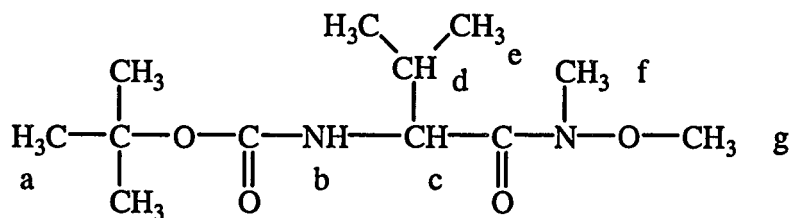
Boc-Val-N(Me)-OMe

Rendement = 85%

Masse molaire = 260 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (A, 50 %) = 0,60



RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ (en ppm) = 0,90 (d ($J = 6,8$ Hz), 3e) ; 0,95 (d ($J = 7,3$ Hz), 3e) ; 1,43 (s, 9a) ; 1,98 (m, 1d) ; 3,21 (s, 3f) ; 3,77 (s, 3g) ; 4,58 (m, 1c) ; 5,12 (d, 1b)

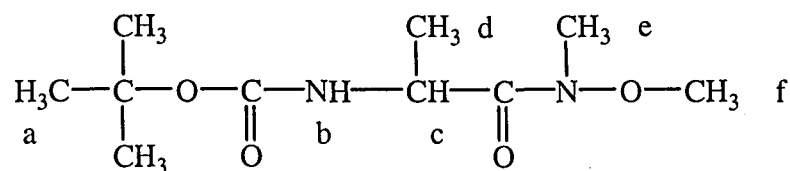
Boc-Ala-N(Me)-OMe

Rendement = 70 % (précipitation dans Et_2O)

Masse molaire = 232 g/mol

Aspect = solide blanc

Pf = 149°C



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,31 (d (J = 6,9 Hz), 3d) ; 1,44 (s, 9a) ; 3,21 (s, 3e) ; 3,77 (s, 3f) ; 4,68 (m, 1c) ; 5,24 (d, 1b)

γ) Réduction par LiAlH₄

10 mmol de *N,O*-diméthylhydroxamide sont dissoutes dans 30 mL de THF. La solution est refroidie à -15°C. 20 mmol (0,76 g) d'hydrure mixte de lithium et d'aluminium sont ajoutées par portion. La réaction se poursuit sous azote et sous agitation à -15°C pendant une heure. Sont alors additionnés 20 mL de THF, 10 mL d'AcOEt et 50 mL d'une solution à 5% de KHSO₄. La phase organique est séparée et concentrée. Le brut réactionnel est repris par 80 mL de DCM, puis lavé 3 fois avec 15 mL d'une solution à 5% de KHSO₄, 3 fois avec 15 mL d'une solution à 5 % de KHCO₃ et 3 fois avec 15 mL d'eau saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄. Le DCM est évaporé sous vide. L'α-amino aldéhyde est utilisé en l'état sans purification supplémentaire.

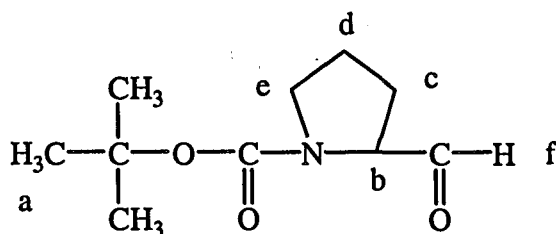
Boc-Pro-H

Rendement = 88 %

Masse molaire = 199 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (A, 70 %) = 0,79



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = (A/B = 2/1) 1,48 (s, 9a) ; 1,87-2,12 (m, 2c + 2d) ; 3,51 (m, 2e) ; 4,05 (m, 1bA) ; 4,20 (m, 1bB) ; 9,46 (d (J = 3 Hz), 1fA) ; 9,56 (d (J = 3 Hz), 1fB)

Boc-Ala-H

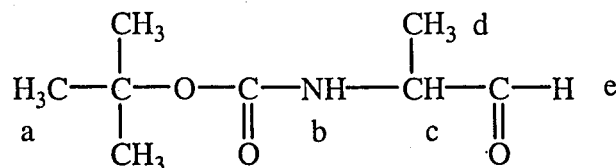
Rendement = 90 %

Masse molaire = 173 g/mol

Aspect = solide blanc

R_f (A, 50 %) = 0,60

Point de fusion = 92°C



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,33 (d (J = 7,3 Hz), 3d) ; 1,45 (s, 9a) ; 4,23 (m, 1c) ; 5,10 (d, 1b) ; 9,56 (s, 1e)

δ) Addition d'un organomagnésien

10 mmol (2,58 g) de Boc-Pro-N(Me)-OMe sont dissoutes dans 50 mL de THF. La solution est refroidie à -15°C. 15 mmol de bromure d'alkylmagnésium (R-MgBr) en solution dans le THF sont ajoutées goutte à goutte. La réaction se poursuit sous azote et sous agitation à -15°C pendant 2 heures. A -15°C, 50 mL d'une solution à 5% de KHSO₄ sont introduits. La phase organique est séparée et concentrée. Le brut réactionnel est repris par 80 mL de DCM, puis lavé 3 fois avec 15 mL d'une solution à 5% de KHSO₄, 3 fois avec 15 mL d'une solution à 5 % de KHCO₃ et 3 fois avec 15 mL d'eau saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄. Le DCM est évaporé sous vide. La cétone est purifiée par chromatographie sur colonne de silice.

Boc-Pro-Me

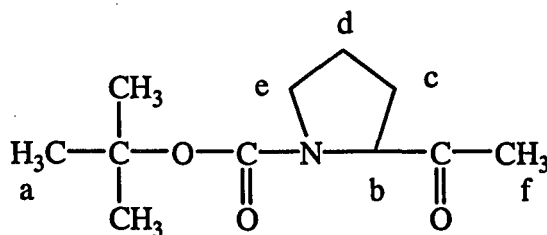
Le bromure de méthylmagnésium en solution dans le THF est commercial.

Rendement = 42 %

Masse molaire = 213 g/mol

Aspect = huile incolore

R_f (A, 70 %) = 0,70



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = (A/B = 2/1) 1,41 (s, 9aA) ; 1,45 (s, 9aB) ; 1,85 (m, 1c + 2d) ; 2,12 (s, 3fA) ; 2,16 (s, 3fB + 1c) ; 3,52 (m, 2e) ; 4,18 (m, 1bA) ; 4,32 (m, 1bB)

Boc-Pro-Pr

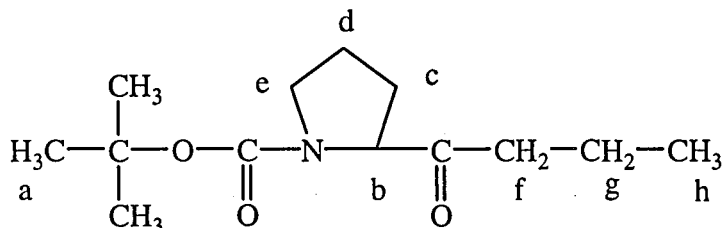
Le bromure de propylmagnésium est préparé par ajout goutte à goutte de 15 mmol (1,38 mL) de bromure de propyle sur 15 mmol (0,36 g) de magnésium. Le mélange réactionnel est agité sous azote pendant 15 minutes.

Rendement = 19 %

Masse molaire = 241 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (A, 70 %) = 0,83



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = (A/B = 2/1) 0,92 (t, 3h) ; 1,40 (s, 9aA) ; 1,45 (s, 9aB) ; 1,61 (m, 2g) ; 1,83-2,16 (m, 2c + 2d) ; 2,44 (m, 2f) ; 3,50 (m, 2e) ; 4,23 (m, 1bA) ; 4,35 (m, 1bB)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 1725 (ν (C=O) de la cétone) ; 1690 (amide I : ν (C=O) du Boc)

b) Méthode aux β -amino alcools :

α) Synthèses des β -amino alcools :

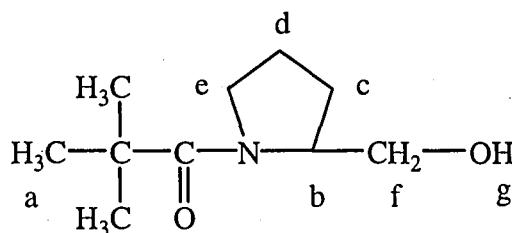
10 mmol de Piv-acide aminé sont dissoutes dans 10 mL de diméthoxyéthane (DME). La solution est refroidie à -15°C. Sont successivement additionnées goutte à goutte 10 mmol (1,10 mL) de NMM et 10 mmol (1,30 mL) d'ICF. Après une minute, les sels de NMM sont filtrés et lavés avec 5 fois 2 mL de DME. Le filtrat et le DME de lavage sont rassemblés et plongés dans un bain d'eau glacée. Une solution de 15 mmol (0,57 g) de borohydrure de sodium (NaBH₄) dans 5 mL d'eau est additionnée en une seule fois. 250 mL d'eau sont immédiatement ajoutés. Le β -amino alcool est extrait 5 fois par 20 mL de DCM. La phase organique est lavée 3 fois avec 15 mL d'une solution à 5% de KHSO₄, 3 fois avec 15 mL d'une solution à 5 % de KHCO₃ et 3 fois avec 15 mL d'eau saturée en NaCl. Elle est séchée sur MgSO₄. Le DCM est évaporé sous vide. Le β -amino alcool est utilisé en l'état sans purification supplémentaire.

Piv-Pro-ol

Rendement = 40 %

Masse molaire = 185 g/mol

Aspect = huile incolore



RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,28 (s, 9a) ; 1,47 / 1,78 / 1,92 / 2,03 (m, 2c + 2d) ; 3,46 / 3,87 (m, 2e) ; 3,57 / 3,65 (m, 2f) ; 4,33 (m, 1b) ; 5,02 (t, 1g)

Piv-Val-ol

Rendement = 44 %

Masse molaire = 187 g/mol

Aspect = huile incolore

β) Synthèses des α -amino aldéhydes : méthode de Swern

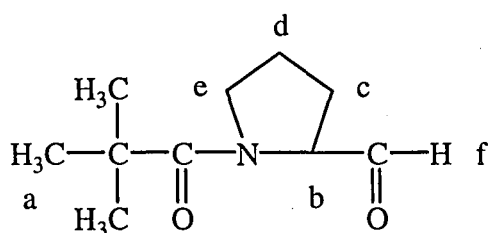
7,5 mmol (0,65 mL) de chlorure d'oxalyde sont dissoutes dans 12,5 mL de DCM. La solution est refroidie à -60°C. 15 mmol (1,06 mL) de diméthylsulfoxyde (DMSO) sont additionnées et le mélange est agité vigoureusement pendant 10 minutes. 5 mmol de β -amino alcool dans 25 mL de DCM sont alors ajoutées goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité pendant 15 minutes à -60°C sous courant d'azote. 30 mmol (5,13 mL) de DIEA sont enfin additionnées. Après 5 minutes, le milieu est réchauffé jusqu'à atteindre la température ambiante. 125 mL d'eau sont ajoutés. L'agitation est maintenue pendant 10 minutes. L' α -amino aldéhyde est extrait 3 fois par 30 mL de DCM. La phase organique est lavée par 3 fois 15 mL d'une solution à 5 % de KHSO₄ et par 3 fois 15 mL d'eau saturée en NaCl, puis séchée sur MgSO₄. Le DCM est évaporé sous vide. L' α -amino aldéhyde est utilisé en l'état sans purification supplémentaire.

Piv-Pro-H

Rendement = 88 %

Masse molaire = 183 g/mol

Aspect = huile incolore



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,29 (s, 9a) ; 1,84-1,99 (m, 2c + 2d) ; 3,75 (m, 2e) ; 4,44 (m, 1b) ; 9,45 (d (J = 2,4 Hz), 1f)

Piv-Val-H

Rendement = 67 %

Masse molaire = 185 g/mol

Aspect = huile incolore

2 : SYNTHÈSE DES MONOPEPTIDES

La synthèse des composés *Bocψ[CO-NH-O]Gly-NH^tPr*, *Bocψ[CO-NH-O]Ala-NH^tPr* et *Bocψ[CO-NH-O]Gly-NHMe* est décrite au paragraphe 1-2-b.

2-1 : Couplage avec la O-méthylhydroxylamine ou la N,N-diméthylhydrazine (méthode au TBTU)

Mode opératoire : voir 1-4-a-β. La O-méthylhydroxylamine et la N,N-diméthylhydrazine sont introduites sous forme de chlorhydrate.

Boc-Pro-NH-OMe

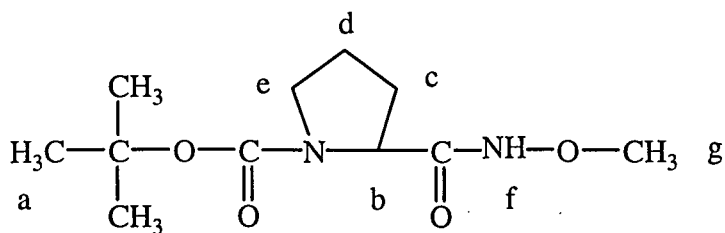
Rendement = 81 %

Masse molaire = 244 g/mol

Aspect = solide blanc

R_f (B, 10 %) = 0,50

Point de fusion = 138°C



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,47 (s, 9a) ; 1,91-2,46 (m, 2c + 2d) ; 3,39 (m, 2e) ; 3,76 (s, 3g) ; 4,18 (m, 1b) ; 9,86 (s, 1f)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3392 (amide A : ν (N-H) du NHO libre) ; 3255 (amide A : ν (N-H) du NHO lié) ; 1696 (amide I : ν (C=O) du CONHO) ; 1669 (amide I : ν (C=O) du Boc)

Boc-Pro-NH-NMe₂

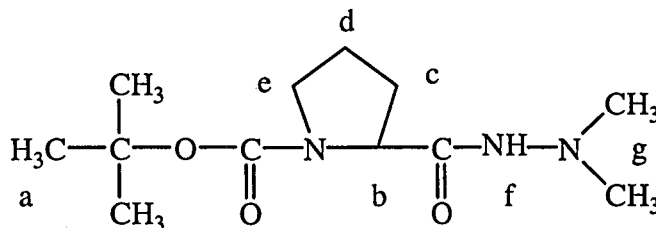
Rendement = 94 %

Masse molaire = 257 g/mol

Aspect = solide blanc

R_f (B, 15 %) = 0,48

Point de fusion = 111°C



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = (E/Z = 78/22) 1,43 (s, 9aZ) ; 1,46 (s, 9aE) ; 1,87-2,24 (m, 2c + 2d) ; 2,54 (s, 6gZ) ; 2,57 (s, 6gE) ; 3,41 (m, 2e) ; 4,17 (m, 1bE) ; 4,77 / 4,90 (m, 1bZ) (isomérisie cis/trans de la liaison Boc-Pro) ; 6,03 (s, 1fZ) ; 6,74 / 7,78 (m, 1fE) (isomérisie cis/trans de la liaison Boc-Pro)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3419 / 3325 / 3295 / 3256 (amide A : ν (N-H)) ; 1692 (amide I : ν (C=O) du CONHNMe₂ et du Boc)

2-2 : Synthèses des Piv-amidoxy peptides

Mode opératoire : voir 1-3. Le groupement protecteur Boc des Boc-amidoxy mono-peptides est préalablement éliminé suivant le mode opératoire décrit au paragraphe 1-4-a.

Piv-Pro-NH-OMe

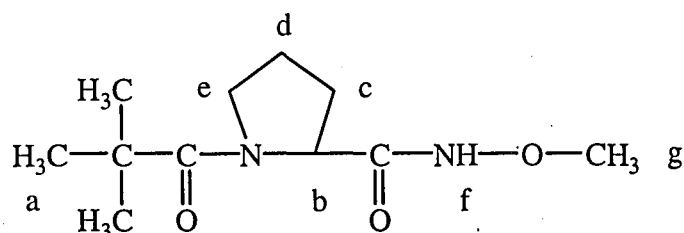
Rendement = 51 %

Masse molaire = 228 g/mol

Aspect = solide blanc

Rf (B, 15 %) = 0,59

Point de fusion = 83°C



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,27 (s, 9a) ; 1,82-2,31 (m, 2c + 2d) ; 3,71 (m, 2e) ; 3,74 (s, 3g) ; 4,51 (m, 1b) ; 9,69 (s, 1f)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3389 (amide A : ν (N-H) du NHO libre) ; 3232 (amide A : ν (N-H) du NHO lié) ; 1698 (amide I : ν (C=O) du CONHO) ; 1605 (amide I : ν (C=O) du Piv)

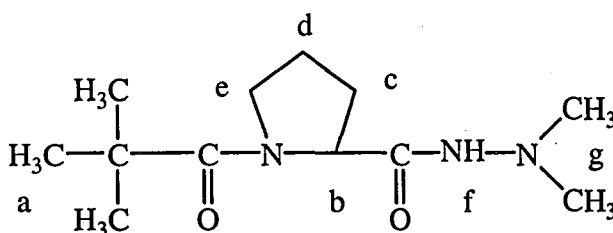
Piv-Pro-NH-NMe₂

Rendement = 69 %

Masse molaire = 241 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (B, 15 %) = 0,34



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = (E/Z = 66/34) 1,25 (s, 9a) ; 1,76-2,33 (m, 2c + 2d) ; 2,53 (s, 6g) ; 3,73 (m, 2e) ; 4,51 (m, 1bE) ; 5,15 (m, 1bZ) ; 6,11 (s, 1fZ) ; 6,67 (m, 1fE)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3420 / 3323 / 3294 / 3216 (amide A : ν (N-H)) ; 1687 (amide I : ν (C=O) du CONHNMe₂) ; 1610 (amide I : ν (C=O) du Piv)

Piv-Pro-N(Me)-OMe

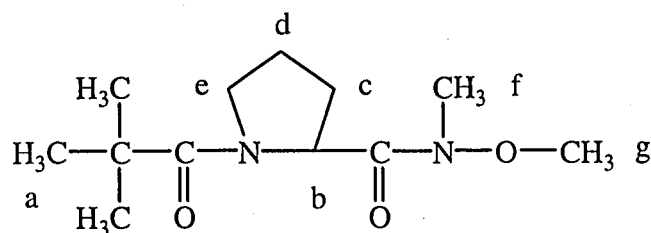
Rendement = 64 %

Masse molaire = 242 g/mol

Aspect = solide blanc

Rf (B, 15 %) = 0,71

Point de fusion = 82°C



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,29 (s, 9a) ; 1,80-2,12 (m, 2c + 2d) ; 3,20 (s, 3f) ; 3,77 (m, 2e) ; 3,83 (s, 3g) ; 4,95 (m, 1b)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 1667 (amide I : ν(C=O) du CONHO) ; 1613 (amide I : ν(C=O) du Piv)

Pivψ[CO-NH-O]Gly-NHMe

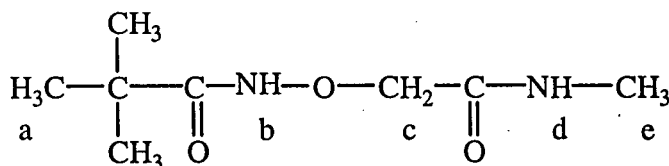
Rendement = 90 %

Masse molaire = 188 g/mol

Aspect = solide blanc

R_f (B, 15 %) = 0,63

Point de fusion = 70°C



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,22 (s, 9a) ; 2,86 (d (J = 4,8 Hz), 3e) ; 4,36 (s, 2c) ; 8,40 (d, 1d) ; 8,78 (s, 1b)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3443 (amide A : ν(N-H) du NHMe libre) ; 3388 (amide A : ν(N-H) du NHO libre) ; 3306 (amide A : ν(N-H) du NHMe lié) ; 1679 (amide I : ν(C=O) du Piv et du CONHMe) ; 1569 (amide II : ν(C-N) et δ(N-H))

2-3 : Synthèses des oxime peptides

10 mmol (1,10 mL) de pivaldéhyde sont diluées dans 20 mL d'EtOH. 5 mmol de Boc-amidoxy peptide, dont le groupement protecteur Boc a préalablement été éliminé suivant le mode opératoire décrit au paragraphe 1-4-a, sont dissoutes dans un mélange de 2 mL d'EtOH et de 5 mmol (0,55 mL) de NMM. Cette solution est alors additionnée au 20 mL d'EtOH contenant l'aldéhyde. Sont également ajoutées 20 mmol (1,64 g) d'acétate de sodium (AcONa) ainsi que du tamis moléculaire. La réaction se poursuit toute la nuit sous agitation. Le mélange réactionnel est filtré et repris par 80 mL de DCM. La phase organique est lavée 3 fois avec 15 mL d'une solution à 5% de KHSO₄, 3 fois avec 15 mL d'une solution aqueuse à

5 % en masse d'hydrogénocarbonate de potassium (KHCO_3) et 3 fois avec 15 mL d'eau saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO_4 . Les solvants sont évaporés sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice.

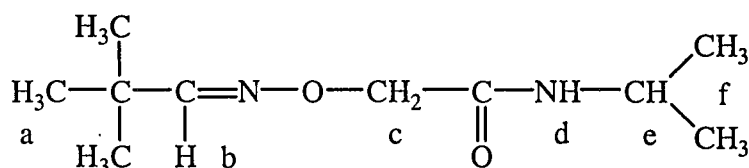
Pivψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr

Rendement = 79 %

Masse molaire = 200 g/mol

Aspect = huile jaunâtre

Rf (A, 50 %) = 0,4



RMN-¹H (200 MHz, CDCl_3) : δ (en ppm) = 1,07 (s, 9a) ; 1,13 (d (J = 6,6 Hz), 6f) ; 4,11 (m, 1e) ; 4,41 (s, 2c) ; 6,05 (d, 1d) ; 7,41 (s, 1b)

IR (DCM) : (en cm^{-1}) 3422 (amide A : $\nu(\text{N-H})$ du NH^iPr) ; 1673 (amide I : $\nu(\text{C=O})$ du CONH^iPr) ; 1528 (amide II : $\nu(\text{C-N})$ et $\delta(\text{N-H})$)

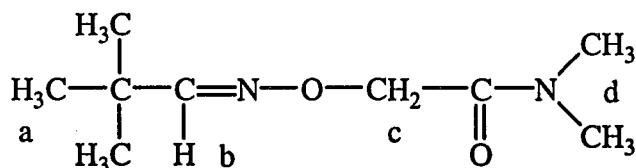
Pivψ[CH=N-O]Gly-NMe₂

Rendement = 87 %

Masse molaire = 186 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (A, 60 %) = 0,58



RMN-¹H (200 MHz, CDCl_3) : δ (en ppm) = 0,91 (s, 9a) ; 2,79 (s, 3d) ; 2,84 (s, 3d) ; 4,49 (s, 2c) ; 7,25 (s, 1b)

IR (DCM) : (en cm^{-1}) 1666 / 1651 (amide I : $\nu(\text{C=O})$ du CONMe_2)

2-4 : Synthèses des amidoxy peptides réduits

2 mmol d'oxime peptide sont dissoutes dans 10 mL de MeOH. 20 mmol (1,26 g) de cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) sont ajoutées par portions sur 5 jours. Le mélange

est agité pendant 6 jours à température ambiante. Le pH est ajusté à 3 par addition d'acide acétique (AcOH) après chaque ajout de réducteur. L'indicateur coloré alors utilisé est l'orangé de méthyle. 20 mL d'une solution aqueuse concentrée en carbonate de potassium (K_2CO_3) sont introduits dans le mélange réactionnel. Le produit attendu est extrait par 3 fois 10 mL de DCM. La phase organique est lavée avec 5 mL d'eau saturée en NaCl et séchée sur $MgSO_4$. Les solvants sont évaporés sous vide. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice.

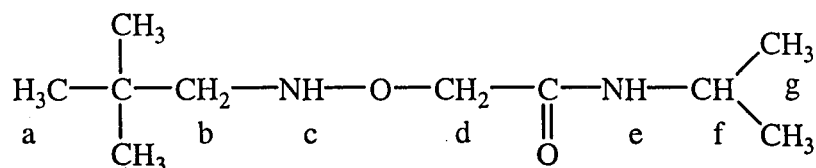
Pivψ[CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr

Rendement = 60 %

Masse molaire = 202 g/mol

Aspect = solide blanc

Rf (A, 50 %) = 0,58



RMN-¹H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ (en ppm) = 0,93 (s, 9a) ; 1,18 (d (J = 6,2 Hz), 6g) ; 2,77 (s, 2b) ; 4,12 (s, 2d) ; 4,13 (m, 1f) ; 5,79 (s, 1c) ; 6,24 (d, 1e)

IR (DCM) : (en cm^{-1}) 3417 (amide A : $\nu(N-H)$ du $\underline{NH^iPr}$) ; 1663 (amide I : $\nu(C=O)$ du $\underline{CONH^iPr}$) ; 1533 (amide II : $\nu(C-N)$ et $\delta(N-H)$)

3 : SYNTHESE DES DIPEPTIDES

3-1 : Synthèses des amidoxy peptides

a) couplage : méthode au TBTU

Mode opératoire : voir 1-4-a-β. Le groupement protecteur Boc des Boc-amidoxy mono-peptides est préalablement éliminé suivant le mode opératoire décrit au paragraphe 1-4-a.

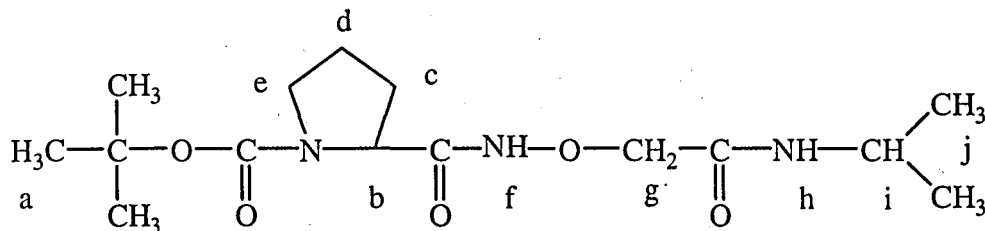
Boc-Proψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr

Rendement = 60 %

Masse molaire = 329 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (5 % EtOH / 95 % AcOEt) = 0,45



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,18 (d (J = 6,6 Hz), 6j) ; 1,45 (s, 9a) ; 1,95-2,34 (m, 2c + 2d) ; 3,38 (m, 2e) ; 4,11 (m, 1i) ; 4,16 (m, 1b) ; 4,26 (d (J = 16,2 Hz), 1g) ; 4,30 (d (J = 16,2 Hz), 1g) ; 8,11 (d, 1h) ; 10,35 (s, 1f)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3416 (amide A : ν(N-H) du NHⁱPr libre) ; 3355 (amide A : ν(N-H) du NHO libre) ; 3304 (amide A : ν(N-H) du NHⁱPr lié) ; 3225 (amide A : ν(N-H) du NHO lié) ; 1697 (amide I : ν(C=O) du CONHO) ; 1668 (amide I : ν(C=O) du Boc et du CONHⁱPr) ; 1556 (amide II : ν(C-N) et δ(N-H))

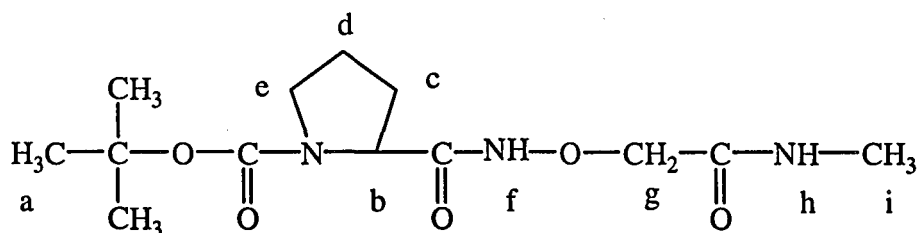
Boc-Proψ[CO-NH-O]Gly-NHMe

Rendement = 72 %

Masse molaire = 301 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (B, 15 %) = 0,47



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,47 (s, 9a) ; 1,93-2,37 (m, 2c + 2d) ; 2,84 (d (J = 4,9 Hz), 3i) ; 3,37 (m, 2e) ; 4,19 (m, 1b) ; 4,31 (d (J = 16,2 Hz), 1g) ; 4,37 (d (J = 16,2 Hz), 1g) ; 8,22 (d, 1h) ; 10,43 (s, 1f)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3441 (amide A : ν(N-H) du NHMe libre) ; 3355 (amide A : ν(N-H) du NHO libre) ; 3319 (amide A : ν(N-H) du NHMe lié) ; 3233 (amide A : ν(N-H) du NHO lié) ; 1695 (amide I : ν(C=O) du CONHO) ; 1676 (amide I : ν(C=O) du Boc et du CONHMe) ; 1566 (amide II : ν(C-N) et δ(N-H))

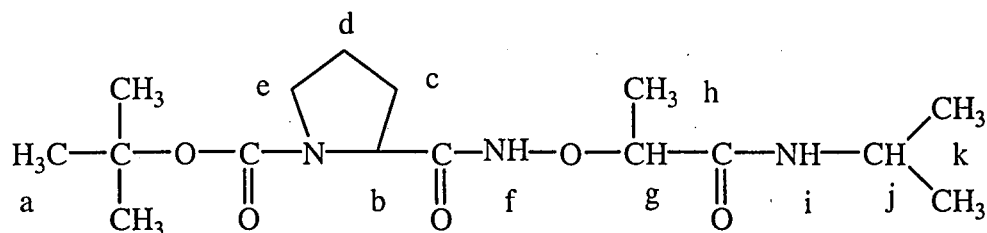
Boc-Proψ[CO-NH-O]Ala-NHⁱPr

Rendement = 69 %

Masse molaire = 343 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (B, 12 %) = 0,61



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,14 (d (J = 6,8 Hz), 3k) ; 1,17 (d (J = 7,1 Hz), 3k) ; 1,44 (d, 3h) ; 1,47 (s, 9a) ; 1,89-2,43 (m, 2c + 2d) ; 3,35 (m, 2e) ; 4,05 (m, 1j) ; 4,24 (m, 1b + 1g) ; 7,70 (d, 1i) ; 10,03 (s, 1f)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3417 (amide A : ν (N-H) du NHⁱPr libre) ; 3350 (amide A : ν (N-H) du NHO libre) ; 3313 (amide A : ν (N-H) du NHⁱPr lié) ; 3240 (amide A : ν (N-H) du NHO lié) ; 1694 (amide I : ν (C=O) du CONHO) ; 1667 (amide I : ν (C=O) du Boc et du CONHⁱPr) ; 1547 (amide II : ν (C-N) et δ (N-H))

b) Pivaloylation de la fonction amine N-terminale :

Mode opératoire : voir 1-3. Le groupement protecteur Boc des Boc-amidoxy dipeptides est préalablement éliminé suivant le mode opératoire décrit au paragraphe 1-4-a.

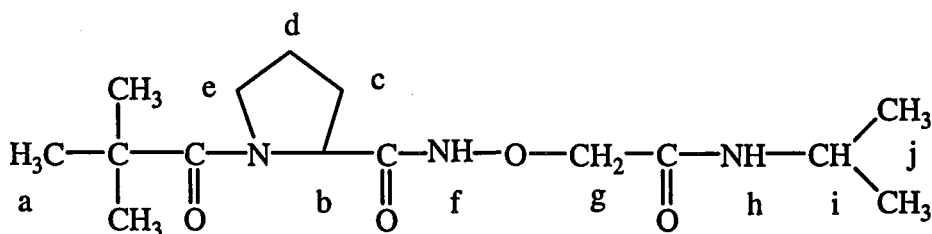
Piv-Proψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr

Rendement = 61 %

Masse molaire = 313 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (5 % EtOH / 95 % AcOEt) = 0,40



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,16 (d (J = 6,5 Hz), 3j) ; 1,19 (d (J = 6,4 Hz), 3j) ; 1,26 (s, 9a) ; 1,90-2,24 (m, 2c + 2d) ; 3,70 (m, 2e) ; 4,11 (m, 1i) ; 4,25 (d (J = 16,1 Hz), 1g) ; 4,31 (d (J = 16,1 Hz), 1g) ; 4,46 (m, 1b) ; 7,97 (d, 1h) ; 10,12 (s, 1f)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3415 (amide A : ν (N-H) du NHⁱPr libre) ; 3304 (amide A : ν (N-H) du NHO libre et du NHⁱPr lié) ; 3215 (amide A : ν (N-H) du NHO lié) ; 1696 (amide I : ν (C=O))

du CONHO) ; 1668 (amide I : $\nu(\text{C}=\text{O})$ du CONHⁱPr) ; 1600 (amide I : $\nu(\text{C}=\text{O})$ du Piv) ; 1559 (amide II : $\nu(\text{C}-\text{N})$ et $\delta(\text{N}-\text{H})$)

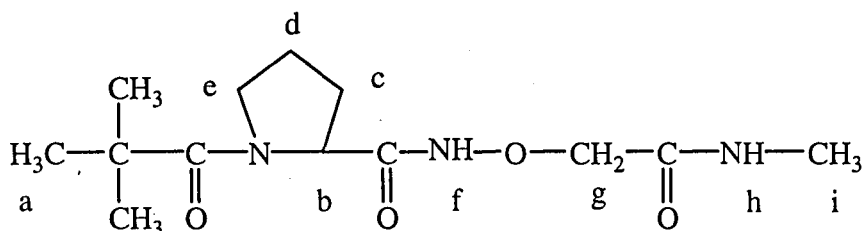
Piv-Proψ[CO-NH-O]Gly-NHMe

Rendement = 57 %

Masse molaire = 285 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (B, 20 %) = 0,47



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,27 (s, 9a) ; 1,92-2,23 (m, 2c + 2d) ; 2,84 (d (J = 4,8 Hz), 3i) ; 3,71 (m, 2e) ; 4,29 (d (J = 16,0 Hz), 1g) ; 4,37 (d (J = 16,0 Hz), 1g) ; 4,46 (m, 1b) ; 8,12 (d, 1h) ; 10,33 (s, 1f)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3440 (amide A : $\nu(\text{N}-\text{H})$ du NHMe libre) ; 3322 (amide A : $\nu(\text{N}-\text{H})$ du NHO libre et du NHMe lié) ; 3225 (amide A : $\nu(\text{N}-\text{H})$ du NHO lié) ; 1694 (amide I : $\nu(\text{C}=\text{O})$ du CONHO) ; 1677 (amide I : $\nu(\text{C}=\text{O})$ du CONHMe) ; 1602 (amide I : $\nu(\text{C}=\text{O})$ du Piv) ; 1566 (amide II : $\nu(\text{C}-\text{N})$ et $\delta(\text{N}-\text{H})$)

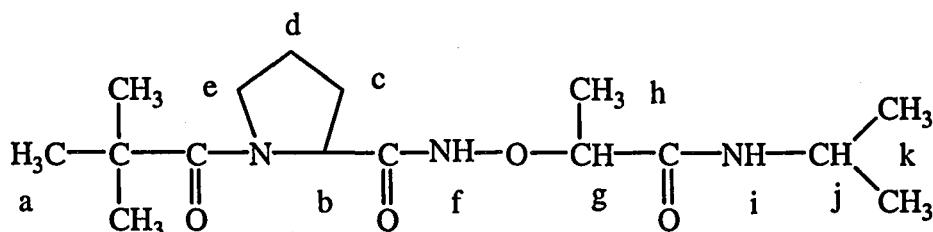
Piv-Proψ[CO-NH-O]Ala-NHⁱPr

Rendement = 66 %

Masse molaire = 327 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (B, 20 %) = 0,67



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,14 (d (J = 6,5 Hz), 3k) ; 1,16 (d (J = 6,6 Hz), 3k) ; 1,26 (s, 9a) ; 1,45 (d (J = 6,9 Hz), 3h) ; 1,90-2,33 (m, 2c + 2d) ; 3,68 (m, 2e) ; 4,04 (m, 1j) ; 4,24 (q, 1g) ; 4,53 (m, 1b) ; 7,59 (d, 1i) ; 9,89 (s, 1f)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3416 (amide A : $\nu(\text{N}-\text{H})$ du NHⁱPr libre) ; 3315 (amide A : $\nu(\text{N}-\text{H})$ du NHO libre et du NHⁱPr lié) ; 3226 (amide A : $\nu(\text{N}-\text{H})$ du NHO lié) ; 1689 (amide I : $\nu(\text{C}=\text{O})$)

du CONHO) ; 1667 (amide I : $\nu(\text{C}=\text{O})$ du CONHⁱPr) ; 1601 (amide I : $\nu(\text{C}=\text{O})$ du Piv) ; 1547-1524 (amide II : $\nu(\text{C}-\text{N})$ et $\delta(\text{N}-\text{H})$)

3-2 : Synthèses des oxime peptides

a) couplage entre un α -amino aldéhyde et un aminoxy peptide

Mode opératoire : voir 2-3. Le groupement protecteur Boc des Boc-amidoxo mono-peptides est préalablement éliminé suivant le mode opératoire décrit au paragraphe 1-4-a.

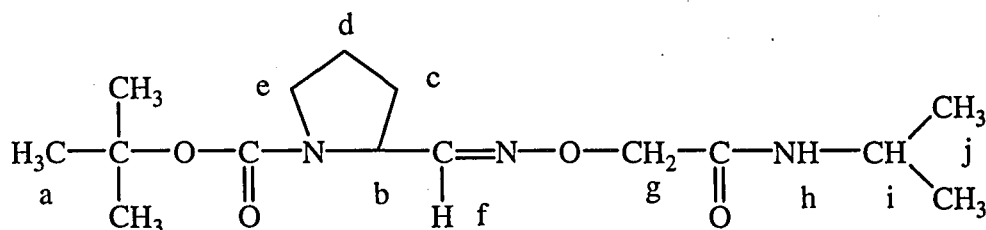
Boc-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr

Rendement = 82 %

Masse molaire = 313 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (A, 70 %) = 0,53



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,10 (d (J = 6,6 Hz), 6j) ; 1,38 (s, 9a) ; 1,81-1,95 (m, 2c + 2d) ; 3,32 (m, 2e) ; 4,06 (m, 1i) ; 4,31 (m, 1b) ; 4,39 (s, 2g) ; 6,03 (d, 1h) ; 7,40 (d (J = 10,1 Hz), 1f)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3422 (amide A : $\nu(\text{N}-\text{H})$ du NHⁱPr) ; 1687 (amide I : $\nu(\text{C}=\text{O})$ du Boc) ; 1676 (amide I : $\nu(\text{C}=\text{O})$ du CONHⁱPr) ; 1528 (amide II : $\nu(\text{C}-\text{N})$ et $\delta(\text{N}-\text{H})$)

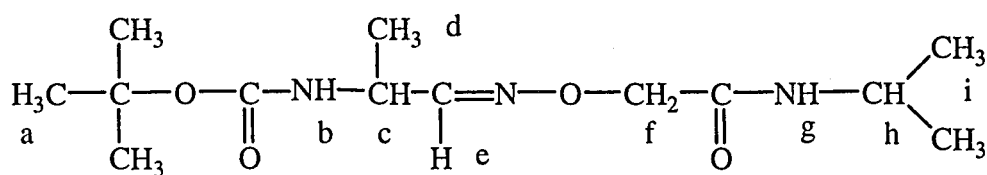
Boc-Alaψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr

Rendement = 35 %

Masse molaire = 287 g/mol

Aspect = solide blanc

Rf (A, 70 %) = 0,55



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = (Z/E = 1/2) 1,19 (d (J = 6,8 Hz), 6i) ; 1,24 (d (J = 6,6 Hz), 3dZ) ; 1,31 (d (J = 6,9 Hz), 3dE) ; 1,45 (s, 9a) ; 4,17 (m, 1h) ; 4,35 (m, 1cE) ; 4,48 (s, 2fE) ; 4,52 (d (J = 15,9 Hz), 1fZ) ; 4,63 (d (J = 15,9 Hz), 1fZ) ; 4,68 (d, 1bZ) ; 4,86 (d (J = 7,2 Hz), 1bE) ; 4,95 (m, 1cZ) ; 6,02 (d, 1gE) ; 6,54 (d (J = 7,4 Hz), 1eZ) ; 6,98 (d, 1gZ) ; 7,52 (d (J = 4,1 Hz), 1eE)

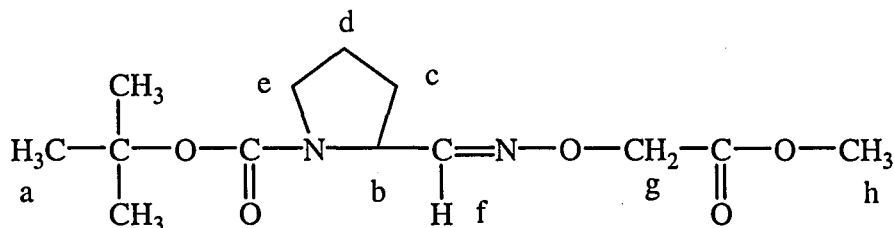
Boc-Proψ[CH=N-O]Gly-OMe

Rendement = 53 % (rendement global à partir de ½HCl.NH₂-O-CH₂-COOH)

Masse molaire = 286 g/mol

Aspect = huile incolore

R_f (A, 70 %) = 0,77



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,44 (s, 9a) ; 1,86-2,03 (m, 2c + 2d) ; 3,40 (m, 2e) ; 3,76 (s, 3h) ; 4,33 (m, 1b) ; 4,58 (s, 2g) ; 7,42 (d, 1f)

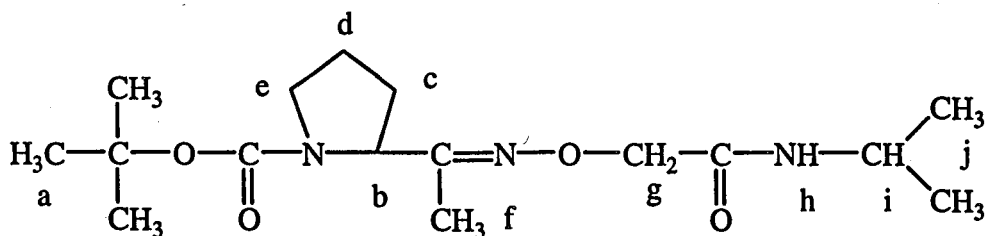
Boc-Proψ[C(Me)=N-O]Gly-NHⁱPr

Rendement = 32 %

Masse molaire = 327 g/mol

Aspect = huile incolore

R_f (A, 70 %) = 0,44



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,17 (d (J = 6,5 Hz), 6j) ; 1,42 (s, 9a) ; 1,81-2,06 (m, 2c + 2d) ; 1,81 (s, 3f) ; 3,38-3,55 (m, 2e) ; 4,15 (m, 1i) ; 4,29 (m, 1b) ; 4,46 (s, 2g) ; 6,00 / 6,15 (d, 1h) (isomérisie cis/trans de la liaison Boc-Pro)

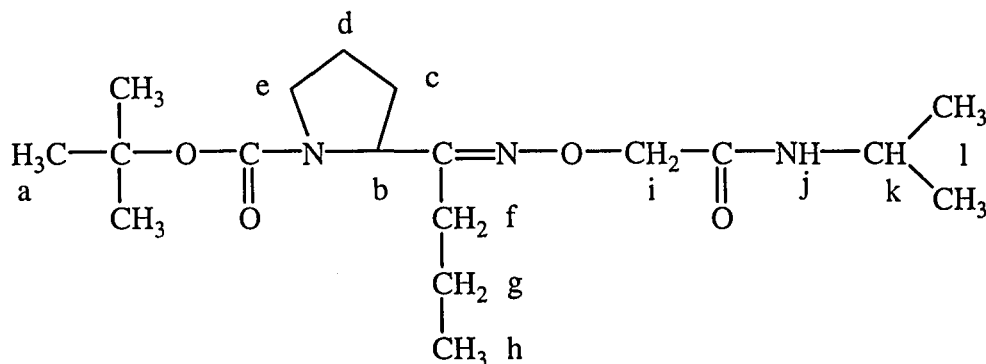
Boc-Proψ[C(Pr)=N-O]Gly-NHⁱPr

Rendement = 43 %

Masse molaire = 355 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (A, 70 %) = 0,71



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,00 (t (J = 7,3 Hz), 3h) ; 1,17 (d (J = 6,5 Hz), 6l) ; 1,44 (s, 9a) ; 1,58-2,30 (m, 2c + 2d + 2f + 2g) ; 3,41 (m, 2e) ; 4,14 (m, 1k) ; 4,37 (m, 1b) ; 4,45 (s, 2i) ; 6,01 / 6,13 (d, 1j) (isomérisation cis/trans de la liaison Boc-Pro)

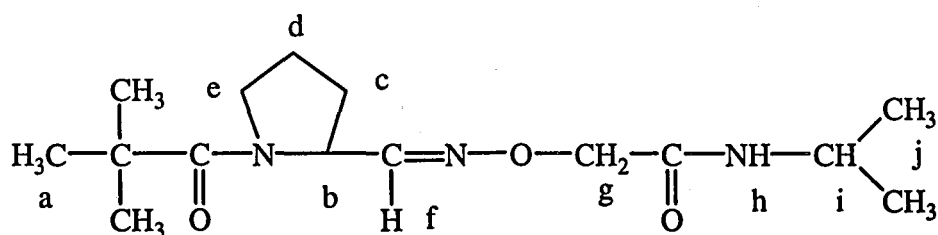
Piv-Proψ[CH=N-O]Gly-NHⁱPr

Rendement = 77 %

Masse molaire = 297 g/mol

Aspect = solide blanc

Rf (B, 10 %) = 0,67



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = (isomère E) 1,17 (d (J = 6,6 Hz), 3j) ; 1,18 (d (J = 6,6 Hz), 3j) ; 1,26 (s, 9a) ; 1,98 (m, 2c + 2d) ; 3,68 (m, 2e) ; 4,14 (m, 1i) ; 4,45 (s, 2g) ; 4,73 (m, 1b) ; 6,06 (d, 1h) ; 7,56 (d (J = 4,5 Hz), 1f)

(isomère Z) 1,17 (d (J = 6,6 Hz), 3j) ; 1,18 (d (J = 6,6 Hz), 3j) ; 1,28 (s, 9a) ; 1,98-2,11 (m, 2c + 2d) ; 3,77 (m, 2e) ; 4,27 (m, 1i) ; 4,61 (d (J = 16,8 Hz), 1g) ; 4,72 (d (J = 16,8 Hz), 1g) ; 5,28 (m, 1b) ; 6,45 (d (J = 7,9 Hz), 1f) ; 7,53 (d, 1h)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3420 (amide A : ν(N-H) du NHⁱPr libre (E)) ; 3342 (amide A : ν(N-H) du NHⁱPr lié (Z)) ; 1666 (amide I : ν(C=O) du CONHⁱPr) ; 1618 (amide I : ν(C=O) du Piv) ; 1529 (amide II : ν(C-N) et δ(N-H))

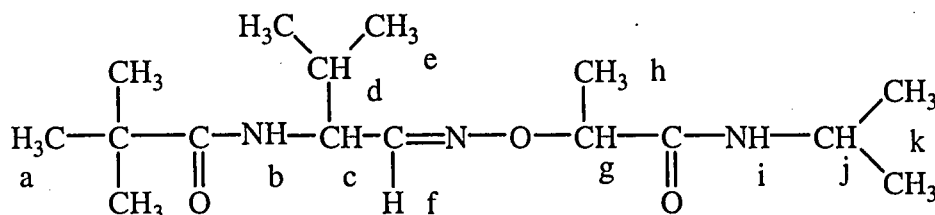
Piv-Valψ[CH=N-O]Ala-NH^tPr

Rendement = 35 %

Masse molaire = 313 g/mol

Aspect = solide blanc

R_f (A, 70 %) = 0,62



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = (Z/E = 1/2) 0,91 (d (J = 6,7 Hz), 3e) ; 0,98 (d (J = 6,8 Hz), 3e) ; 1,16 (m, 6k) ; 1,20 (s, 9a) ; 1,42 (d (J = 7,2 Hz), 3hE) ; 1,48 (d (J = 6,6 Hz), 3hZ) ; 1,90 (m, 1dZ) ; 2,09 (m, 1dE) ; 4,11 (m, 1j) ; 4,56 (m, 1cE) ; 4,64 (q, 1g) ; 4,89 (m, 1cZ) ; 5,77 (d (J = 7,7 Hz), 1bZ) ; 5,89 (d (J = 7,9 Hz), 1iE) ; 6,12 (d (J = 7,6 Hz), 1bE) ; 6,65 (d (J = 6,6 Hz), 1fZ) ; 6,83 (d, 1iZ) ; 7,54 (d (J = 3,7 Hz), 1fE)

b) Pivaloylation de la fonction amine N-terminale :

Mode opératoire : voir 1-3. Le groupement protecteur Boc des Boc-amidoxy dipeptides est préalablement éliminé suivant le mode opératoire décrit au paragraphe 1-4-a.

Piv-Proψ[CH=N-O]Gly-NH^tPr

Rendement = 67 %

Voir 3-2-a.

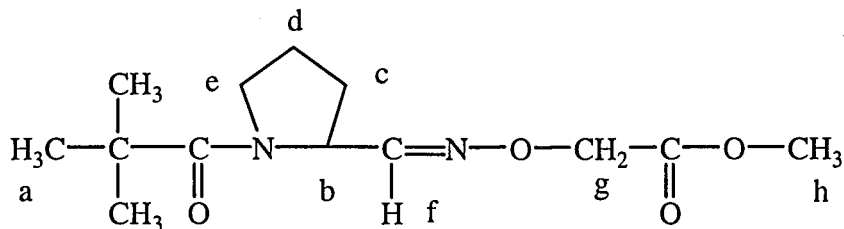
Piv-Proψ[CH=N-O]Gly-OMe

Rendement = 81 %

Masse molaire = 270 g/mol

Aspect = huile jaunâtre

R_f (A, 70 %) = 0,63



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = (isomère E) 1,26 (s, 9a) ; 1,96-2,20 (m, 2c + 2d) ; 3,65 (m, 2e) ; 3,75 (s, 3h) ; 4,56 (s, 2g) ; 4,79 (m, 1b) ; 7,42 (d (J = 4,6 Hz), 1f)

(isomère Z) 1,26 (s, 9a) ; 1,96-2,20 (m, 2c + 2d) ; 3,65 (m, 2e) ; 3,75 (s, 3h) ; 4,56 (s, 2g) ; 5,06 (m, 1b) ; 6,65 (d (J = 5,5 Hz), 1f)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 1759 / 1740 (ν(C=O) du COOMe) ; 1617 (amide I : ν(C=O) du Piv)

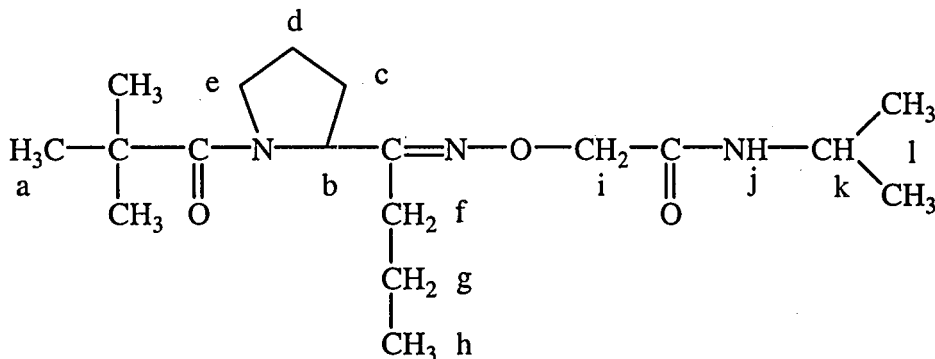
Piv-Proψ[C(Pr)=N-O]Gly-NH^tPr

Rendement = 68 %

Masse molaire = 339 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (A, 70 %) = 0,49



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = (isomère E) 1,00 (t (J = 7,3 Hz), 3h) ; 1,16 (d (J = 6,5 Hz), 3l) ; 1,17 (d (J = 6,6 Hz), 3l) ; 1,22 (s, 9a) ; 1,63-2,45 (m, 2c + 2d + 2f + 2g) ; 3,67 (m, 2e) ; 4,09 (m, 1k) ; 4,40 (s, 2i) ; 4,66 (m, 1b) ; 6,02 (d, 1j)

(isomère Z) 0,89 (t (J = 7,3 Hz), 3h) ; 1,21 (d (J = 6,5 Hz), 6l) ; 1,27 (s, 9a) ; 1,54-2,10 (m, 2c + 2d + 2f + 2g) ; 3,53 / 3,93 (m, 2e) ; 4,27 (m, 1k) ; 4,55 (d (J = 16,6 Hz), 1i) ; 4,66 (d (J = 16,6 Hz), 1i) ; 5,44 (m, 1b) ; 7,74 (d, 1j)

3-3 : Synthèses des amidoxy peptides réduits

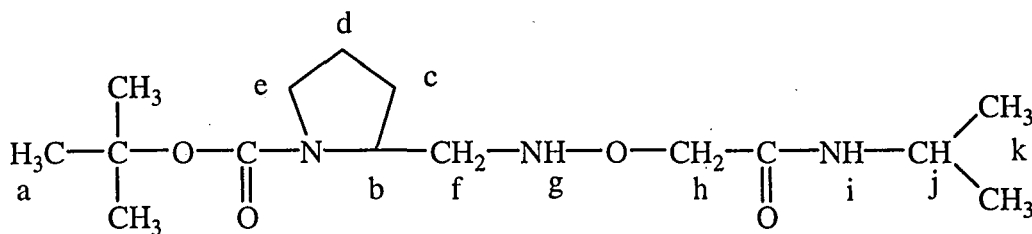
Mode opératoire : voir 2-4.

Boc-Proψ[CH₂-NH-O]Gly-NH^tPr

Rendement = 18 % (24 heures de réaction, 2/3 équivalent (éq) de NaBH₃CN)

Masse molaire = 315 g/mol

Aspect = huile incolore



RMN-¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) : δ (en ppm) = 1,20 (d ($J = 6,6$ Hz), 6k) ; 1,41 (s, 9a) ; 1,79 (m, 2c + 2d) ; 2,64 (m ($^2J_{ff} = 12,9$ Hz ; $^3J_{fb} = 8,8$ Hz ; $^3J_{fg} = 5,1$ Hz), 1f) ; 3,07 (m ($^2J_{ff} = 12,9$ Hz ; $^3J_{fb} = 3,3$ Hz ; $^3J_{fg} = 6,6$ Hz), 1f) ; 3,21 (m, 2e) ; 3,88 (m, 1b + 1j) ; 3,94 (s, 2h) ; 6,97 (t, 1g) ; 7,45 (d ($J = 7,5$ Hz), 1i)

IR (DCM) : (en cm^{-1}) 3416 (amide A : $\nu(\text{N-H})$ du NH^tPr) ; 1676 (amide I : $\nu(\text{C=O})$ du Boc et du CONH^tPr) ; 1526 (amide II : $\nu(\text{C-N})$ et $\delta(\text{N-H})$)

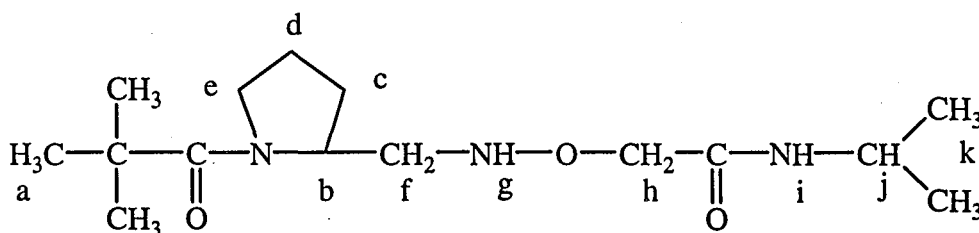
Piv-Prop[CH₂-NH-O]Gly-NH^tPr

Rendement = 22 % (24 heures de réaction, $\frac{2}{3}$ éq de NaBH₃CN)

Masse molaire = 299 g/mol

Aspect = solide blanc

R_f (B, 10 %) = 0,45



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,20 (d ($J = 6,6$ Hz), 6k) ; 1,26 (s, 9a) ; 1,92 (m, 2c + 2d) ; 2,87 (dd ($^2J_{ff} = 13,4$ Hz ; $^3J_{fb} = 6,0$ Hz), 1f) ; 3,16 (dd ($^2J_{ff} = 13,4$ Hz ; $^3J_{fb} = 4,8$ Hz), 1f) ; 3,56 / 3,67 (m, 2e) ; 4,17 (s, 2h + 1j) ; 4,43 (m, 1b) ; 6,90 (d, 1i)

IR (DCM) : (en cm^{-1}) 3416 (amide A : $\nu(\text{N-H})$ du NH^tPr) ; 1676 (amide I : $\nu(\text{C=O})$ du CONH^tPr) ; 1608 (amide I : $\nu(\text{C=O})$ du Piv) ; 1529 (amide II : $\nu(\text{C-N})$ et $\delta(\text{N-H})$)

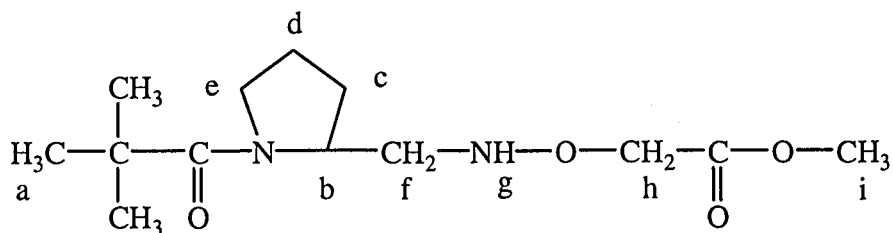
Piv-Prop[CH₂-NH-O]Gly-OMe

Rendement = 48 % (72 heures de réaction, 4 éq de NaBH₃CN)

Masse molaire = 272 g/mol

Aspect = huile incolore

R_f (A, 70 %) = 0,32



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,24 (s, 9a) ; 1,88 (m, 2c + 2d) ; 2,94 (dd (²J_{ff} = 12,8 Hz ; ³J_{fb} = 6,9 Hz), 1f) ; 3,20 (dd (²J_{ff} = 12,8 Hz ; ³J_{fb} = 4,1 Hz), 1f) ; 3,50 (m, 1e) ; 3,69 (m, 1e) ; 3,74 (s, 3i) ; 4,25 (s, 2h) ; 4,30 (m, 1b)

IR (DCM) : (en cm⁻¹) 3269 (ν(N-H) du NHO) ; 1753 / 1740 (amide I : ν(C=O) du COOMe) ; 1623 (amide I : ν(C=O) du Piv)

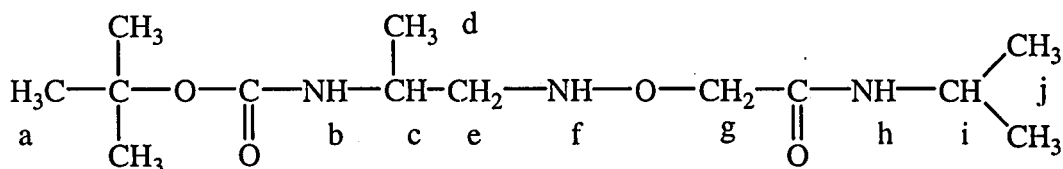
Boc-Ala^ψ[CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr

Rendement = 50 % (72 heures de réaction, 4 éq de NaBH₃CN)

Masse molaire = 289 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (A, 70 %) = 0,22



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,16 (m, 6j + 3d) ; 1,43 (s, 9a) ; 2,83 (dd (²J_{ee'} = 13,5 Hz ; ³J_{ec} = 7,6 Hz), 1e) ; 3,00 (dd (²J_{ee'} = 13,5 Hz ; ³J_{ec} = 4,5 Hz), 1e) ; 3,94 (m, 1c) ; 4,09 (m, 1i) ; 4,14 (s, 2g) ; 4,59 (d (J = 8,0 Hz), 1b) ; 6,47 (d, 1h)

3-4 : Synthèses des intermédiaires pour la synthèse des hexapeptides

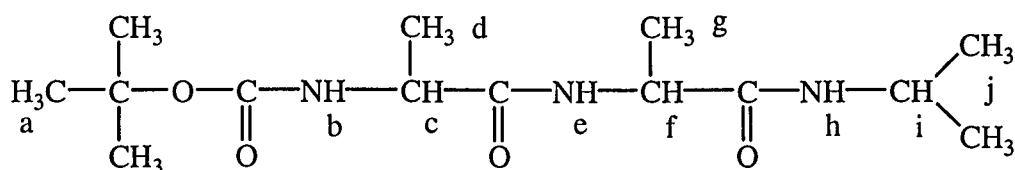
Mode opératoire : couplage par la méthode au TBTU (voir 1-4-a-β). Le groupement protecteur Boc des Boc-amidoxy mono-peptides est préalablement éliminé suivant le mode opératoire décrit au paragraphe 1-4-a.

Boc-Ala-Ala-NHⁱPr

Rendement = 79 % (purification par lavages)

Masse molaire = 301 g/mol

Aspect = solide blanc



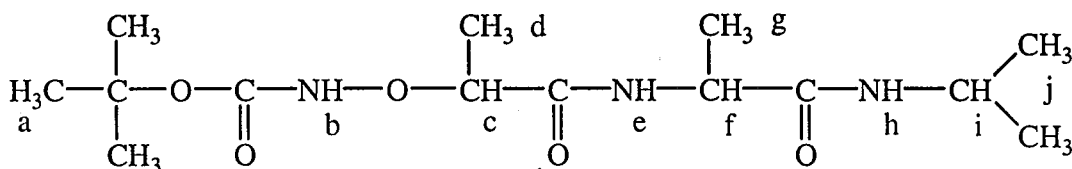
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,13 (d (J = 6,5 Hz), 3j) ; 1,15 (d (J = 6,5 Hz), 3j) ; 1,36 (d (J = 7,1 Hz), 3g + 3d) ; 1,45 (s, 9a) ; 4,04 (m, 1i) ; 4,13 (m, 1c) ; 4,40 (m, 1f) ; 5,03 (d (J = 5,6 Hz), 1b) ; 6,31 (d, 1h) ; 6,72 (d (J = 7,2 Hz), 1e)

Bocψ[CO-NH-O]Ala-Ala-NHⁱPr

Rendement = 58 % (recristallisation dans l'AcOEt)

Masse molaire = 317 g/mol

Aspect = solide blanc



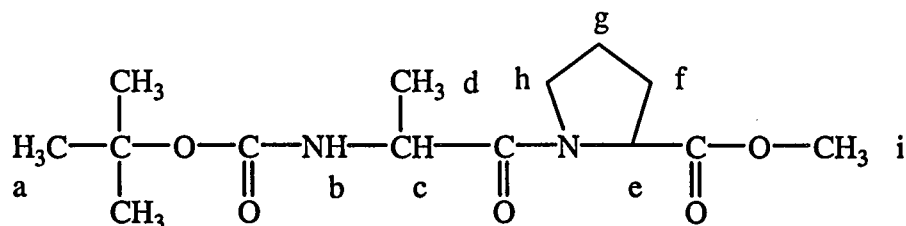
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,13 (d (J = 6,6 Hz), 3j) ; 1,14 (d (J = 6,5 Hz), 3j) ; 1,41 (d (J = 8,9 Hz), 3g) ; 1,46 (d (J = 8,7 Hz), 3d) ; 1,49 (s, 9a) ; 4,04 (m, 1i) ; 4,33 (q, 1c) ; 4,42 (m, 1f) ; 6,23 (d, 1h) ; 7,63 (s, 1b) ; 7,81 (d (J = 7,7 Hz), 1e)

Boc-Ala-Pro-OMe

Rendement = 54 % (chromatographie sur gel de silice avec l'AcOEt pur comme éluant)

Masse molaire = 300 g/mol

Aspect = huile incolore



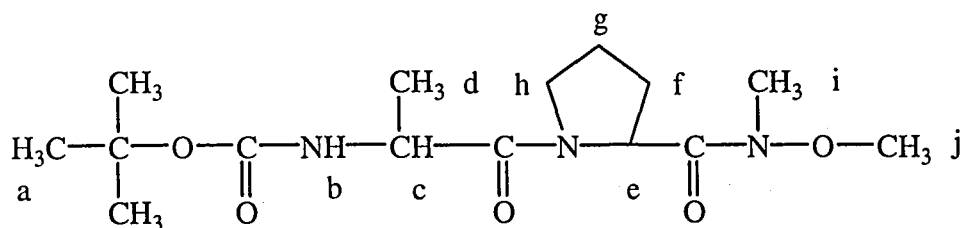
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,18 (d (J = 6,9 Hz), 3d) ; 1,43 (s, 9a) ; 2,01-2,22 (m, 2f + 2g) ; 3,63 (m, 2h) ; 3,73 (s, 3i) ; 4,47 (m, 1c) ; 4,53 (m, 1e) ; 5,34 (d, 1b)

Boc-Ala-Pro-N(Me)-OMe

Rendement = 35 % (purification par lavages)

Masse molaire = 329 g/mol

Aspect = huile incolore



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,31 (d (J = 6,9 Hz), 3d) ; 1,37 (s, 9a) ; 1,85-2,14 (m, 2f + 2g) ; 3,15 (s, 3i) ; 3,60 (m, 2h) ; 3,79 (s, 3j) ; 4,45 (m, 1c) ; 4,87 (m, 1e) ; 5,30 (d, 1b)

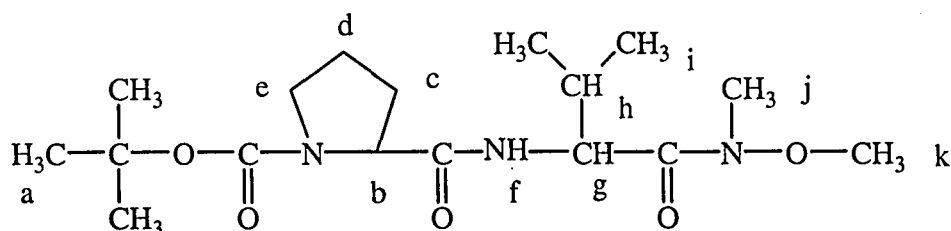
Boc-Pro-Val-N(Me)-OMe

Rendement = 78 %

Masse molaire = 329 g/mol

Aspect = huile incolore

Rf (A, 70 %) = 0,48



RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 0,91 (d (J = 6,7 Hz), 3i) ; 0,93 (d (J = 6,7 Hz), 3i) ; 1,46 (s, 9a) ; 1,92-2,15 (m, 2c + 2d + 1h) ; 3,20 (s, 3j) ; 3,45 (m, 2e) ; 3,78 (s, 3k) ; 4,27 (m, 1b) ; 4,88 (m, 1g) ; 6,60 (d, 1f)

4 : SYNTHÈSES DES HEXAPSEUDOPEPTIDES

4-1 : Synthèses des intermédiaires

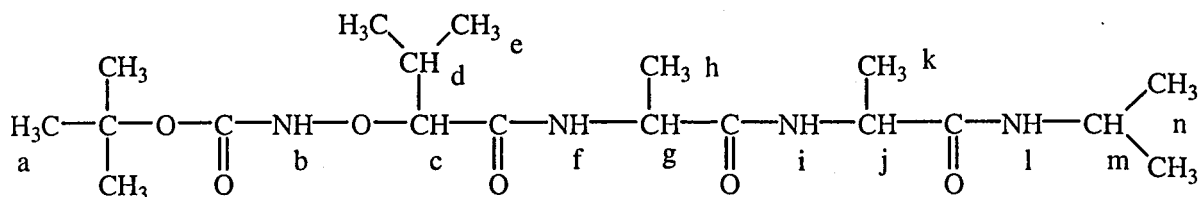
Mode opératoire : couplage par la méthode au TBTU (voir 1-4-a-β). Le groupement protecteur Boc des Boc-amidoxy peptides est préalablement éliminé suivant le mode opératoire décrit au paragraphe 1-4-a.

Bocψ[CO-NH-O]Val-Ala-Ala-NH^tPr

Rendement = 65 % (purification par lavages)

Masse molaire = 416 g/mol

Aspect = solide blanc



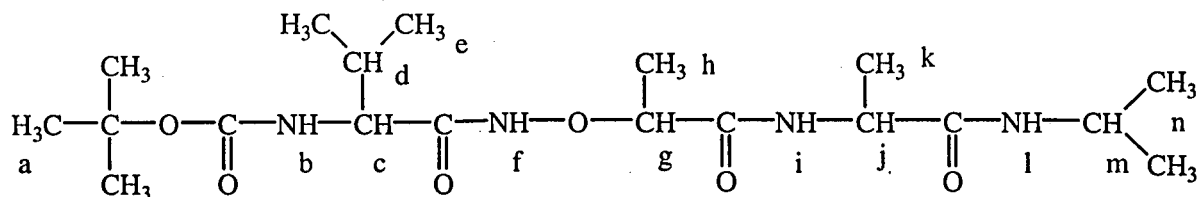
RMN-¹H (DMSO-*d*₆) : δ (en ppm) = 0,90 (d (J = 6,6 Hz), 3e) ; 0,92 (d (J = 6,7 Hz), 3e) ; 1,01 (d (J = 6,5 Hz), 3n) ; 1,02 (d (J = 6,6 Hz), 3n) ; 1,17 (d (J = 7,0 Hz), 3k) ; 1,19 (d (J = 7,9 Hz), 3h) ; 1,40 (s, 9a) ; 1,96 (m, 1d) ; 3,79 (m, 1m) ; 3,82 (d, 1c) ; 4,18 (m, 1j) ; 4,27 (m, 1g) ; 7,62 (d (J = 7,7 Hz), 1l) ; 7,80 (d (J = 7,6), 1i) ; 8,11 (d (J = 7,0 Hz), 1f) ; 10,06 (s, 1b)

Boc-Valy[CO-NH-O]Ala-Ala-NHⁱPr

Rendement = 82 % (précipitation dans l'eau)

Masse molaire = 416 g/mol

Aspect = solide blanc



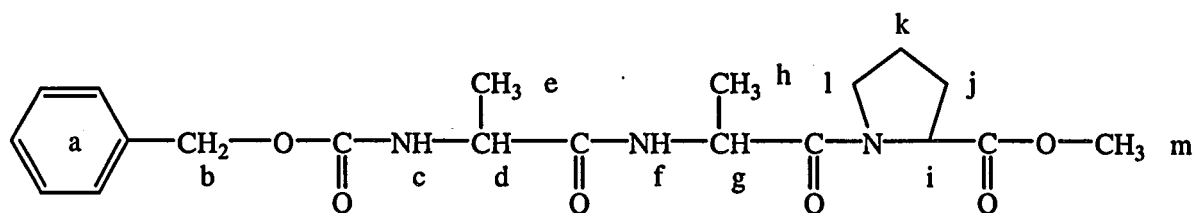
RMN-¹H (DMSO-*d*₆) : δ (en ppm) = 0,80 (d (J = 6,6 Hz), 3e) ; 0,83 (d (J = 6,5 Hz), 3e) ; 1,03 (d (J = 6,5 Hz), 3n) ; 1,05 (d (J = 6,5 Hz), 3n) ; 1,19 (d (J = 7,0 Hz), 3k) ; 1,27 (d (J = 8,0 Hz), 3h) ; 1,37 (s, 9a) ; 1,84 (m, 1d) ; 3,59 (m, 1c) ; 3,81 (d, 1m) ; 4,19 (m, 1j) ; 4,31 (m, 1g) ; 6,81 (d (J = 8,7 Hz), 1b) ; 7,73 (d (J = 7,4), 1l) ; 8,17 (d (J = 7,2 Hz), 1i) ; 11,26 (s, 1f)

Z-Ala-Ala-Pro-OMe

Rendement = 66 % (recristallisation dans un mélange AcOEt/EtOH)

Masse molaire = 405 g/mol

Aspect = solide blanc



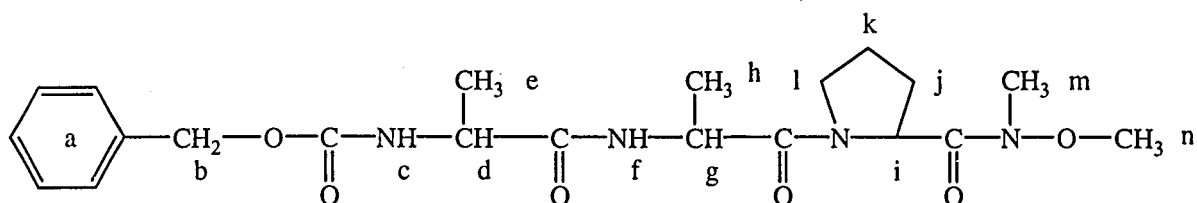
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,37 (d (J = 6,6 Hz), 3e + 3h) ; 2,02-2,24 (m, 2j + 2k) ; 3,66 (m, 2l) ; 3,74 (s, 3m) ; 4,23 (m, 1d) ; 4,51 (m, 1i) ; 4,70 (m, 1g) ; 5,11 (s, 2b) ; 5,33 (d (J = 6,4 Hz), 1c) ; 6,83 (d (J = 7,0 Hz), 1f) ; 7,35 (m, 5a)

Z-Ala-Ala-Pro-N(Me)-OMe

Rendement = 42 % (recristallisation dans un mélange AcOEt/EP)

Masse molaire = 434 g/mol

Aspect = solide blanc



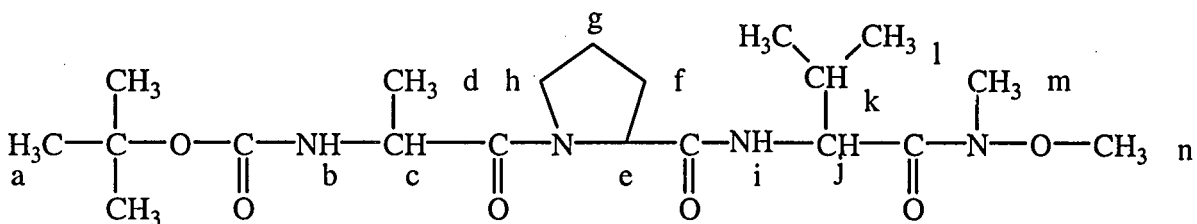
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 1,37 (d, 3e + 3h) ; 1,98-2,22 (m, 2j + 2k) ; 3,20 (s, 3m) ; 3,67 (m, 2l) ; 3,80 (s, 3n) ; 4,23 (m, 1d) ; 4,71 (m, 1g) ; 4,91 (m, 1i) ; 5,10 (s, 2b) ; 5,43 (d (J = 7,1 Hz), 1c) ; 6,88 (d (J = 7,6 Hz), 1f) ; 7,34 (m, 5a)

Boc-Ala-Pro-Val-N(Me)-OMe

Rendement = 79 % (purification par lavages)

Masse molaire = 428 g/mol

Aspect = huile incolore



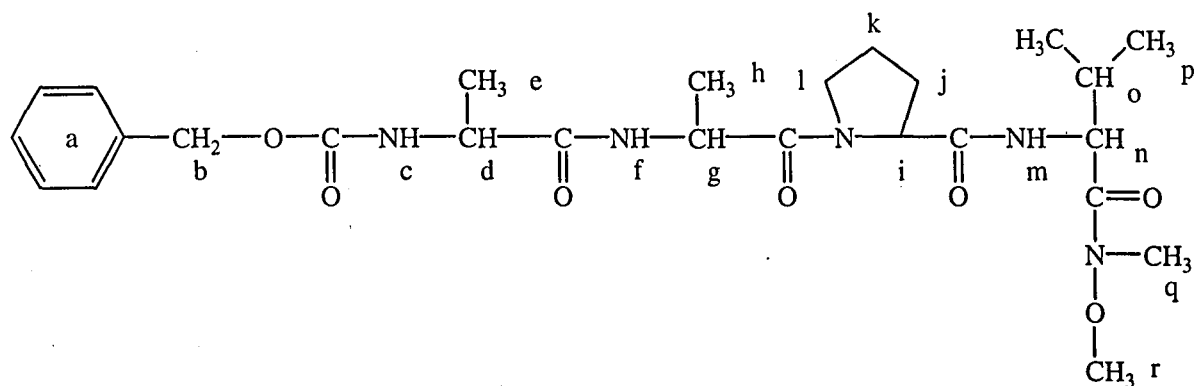
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 0,86 (d (J = 6,6 Hz), 3l) ; 0,90 (d (J = 6,4 Hz), 3l) ; 1,33 (d (J = 6,9 Hz), 3d) ; 1,41 (s, 9a) ; 1,99-2,25 (m, 2f + 2g + 1k) ; 3,18 (s, 3m) ; 3,59 (m, 2h) ; 3,75 (s, 3n) ; 4,47 (m, 1c) ; 4,60 (m, 1e) ; 4,81 (m, 1j) ; 6,60 (d (J = 8,0 Hz), 1b) ; 7,09 (d (J = 9,0 Hz), 1i)

Z-Ala-Ala-Pro-Val-N(Me)-OMe

Rendement = 67 % (recristallisation dans l'AcOEt)

Masse molaire = 533 g/mol

Aspect = solide blanc



RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃) : δ (en ppm) = 0,89 (d (J = 6,9 Hz), 3p) ; 0,93 (d (J = 6,6 Hz), 3p) ; 1,35 / 1,37 (d, 3e + 3h) ; 2,02 / 2,16 / 2,24 (m, 2j + 2k + 1o) ; 3,22 (s, 3q) ; 3,62 (m, 1l) ; 3,68 (m, 1l) ; 3,77 (s, 3r) ; 4,39 (m, 1d) ; 4,66 / 4,78 / 4,88 (m, 1i + 1g + 1n) ; 5,14 (m, 2b) (signal AB) ; 5,47 (d, 1c) ; 7,19 / 7,33 (d, 1f + 1m) ; 7,37 (m, 5a)

4-2 : Synthèses des amidoxy peptides

Mode opératoire : couplage par la méthode au TBTU (voir 1-4-a-β). Le groupement protecteur Boc des Boc-amidoxy peptides est préalablement éliminé suivant le mode opératoire décrit au paragraphe 1-4-a.

Z-Ala-Ala-Pro-Valψ[CO-NH-O]Ala-Ala-NHⁱPr [7]

Le solvant utilisé pour le couplage de Z-Ala-Ala-Pro-OH avec H-Valψ[CO-NH-O]Ala-Ala-NHⁱPr est la DMF. Avec le TBTU, 1 éq de benzotriazole (HOBt) est ajouté. Le produit brut est précipité dans l'eau et lavé au DCM.

Rendement = 25 %

Masse molaire = 689,7 g/mol

Aspect = solide blanc

RMN-¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) :

	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H
Ala ¹	7,43	4,05	1,19		
Ala ²	8,01	4,49	1,19		
Pro ³		4,43	1,82 - 1,97		3,51 / 3,60
Val ⁴	7,87	3,93	1,86	0,80 / 0,84	
Ala ⁵	11,33	4,31	1,26		
Ala ⁶	8,17	4,20	1,17		
NH ⁱ Pr	7,76	3,80	1,03 / 1,05		

Ph (Z) : 7,31 - 7,36 ; CH₂ (Z) : 5,01

Z-Ala-Ala-Proψ[CO-NH-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr [8]

Le solvant utilisé pour le couplage de Z-Ala-Ala-Pro-OH avec H₂N-O-(L)-CH(ⁱPr)-CO-Ala-Ala-NHⁱPr est la DMF. Avec le TBTU, 1 éq de HOBt est ajouté.

Rendement = 35 %

Masse molaire = 689,7 g/mol

Aspect = solide blanc

Rf (B, 20 %) = 0,63

RMN-¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) :

	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H
Ala ¹	7,41	4,05	1,17		
Ala ²	8,01	4,48	1,17		
Pro ³		4,16	1,76 - 1,97		3,50 / 3,59
Val ⁴	11,16	3,91	1,96	0,91 / 0,94	
Ala ⁵	8,28	4,28	1,23		
Ala ⁶	7,83	4,18	1,17		
NH ⁱ Pr	7,63	3,78	1,02 / 1,03		

Ph (Z) : 7,31 - 7,36 ; CH₂ (Z) : 5,01

4-3 : Synthèses des oxime peptides

Mode opératoire : la *N,O*-diméthylhydroxamide est réduite en aldéhyde suivant le mode opératoire 1-5-a-γ. Le groupement protecteur Boc des Boc-amidoxy peptides est préalablement éliminé suivant le mode opératoire décrit au paragraphe 1-4-a. Les deux fragments sont couplés suivant le mode opératoire 2-3.

Z-Ala-Ala-Pro-Valψ[CH=N-O]Ala-Ala-NH^tPr [9]

Le produit parasite issu de l'attaque de LiAlH₄ sur le carbonyle de la liaison Ala-Pro lors de la réduction de *Z*-Ala-Ala-Pro-Val-N(Me)-OMe en aldéhyde est précipité dans MeOH et dans l'acétonitrile.

Le couplage s'effectue entre le peptide aldéhyde *Z*-Ala-Ala-Pro-Val-H et H₂N-O-(*L*)-CH(Me)-CO-Ala-NH^tPr.

Rendement = 12 %

Masse molaire = 673,7 g/mol

Aspect = solide blanc

Rf (B, 16 %) = 0,53

RMN-¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) : CH du lien oxime : 7,43

	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H
Ala ¹	7,43	4,05	1,18		
Ala ²	8,01	4,49	1,18		
Pro ³		4,33	1,80 - 1,99		3,51 / 3,60
Val ⁴	7,92	4,13	1,86	0,84 / 0,86	
Ala ⁵		4,51	1,27		
Ala ⁶	7,61	4,21	1,18		
NH ^t Pr	7,76	3,79	1,03 / 1,04		

Ph (Z) : 7,31 - 7,37 ; CH₂ (Z) : 5,01

Z-Ala-Ala-Proψ[CH=N-O]Val-Ala-Ala-NH^tPr [10]

Le couplage s'effectue entre le peptide aldéhyde *Z*-Ala-Ala-Pro-H et H₂N-O-(*L*)-CH(^tPr)-CO-Ala-Ala-NH^tPr.

Rendement = 22 %

Masse molaire = 673,7 g/mol

Aspect = solide blanc

Rf (B, 20 %) = 0,54

RMN-¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) : isomérisie cis/trans de la liaison Ala-Pro (c/t = 1/3)

CH du lien oxime : 7,493

	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H
Ala ¹	7,42	4,05	1,17		
Ala ²	7,98	4,44 (t) / 4,49 (c)	1,18		
Pro ³		4,57 (t) / 4,69 (c)	1,88 - 2,02		3,46 / 3,55
Val ⁴		4,09	2,00	0,88 / 0,89	
Ala ⁵	7,69	4,31	1,21		
Ala ⁶	7,88	4,17	1,16		
NH ⁱ Pr	7,66	3,79	1,02 / 1,04		

Ph (Z) : 7,31 - 7,36 ; CH₂ (Z) : 5,00

4-4 : Synthèses des amidoxy peptides réduits

Mode opératoire : voir 2-4.

Z-Ala-Ala-Pro-Valψ[CH₂-NH-O]Ala-Ala-NHⁱPr [11]

Rendement = 80 %

Masse molaire = 675,7 g/mol

Aspect = solide blanc

Rf (B, 16 %) = 0,34

RMN-¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) : CH₂ du lien réduit : 2,69 / 2,96

	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H
Ala ¹	7,43	4,05	1,19		
Ala ²	8,04	4,51	1,17		
Pro ³		4,28	1,84 - 1,98		3,54 / 3,59
Val ⁴	7,42	3,72	1,67	0,81 / 0,83	
Ala ⁵	6,46	4,00	1,14		
Ala ⁶	7,59	4,22	1,20		
NH ⁱ Pr	7,64	3,80	1,02 / 1,04		

Ph (Z) : 7,32 - 7,37 ; CH₂ (Z) : 5,01

Z-Ala-Ala-Proψ[CH₂-NH-O]Val-Ala-Ala-NH^tPr [12]

Rendement = 98 %

Masse molaire = 675,7 g/mol

Aspect = solide blanc

R_f (B, 20 %) = 0,35

RMN-¹H (DMSO-*d*₆, 600 MHz) : isomérisie cis/trans de la liaison Ala-Pro (c/t = 2/3)

CH₂ du lien réduit : 2,61 / 3,10 (t) ; 2,72 / 3,23 (c)

	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H
Ala ¹	7,38 (c) ; 7,44 (t)	4,05 (t) ; 4,10 (c)	1,18		
Ala ²	7,96 (t) ; 8,07 (c)	4,44 (t) ; 4,62 (c)	1,18		
Pro ³		4,13	1,75-1,88 (t) ; 1,75-1,97 (c)		3,28 (c) ; 3,44/3,49 (t)
Val ⁴	6,74 (t) ; 7,02 (c)	3,65 (t) ; 3,69 (c)	1,80 (c) ; 1,88 (t)	0,84/0,86 (c) ; 0,87/0,88 (t)	
Ala ⁵	7,84 (c) ; 7,85 (t)	4,31	1,23		
Ala ⁶	7,78 (t) ; 7,81 (c)	4,19	1,17		
NH ^t Pr	7,65 (t) ; 7,71 (c)	3,78	1,02 / 1,04		

Ph (Z) : 7,31 - 7,36 ; CH₂ (Z) : 5,01

5 : SYNTHESSES SUR SUPPORT SOLIDE

Les synthèses ont été effectuées sur un multi-synthétiseur semi-automatique PSP 4000 (184). La résine est expansée pendant 15 minutes dans le DCM. Trois protocoles peuvent alors être mis en œuvre correspondant à la stratégie Boc-résine PAM (1a), à la stratégie Boc-résine oxime (1b) et à la stratégie Fmoc (2).

La première étape du protocole **1b** est la fixation du premier résidu sur la résine. 200 µeq de résine sont agités pendant une nuit dans 5 mL de DCM en présence de 3 éq d'acide aminé Boc-protégé, de 3 éq de DCCI et de 6 éq de 2-(hydroxyimino)-2-cyanoacétate d'éthyle (EACNOx). La résine est filtrée et lavée successivement, pendant 30 secondes, 2 fois par 2 mL d'EtOH, 4 fois par 2 mL d'un mélange DCM/EtOH 1/1 (v/v) et 2 fois par 2 mL de DCM. La résine est ensuite traitée 30 minutes par un mélange de 0,94 mL d'anhydride acétique (Ac₂O), 0,31 mL de DIEA et 3,75 mL de DMF. La résine est filtrée et lavée successivement pendant 30 secondes par 3 fois 2 mL de DCM, par 3 fois 2 mL de MeOH et par 3 fois 2 mL de DMF.

Le premier acide aminé fixé sur la résine est déprotégé. Le groupement Boc est éliminé par 2 traitements au TFA pur de 1 et 3 minutes (**1a**) ou avec un mélange TFA/DCM 1/3 (v/v) de 1 et 25 minutes (**1b**). Le groupement Fmoc est éliminé par 3 traitements avec une solution à 25 % en volume de pipéridine dans la DMF pendant 2, 5 et 8 minutes (**2**). La résine est lavée successivement pendant 30 secondes par 3 fois 2 mL de DCM, par 3 fois 2 mL de MeOH et par 3 fois 2 mL de DMF (**1a** et **1b**) ou par 3 fois 2 mL de DMF, par 3 fois 2 mL de MeOH et par 3 fois 2 mL de DMF (**2**). Les tests de Kaiser, à l'acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique (TNBSA) ou au chloranil effectués doivent être positifs.

Test de Kaiser : Sont introduites successivement 2 gouttes d'une solution de 5 g de ninhydrine dans 100 mL d'EtOH, 2 gouttes d'une solution de 80 g de phénol dans 20 mL d'EtOH et 2 gouttes d'un mélange de 2 mL d'une solution aqueuse de cyanure de potassium (KCN) 1 mM et de 98 mL de pyridine. Le plus souvent, une coloration violette apparaît sur les billes de résine comportant des fonctions amine libres.

Test au TNBSA : Sont successivement introduites 2 gouttes d'EtOH, 2 gouttes de DIEA et 2 gouttes d'une solution commerciale de 1 % de TNBSA dans la DMF. Une coloration orange apparaît sur les billes de résine comportant des fonctions amine libres.

Test au chloranil : Sont successivement introduites 2 gouttes d'une solution saturée de chloranil dans le toluène et 2 gouttes d'acétaldéhyde (fonction amine primaire) ou d'acétone (fonction amine secondaire). Une coloration bleu-verte apparaît sur les billes de résine comportant des fonctions amine libres.

6 éq du deuxième acide aminé *N*-protégé, 6 éq de TBTU et 6 éq de HOBt sont dissous dans 4 mL de DMF. 2 mL de cette solution et 9 éq de DIEA sont introduits sur la résine. La

réaction se poursuit sous agitation pendant 10 minutes (**1a**) ou 20 minutes (**1b** et **2**). La résine est filtrée puis lavée 3 fois pendant 30 secondes par 2 mL de DMF. Les 2 mL restant de la solution précédemment préparée et 9 éq de DIEA sont, de nouveau introduits sur la résine. La réaction se poursuit sous agitation pendant 20 minutes (**1a**), 40 minutes (**2**) ou 1 heure (**1b**). La résine est lavée successivement pendant 30 secondes par 3 fois 2 mL de DMF, par 3 fois 2 mL de MeOH et par 3 fois 2 mL de DCM (**1a** et **1b**) ou par 3 fois 2 mL de DMF, par 3 fois 2 mL de MeOH et par 3 fois 2 mL de DMF (**2**). Les tests de Kaiser, au TNBSA ou au chloranil effectués doivent être négatifs. Si le couplage n'est pas total, une nouvelle procédure de couplage est mise en œuvre. Il faut noter que pour les couplages difficiles (présence d'une fonction aminoxy) le TBTU et le HOBt sont remplacés par l'hexafluorophosphate de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (HATU) et le 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) et la durée du couplage est étendue à une nuit. La biotine est dissoute dans un mélange DMF / DMSO 1/1 (v/v).

La synthèse du peptide se poursuit par une alternance de procédures de déprotection et de couplage. La synthèse terminée, si le peptide possède un groupement protecteur Boc ou Fmoc *N*-terminal, celui-ci est éliminé suivant les procédures classiques. La résine est lavée plusieurs fois au DCM et à Et₂O pour être ensuite séchée sous vide une nuit (**1a** et **2**).

Protocole 1a : Le peptide est clivé de la résine pendant 2 heures à 0°C dans un mélange diméthylsulfure (Me₂S)/HF 9/1 (v/v). Le mélange est évaporé sous vide. Le clivage se poursuit à 0°C pendant 2 heures avec un mélange HF/*para*-crésol 9/1 (v/v). Le mélange est évaporé sous vide. Du TFA pur est ajouté. La résine est filtrée. Le peptide précipite par ajout du Et₂O glacé dans le filtrat et il est centrifugé. Le mélange Et₂O/TFA surnageant est éliminé. Le peptide est repris 4 fois par Et₂O glacé, centrifugé pour éliminer le liquide surnageant.

Procédure 1b : La résine est agitée pendant une nuit dans 2 mL de DCM dans lesquels sont dissous 3 éq d'amine (isopropylamine ou H-Ala-NH^tPr). La résine est filtrée, lavée avec 80 mL de DCM. La phase organique est lavée 3 fois avec 15 mL d'une solution à 5% de KHSO₄ et 3 fois avec 15 mL d'eau saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄. Le DCM est évaporé sous vide.

Procédure 2 : Le peptide est clivé de la résine pendant 2 heures par un mélange de 10 mL de TFA, 0,750 g de phénol, 0,25 mL d'éthanedithiol, 0,50 mL de thioanisole et 0,5 mL d'eau. Ce mélange est initialement refroidi à 0°C mais le clivage se déroule à température ambiante. La résine est filtrée. Le peptide précipite par ajout d'Et₂O glacé dans le filtrat et il est centrifugé. Le mélange Et₂O/TFA surnageant est éliminé. Le peptide est repris 4 fois par du Et₂O glacé, centrifugé pour éliminer le liquide surnageant.

Les peptides sont purifiés par chromatographie liquide haute performance (HPLC). La colonne préparative utilisée est une Waters DELTA PAK C18 (15 µm, 300 Å, 19 x 300 mm). La pureté des peptides isolés est contrôlée par chromatographie analytique et spectroscopie de masse (MALDI-TOF). La colonne alors utilisée est une Merck LiChroCART RP-18 (5 µm, 300 Å, 4 x 250 mm). L'éluant est composé d'une solution A de 0,1 % en volume de TFA dans l'eau et d'une solution B de 0,08 % de TFA et de 20 % d'eau dans l'acétonitrile.

Z-Ala-Ala-Proψ[CO-NH-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr

Résine utilisée : résine oxime ou résine de Kaiser

Procédure : 1b

Temps de rétention : (colonne analytique ; gradient : de 12 % B à 75 % B en 15 minutes ; débit : 1 mL/min) 11,89 min

H-A¹⁹⁶-E-S-D-I-F-S-I-R-E-V-S-F-Q-S-T-G-E²¹³-OH

Résine utilisée : PAM résine

Procédure : 1a

Temps de rétention : (colonne analytique ; gradient : de 12 % B à 75 % B en 15 minutes ; débit : 1 mL/min) 12,5 min

Masse molaire : 2002,10 (calculée) ; 2002,41 (mesurée)

H-G¹⁹¹-Q-E-D-E-A-E-S-D-I-F-S-I-R-E-V-S-F-Q-S-T-G-E-S-E²¹⁵-OH

Résine utilisée : PAM résine

Procédure : 1a

Temps de rétention : (colonne analytique ; gradient : de 12 % B à 75 % B en 15 minutes ; débit : 1 mL/min) 11,92 min

Masse molaire : 2776,78 (calculée) ; 2777,78 (mesurée)

RMN-¹H (Eau, 600 MHz) :

	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H
Gly ¹⁹¹					
Gln ¹⁹²	8,79	4,12	1,77 / 1,90	2,12	
Glu ¹⁹³	8,14	4,09	1,78 / 1,88	2,11	
Asp ¹⁹⁴	8,15	4,43	2,48 / 2,56		
Glu ¹⁹⁵	8,16	4,08	1,78 / 1,89	2,12	
Ala ¹⁹⁶	8,24	4,13	1,24		
Glu ¹⁹⁷	8,33	4,18	1,79 / 1,90	2,13	
Ser ¹⁹⁸	8,22	4,21	3,67 / 3,72		
Asp ¹⁹⁹	8,37	4,48	2,52		
Ile ²⁰⁰	7,87	3,90	1,58	0,88 (CH ₃) / 1,00 (CH ₂)	0,55
Phe ²⁰¹	8,13	4,47	2,84 / 2,98		
Ser ²⁰²	7,98	4,27	3,62		
Ile ²⁰³	8,03	3,97	1,72	1,01 (CH ₃) / 1,29 (CH ₂)	0,71
Arg ²⁰⁴	8,23	4,12	1,56 / 1,61	1,41 / 1,43	7,58 (NH ^ε) ; 2,15
Glu ²⁰⁵	8,33	4,12	1,76 / 1,83	2,07	
Val ²⁰⁶	8,13	3,91	1,87	0,68 / 0,72	
Ser ²⁰⁷	8,25	4,28	3,67		
Phe ²⁰⁸	8,23	4,47	2,90 / 2,95		
Gln ²⁰⁹	8,18	4,15	1,89 / 1,77	2,12	
Ser ²¹⁰	8,36	4,33	3,72 / 3,80		
Thr ²¹¹	8,26	4,16	4,25	1,08	
Gly ²¹²	8,36	3,85			
Glu ²¹³	8,19	4,20	1,75 / 1,92	2,12	
Ser ²¹⁴	8,37	4,32	3,73		
Glu ²¹⁵	8,01	3,96	1,71 / 1,87	2,03	

Biotine-G¹⁹¹-Q-E-D-E-A-E-S-D-I-F-S-I-R-E-V-S-F-Q-S-T-G-E-S-E²¹⁵-OH

Résine utilisée : PAM résine

Procédure : 1a

Temps de rétention : (colonne analytique ; gradient : de 12 % B à 75 % B en 15 minutes ;

débit : 1 mL/min) 12,90 min

Masse molaire : 3003,07 (calculée) ; 3004,95 (mesurée)

H-S²¹⁰-T-G-E-S-E-W-K-D-T-N-Y-T-E²²³-OH

Résine utilisée : résine de type WANG

Procédure : 2

Temps de rétention : (colonne analytique ; gradient : de 12 % B à 75 % B en 15 minutes ;

débit : 1 mL/min) 10,41 min

Masse molaire : 1630,62 (calculée) ; 1632,34 (mesurée)

**ANNEXE B : DONNEES
CRISTALLOGRAPHIQUES**

Bocψ[CO-NH-O]Gly-NHⁱPr

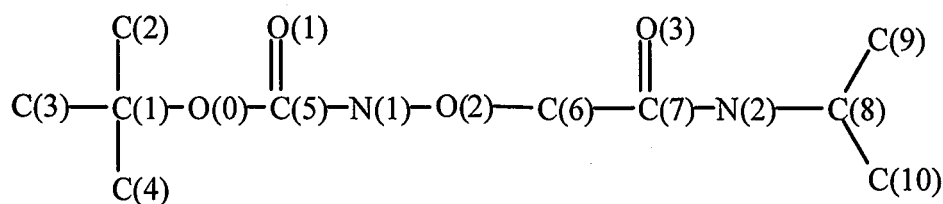


Table 1. Crystal data and structure refinement for ciftab.

Identification code	shelxl
Empirical formula	C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O ₄
Formula weight	232.28
Temperature	293(2) K
Wavelength	1.54060 Å
Crystal system, space group	Monoclinic, P 21/n
Unit cell dimensions	a = 10.4350(10) Å α = 90 deg. b = 10.7310(10) Å β = 93.44(3) deg. c = 24.475(3) Å γ = 90 deg.
Volume	2735.7(5) Å ³
Z, Calculated density	8, 1.128 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.723 mm ⁻¹
F(000)	1008
Crystal size	? x ? x ? mm ³
Theta range for data collection	3.62 to 69.81 deg.
Index ranges	0 ≤ h ≤ 12, 0 ≤ k ≤ 13, -25 ≤ l ≤ 25
Reflections collected / unique	4860 / 4860 [R(int) = 0.0000]
Completeness to 2theta = 69.81	88.7%
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	4860 / 4 / 302
Goodness-of-fit on F ²	1.053
Final R indices [I > 2sigma(I)]	R1 = 0.0426, wR2 = 0.1259
R indices (all data)	R1 = 0.0467, wR2 = 0.1302
Extinction coefficient	0.0052(4)
Largest diff. peak and hole	0.179 and -0.174 e. Å ⁻³

Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for ciftab.

U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
C(1A)	6660(2)	3899(2)	7392(1)	56(1)
C(2A)	6178(2)	5199(2)	7492(1)	87(1)
C(3A)	5541(2)	3013(2)	7313(1)	80(1)
C(4A)	7545(2)	3823(3)	6930(1)	100(1)
O(0A)	7345(1)	3405(1)	7893(1)	56(1)
C(5A)	8426(1)	3941(1)	8093(1)	52(1)
O(1A)	8842(1)	4941(1)	7964(1)	69(1)
N(1A)	9037(1)	3156(1)	8464(1)	56(1)
O(2A)	9898(1)	3788(1)	8835(1)	62(1)
C(6A)	11133(2)	3217(2)	8849(1)	68(1)
C(7A)	12044(2)	3702(2)	8441(1)	55(1)
O(3A)	13152(1)	3284(1)	8464(1)	74(1)
N(2A)	11603(1)	4544(1)	8083(1)	56(1)
C(8A)	12375(2)	5078(2)	7662(1)	62(1)
C(9A)	12880(2)	6347(2)	7832(1)	82(1)
C(10A)	11567(2)	5133(2)	7125(1)	85(1)
C(1B)	2974(2)	4124(2)	10435(1)	75(1)
C(2B)	1888(3)	3319(2)	10621(1)	106(1)
C(3B)	2488(3)	5375(2)	10234(1)	109(1)
C(4B)	4059(3)	4279(3)	10859(1)	118(1)
O(0B)	3453(1)	3573(1)	9934(1)	61(1)
C(5B)	4043(1)	2468(1)	9937(1)	50(1)
O(1B)	4259(1)	1791(1)	10323(1)	69(1)
N(1B)	4426(1)	2259(1)	9420(1)	51(1)
O(2B)	4698(1)	992(1)	9319(1)	53(1)
C(6B)	5868(2)	918(2)	9051(1)	55(1)
C(7B)	7067(1)	1162(1)	9405(1)	49(1)
O(3B)	8080(1)	1380(1)	9184(1)	69(1)
N(2B)	6983(1)	1090(1)	9941(1)	54(1)
C(8B)	8078(2)	1220(2)	10335(1)	67(1)
C(9B)	8601(2)	-48(3)	10495(1)	107(1)
C(10B)	7666(3)	1930(3)	10829(1)	110(1)

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [deg] for ciftab.

C(1A)-O(0A)	1.4805(19)
C(1A)-C(4A)	1.504(3)
C(1A)-C(2A)	1.507(3)
C(1A)-C(3A)	1.509(2)
O(0A)-C(5A)	1.3332(19)
C(5A)-O(1A)	1.2071(18)
C(5A)-N(1A)	1.366(2)
N(1A)-O(2A)	1.4125(18)
O(2A)-C(6A)	1.426(2)
C(6A)-C(7A)	1.510(2)
C(7A)-O(3A)	1.2381(19)
C(7A)-N(2A)	1.322(2)
N(2A)-C(8A)	1.463(2)
C(8A)-C(9A)	1.510(3)
C(8A)-C(10A)	1.519(3)
C(1B)-O(0B)	1.475(2)
C(1B)-C(4B)	1.499(4)
C(1B)-C(3B)	1.507(3)
C(1B)-C(2B)	1.516(3)
O(0B)-C(5B)	1.3355(18)
C(5B)-O(1B)	1.2011(18)
C(5B)-N(1B)	1.3693(19)
N(1B)-O(2B)	1.4138(16)
O(2B)-C(6B)	1.4234(18)
C(6B)-C(7B)	1.502(2)
C(7B)-O(3B)	1.2394(18)
C(7B)-N(2B)	1.322(2)
N(2B)-C(8B)	1.457(2)
C(8B)-C(9B)	1.509(3)
C(8B)-C(10B)	1.513(3)
O(0A)-C(1A)-C(4A)	108.42(15)
O(0A)-C(1A)-C(2A)	110.25(15)
C(4A)-C(1A)-C(2A)	113.43(19)
O(0A)-C(1A)-C(3A)	102.20(13)
C(4A)-C(1A)-C(3A)	112.03(18)
C(2A)-C(1A)-C(3A)	109.92(16)
C(5A)-O(0A)-C(1A)	120.37(12)
O(1A)-C(5A)-O(0A)	126.63(14)
O(1A)-C(5A)-N(1A)	124.16(14)
O(0A)-C(5A)-N(1A)	109.18(13)
C(5A)-N(1A)-O(2A)	112.65(13)
N(1A)-O(2A)-C(6A)	110.38(13)
O(2A)-C(6A)-C(7A)	116.16(14)
O(3A)-C(7A)-N(2A)	124.34(16)
O(3A)-C(7A)-C(6A)	117.90(14)
N(2A)-C(7A)-C(6A)	117.76(14)
C(7A)-N(2A)-C(8A)	123.43(13)
N(2A)-C(8A)-C(9A)	110.86(15)

N(2A)-C(8A)-C(10A)	108.93(15)
C(9A)-C(8A)-C(10A)	111.76(16)
O(0B)-C(1B)-C(4B)	109.91(18)
O(0B)-C(1B)-C(3B)	102.13(15)
C(4B)-C(1B)-C(3B)	110.6(2)
O(0B)-C(1B)-C(2B)	108.54(18)
C(4B)-C(1B)-C(2B)	113.7(2)
C(3B)-C(1B)-C(2B)	111.3(2)
C(5B)-O(0B)-C(1B)	121.98(13)
O(1B)-C(5B)-O(0B)	127.37(14)
O(1B)-C(5B)-N(1B)	125.17(14)
O(0B)-C(5B)-N(1B)	107.39(12)
C(5B)-N(1B)-O(2B)	113.01(12)
N(1B)-O(2B)-C(6B)	108.76(11)
O(2B)-C(6B)-C(7B)	115.50(12)
O(3B)-C(7B)-N(2B)	123.68(15)
O(3B)-C(7B)-C(6B)	118.86(14)
N(2B)-C(7B)-C(6B)	117.42(13)
C(7B)-N(2B)-C(8B)	123.69(13)
N(2B)-C(8B)-C(9B)	110.01(17)
N(2B)-C(8B)-C(10B)	109.12(17)
C(9B)-C(8B)-C(10B)	111.26(19)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 4. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for ciftab.

The anisotropic displacement factor exponent takes the form:

$$-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
C(1A)	51(1)	59(1)	58(1)	7(1)	-1(1)	-2(1)
C(2A)	76(1)	64(1)	119(2)	0(1)	-28(1)	9(1)
C(3A)	66(1)	70(1)	101(2)	0(1)	-13(1)	-10(1)
C(4A)	88(2)	151(2)	61(1)	11(1)	13(1)	-4(2)
O(0A)	48(1)	59(1)	61(1)	13(1)	2(1)	-7(1)
C(5A)	45(1)	54(1)	56(1)	6(1)	7(1)	1(1)
O(1A)	55(1)	58(1)	91(1)	22(1)	-8(1)	-8(1)
N(1A)	53(1)	62(1)	51(1)	11(1)	2(1)	-4(1)
O(2A)	56(1)	79(1)	51(1)	0(1)	2(1)	2(1)
C(6A)	60(1)	85(1)	57(1)	19(1)	-4(1)	11(1)
C(7A)	55(1)	63(1)	46(1)	2(1)	-3(1)	15(1)
O(3A)	63(1)	99(1)	59(1)	14(1)	3(1)	35(1)
N(2A)	49(1)	64(1)	57(1)	12(1)	6(1)	16(1)
C(8A)	57(1)	64(1)	64(1)	11(1)	15(1)	19(1)
C(9A)	69(1)	82(1)	93(2)	8(1)	6(1)	-2(1)
C(10A)	108(2)	90(1)	56(1)	5(1)	11(1)	10(1)
C(1B)	99(1)	67(1)	61(1)	-7(1)	31(1)	14(1)
C(2B)	118(2)	97(2)	109(2)	5(1)	60(2)	12(2)
C(3B)	151(2)	71(1)	112(2)	-6(1)	54(2)	38(2)
C(4B)	160(3)	121(2)	74(2)	-36(2)	2(2)	7(2)
O(0B)	78(1)	55(1)	50(1)	2(1)	14(1)	21(1)
C(5B)	50(1)	52(1)	48(1)	3(1)	3(1)	8(1)
O(1B)	84(1)	69(1)	54(1)	15(1)	8(1)	20(1)
N(1B)	54(1)	51(1)	47(1)	1(1)	2(1)	17(1)
O(2B)	47(1)	52(1)	61(1)	-5(1)	6(1)	9(1)
C(6B)	55(1)	62(1)	47(1)	-3(1)	8(1)	13(1)
C(7B)	50(1)	47(1)	50(1)	10(1)	11(1)	10(1)
O(3B)	55(1)	90(1)	64(1)	24(1)	18(1)	1(1)
N(2B)	46(1)	69(1)	46(1)	11(1)	5(1)	3(1)
C(8B)	56(1)	86(1)	58(1)	20(1)	-4(1)	-5(1)
C(9B)	70(1)	115(2)	132(2)	37(2)	-21(1)	22(1)
C(10B)	133(2)	133(2)	60(1)	-3(1)	-19(1)	7(2)

Table 5. Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for ciftab.

	x	y	z	U(eq)
H(21A)	5640	5190	7797	114
H(22A)	5693	5490	7171	114
H(23A)	6895	5744	7571	114
H(31A)	5013	3074	7620	104
H(32A)	5856	2176	7286	104
H(33A)	5043	3225	6984	104
H(41A)	7831	2979	6892	130
H(42A)	8273	4356	7008	130
H(43A)	7096	4087	6596	130
H(1A)	8449(16)	2558(15)	8645(7)	72
H(61A)	11017	2331	8787	88
H(62A)	11536	3322	9213	88
H(2A)	10675(10)	4786(18)	8090(8)	73
H(81A)	13109	4527	7613	80
H(91A)	13392	6276	8170	106
H(92A)	12173	6899	7881	106
H(93A)	13397	6672	7554	106
H(11A)	11267	4312	7028	110
H(12A)	12078	5448	6842	110
H(13A)	10846	5673	7164	110
H(21B)	1227	3260	10332	137
H(22B)	1542	3686	10938	137
H(23B)	2209	2501	10711	137
H(31B)	1796	5258	9962	142
H(32B)	3172	5823	10076	142
H(33B)	2187	5842	10535	142
H(41B)	4713	4792	10715	154
H(42B)	4412	3477	10955	154
H(43B)	3746	4667	11178	154
H(1B)	3858(15)	2588(16)	9105(6)	66
H(61B)	5831	1512	8751	71
H(62B)	5931	93	8893	71
H(2B)	6135(12)	835(17)	10070(7)	70
H(81B)	8751	1695	10165	87
H(91B)	8885	-464	10177	138
H(92B)	7939	-532	10650	138
H(93B)	9310	45	10760	138
H(11B)	7357	2739	10717	143
H(12B)	8385	2022	11089	143
H(13B)	6994	1481	10994	143

Table 6. Torsion angles [deg] for ciftab.

C(4A)-C(1A)-O(0A)-C(5A)	60.4(2)
C(2A)-C(1A)-O(0A)-C(5A)	-64.35(19)
C(3A)-C(1A)-O(0A)-C(5A)	178.82(14)
C(1A)-O(0A)-C(5A)-O(1A)	13.0(2)
C(1A)-O(0A)-C(5A)-N(1A)	-164.98(13)
O(1A)-C(5A)-N(1A)-O(2A)	23.9(2)
O(0A)-C(5A)-N(1A)-O(2A)	-158.02(12)
C(5A)-N(1A)-O(2A)-C(6A)	-127.82(14)
N(1A)-O(2A)-C(6A)-C(7A)	89.09(18)
O(2A)-C(6A)-C(7A)-O(3A)	175.53(16)
O(2A)-C(6A)-C(7A)-N(2A)	-4.5(2)
O(3A)-C(7A)-N(2A)-C(8A)	0.8(3)
C(6A)-C(7A)-N(2A)-C(8A)	-179.14(16)
C(7A)-N(2A)-C(8A)-C(9A)	-100.00(19)
C(7A)-N(2A)-C(8A)-C(10A)	136.62(18)
C(4B)-C(1B)-O(0B)-C(5B)	58.6(2)
C(3B)-C(1B)-O(0B)-C(5B)	176.06(18)
C(2B)-C(1B)-O(0B)-C(5B)	-66.3(2)
C(1B)-O(0B)-C(5B)-O(1B)	0.3(3)
C(1B)-O(0B)-C(5B)-N(1B)	-176.80(15)
O(1B)-C(5B)-N(1B)-O(2B)	21.3(2)
O(0B)-C(5B)-N(1B)-O(2B)	-161.53(12)
C(5B)-N(1B)-O(2B)-C(6B)	-135.04(13)
N(1B)-O(2B)-C(6B)-C(7B)	73.91(15)
O(2B)-C(6B)-C(7B)-O(3B)	-164.50(14)
O(2B)-C(6B)-C(7B)-N(2B)	17.6(2)
O(3B)-C(7B)-N(2B)-C(8B)	-2.0(3)
C(6B)-C(7B)-N(2B)-C(8B)	175.76(15)
C(7B)-N(2B)-C(8B)-C(9B)	-95.5(2)
C(7B)-N(2B)-C(8B)-C(10B)	142.14(19)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 7. Hydrogen-bonds for ciftab [Å and deg.].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(2A)-H(2A)...O(1A)	1.004(9)	1.926(10)	2.9097(17)	165.7(17)
N(2B)-H(2B)...O(1B)	0.996(9)	2.326(15)	3.1357(18)	137.8(15)
N(2A)-H(2A)...O(2A)	1.004(9)	2.304(19)	2.7587(19)	106.2(13)
N(2B)-H(2B)...O(2B)	0.996(9)	2.307(18)	2.7523(18)	106.0(12)
N(1A)-H(1A)...O(3B)	1.009(9)	1.883(12)	2.8187(18)	152.9(16)
N(1B)-H(1B)...O(3A)#1	1.006(9)	1.851(10)	2.8416(18)	167.4(16)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 x-1,y,z

Piv-Proψ[CH₂-NH-O]Gly-NHiPr

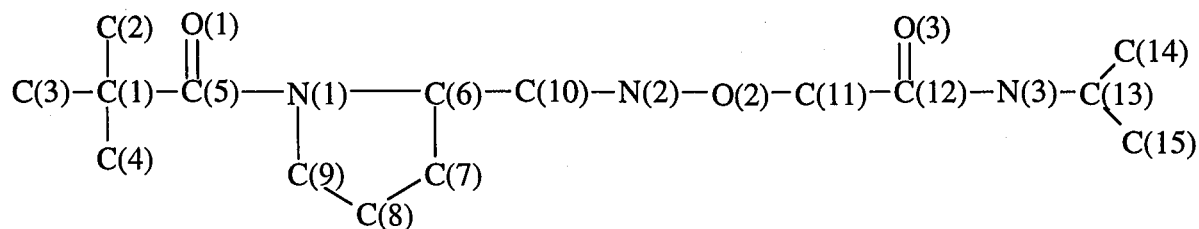


Table 1. Crystal data and structure refinement.

Temperature	293(2) K	
Wavelength	1.54060 Å	
Crystal system	orthorhombic	
Space group	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Unit cell dimensions	a = 5.3860(5) Å	α = 90°
	b = 11.470(2) Å	β = 90°
	c = 27.539(3) Å	γ = 90°
Volume	1701.3(4) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.169 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.658 mm ⁻¹	
F(000)	656	
Crystal size	0.6 x 0.1 x 0.1 mm ³	
Theta range for data collection	3.21 to 69.69°.	
Index ranges	0 ≤ h ≤ 6, 0 ≤ k ≤ 13, 0 ≤ l ≤ 33	
Reflections collected	1877	
Independent reflections	1877 [R(int) = 0.0000]	
Completeness to theta = 69.69°	98.5 %	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	1877 / 2 / 197	
Goodness-of-fit on F ²	1.063	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.054, wR2 = 0.147	
R indices (all data)	R1 = 0.059, wR2 = 0.157	
Extinction coefficient	0.0125(16)	
Largest diff. peak and hole	0.276 and -0.331 e.Å ⁻³	

Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

Table	x	y	z	$U(\text{eq})$
N1	2908(4)	864(2)	2196(1)	38(1)
N2	3164(5)	2958(2)	1150(1)	45(1)
N3	5056(5)	4479(2)	300(1)	47(1)
O1	2749(5)	2580(2)	2573(1)	56(1)
O2	3926(4)	2377(2)	705(1)	44(1)
O3	9164(4)	4192(2)	432(1)	58(1)
C1	1008(5)	1012(3)	3036(1)	48(1)
C2	-1714(6)	938(6)	2902(2)	96(2)
C3	1355(9)	1880(4)	3452(1)	76(1)
C4	1954(8)	-178(3)	3213(1)	70(1)
C5	2316(5)	1526(2)	2586(1)	39(1)
C6	4081(5)	1432(2)	1769(1)	40(1)
C7	5233(7)	403(3)	1506(1)	58(1)
C8	3446(8)	-588(3)	1605(1)	61(1)
C9	2741(7)	-412(2)	2135(1)	51(1)
C10	2102(6)	2081(2)	1476(1)	43(1)
C11	6451(6)	2631(3)	619(1)	53(1)
C12	7006(5)	3856(2)	443(1)	43(1)
C13	5235(6)	5661(3)	103(1)	53(1)
C14	3775(11)	6485(3)	422(2)	86(1)
C15	4160(20)	5665(4)	-395(1)	132(3)

Table 3. Bond lengths [Å].

O2-C11	1.411(4)	C6-C7	1.518(4)
O2-N2	1.453(3)	C6-C10	1.531(4)
O3-C12	1.225(4)	C5-C1	1.543(4)
O1-C5	1.232(4)	C13-C15	1.489(6)
N1-C5	1.353(4)	C13-C14	1.513(6)
N1-C9	1.477(3)	C1-C2	1.514(4)
N1-C6	1.485(3)	C1-C3	1.530(5)
N3-C12	1.330(4)	C1-C4	1.536(5)
N3-C13	1.464(4)	C9-C8	1.522(5)
N2-C10	1.464(3)	C7-C8	1.514(5)
C12-C11	1.516(4)		

Table 4. Bond angles [°].

C11-O2-N2	108.6(2)	N2-C10-C6	112.7(2)
C5-N1-C9	129.3(2)	N3-C13-C15	108.6(3)
C5-N1-C6	118.8(2)	N3-C13-C14	109.2(3)
C9-N1-C6	111.7(2)	C15-C13-C14	109.4(4)
C12-N3-C13	123.7(3)	C2-C1-C3	109.7(4)
O2-N2-C10	108.2(2)	C2-C1-C4	110.4(4)
O3-C12-N3	124.9(3)	C3-C1-C4	107.4(3)
O3-C12-C11	119.1(3)	C2-C1-C5	105.6(3)
N3-C12-C11	115.9(3)	C3-C1-C5	107.3(3)
N1-C6-C7	102.2(2)	C4-C1-C5	116.3(3)
N1-C6-C10	109.6(2)	N1-C9-C8	103.1(2)
C7-C6-C10	114.3(3)	O2-C11-C12	115.7(2)
O1-C5-N1	118.9(2)	C8-C7-C6	103.8(2)
O1-C5-C1	119.1(3)	C7-C8-C9	103.3(3)
N1-C5-C1	122.0(2)		

Table 5. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
N1	37(1)	30(1)	48(1)	9(1)	1(1)	-1(1)
N2	57(1)	33(1)	47(1)	5(1)	6(1)	4(1)
N3	35(1)	43(1)	62(1)	17(1)	3(1)	-1(1)
O1	69(2)	40(1)	59(1)	-1(1)	7(1)	-7(1)
O2	47(1)	40(1)	45(1)	3(1)	2(1)	0(1)
O3	36(1)	63(1)	75(1)	12(1)	2(1)	-3(1)
C1	32(1)	61(2)	50(1)	9(1)	2(1)	-4(1)
C2	30(2)	177(6)	80(2)	15(3)	2(2)	-11(3)
C3	85(3)	90(3)	53(2)	3(2)	8(2)	-6(3)
C4	68(2)	70(2)	72(2)	34(2)	8(2)	-9(2)
C5	30(1)	39(1)	48(1)	8(1)	-2(1)	-3(1)
C6	33(1)	37(1)	49(1)	9(1)	1(1)	2(1)
C7	56(2)	54(2)	63(2)	9(1)	12(2)	23(2)
C8	77(2)	38(1)	69(2)	-1(1)	1(2)	12(2)
C9	57(2)	31(1)	64(2)	7(1)	-2(2)	-1(1)
C10	40(1)	40(1)	50(1)	11(1)	4(1)	7(1)
C11	42(2)	47(2)	71(2)	14(1)	12(1)	9(1)
C12	39(1)	45(1)	46(1)	5(1)	7(1)	2(1)
C13	46(2)	43(2)	70(2)	19(1)	4(1)	-6(2)
C14	105(4)	55(2)	99(3)	-5(2)	-4(3)	8(3)
C15	267(9)	74(2)	54(2)	25(2)	-8(4)	-14(5)

Table 5. Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).

	x	y	z	U(eq)
H(N2)	1780(50)	3480(30)	1018(12)	59
H(N3)	3280(30)	4160(30)	294(14)	61
H(C2)	-1928	384	2644	124
H'(C2)	-2286	1689	2798	124
H''(C2)	-2653	692	3180	124
H(C3)	3088	1944	3529	99
H'(C3)	463	1613	3732	99
H''(C3)	731	2629	3356	99
H(C4)	3667	-113	3305	91
H'(C4)	1792	-741	2957	91
H''(C4)	992	-424	3488	91
H(C6)	5377	1974	1876	52
H(C7)	5368	556	1161	75
H'(C7)	6870	229	1634	75
H(C8)	4242	-1338	1556	80
H'(C8)	1999	-537	1396	80
H(C9)	1070	-689	2198	66
H'(C9)	3889	-813	2349	66
H(C10)	1162	1523	1286	56
H'(C10)	961	2461	1698	56
H(C11)	7075	2083	380	69
H'(C11)	7366	2499	918	69
H(C13)	6978	5904	90	69
H(C14)	4540	6527	737	112
H'(C14)	2104	6204	456	112
H''(C14)	3753	7246	278	112
H(C15)	5136	5174	-603	171
H'(C15)	4160	6446	-520	171
H''(C15)	2486	5378	-383	171

Table 6. Torsion angles [°].

C11-O2-N2-C10	-125.4(2)	O1-C5-C1-C2	96.9(4)
C13-N3-C12-O3	0.6(5)	N1-C5-C1-C2	-80.3(4)
C13-N3-C12-C11	-177.7(3)	O1-C5-C1-C3	-20.0(4)
C5-N1-C6-C7	161.1(3)	N1-C5-C1-C3	162.8(3)
C9-N1-C6-C7	-14.6(3)	O1-C5-C1-C4	-140.3(3)
C5-N1-C6-C10	-77.4(3)	N1-C5-C1-C4	42.6(4)
C9-N1-C6-C10	107.0(3)	C5-N1-C9-C8	174.9(3)
C9-N1-C5-O1	175.4(3)	C6-N1-C9-C8	-10.0(4)
C6-N1-C5-O1	0.6(4)	N2-O2-C11-C12	-73.8(3)
C9-N1-C5-C1	-7.5(5)	O3-C12-C11-O2	169.0(3)
C6-N1-C5-C1	177.8(2)	N3-C12-C11-O2	-12.6(4)
O2-N2-C10-C6	83.8(3)	N1-C6-C7-C8	33.5(3)
N1-C6-C10-N2	161.3(2)	C10-C6-C7-C8	-84.7(3)
C7-C6-C10-N2	-84.7(3)	C6-C7-C8-C9	-40.5(3)
C12-N3-C13-C15	121.0(5)	N1-C9-C8-C7	30.7(3)
C12-N3-C13-C14			

Table 7. Hydrogen bond dimensions [Å and °].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N2-H...O2	1.022(10)	2.366(*)	2.725(*)	99(*)
N2-H...O3 ^a	1.022(10)	2.293(18)	3.249(3)	155(3)
N3-H...O3 ^a	1.022(10)	2.250(18)	3.211(3)	156(3)

^a Symmetry code: x-1, y, z

ANNEXE C : EFFETS DE SOLVANT

EFFETS DE SOLVANT (CDCl₃/DMSO-*d*₆)

Bocψ[CO-NH-O]Gly-NH^{*i*}Pr

% DMSO	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80	100
NH̲O	7,46	7,90	8,33	8,70	9,18	9,61	9,97	10,20	10,34	10,38
NH̲ ^{<i>i</i>} Pr	7,98	8,00	8,02	8,02	8,05	8,05	8,06	8,02	7,94	7,92

Boc-Pro-NH-OMe

% DMSO	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80	100
NH̲O cis	8,52	9,19	9,50	9,82	10,22	10,64	10,93	11,08	11,14	11,15
NH̲O trans	9,86	9,91	9,95	10,01	10,17	10,40	10,74	11,01	11,11	11,12

Piv-Proψ[CO-NH-O]Gly-NH^{*i*}Pr

% DMSO	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80	100
NH̲O	10,10	10,24	10,40	10,57	10,80	11,05	11,30	11,40	11,45	11,43
NH̲ ^{<i>i</i>} Pr	8,00	8,03	8,06	8,13	8,19	8,25	8,30	8,29	8,25	8,23

Pivψ[CH=N-O]Gly-NH^{*i*}Pr

% DMSO	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80	100
NH̲ ^{<i>i</i>} Pr	5,99	6,00	6,01	6,04	6,07	6,17	6,40	6,81	7,30	7,40

Piv-Proψ[CH=N-O]Gly-NH^{*i*}Pr

% DMSO	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80	100
NH̲ ^{<i>i</i>} Pr (E)	6,07	6,08	6,10	6,12	6,16	6,24	6,43	6,85	7,26	7,37
NH̲ ^{<i>i</i>} Pr (Z)	7,50	7,50	7,50	7,52	7,53	7,55	7,57	7,60	7,62	7,65

Pivψ[CH₂-NH-O]Gly-NH^{*i*}Pr

% DMSO	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80	100
NH̲O	5,78	5,81	5,85	5,89	5,98	6,14	6,38	6,65	6,83	6,87
NH̲ ^{<i>i</i>} Pr	6,22	6,25	6,28	6,34	6,43	6,61	6,91	7,23	7,42	7,46

Pty-Proψ[CH₂-NH-O]Gly-NHⁱPr

% DMSO	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80	100
NH <u>O</u>	6,42	6,43	6,44	6,46	6,50	6,58	6,70	6,88	6,99	7,01
NH ⁱ Pr	6,90	6,92	6,95	6,97	7,02	7,11	7,26	7,44	7,53	7,55

Z-Ala-Ala-Pro-Valψ[CH=N-O]Ala-Ala-NHⁱPr [9]

% DMSO	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80	100
NH(Ala ¹)	5,63	5,81	5,95	6,10	6,36	6,62	6,93	7,18	7,39	7,43
NH(Ala ²)	7,43	7,41	7,40	7,39	7,44	7,53	7,67	7,85	7,99	8,02
NH(Val ⁴)	7,26	7,28	7,30	7,33	7,34	7,40	7,52	7,75	7,91	7,93
NH(Ala ⁶)	6,95	6,96	6,98	7,00	7,04	7,09	7,17	7,40	7,55	7,63
NH ⁱ Pr	6,20	6,38	6,51	6,67	6,92	7,15	7,43	7,62	7,74	7,76

Z-Ala-Ala-Proψ[CH=N-O]Val-Ala-Ala-NHⁱPr [10]

% DMSO	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80	100
NH(Ala ¹)	5,62	5,73	5,85	6,00	6,22	6,50	6,86	7,17	7,39	7,43
NH(Ala ²)	7,04	7,09	7,14	7,22	7,35	7,46	7,64	7,84	7,97	7,99
NH(Ala ⁵)	6,48	6,53	6,57	6,63	6,71	6,83	7,04	7,31	7,64	7,70
NH(Ala ⁶)	6,83	6,92	6,99	7,08	7,20	7,34	7,55	7,75	7,87	7,89
NH ⁱ Pr	6,31	6,38	6,45	6,53	6,65	6,79	7,01	7,31	7,60	7,65

Z-Ala-Ala-Pro-Valψ[CH₂-NH-O]Ala-Ala-NHⁱPr [11]

% DMSO	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80	100
NH(Ala ¹)	5,55	5,73	5,86	6,02	6,27	6,55	6,87	7,16	7,34	7,43
NH(Ala ²)	7,53	7,56	7,58	7,61	7,65	7,71	7,82	7,93	8,03	8,05
NH(Val ⁴)	6,68	6,70	6,72	6,75	6,80	6,90	7,07	7,29	7,41	7,43
NH <u>O</u> (Ala ⁵)	5,92	5,96	5,99	6,02	6,07	6,15	6,23	6,35	6,45	6,47
NH(Ala ⁶)	6,45	6,60	6,72	6,83	7,00	7,18	7,34	7,48	7,57	7,59
NH ⁱ Pr	7,22	7,24	7,27	7,29	7,33	7,39	7,47	7,53	7,61	7,65

Z-Ala-Ala-Proψ[CH₂-NH-O]Val-Ala-Ala-NH^tPr [12]

% DMSO	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80	100
NH(Ala ¹)	5,69	5,78	5,86	5,99	6,20	6,48	6,85	7,20	7,39	7,45
NH(Ala ²)	7,58	7,53	7,50	7,48	7,48	7,51	7,63	7,81	7,94	7,97
NHO(Val ⁴)	6,48	6,50	6,48	6,50	6,52	6,56	6,63	6,71	6,74	6,75
NH(Ala ⁵)	7,35	7,35	7,35	7,35	7,39	7,44	7,59	7,76	7,83	7,86
NH(Ala ⁶)	6,99	7,07	7,15	7,25	7,35	7,44	7,56	7,67	7,75	7,78
NH ^t Pr	6,48	6,50	6,54	6,59	6,68	6,80	6,98	7,34	7,59	7,66

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Fauchère, J. L. ; Thurieau, C. *Adv. Drug Res.* 1992, 23, 128-159
- 2 Hruby, V. J. ; Al-Obeidi, F. ; Kazmierski, W. *Biochem. J.* 1990, 268, 249-262
- 3 Fauchère, J. L. *Adv. Drug Res.* 1986, 15, 29-69
- 4 Dutta, A. S. *Adv. Drug Res.* 1991, 21, 145-286
- 5 Spatola, A. F. *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins* (Weinstein, B., Ed.) Marcel Dekker : New York, 1983, 7, 267-357
- 6 Szelke, M. ; Leckie, B. ; Hallett, A. ; Jones, D. M. ; Sueiras, J. ; Atrash, B. ; Lever, A. F. *Nature* 1982, 299, 555-557
- 7 Sasaki, Y. ; Murphy, W. A. ; Heiman, M. L. ; Lance, V. A. ; Coy, D. H. *J. Med. Chem.* 1987, 30, 1162-1166
- 8 Rodriguez, M. ; Bali, J.-P. ; Magous, R. ; Castro B. ; Martinez, J. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1986, 27, 293-299
- 9 Couder, J. ; Tourwé, D. ; Van Binst, G. ; Schuurkens, J. ; Leysen J. E. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1993, 41, 181-184
- 10 Harbeson, S. L. ; Rich, D. H. *J. Med. Chem.* 1989, 32, 1378-1392
- 11 Gonzáles-Muniz, R. ; García-López, M. T. ; Gómez-Monterrey, I. ; Herranz, R. ; Jimeno, M. L. ; Suárez-Gea, M. L. ; Johansen, N. L. ; Madsen, K. ; Thøgersen, H. ; Suzdak, P. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 1015-1021
- 12 Almquist, R. G. ; Chao, W. R. ; Ellis, M. E. ; Johnson, H. L. *J. Med. Chem.* 1980, 23, 1392-1398
- 13 Rodriguez, M. ; Aumelas, A. ; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 5153-5156
- 14 Rodriguez, M. ; Heitz, A. ; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 7319-7322
- 15 Tourwé, D. ; Couder, J. ; Ceusters, M. ; Meert, D. ; Burks, T. F. ; Kramer, T. H. ; Davis, P. ; Knapp, R. ; Yamamura, H. I. ; Leysen, J. E. ; Van Binst, G. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1992, 39, 131-136
- 16 Kempf, D. J. ; Wang, X. C. ; Spanton, S. G. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1991, 38, 237-241
- 17 Bohnstedt, A. C. ; Vara Prasad, J. V. N. ; Rich, D. H. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 5217-5220
- 18 Fujii, N. ; Habashita, H. ; Shigemori, N. ; Otaka, A. ; Ibuka, T. ; Tanaka, M. ; Yamamoto, Y. *Tetrahedron Lett.* 1991, 32, 4969-4972
- 19 Breton, P. ; Monsigny, M. ; Mayer, R. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990, 35, 346-351
- 20 TenBrink, R. E. *J. Org. Chem.* 1987, 52, 418-422

- 21 Nicolaides, E. D. ; Tinney, F. J. ; Kaltenbronn, J. S. ; Repine, J. T. ; DeJohn, D. A. ; Lunney, E. A. ; Roark, W. H. ; Marriott, J. G. ; Davis, R. E. ; Voigtman, R. E. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 959-971
- 22 Anwer, M. K. ; Sherman, D. B. ; Spatola, A. F. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 36, 392-399
- 23 Zabrocki, J. ; Dunbar, J. B. ; Marshall, K. W. ; Toth, M. V. ; Marshall, G. R. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 202-209
- 24 Boteju, L. W. ; Hruby, V. J. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1757-1760
- 25 Shemyakin, M. M. ; Ovchinnikov, Y. A. ; Ivanov, V. T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1969**, 8, 492-499
- 26 Chorev, M. ; Shavitz, R. ; Goodman, M. ; Minick, S. ; Guillemin, R. *Science* **1979**, 204, 1210-1212
- 27 Bartlett, P. A. ; Spear, K. L. ; Jacobsen, N. E. *Biochemistry* **1982**, 21, 1608-1611
- 28 Clausen, K. ; Spatola, A. F. ; Lemieux, C. ; Schiller, P. W. ; Lawesson, S. O. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 120, 305-310
- 29 Lajoie, G. ; Lépine, F. ; Lemaire, S. ; Jolicoeur, F. ; Aubé, C. ; Turcotte, A. ; Belleau, B. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, 24, 316-327
- 30 Majer, Z. ; Zewdu, M. ; Hollósi, M. ; Seprődi, J. ; Vadász, Z. ; Teplán, I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, 150, 1017-1020
- 31 Hassall, C. H. ; Johnson, W. H. ; Theobald, C. J. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1977**, 635-636
- 32 Woo, P. W. K. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 2973-2976
- 33 Evans, B. E. ; Rittle, K. E. ; Homnick, C. F. ; Springer, J. P. ; Hirshfield, J. ; Veber, D. J. *Org. Chem.* **1985**, 50, 4615-4625
- 34 Wuts, P. G. M. ; Putt, S. R. ; Ritter, A. R. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 4503-4508
- 35 Baker, W. R. ; Condon, S. L. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3277-3284
- 36 Atsuumi, S. ; Funabashi, H. ; Nakano, M. ; Koike, Y. ; Tanaka, S. ; Harada, J. ; Matsuyama, K. ; Ikenaga, T. ; Morishima, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 306-313
- 37 Gordon, E. M. ; Godfrey, J. D. ; Pluscec, J. ; Von Langen, D. ; Natarajan, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, 126, 419-426
- 38 Rich, D. H. ; Green, J. ; Toth, M. V. ; Marshall, G. R. ; Kent, S. B. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1285-1288
- 39 Rich, D. H. ; Prasad, J. V. N. ; Sun, C. Q. ; Green, J. ; Mueller, R. ; Houseman, K. ; MacKenzie, D. ; Malkovsky, M. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 3803-3812
- 40 Bartlett, P. A. ; Marlowe, C. K. *Biochemistry* **1983**, 22, 4618-4624
- 41 Moree, W. J. ; Van der Marel, G. A. ; Liskamp, R. M. J. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 409-412
- 42 Dutta, A. S. ; Morley, J. S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1975**, 1712-1720

- 43 Dutta, A. S. ; Morley, J. S. *Peptides* 1976 (Loffet, A., Ed) Editions de l'Université de Bruxelles, **1976**, 517-522
- 44 Limal, D. ; Grand, V. ; Vanderesse, R. ; Marraud, M. ; Aubry, A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 3711-3714
- 45 Vanderesse, R. ; Grand, V. ; Limal, D. ; Vicherat, A. ; Marraud, M. ; Didierjean, C. ; Aubry, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9444-9451
- 46 Al-Obeidi, F. ; Castrucci, A. M. ; Hadley, M. E. ; Hruby, V. J. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 2555-2561
- 47 Veber, D. F. ; Holly, F. W. ; Paleveda, W. J. ; Nutt, R. F. ; Bergstrand, S. J. ; Torchiana, M. ; Glitzer, M. S. ; Saperstein, R. ; Hirschmann, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 2636-2640
- 48 Freidinger, R. M. ; Veber, D. F. ; Perlow, D. S. ; Brooks, J. R. ; Saperstein, R. *Science* **1980**, 210, 656-658
- 49 Callahan, J. F. ; Newlander, K. A. ; Burgess, J. L. ; Eggleston, D. S. ; Nichols, A. ; Wong, A. ; Huffman, W. F. *Tetrahedron* **1993**, 49, 3479-3488
- 50 Smith, A. B. ; Keenan, T. P. ; Holcomb, R. C. ; Sprengeler, P. A. ; Guzman, M. C. ; Wood, J. L. ; Carroll, P. J. ; Hirschmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10672-10674
- 51 Sletzinger, M. ; Firestone, R. A. ; Reinhold, D. F. ; Rooney, C. S. ; Nicholson, W. H. *J. Med. Chem.* **1968**, 11, 261-263
- 52 Sawayama, T. ; Kinugasa, H. ; Nishimura, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1976**, 24, 326-329
- 53 Niedrich, H. ; Grupe, R. *J. Prakt. Chem.* **1965**, 27, 108-112
- 54 Hoffman, R. V. ; Kim, H.-O. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 2953-2956
- 55 Brosse, N. ; Pinto, M.-F. ; Jamart-Grégoire, B. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 205-207
- 56 Burk, M. J. ; Martinez, J. P. ; Feaster, J. E. ; Cosford, N. *Tetrahedron* **1994**, 50, 4399-4428
- 57 Trimble, L. A. ; Vederas, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6397-6399
- 58 Gennari, C. ; Colombo, L. ; Bertolini, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6394-6395
- 59 Evans, D. A. ; Britton, T. C. ; Dorow, R. L. ; Dellaria, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6395-6397
- 60 Oppolzer, W. ; Moretti, R. *Tetrahedron* **1988**, 44, 5541-5552
- 61 Evans, D. A. ; Britton, T. C. ; Dorow, R. L. ; Dellaria, J. F. *Tetrahedron* **1988**, 44, 5525-5540
- 62 Guanti, G. ; Banfi, L. ; Narisano, E. *Tetrahedron* **1988**, 44, 5553-5562
- 63 Shestakow, P. *J. Soc. Phys. Chim. Russe* **1903**, 35, 850-852
- 64 Karady, S. ; Ly, M. G. ; Pines, S. H. ; Sletzinger, M. *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 1949-1951
- 65 Gustafsson, H. ; Ragnarsson, U. *Acta Pharma. Suecica* **1974**, 11, 493-494
- 66 Viret, J. ; Gabard, J. ; Collet, A. *Tetrahedron* **1987**, 43, 891-894

- 67 Andreae, S. ; Schmitz, E. *Synthesis* **1991**, 327-341
- 68 Vidal, J. ; Damestoy, S. ; Guy, L. ; Hannachi, J.-C. ; Aubry, A. ; Collet, A. *Chem. Eur. J.* **1997**, 3 1691-1709
- 69 Vidal, J. ; Hannachi, J.-C. ; Hourdin, G. ; Mulatier, J.-C. ; Collet, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8845-8848
- 70 Niederer, D. A. ; Kapron, J. T. ; Vederas, J. C. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 6859-6862
- 71 Lecoq, A. *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine* **1991**
- 72 Lecoq, A. ; Marraud, M. ; Aubry, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 2765-2768
- 73 Dubar, C. *Thèse Université de Lyon I* **1992**
- 74 Guy, L. ; Vidal, J. ; Collet, A. ; Amour, A. ; Reboud-Ravaux, M. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4833-4843
- 75 Klosterman, H. J. ; Lamoureux, G. L. ; Parsons, J. L. *Biochemistry* **1967**, 6, 170-177
- 76 Kondo, S. ; Shibakara, S. ; Takahashi, S. ; Maeda, K. ; Umezawa, H. ; Ohno, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 6305-6306
- 77 Grupe, R. ; Baeck, B. ; Niedrich, H. *J. Prakt. Chem.* **1972**, 314, 751-758
- 78 Niedrich, H. *J. Prakt. Chem.* **1972**, 314, 769-779
- 79 Bentley, P. H. ; Morley, J. S. *J. Chem. Soc. (C.)* **1966**, 60-64
- 80 Takahashi, S. ; Takeuchi, M. ; Inukai, M. ; Arai, M. *J. Antib.* **1980**, 33, 1220-1223
- 81 Morley, J. S. ; Payne, J. W. ; Hennessey, T. D. *J. Gen. Microbiol.* **1983**, 129, 3701-3708
- 82 Payne, J. W. ; Morley, J. S. ; Armitage, P. ; Payne, G. M. *J. Gen. Microbiol.* **1984**, 130, 2253-2265
- 83 Kisfaludy, L. ; Lów, M. ; Dancsi, L. ; Patthy, Á. ; Nyéki, O. ; Sárközi, M. *Peptides 1972* (Hanson, H. ; Jakubke, H. D., Eds.) North Holland : Amsterdam, **1973**, 409-415
- 84 Briggs, M. T. ; Morley, J. S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1979**, 2138-2143
- 85 Kisfaludy, L. ; Schön, I. ; Náfrádi, J. ; Varga, L. ; Varró, V. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1978**, 359, 887-895
- 86 Schön, I. ; Kisfaludy, L. ; Náfrádi, J. ; Varga, L. ; Varró, V. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1978**, 359, 897-916
- 87 Schön, I. ; Kisfaludy, L. ; Náfrádi, J. ; Varga, L. ; Varró, V. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1978**, 359, 917-922
- 88 Salvadori, S. ; Menegatti, E. ; Sarto, G. ; Tomatis, R. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1981**, 18, 393-401
- 89 Salvadori, S. ; Minozzi, L. ; Tomatis, R. *Il Farmaco* **41**, 103-110
- 90 Cavicchioni, G. ; Breveglieri, A. ; Boggian, M. ; Vertuani, G. ; Reali, E. ; Spisani, S. *J. Pept. Sci.* **1996**, 2, 135-140

- 91 Rose, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 30-33
- 92 Shao, J. ; Tam, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3893-3899
- 93 Tam, J. P. ; Spetzler, J. C. *Biomedical Peptides Proteins Nucleic Acids* **1995**, 1, 123-132
- 94 Rose, K. ; Zeng, W. ; Regamey, P. O. ; Chernushevich, I. V. ; Standing, K. G. ; Gaertner, H. *F. Bioconjugate Chem.* **1996**, 7, 552-556.
- 95 Lelièvre, D. ; Chabane, H. ; Delmas, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9675-9678
- 96 Werner, A. *Chem Ber.* **1893**, 26, 1567
- 97 Werner, A. *Chem Ber.* **1894**, 27, 3350
- 98 Mc Hale, D. ; Green, J. ; Mamalis, P. *J. Chem. Soc.* **1960**, 225-238
- 99 Testa, E. ; Nicolaus, B. J. R. ; Mariani, L. ; Pagani, G. *Helv. Chim. Acta* **1963**, 46, 766-780
- 100 Richardson, A. *J. Med. Chem.* **1964**, 7, 824-826
- 101 Frankel, M. ; Zvilichovsky, G. Knobler, Y. *J. Chem. Soc.* **1964**, 3931-3940
- 102 Undheim, K. ; Bamberg, P. ; Sjöberg, B. *Acta Chem. Scand.* **1965**, 19, 317-324
- 103 Liberek, B. ; Cupryszak, C. *Rocz. Chem.* **1971**, 45, 677-679
- 104 Curtius, T. *Chem. Ber.* **1902**, 35, 3226
- 105 Vaughan, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 3547
- 106 Stavropoulos, G. ; Karagiannis, K. ; Anagnostides, S. ; Ministrouski, I. ; Selinger, Z. ; Chorev, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, 45, 508-513
- 107 Sheehan, J. C. ; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067-1068
- 108 Kimura, T. ; Takai, M. ; Masui, Y. ; Morikawa, T. ; Sakakibara, S. *Biopolymers* **1981**, 20, 1823-1832
- 109 DeTar, D. F. ; Silverstein, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 1013-1019
- 110 DeTar, D. F. ; Silverstein, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 1020-1023
- 111 Sheehan, J. C. ; Goodman, M. ; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 1367-1369
- 112 König, W. ; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798
- 113 Anderson, G. W. ; Zimmerman, J. E. ; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3039
- 114 Bodanszky, M. ; Du Vigneaud, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 6072-6075
- 115 Kovacs, J. ; Kisfaludy, L. ; Ceprini, M. Q. ; Johnson, R. H. *Tetrahedron* **1969**, 25, 2555-2573
- 116 Gawne, G. ; Kenner, G. W. ; Sheppard, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 5669-5671
- 117 Castro, B. ; Dormoy, J.-R. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1973**, 12, 3359-3361
- 118 Castro, B. ; Dormoy, J.-R. ; Evin, G. ; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 14, 1219-1222
- 119 Castro, B. ; Dormoy, J.-R. ; Evin, G. ; Selve, C. *J. Chem. Res. (S)* **1977**, 182
- 120 Knorr, R. ; Trzeciak, A. ; Bannwarth, W. ; Gillessen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927-1930
- 121 Nahm, S. ; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3815-3818

- 122 Fehrentz, J.-A. ; Castro, B. *Synthesis* **1983**, 676-678
- 123 Ho, P. T. ; Ngu, K.-Y. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2313-2316
- 124 Guichard, G. ; Briand, J.-P. ; Friede, M. *Pept. Res.* **1993**, 6, 121-124
- 125 Fehrentz, J.-A. ; Pothion, C. ; Califano, J.-C. ; Loffet, A. ; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 48, 9031-9034
- 126 Rodriguez, M. ; Llinares, M. ; Doulut, S. ; Heitz, A. ; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 923-926
- 127 Wen, J. J. ; Crews, C. M. *Tetrahedron : asymmetry* **1998**, 9, 1855-1858
- 128 Mancuso, A. J. ; Huang, S.-L. ; Swern, D. *CJ. Org. Chem.* **1978**, 43, 2480-2482
- 129 Seyden-Penne, J. *Reductions by the Alumino- and Borohydrides in Organic Synthesis* (Curran, D. P., Ed.) Wiley-VCH, 141-142
- 130 Neighbors, D. W. ; Foster, A. L. ; Clark, S. M. ; Miller, J. E. ; Bailey, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1922**, 44, 1557-1564
- 131 Poth, E. J. ; Bailey, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1923**, 45, 3001-3008
- 132 Abdel-Magid, A. F. ; Carson, K. G. ; Harris, B. D. ; Maryanoff, C. A. ; Shah, R. D. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 3849-3862
- 133 Borch, R. F. ; Durst, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 3996-3997
- 134 Borch, R. F. ; Bernstein, M. D. ; Durst, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2897-2904
- 135 Boussard, G. ; Marraud, M. ; Aubry, A. *Biopolymers* **1979**, 18, 1297-1331
- 136 Boussard, G. ; Cung, M. T. ; Marraud, M. ; Néel, J. *J. Chim. Phys.* **1974**, 71, 1159-1166
- 137 Milner-White, E. J. *J. Mol. Biol.* **1990**, 216, 385-397
- 138 Némethy, G. ; Scheraga, H. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, 95, 320-327
- 139 Chou, P. Y. ; Fasman, G. D. *J. Mol. Biol.* **1977**, 115, 135-175
- 140 Rose, G. D. *Nature* **1978**, 272, 586-590
- 141 Toniolo, C. ; Benedetti, E. *Macromolecules* **1991**, 24, 4004-4009
- 142 Stickle, D. F. ; Presta, L. G. ; Dill, K. A. ; Rose, G. D. *J. Mol. Biol.* **1992**, 226, 1143-1159
- 143 Baker, E. N. ; Hubbard, R. E. *Prog. Biophys. molec. Biol.* **1984**, 44, 97-179
- 144 Aubry, A. ; Abbadi, A. ; Boussard, G. ; Marraud, M. *New J. Chem.* **1987**, 11, 739-744
- 145 Abbadi, A. ; Mcharfi, M. ; Aubry, A. ; Prémilat, S. ; Boussard, G. ; Marraud, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 2729-2735
- 146 Yang, D. ; Ng, F.-F. ; Li, Z.-J. ; Wu, Y.-D. ; Chan, K. W. K. ; Wang, D.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9794-9795
- 147 Yang, D. ; Qu, J. ; Li, B. ; Ng, F.-F. ; Wang, X.-C. ; Cheung, K.-K. ; Wang, D.-P. ; Wu, Y.-D. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 589-590

- 148 Wu, Y.-D. ; Wang, D.-P. ; Chan, K. W. K. ; Yang, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11189-11196
- 149 Zerkout, S. *Thèse Institut National Polytechnique de Lorraine* **1994**
- 150 Chakrabarty, M. ; Khasnobis, S. *Synthetic Communications* **1998**, 28, 1361-1368
- 151 Knapp, S. ; Toby, B. H. ; Sebastian, M. ; Krogh-Jespersen, K. ; Potenza, J. A. *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 2490-2497
- 152 Bouchet, P. ; Elguero, J. ; Jacquier, R. ; Pereillo, J.-M. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1972**, 6, 2264-2271
- 153 Brown, R. F. ; Van Gulick, N. M. ; Schmid, G. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1094-1097
- 154 Buehler, E. *J. Org. Chem.* **1967**, 32, 261-265
- 155 Schechter, I. ; Berger, A. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1967**, 27, 157-162
- 156 Snider, L. G. *Am. Rev. Respir. Dis* **1992**, 146, 1615-1622
- 157 Clore, G. M. ; Gronenborn, A. M. ; Carlson, G. ; Meyer, E. F. *J. Mol. Biol.* **1986**, 190, 259-267
- 158 Meyer, E. F. ; Clore, G. M. ; Gronenborn, A. M. ; Hansen, H. A. *Biochemistry* **1988**, 27, 725-730
- 159 Bode, W. ; Wei, A.-Z. ; Huber, R. ; Meyer, E. ; Travis, J. ; Neumann, S. *EMBO J.* **1986**, 5, 2453-2458
- 160 Navia, M. A. ; McKeever, B. M. ; Springer, J. P. ; Lin, T.-Y. ; Williams, H. R. ; Fluder, E. M. ; Dorn, C. P. ; Hoogsteen, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 7-11
- 161 Takahashi, L. H. ; Radhakrishnan, R. ; Rosenfield, R. E. ; Meyer, E. F. *Biochemistry* **1989**, 28, 7610-7617
- 162 Mattos, C. ; Giammona, D. A. ; Petsko, G. A. ; Ringe, D. *Biochemistry* **1995**, 34, 3193-3203
- 163 Reboud-Ravaux, M. C. ; Boggetto, N. D. ; Doucet, C. E. ; De Rosny, E. H. ; Vergely, I. B. ; Thierry, N. M. ; Amour, A. J. *J. Pharm. Belg.* **1996**, 51, 161-164
- 164 Maillard, J. L. ; Favreau, C. ; Reboud-Ravaux, M. ; Kobaiter, R. ; Joyeau, R. ; Wakselman, M. *Eur. J. Cell. Biol.* **1990**, 52, 213-218
- 165 Wakselman, M. ; Joyeau, R. ; Kobaiter, R. ; Boggetto, N. ; Vergely, I. ; Maillard, J. ; Okochi, V. ; Montagne, J.-J. ; Reboud-Ravaux, M. *FEBS Lett.* **1991**, 282, 377-381
- 166 Joyeau, R. ; Felk, A. ; Guillaume, S. ; Wakselman, M. ; Vergely, I. ; Doucet, C. ; Boggetto, N. ; Reboud-Ravaux, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1996**, 48, 1218-1230
- 167 Vergely, I. ; Laugâa, P. ; Reboud-Ravaux, M. *J. Mol. Graph.* **1996**, 14, 158-167
- 168 Pochet, L. ; Doucet, C. ; Schynts, M. ; Thierry, N. ; Boggetto, N. ; Pirotte, B. ; Jiang, K. Y. ; Masereel, B. ; De Tullio, P. ; Delarge, J. ; Reboud-Ravaux, M. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 2579-2585

- 169 Doucet, C. ; Pochet, L. ; Thierry, N. ; Pirotte, B. ; Delarge, J. ; Reboud-Ravaux, M. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4161-4171
- 170 Amour, A. ; Reboud-Ravaux, M. ; De Rosny, E. ; Abouabdellah, A. ; Bégué, J.-P. ; Bonnet-Delpon, D. ; Le gall, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, 50, 593-600
- 171 Vilain, A. C. ; Pirotte, B. ; Vergely, I. ; Boggetto, N. ; Masereel, B. ; Schynts, M. ; Delarge, J. ; Reboud-Ravaux, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1993**, 45, 466-472
- 172 Amour, A. ; Smaoui, H. ; Heudes, D. ; Reboud-Ravaux, M. *Respiration* **1996**, 63, 277-282
- 173 Powers, J. C. ; Gupton, B. F. *Methods Enzymol.* **1977**, 46, 208-216
- 174 Powers, J. C. ; Boone, R. ; Carroll, D. L. ; Gupton, F. ; Kam, C.-M. ; Nishino, N. ; Sakamoto, M. ; Tuhy, P. M. *J. Bio. Chem.* **1984**, 259, 4288-4294
- 175 Amour, A. ; Collet, A. ; Dubar, C. ; Reboud-Ravaux, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, 43, 297-304
- 176 Johnson, D. ; Travis, J. *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 7142-7144
- 177 McRae, B. ; Nakajima, K. ; Travis, J. ; Powers, J. C. *Biochemistry* **1980**, 19, 3973-3978
- 178 Zimmerman, M. ; Ashe, B. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 480, 241-245
- 179 Goodman, M. ; Levine, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 2918-2922
- 180 Antonovics, I. ; Young, G. T. *J. Chem. Soc. (C)* **1967**, 591-601
- 181 Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398
- 182 Carpino, L. A. ; El-Faham, A. ; Minor, C. ; Albericio, F. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201-203
- 183 Angell, Y. M. ; Garcia-Echeverria, C. ; Rich, D. H. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5981-5984
- 184 Neimark, J. ; Briand, J.-P. *Pept. Res.* **1993**, 6, 219-228
- 185 Fields, C. G. ; Fields, G. B. *Methods in Molecular Biology* **1994**, 35, 29-40
- 186 Pugh, K. C. ; York, E. J. ; Stewart, J. M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, 40, 208-213
- 187 Reid, G. E. ; Simpson, R. J. *Analytical Biochemistry* **1992**, 200, 301-309
- 188 Kaiser, E. ; Colescott, R. L. ; Bossinger, C. D. ; Cook, P. I. *Analytical Biochemistry* **1970**, 34, 595-598
- 189 Hancock, W. S. ; Battersby, J. E. *Analytical Biochemistry* **1976**, 71, 260-264
- 190 DeGrado, W. F. ; Kaiser, E. T. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1295-1300
- 191 Lobl, T. J. ; Maggiora, L. L. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 1979-1982
- 192 Kaiser, E. T. ; Mihara, H. ; Laforet, G. A. ; Kelly, J. W. ; Walters, L. ; Findeis, M. A. ; Sasaki, T. *Science* **1989**, 243, 187-192
- 193 Sasaki, T. ; Findeis, M. A. ; Kaiser, E. T. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 3159-3168
- 194 Ösapay, G. ; Profit, A. ; Taylor, J. W. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 6121-6124

- 195 Nishino, N. ; Xu, Ming ; Mihara, H. ; Fujimoto, T. ; Ohba, M. ; Ueno, Y. ; Kumagai, H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 180-181
- 196 Christensen, T. *Peptides Structure and Biological Function* (Gross, E. ; Maienhofer, J., Eds) Pierce Chemical Co. : Rockford, **1979**, 385-388
- 197 Lansbury, P. T. ; Hendrix, J. C. ; Coffman, A. I. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4915-4918
- 198 Hendrix, J. C. ; Jarrett, J. T. ; Anisfeld, S. T. ; Lansbury, P. T. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3414-3420
- 199 Aue, W. P. ; Bartholdi, E. ; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2229-2246
- 200 Braunschweiler, L. ; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* **1983**, 53, 521-528
- 201 Bax, A. ; Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* **1985**, 65, 355-360
- 202 Jeener, J. ; Meier, B. H. ; Bachmann, P. ; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1979**, 71, 4546-4553
- 203 Macura, S. ; Ernst, R. R. *Mol. Phys.* **1980**, 41, 95-117
- 204 Bothner-By, A. A. ; Stephens, R. L. ; Lee, J. ; Warren, C. D. ; Jeanloz, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 811-813
- 205 Bax, A. ; Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* **1985**, 63, 207-213
- 206 Barré-Sinoussi, F. ; Chermann, J. C. ; Rey, F. ; Nugeyre, M. T. ; Chamaret, S. ; Gruest, J. ; Dauguet, C. ; Axler-Blin, C. ; Vézinet-Brun, F. ; Rouzioux, C. ; Rozenbaum, W. ; Montagnier, L. *Science* **1983**, 220, 868-871
- 207 Programme commun des Nations Unies sur le VIH / SIDA, ONUSIDA-OMS, **Décembre 1999**
- 208 De Clercq E. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 2491-2517
- 209 Kohlstaedt L. A. ; Wang, J. ; Friedman, J. M. ; Rice, P. A. ; Steitz, T. A. *Science* **1992**, 256, 1783-1790
- 210 Horwitz, J. P. ; Chua, J. ; Noel, M. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 2076-2078
- 211 Kalland, K.-H. ; Szilvay, A. M. ; Brokstad, K. A. ; Sætrevik, W. ; Haukenes, G. *Mol. Cell Biol.* **1994**, 14, 7436-7444
- 212 Fischer, U. ; Meyer, S. ; Teufel, M. ; Heckel, C. ; Lührmann, R. ; Rautmann, G. *EMBO J.* **1994**, 13, 4105-4112
- 213 Fritz, C. C. ; Zapp, M. L. ; Green, M. R. *Nature* **1995**, 376, 530-533
- 214 Jensen, A. ; Jensen, T. H. ; Kjems, J. *J. Mol. Biol.* **1998**, 283, 245-254
- 215 Kjems, J. ; Calnan, B. J. ; Frankel, A. D. ; Sharp, P. A. *EMBO J.* **1992**, 11, 1119-1129
- 216 Leclerc, F. ; Cedergren, R. ; Ellington, A. D. *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 293-300
- 217 Battiste, J. L. ; Tan, R. ; Frankel, A. D. ; Williamson, J. R. *Biochemistry* **1994**, 33, 2741-2747
- 218 Ippolito, J. A. ; Steitz, T. A. *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 711-717

- 219 Heaphy, S. ; Finch, J. T. ; Gait, M. J. ; Karn, J. ; Singh, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 7366-7370
- 220 Malim, M. H. ; Cullen, B. R. *Cell* **1991**, 65, 241-248
- 221 Mann, D. A. ; Mikaélian, I. ; Zimmell, R. W. ; Green, S. M. ; Lowe, A. D. ; Kimura, T. ; Singh, M. ; Butler, P. J. G. ; Gait, M. J. ; Karn, J. *J. Mol. Biol.* **1994**, 241, 193-207
- 222 Watts, N. R. ; Misra, M. ; Wingfield, P. T. ; Stahl, S. J. ; Cheng, N. ; Trus, B. L. ; Steven, A. C. ; Williams, R. W. *J. Struct. Biol.* **1998**, 121, 41-52
- 223 Kjems, J. ; Sharp, P. A. *J. Virol.* **1993**, 67, 4769-4776
- 224 Stutz, F. ; Rosbash, M. *EMBO J.* **1994**, 13, 4096-4104
- 225 Luo, Y. ; Yu, H. ; Peterlin, B. M. *J. Virol.* **1994**, 68, 3850-3856
- 226 Tange, T. O. ; Jensen, T. H. ; Kjems, J. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 10066-10072
- 227 Petersen-Mahrt, S. K. ; Estmer, C. ; Öhrmalm, C. ; Matthews, D. A. ; Russell, W. C. ; Akusjärvi, G. *EMBO J.* **1999**, 18, 1014-1024
- 228 Yu, L. ; Zhang, Z. ; Lowenstein, P. M. ; Desai, K. ; Tang, Q. ; Mao, D. ; Symington, J. S. ; Green, M. *J. Virol.* **1995**, 69, 3007-3016
- 229 Yu, L. ; Lowenstein, P. M. ; Zhang, Z. ; Green, M. *J. Virol.* **1995**, 69, 3017-3023
- 230 Jiang, J. ; Zhang, Y. ; Krainer, A. R. ; Xu, R.-M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 3572-3577
- 231 Blondelle, S. E. ; Houghten, R. A. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, 41, 522-527
- 232 Stewart, J. M. *Methods in Enzymology* **1997**, 289, 29-44
- 233 Yajima, H. ; Fujii, N. ; Ogawa, H. ; Kawatani, H. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1974**, 107-108
- 234 Yajima, H. ; Fujii, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 5867-5871
- 235 Tam, J. P. ; Heath, W. F. ; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5242-5251
- 236 Noyori, R. ; Murata, S. ; Suzuki, M. *Tetrahedron* **1981**, 37, 3899-3910
- 237 Ono, S. ; Kiyama, S. ; Futaki, S. ; Nakamura, T. ; Taike, T. ; Akita, T. ; Sumi, S. ; Inoue, K. ; Fujimura, M. ; Tobe, T. ; Yajima, H. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, 33, 29-38
- 238 Pennington, M. W. *Methods in Molecular Biology* **1994**, 35, 41-62
- 239 Ramachandran, J. ; Li, C. H. *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 4006-4009
- 240 Wade, J. D. ; Bedford, J. ; Sheppard, R. C. ; Tregear, G. W. *Pept. Res.* **1991**, 4, 194-199
- 241 Ramage, R. ; Green, J. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2287-2290
- 242 Green, J. ; Ogunjobi, O. M. ; Ramage, R. ; Stewart, A. S. J. ; McCurdy, S. ; Noble, R. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4341-4344
- 243 King, D. S. ; Fields, C. G. ; Fields, G. B. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 36, 255-266
- 244 Gisin, B. F. ; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 3102-3106

- 245 Dimarchi, R. D. ; Tam, J. P. ; Kent, S. B. H. ; Merrifield, R. B. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, 19, 88-93
- 246 Shimonishi, Y. ; Sakakibara, S. ; Akabori, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1962**, 35, 1966-1970
- 247 Bodanszky, M. ; Kwei, J. Z. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, 12, 69-74
- 248 Dimarchi, R. D. ; Tam, J. P. ; Merrifield, R. B. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, 19, 270-279
- 249 Bedford, J. ; Hyde, C. ; Johnson, T. ; Jun, W. ; Owen, D. ; Quibell, M. ; Sheppard, R. C. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, 40, 300-307
- 250 Van Woerkom, W. J. ; Van Nispen, J. W. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 19, 103-113
- 251 Feinberg, R. S. ; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 3485-3496
- 252 Tam, J. P. ; Heath, W. F. ; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 6442-6455
- 253 Stewart, J. M. ; Young, J. D. *Solide Phase Peptide Synthesis* Freeman, W. H. and Company : San Francisco, **1984**, 42-43
- 254 Sakakibara, S. ; Shin, K. H. ; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 4921-4928
- 255 Lenard, J. ; Hess, G. P. *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 3275-3281
- 256 Gaboriaud, C. ; Bissery, V. ; Benchetrit, T. ; Mornon, J.-P. *FEBS Lett.* **1987**, 224, 149-155
- 257 Lemesle-Varloot, L. ; Henrissat, B. ; Gaboriaud, C. ; Bissery, V. ; Morgat, A. ; Mornon, J.-P. *Biochimie* **1990**, 72, 555-574
- 258 Albrand, J. P. ; Birdsall, B. ; Feeney, J. ; Roberts, G. C. K. ; Burgen, A. S. V. *Int. J. Biol. Macromol.* **1979**, 1, 37-41
- 259 Clore, G. M. ; Gronenborn, A. M. *J. Magn. Reson.* **1982**, 48, 402-417
- 260 Clore, G. M. ; Gronenborn, A. M. *J. Magn. Reson.* **1983**, 53, 423-442
- 261 Still, W. C. ; Kahn, M. ; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2925

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur CHASSAING Gérard, Professeur, Université Pierre et Marie Curie Paris 6,
Madame VIDAL Joëlle, Professeur, ENS Lyon.**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur THEVENET Laurent

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Pseudopeptides dérivés d' α -aminoxy acides : synthèses et structures. Application à des
inhibiteurs de l'élastase leucocytaire humaine".**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **" GENIE DES PROCEDES "**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDOEUVRE CEDEX

Fait à Vandoeuvre le, **14 septembre 2000**

Le Président de l'I.N.P.L.,

J. HARDY



Pseudopeptides dérivés d' α -aminoxy acides : synthèses et structures.

Application à l'inhibition de l'élastase leucocytaire humaine.

Nous avons étudié des pseudopeptides comportant un motif hydroxamide $\psi[\text{CO-NH-O}]$: les amidoxy peptides. Ces derniers possèdent des propriétés structurales intéressantes et similaires aux hydrazide peptides $\psi[\text{CO-NH-NH}]$: ils induisent un pseudorepliement γ très stable. Le motif amidoxy est, par ailleurs, introduit par simple couplage peptidique en substituant un acide α -aminé par un α -aminoxy acide. Les amidoxy peptides sont donc *a priori* susceptibles de remplacer les hydrazide peptides quand la synthèse de ces derniers s'avère délicate en phase homogène comme sur support solide.

Un α -aminoxy acide donne naissance à deux autres familles pseudopeptidiques : les oxime peptides $\psi[\text{CH=N-O}]$ obtenus par couplage de la fonction aminoxy avec un α -amino aldéhyde et les amidoxy peptides réduits $\psi[\text{CH}_2\text{-NH-O}]$ formés après réduction du lien oxime. Ce dernier peut exister sous les configurations Z et E. Seuls les (Z)-oxime peptides présentent une structure intrinsèque intéressante : un pseudorepliement β . Les (Z)-oxime peptides n'ont pu être séparés des isomères E. Quant aux amidoxy peptides réduits, bien qu'ils soient peu structurés, ils présentent l'intérêt de ne pas être protonés au pH physiologique et constituent donc des mimes potentiels de l'intermédiaire réactionnel de l'hydrolyse enzymatique.

Nous avons d'une part synthétisé des inhibiteurs de l'élastase leucocytaire humaine (ELH), une enzyme dont l'activité non régulée entraîne des maladies comme l'emphysème pulmonaire. Cette étude a permis de préparer des pseudopeptides dérivés d' α -aminoxy acides potentiellement bioactifs. Les tests biologiques ont pu confirmer le comportement semblable des hydrazide et des amidoxy peptides. Nous avons d'autre part étudié l'interaction entre deux protéines Rev et TAP(p32) du virus du SIDA. Nous avons synthétisé des fragments de TAP(p32) susceptibles d'interagir avec Rev pour empêcher cette dernière d'accroître la production de nouveaux virions.

Amide surrogates from α -aminoxy acids : syntheses and structures. Application to human leukocyte elastase inhibitors.

The α -aminoxy acids $\text{NH}_2\text{-O-CHR-CO}_2\text{H}$ are easily obtained as pure enantiomers from the corresponding α -amino acids and can be *N*-coupled to a peptide carboxyl to give the $\psi[\text{CO-NH-O}]$ amidoxy link. IR, $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy, and X-ray diffraction experiments on model dipeptides show that the amidoxy link gives rise to a very stable γ -like turn. The $\psi[\text{CO-NH-NH}]$ hydrazide link and the amidoxy link induce quite similar folded structure but, contrary to the hydrazino acids, there is no problem of regioselectivity when *N*-acylating aminoxy acids.

Furthermore, the α -aminoxy acids can be *N*-coupled to a peptide aldehyde to give the $\psi[\text{CH=N-O}]$ oxime link. The latter may be further reduced into the $\psi[\text{CH}_2\text{-NH-O}]$ reduced amidoxy link. The Z/E equilibrium of the oxime link has been observed. The (Z)-oxime link induces a very stable β -like folded structure. It must be emphasized that this interesting amide surrogate could not be isolated from the E isomer. Reduced amidoxy peptides adopt a global extended structure. However, contrary to the $\psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$ reduced peptide link, the reduced amidoxy surrogate is not protonated in water under the physiological conditions and can mimic the intermediate of the enzymatic hydrolysis.

On the one hand, potential inhibitors of human leukocyte elastase (HLE) have been synthesized. Chronic inflammatory diseases, such as pulmonary emphysema, are associated with a deficiency of plasmatic inhibitor ($\alpha_1\text{-PI}$) which regulates the HLE. This study indicates that amidoxy and hydrazide analogues have similar biological properties. On the other hand, interaction between the Rev and TAP(p32) proteins of AIDS virus has been studied. Fragments of TAP(p32) have been synthesized in order to inhibit Rev protein and to prevent production of new viruses.