ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER 2
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER 2

Discipline : Chimie Organique, Minérale et Industrielle
Ecole Doctorale : Sciences Chimiques (ED 459)

SYNTHESE ET ETUDE D'ANALOGUES PEPTIDIQUES EN TANT QU'INHIBITEURS DE FUSION DU VIH

Présentée et soutenue publiquement
par

Alice Baron

Le 15 décembre 2010

M. Jean Martinez	Professeur, Université Montpellier I	Président
Mlle. Claire Pierra	Chercheur principal, Idenix, Montpellier	Directeur de thèse
M. Frédéric Lamaty	Directeur de recherche CNRS-Université Montpellier 2	Directeur de thèse
Mme. Anna Maria Papini	Professeur, Université de Florence-Université de Cergy Pontoise	Rapporteur
M. Giang Vo-thanh	Professeur, Université Paris Sud	Rapporteur
M. Pascal Clayette	Responsable du Laboratoire de Neurovirologie BERTIN Pharma	Examinateur
M. Dominique Surleraux	Directeur exécutif, Idenix, Montpellier	Examinateur

Remerciements

Le présent manuscrit représente l'aboutissement de trois années de recherches menées au sein de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron, UFR Sciences et Techniques de l'Université Montpellier 2, dirigé par le Professeur Jean Martinez. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour m'avoir fait l'honneur de m'accueillir dans cet institut.

Ce travail de thèse a été réalisé en collaboration avec les laboratoires Idenix, dans le cadre d'une bourse CIFRE. Mes remerciements s'adressent au Docteur Dominique Surleraux pour m'avoir accueillie au sein de Cap Gamma et pour son soutien dans mon travail de recherche.

Que le Professeur Anna Maria Papini et le Professeur Giang Vo-thanh trouvent ici l'expression de ma vive considération et de ma sincère gratitude pour avoir accepté de juger ce travail.

Que le Docteur Pascal Clayette et le Docteur Dominique Surleraux soient certains de mes sincères remerciements pour l'honneur qu'ils me font de se joindre à ce jury de thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes directeurs de thèse, le Docteur Claire Pierra et le Docteur Frédéric Lamaty. Un grand merci pour leurs conseils avisés, leur soutien, leurs encouragements ainsi que leur disponibilité qui m'ont permis de mener à bien cette thèse.

Je tiens à remercier le Docteur Gilles Gosselin pour ses conseils et sa disponibilité, en particulier lors de la rédaction de ce manuscrit.

Merci également au Docteur Thierry Convard pour les études de modélisation réalisées sur ce projet ainsi que pour ses conseils et sa disponiblité.

Que le Docteur Michel Liuzzi des laboratoires Idenix et le Docteur Pascal Clayette de la société SPI-Bio (BERTIN Pharma) trouvent ici l'expression de mes remerciements pour les évaluations biologiques effectuées sur nos composés.

Je souhaite adresser mes remerciements au Docteur Pascal Verdié pour son expérience et ses conseils pour la synthèse des peptides sur phase solide.

Merci également à Pierre Sanchez et à l'ensemble du Laboratoire de Mesures

Physiques de l'Université Montpellier 2 pour les analyses réalisées sur nos composés.

Au cours de ces trois années, j'ai eu l'opportunité de travailler sur trois sites, je tiens tout d'abord à remercier tous les membres de la faculté de Pharmacie pour leur convivialité et leur gentillesse et tout particulièrement à Anne-Laure et Nadine, pour tous les agréables moments que nous avons partagés.

Je tiens également à associer à ces remerciements tous les membres d'Idenix pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur en particulier lors de la rédaction de ce manuscrit.

Enfin, un grand merci à tous les membres du laboratoire de la faculté des Sciences, permanents, post-doctorants et stagiaires qui ont rendu ces trois années agréables et enrichissantes. Merci en particulier aux doctorants Pierrick, Rosella, Lyudmila, Nawar, Mathieu, Pierre-Yves, Manuel, Charlotte, Thibault, Sofiane, Nikolas, Christophe, Hélène et Emilie avec qui j'ai passé des moments inoubliables.

Je dédie cette thèse à mes parents, à mon frère, et à Benoît, que ce mémoire soit le témoignage de ma profonde reconnaissance pour leur soutien et leur confiance pendant ces années.

Sommaire

Introduction générale 11

Chapitre 1: Le virus de l'immunodéficience humaine et les thérapies anti-VIH 15

I. Le VIH : découverte, structure, génome et cycle de réplication 17
I.A. Découverte du VIH 17
I.B. Structure du VIH-1 17
I.C. Génome du VIH-1 18
I.D. Le cycle de réplication du VIH-1 20
II. Les stratégies thérapeutiques 22
II.A. Les inhibiteurs de la réplication virale 23
II.A .1. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse 23
II.A.1.1. Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (NRTIs et NtRTIs) 23
II.A.1.2. Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTIs) 25
II.A .2. Les inhibiteurs de la protéase (PIs) 26
II.B. Les inhibiteurs de l'intégrase (INIs) 28
II.C. Les inhibiteurs de l'entrée virale 28
II.C .1. Les inhibiteurs de l'attachement 29
II.C .2. Les inhibiteurs des co-récepteurs 29
III. L'étape de fusion 31
III.A. Structure de la gp41 31
III.B. Mécanisme de fusion 31
III.C. Les inhibiteurs de fusion 33
III.C .1. Les inhibiteurs de la région NHR 33
III.C .2. Les inhibiteurs de la région CHR 34
III.C .3. Les D-peptides 35

Chapitre 2: Etude des D-peptides 45

I. Objectifs 47
II. Etude de modélisation moléculaire 47
II.A. Etude du complexe IQN17/D10-P1-2K 48
II.B. Etude de dynamique moléculaire 51

III. Synthèse des D-peptides 53
III.A. Synthèse peptidique sur support solide 54
III.A .1. Principe 54
III.A .2. Supports solides 57
III.A .3. Activation micro-ondes 58
III.A .4. Synthèses automatisées 60
III.B. Synthèse des D-peptides 62
IV. Evaluation biologique des D-peptides 64
IV.A. Evaluation biologique du D-peptide IDX15971 et de ses analogues 65
IV.A .1. Evaluation biologique du D-peptide IDX15971 et des D-peptides issus de l'étude Ala-scan 65
IV.A .2. Influence des extrémités *N*- et *C*-terminales et comparaison des formes cycliques par rapport aux formes linéaires 66
IV.B. Evaluation biologique du D-Peptide IDX16761 et de ses analogues 67
V. Conclusion 68
VI. Stratégie de synthèse 69
VII. Partie expérimentale 71
VII.A. Index des molécules synthétisées 71
VII.B. Conditions Générales 71
VII.C. Synthèse des D-peptides 73
VII.D. Protocoles évaluations biologiques 80
VII.D .1. Protocole évaluation biologique au sein d'Idenix 80
VII.D .2. Protocole évaluation biologique au sein de SPI-Bio 82
VII.E. Protocole des études de stabilité d'IDX15971 83

Chapitre 3: Synthèse d'analogues des D-peptides 89

I. Objectifs 91
II. Analogues rétro, inverso et rétro-inverso du D-peptide IDX15971 92
II.A. Principe et synthèse 92
II.B. Evaluation biologique des séquences rétro, inverso et rétro-inverso 94
III. Synthèse et évaluation biologique des analogues 7-mer 95
IV. Insertion d'analogues de la D-Leu-13 et du D-Trp-10 dans le D-peptide IDX15971 96
IV.A. Choix des cibles, étude de modélisation 97
IV.B. Synthèse d'analogues de la D-Leu-13 et insertion dans le D-peptide IDX15971 99
IV.B .1. Synthèse d'analogues de la D-Leu-13 100

IV.B.1.1. Synthèse *via* l'alkylation par Catalyse par Transfert de Phase (CTP) 101
IV.B.1.1.(i) Principe *101*
IV.B.1.1.(ii) Synthèse d' analogues de la D-Leu-13 ..... *103*
IV.B.1.2. Synthèse *via* la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons 105
IV.B.1.2.(i) Principe *105*
IV.B.1.2.(ii) Synthèse des analogues de la D-Leu-13 ..... *106*
IV.B .2. Réaction de Horner-Wadsworth-Emmons sans solvant 107
IV.B.2.1. Activation mécanique : principe et exemples 108
IV.B.2.1.(i) Principe *108*
IV.B.2.1.(ii) Exemples *110*
IV.B.2.2. Rappels bibliographiques concernant la réaction de HWE sans solvant 112
IV.B.2.3. Résultats et discussion 114
IV.B.2.3.(i) Mise au point de la réaction *115*
IV.B.2.3.(ii) La réaction de HWE *117*
IV.B .3. Synthèse des peptides incorporant les analogues de la D-Leu-13 120
IV.B .4. Evaluation biologique 122
IV.C. Synthèse d'analogues du D-Trp-10 et insertion dans le D-peptide IDX15971 128
IV.C .1. Synthèse d'analogues du D-Trp-10 129
IV.C.1.1. Synthèse *via* l'alkylation de Friedel-Crafts 130
IV.C.1.1.(i) Principe *130*
IV.C.1.1.(ii) Synthèse d' analogues du D-Trp-10 ..... *131*
IV.C.1.2. Synthèse *via* l'alkylation par Catalyse par Transfert de phase (CTP) 132
IV.C .2. Synthèse des peptides incorporant les analogues du D-Trp-10 133
IV.C .3. Evaluation biologique 133
IV.D. Insertion simultanée des analogues de la D-Leu-13 et du D-Trp-10 dans le D-peptide IDX15971 et évaluation biologique 136
V. Insertion des analogues de la D-Leu-13 et du D-Trp-10 dans le D-peptide IDX16761 et évaluation biologique 137
VI. Conclusion 138
VII. Partie expérimentale 140
VII.A. Index des molécules synthétisées 140
VII.B. Conditions générales 145
VII.C. Synthèse d'analogues des D-peptides 146
VII.C .1. Synthèse des intermédiaires et acides aminés protégés *via* la voie alkylation par transfert de phase 146
VII.C .2. Synthèse des intermédiaires et acides aminés protégés *via* la voie HWE 152

VII.C .3. Synthèse des intermédiaires et acides aminés protégés *via* la voie d'alkylation de Friedel-Crafts 160
VII.D. Synthèse d'analogues peptidiques 163

Chapitre 4: Synthèse de pseudopeptides cycliques 187

I. Objectifs 189
II. Synthèse des macrocycles et évaluation biologique des composés 190
II.A. Stratégie de synthèse 190
II.B. Synthèse des macrocycles 191
II.C. Evaluation biologique des macrocycles 193
III. Synthèse de macrocycles par cyclisation/décrochage par métathèse 195
III.A. Réaction de cyclisation/décrochage par métathèse : principe et étude bibliographique 196
III.B. Stratégie de synthèse 198
III.C. Synthèse du linker acide *cis*-5-aminopent-3-énoique (Etape 1) 199
III.C .1. Rappels bibliographiques 199
III.C .2. Nouvelle synthèse du *cis*-Apa 200
III.D. Synthèse des précurseurs linéaires sur phase solide (Etape 2) 203
III.D .1. Stratégie de synthèse 203
III.D .2. Synthèse des précurseurs linéaires 205
III.E. Cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante (Etape 3) 206
III.E .1. Résultats 206
III.E .2. Optimisation par activation micro-ondes 210
IV. Conclusion 211
V. Partie expérimentale 213
V.A. Index des molécules synthétisées 213
V.B. Conditions générales 214
V.C. Synthèse des pentapeptides cycliques par macrolactamisation 215
V.D. Synthèse de pseudopeptides cycliques par cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante 226
V.D.1.1. Synthèse du *cis*-Apa 226
V.D.1.2. Synthèse des pseudopeptides cycliques par cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante 230
V.E. Protocole des études de stabilité d'IDX15921 232

Conclusion générale 237

Liste des abréviations

ACN	Acétonitrile
Ac_2O	Anhydride acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyle
Boc_2O	Di-*tert*-butyldicarbonate
BOP	hexafluorophosphate de 1-Benzotriazol-1-yloxy tris(diméthylamino)phosphonium
Bzl	Benzyle
CC_{50}	Concentration cytotoxique, concentration nécessaire pour réduire de 50% la viabilité des cellules non effectées
CE_{50}	Concentration effective, concentration nécessaire pour réduire de 50% l'effet induit par le virus sur les cellules
CI_{50}	Concentration inhibitrice, concentration inhibant de 50% un paramètre
CPE	Cytopathogen effect : effet cytopathogène
CTP	Catalyseur/catalyse par transfert de phase
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DIC	Diisopropylacarbodiimide
DIEA	Diisopropyléthylamine
DCM	Dichlorométhane
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxide
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DBU	diaza-1,3-bicyclo[5.4.0]undécane
EDT	1,2-éthanedithiol
éq.	Equivalent
ESI	Ionisation électrospray
EWG	Electron withdrawing group : groupement électroattracteur
FCS	Fetal calf serum: serum de veau fétal
Fmoc	9-Fluorénylméthoxycarbonyle
FmocOSu	9-Fluorénylméthoxycarbonyl-N-hydroxysuccinimide
HATU	hexafluorophosphate de 2-(1H-7-Azabenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HBTU	hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HMPA	Hexaméthylphosphoramide

HPLC	Chromatographie liquid haute performance
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
LC/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MeOH	Méthanol
m.o.i	Multiplicity of infection : multiplicité de l'infection
MW	Micro-ondes
NMP	N-méthyl-2-pyrrolidone
PEG	Polyéthylène glycol
Pbf	2,2,4,6,7-pentaméthyldihydrobenzofuran-5-sulfonyle
PS	Polystyrène
RCM	Ring-closing metathesis : métathèse cyclisante
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
R_f	Rapport frontal
SAR	Structure Activity Relationship : Etude de relation structure-activité
SM	Spectrométrie de masse
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise
SPPS	Synthèse de peptide en phase solide
TFE	Trifluoroéthanol
TFA	Acide Trifluoroacétique
TIS	Triisoprorylsilane
TNBS	acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique
Trt	Trityle
UV	Ultra-Violet
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Acides aminés

Ala A	Alanine	Leu L	Leucine
Asp D	Acide aspartique	Lys K	Lysine
Asn N	Asparagine	Met M	Méthionine
Arg R	Arginine	Phe F	Phénylalanine
Cys C	Cystéine	Pro P	Proline
Glu E	Acide glutamique	Ser S	Sérine
Gln Q	Glutamine	Thr T	Threonine
Gly G	Glycine	Trp W	Tryptophane
His H	Histidine	Tyr Y	Tyrosine
Ile I	Isoleucine	Val V	Valine

Introduction générale

Apparu il y a une vingtaine d'années, le Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise (SIDA) s'est considérablement répandu et sa propagation perdure encore aujourd'hui. Les dernières estimations des Nations Unies révèlent qu'en 2008 près de 33,4 millions de personnes vivent avec le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) à travers le monde. Près de 2,7 millions de personnes ont été contaminés par le virus et 2 millions de personnes sont décédés suite aux maladies associées au SIDA, faisant de cette pandémie une des principales causes de mortalité dans le monde.

Durant toutes ces années, des progrès considérables ont été réalisés dans la découverte de nouvelles molécules anti-VIH. La combinaison des inhibiteurs de la transcriptase inverse et de la protéase sous la forme de trithérapie HAART (« Highly Active Antiretroviral Therapy ») a permis de diminuer considérablement la mortalité liée à l'infection par le VIH-1 et d'améliorer la qualité de vie des patients infectés. Cependant, ces traitements, administrés de façon chronique, provoquent à long terme de nombreux effets secondaires. De plus, l'apparition de nouvelles souches virales mutantes multi-résistantes aux anti-rétroviraux observées lors de ces thérapies combinées rend compte de la capacité du virus à s'adapter à son environnement et donc à survivre.

Ainsi, il convient de continuer à compléter les traitements actuels en inhibant le virus lors d'un maximum d'étapes clés de son cycle réplicatif. La découverte des récepteurs et la compréhension du mécanisme d'entrée du virus dans la cellule hôte ont encouragé la recherche de nouveaux inhibiteurs ciblant l'entrée virale. A ce jour, l'Enfuvirtide est le seul inhibiteur d'entrée approuvé en tant qu'inhibiteur de fusion. Bien que ce composé soit un antiviral puissant, il présente néanmoins de sérieuses limitations, son mode d'administration (injection sous cutanée deux fois par jour) et l'émergence de résistances, le classent en agent rétroviral de seconde classe.

La génération de D-peptides inhibiteurs de fusion, résistants aux protéases, constitue une approche alternative prometteuse pour le développement et l'identification d'une nouvelle classe de médicaments anti-VIH.

Basée sur cette approche, cette thèse est consacrée à la synthèse et à l'étude d'analogues peptidiques en tant qu'inhibiteurs de fusion du VIH. Des études de relation structure-activité ont été menées à partir de séquences modifiées et ont conduit à l'obtention d'analogues actifs.

Ces travaux de thèse ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration CIFRE entre les laboratoires Idenix et l'Institut des Biomolécules Max Mousseron. Ce manuscrit présente l'ensemble du projet mené depuis trois ans et s'organise en quatre chapitres.

Tout d'abord, le premier chapitre consiste en une présentation du VIH et des thérapies anti-VIH actuellement utilisées. Le mécanisme de l'étape d'entrée du virus ainsi que les nouveaux D-peptides inhibiteurs de fusion sont détaillés.

Le deuxième chapitre porte sur les caractéristiques essentielles à l'origine de l'activité des D-peptides.

Le troisième chapitre est consacré à la synthèse d'analogues peptidiques et détaille les différentes stratégies de synthèse étudiées ainsi que les résultats des évaluations biologiques.

Enfin, le dernier chapitre présente la synthèse de macrocycles ainsi qu'une nouvelle stratégie de synthèse de peptides cycliques.

Chapitre 1: Le virus de l'immunodéficience humaine et les thérapies anti-VIH

I. Le VIH : découverte, structure, génome et cycle de réplication

I.A. Découverte du VIH

C'est au début des années 80 que les premiers cas suspects de déficiences immunitaires graves parmi les populations homosexuelles américaines ont été recensés. Les études cliniques et épidémiologiques ont rapidement révélé que ce syndrome était causé par un agent infectieux transmis par voie sexuelle et sanguine. A la fin de l'année 1981, une première définition d'un Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise (SIDA) a été établie et un peu plus d'un an après, l'agent causal du SIDA a été identifié par l'équipe du professeur Montagnier comme étant un virus dénomé, depuis 1986, le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). La structure de ce virus, initialement appelé Lymphadenopathy Associed Virus (LAV),[1] présente des caractéristiques proches de celles du Human T cell Lymphotropic Virus (HTLV), découvert par le professeur Gallo en 1980.[2] En 1986, l'équipe du professeur Montagnier identifie un deuxième virus structurellement très proche du VIH-1, le VIH-2 (localisé principalement en Afrique de l'Ouest). Les travaux concernant la découverte du VIH ont été récemment récompensés en 2008 par l'attribution du Prix Nobel de Médecine au Prof Montagnier et au Dr Barré-Sinoussi.

I.B. Structure du VIH-1

Le virus de l'immunodéficience humaine appartient à la famille des *Retroviridae* et au genre *Lentivirus*, caractérisé par une longue période d'incubation et par conséquent par une évolution lente de la maladie. Le VIH-1 est un virus enveloppé à symétrie icosaédrique d'un diamètre variant de 90 à 120 nanomètres (Figure 1). L'enveloppe virale est constituée d'une bicouche lipidique provenant de la cellule hôte dans laquelle sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe constituées de deux sous-unités : la gp120 extramembranaire et la gp41 transmembranaire. Les protéines de matrice sont ancrées sur la face interne de l'enveloppe virale. La capside qui forme le cœur du virus, renferme les enzymes virales (intégrase, transcriptase inverse et protéase) et le génome viral, comprenant deux copies d'ARN simple brin de polarité positive, auxquelles sont associées les protéines de la nucléocapside.

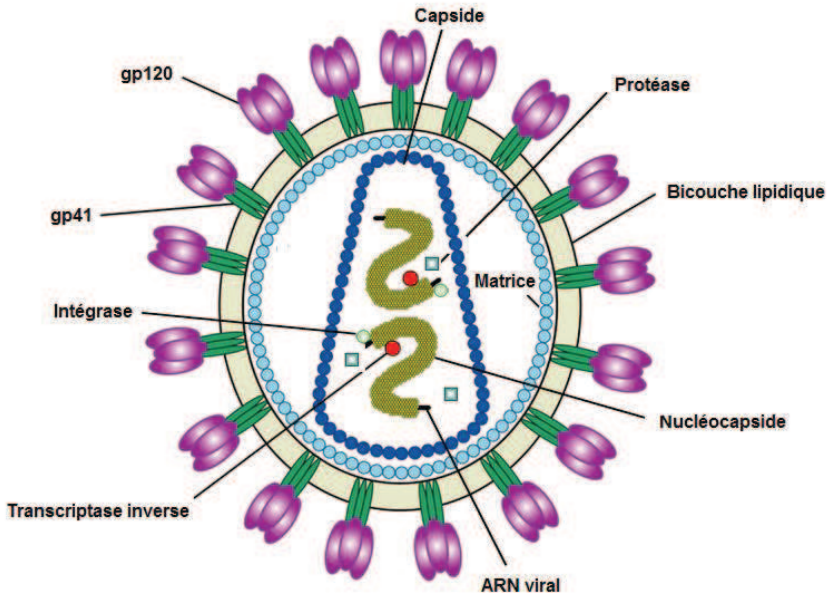


Figure 1. Structure du VIH-1

Source : http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html

I.C. Génome du VIH-1

Le génome du VIH-1 est constitué de deux molécules d'ARN simple brin d'environ 10000 nucléotides de polarité positive. L'ARN viral, coiffé sur l'extrémité 5' et polyadénylé en 3', est encadré par deux courtes séquences répétées R adjacentes aux séquences uniques U5 et U3 présentes, respectivement, aux extrémités 5' et 3' de l'ARN (Figure 2). Dans la cellule hôte, la rétrotranscription de l'ARN viral simple brin en ADN double brin génère une duplication des séquences U5 et U3 qui conduit à la formation de séquences répétées aux deux extrémités du génome viral : les LTR (« Long Terminal Repeat »), constitués des régions U3, R et U5. L'absence d'activité correctrice de la transcriptase inverse induit la génération d'erreurs, responsables du taux élevé de mutations dans l'ADN rétroviral.

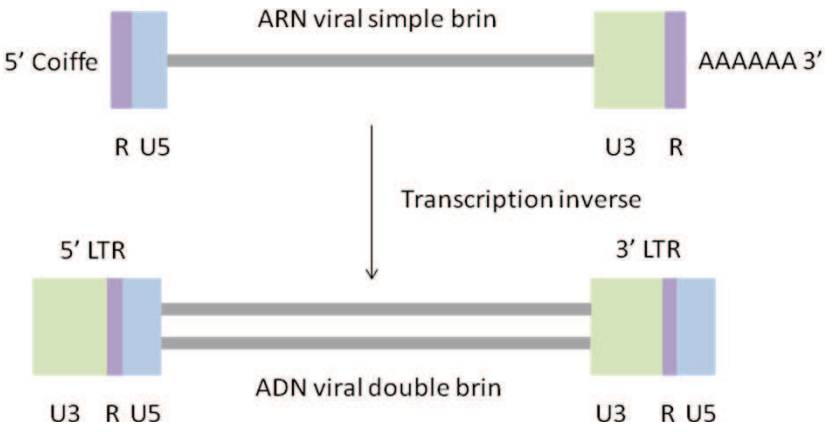


Figure 2. Structure du génome viral

Le génome du VIH-1 code trois familles de protéines : **les protéines de structure**, **les protéines régulatrices**, et **les protéines auxiliaires** (Figure 3).

Les protéines de structure sont codées par les gènes *gag*, *pol* et *env*, communs à tous les rétrovirus.[3] Le gène *gag* (« group-specific antigen ») code le précurseur Gag de 55kDa, ou pr55, dont le clivage par la protéase virale permet la formation de protéines de matrice (MA, p17), de capside (CA, p24), de nucléocapside (NC, p7) et d'un polypeptide p6. Le gène *pol* (« polymerase ») code le précurseur Gag-Pol de 160 kDa, ou pr160, dont le clivage par la protéase virale conduit à l'expression des enzymes virales : la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN). Le gène *env* (« envelope ») code le précurseur glycoprotéique Env ou gp160 qui est clivé par une protéase cellulaire en deux sous-unités : la glycoprotéine d'enveloppe extramembranaire gp120 (SU) et la glycoprotéine d'enveloppe transmembranaire gp41 (TM).

Les protéines régulatrices et **les protéines auxiliaires** interviennent dans le cycle de réplication du VIH. Les gènes *tat* (« transactivator ») et *rev* (« regulator of viral expression)[4] codent pour les protéines régulatrices permettant respectivement de réguler la transcription des gènes et l'expression des protéines virales. Les gènes *nef* (« negative effector), *vif* (« viral infectivity factor»), *vpr* (« viral protein R) et *vpu* (« viral protein U ») codent pour les protéines auxiliaires intervenant à différentes étapes du cycle viral.[5]

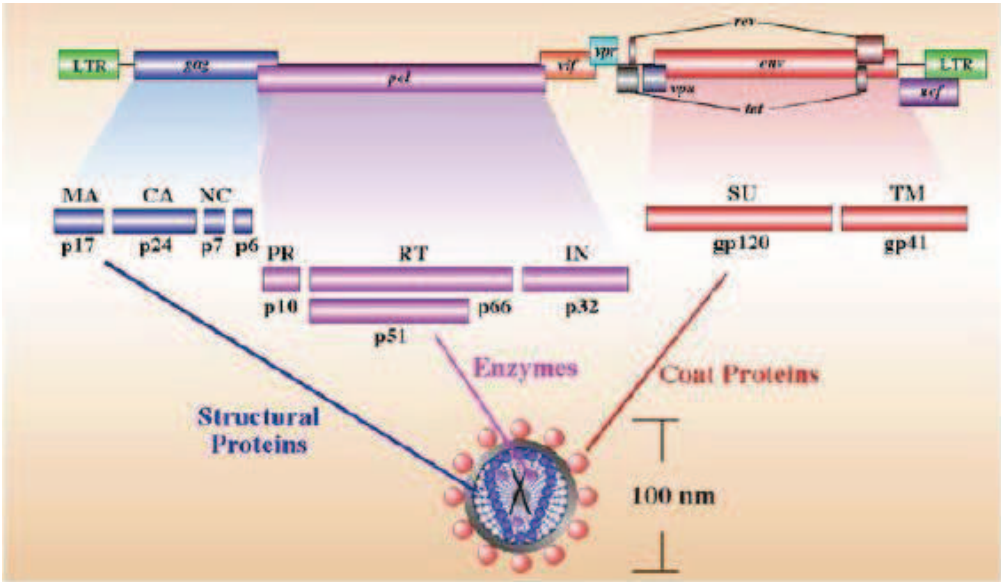


Figure 3. Organisation génomique du VIH-1

Source : http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html

I.D. Le cycle de réplication du VIH-1

Les cellules cibles du VIH-1, telles que les lymphocytes T CD4+, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules microgliales cérébrales, présentent des récepteurs CD4 à leur surface. Le cycle réplicatif du VIH-1 (Figure 4)[6] ne diffère pas de celui des autres rétrovirus et peut être divisé en deux grandes étapes : précoces et tardives.

Etapes précoces

L'entrée du virus dans la cellule s'effectue par une reconnaissance spécifique et forte entre la glycoprotéine d'enveloppe virale gp120 et le récepteur cellulaire CD4.[7] Cette interaction provoque un changement conformationel de gp120 permettant la reconnaissance de régions particulières de cette protéine (boucle V3) par un corécepteur appartenant à la famille des chimiokines CCR5 et/ou CXCR4. Cette deuxième interaction induit une succession de modifications structurales de la glycoprotéine virale gp41, entraînant le rapprochement des membranes, puis la fusion (Le mécanisme de l'étape de fusion est présenté paragraphe III).

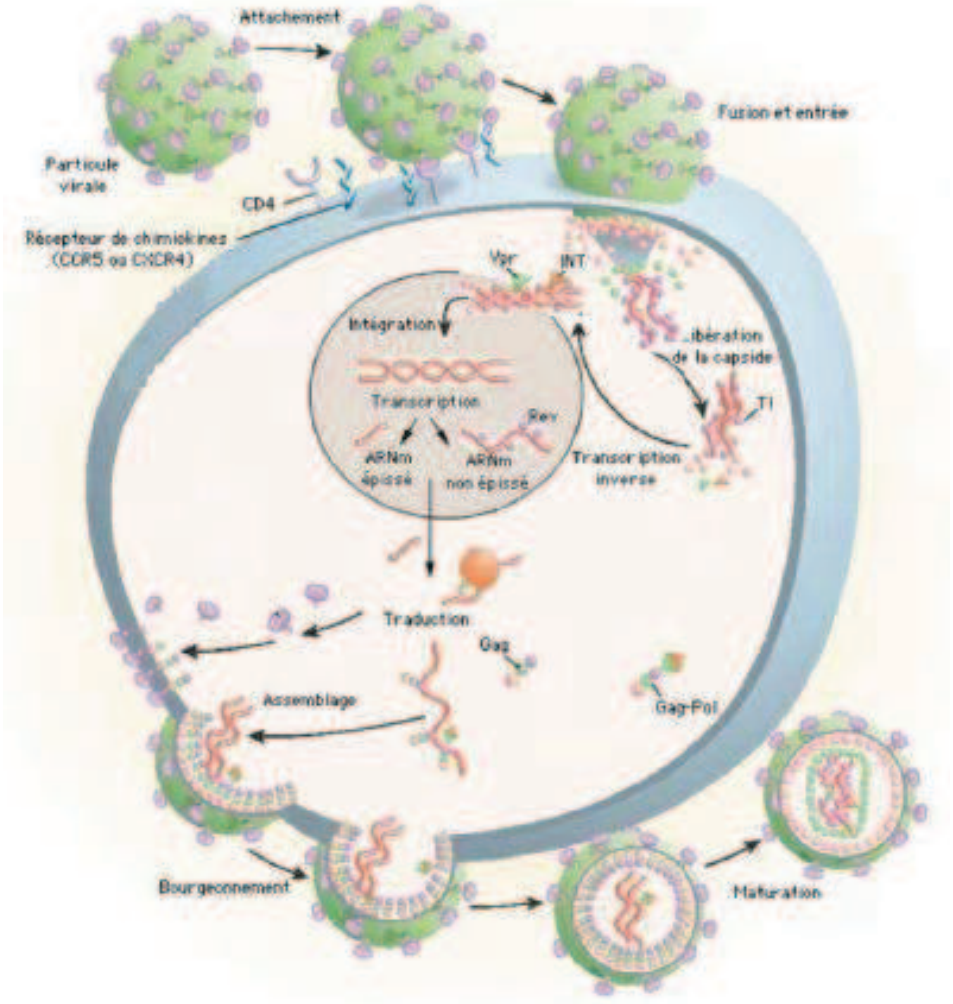


Figure 4. Cycle de réplication du VIH-1

Après un processus de décapsidation, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN double brin linéaire par la transcriptase inverse au sein du complexe RTC (« Reverse Transcription Complex »). L'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule infectée s'effectue sous forme d'un complexe nucléoprotéique appelé complexe de pré-intégration ou PIC (« PreIntegration Complex »), et est catalysé par l'intégrase.

Etapes tardives

La transcription de l'ADN proviral conduit à la synthèse des ARNm viraux qui sont exportés vers le cytoplasme pour y être traduits. La particule virale est assemblée au niveau de la membrane plasmique de la cellule infectée où certains ARNm interagissent avec les précurseurs Gag et Gag-Pol pour former les nucléocapsides. La particule immature

bourgeonne au travers de la membrane plasmique dans laquelle sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe virale. Le clivage des précurseurs Gag et Gag-Pol par la protéase virale permet la formation de particules virales matures capables d'infecter de nouvelles cellules.

II. Les stratégies thérapeutiques

L'analyse du mécanisme de réplication du VIH-1 a permis de développer des molécules dirigées contre des étapes spécifiques du cycle viral. A ce jour, 25 agents antirétroviraux ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis et se répartissent dans sept classes différentes.[8,9]

- Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (NRTIs)
- Inhibiteurs Nucléotidiques de la Transcriptase Inverse (NtRTIs)
- Inhibiteurs Non-Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (NNRTIs)
- Inhibiteurs de la protéase (PIs)
- Inhibiteur de l'intégrase (INIs)
- Inhibiteur des co-récepteurs CCR5 ou CXCR4 (CRIs)
- Inhibiteur de fusion (FIs)

Initialement, les traitements ne comprenaient qu'une seule classe d'inhibiteurs (monothérapie). Cependant, les effets positifs des traitements anti-VIH-1, lorsqu'ils ne comportent qu'un seul inhibiteur de la réplication virale, sont de courte durée du fait de l'émergence rapide de mutations conférant au virus la possibilité de résister aux molécules antirétrovirales. Par contre, chez les patients recevant une combinaison de plusieurs inhibiteurs, le risque de progression vers le SIDA et d'émergence de virus résistants est considérablement diminué. Les traitements antirétroviraux constitués d'une combinaison d'au moins trois inhibiteurs (HAART, « Highly Active Antiretroviral Therapy ») se sont donc généralisés.

Ces traitements consistent en la combinaison d'un inhibiteur de protéase ou d'un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse en association avec deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse.[6,10] Les inhibiteurs d'entrée (inhibiteur des co-récepteurs et inhibiteur de fusion) et les inhibiteurs de l'intégrase sont les dernières classes de composés approuvés par la FDA. Ces agents permettent d'augmenter le nombre de combinaisons médicamenteuses, et ainsi de mieux adapter la thérapie au patient.

II.A. Les inhibiteurs de la réplication virale

Quatre classes d'inhibiteurs se focalisent sur un certain nombre d'étape-clés de la réplication virale. D'une part, les inhibiteurs de la transcriptase inverse, molécules analogues ou non de nucléosides ou nucléotides, permettent de bloquer l'activité de cette enzyme responsable de la synthèse de l'ADN proviral et, d'autre part, les inhibiteurs de la protéase qui miment la structure du substrat originel et empêchent la protéase virale de cliver les précurseurs des protéines constitutives de la capside du virus. Dans les Figures 5 à 10 sont présentés pour chaque classe, les agents thérapeutiques approuvés par la FDA et quelques exemples de composés actuellement en étude clinique.

II.A .1. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Trois classes de médicaments prennent pour cible la transcriptase inverse : les NRTIs, les NtRTIs et les NNRTIs.

II.A.1.1. Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (NRTIs et NtRTIs)

Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse NRTIs sont des composés mimant les nucléosides naturels. Les composés de cette classe d'inhibiteurs ont été les premiers agents antirétroviraux utilisés pour traiter l'infection du VIH. Sept NRTIs sont actuellement utilisés pour le traitement du VIH (Figure 5).[8,9] La Zidovudine (AZT) fut la première molécule efficace utilisée dans la lutte contre le SIDA.[11] Pour être actifs, les NRTIs doivent être phosphorylés par la cellule. Sous forme triphosphorylée, ils s'incorporent à la chaine d'ADN en formation lors de la transcription inverse de l'ARN du virus et en bloquent l'étape d'élongation.[8,12] Ces analogues peuvent cependant être toxiques s'ils interagissent avec les processus naturels de multiplication cellulaire et/ou avec des polymérases cellulaires, notamment l'ADN polymérase mitochondriale γ.

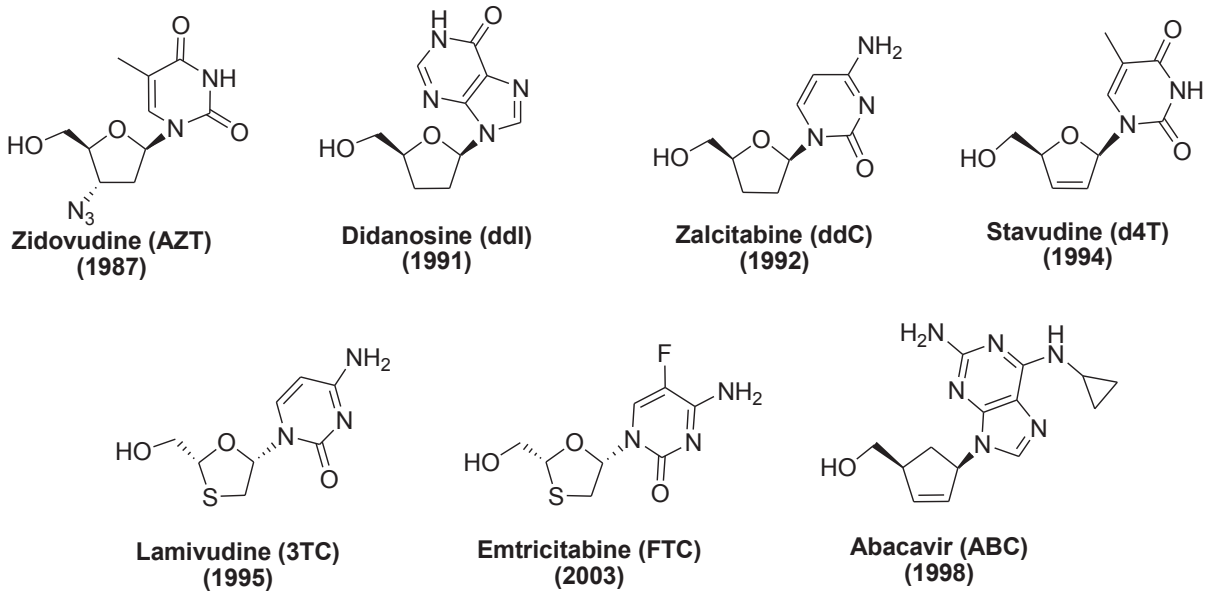


Figure 5. Structures, noms génériques et dates d'approbation des NRTIs

L'objectif majeur dans la conception de nouveaux NRTIs consiste à identifier des composés actifs présentant une toxicité limitée et préservant leur activité face aux souches virales résistantes aux traitements NRTIs actuels. Quatre nouveaux composés sont actuellement en phase clinique II ou III. Il s'agit de l'Apricitabine, le Racivir, mélange 50 :50 des *β*-énantiomères de l'Emtricitabine, l'Amdoxovir et l'Elvucitabine (Figure 6).[8]

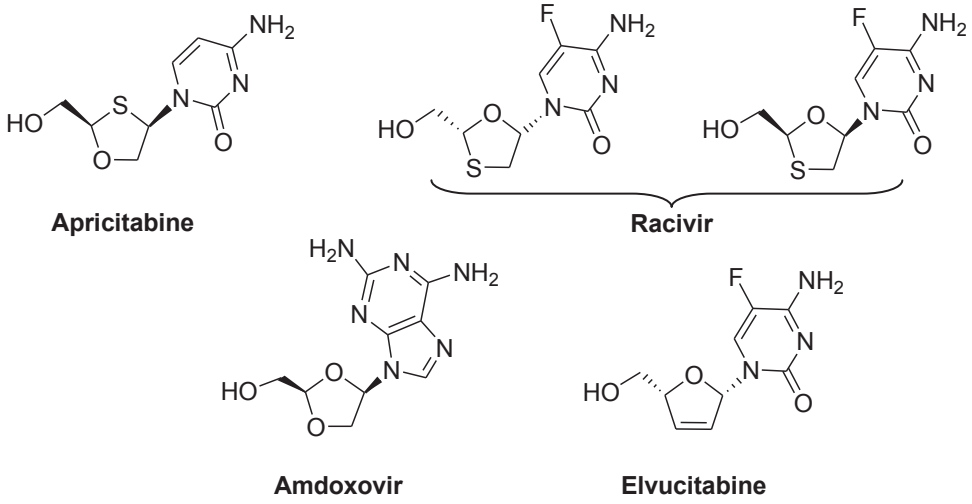


Figure 6. Stuctures des NRTIs en étude clinique

Les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse NtRTIs sont des acyclonucléotides et sont caractérisés par un groupement phosphonate, ce qui diminue le nombre d'étapes d'activation intracellulaire nécessaires pour les rendre actifs. Le Viread ou

fumarate de ténofovir disoproxil[8,9,13,14] est le seul médicament de cette classe ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché. Il est délivré sous forme de prodrogue afin de faciliter son transport cellulaire (Figure 7).[8]

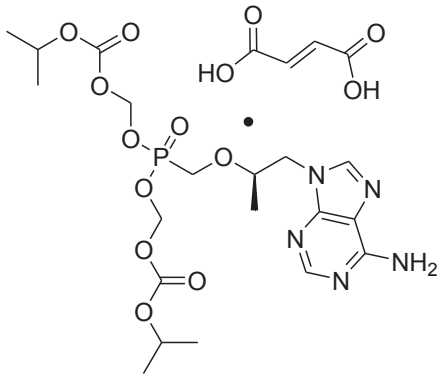


Figure 7. Structure et date d'approbation du Tenofovir

II.A.1.2. Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTIs)

Les inhibiteurs non-nucléosidiques (NNRTIs) ne sont pas des analogues compétitifs des nucléosides. Ils bloquent la synthèse d'ADN viral en se fixant sur d'autres sites que le site actif de la transcriptase inverse, et empêchent ainsi cette enzyme de fonctionner. Les effets secondaires liés à ces composés sont plus faibles sachant qu'ils ciblent uniquement une protéine virale, cette faible toxicité constitue d'ailleurs un de leurs principaux atouts sur le plan thérapeutique.[15] Quatre antirétroviraux sont actuellement prescrits pour cette classe (Figure 8),[8,9] dont l'Efavirenz, inhibiteur le plus souvent utilisé.[16]

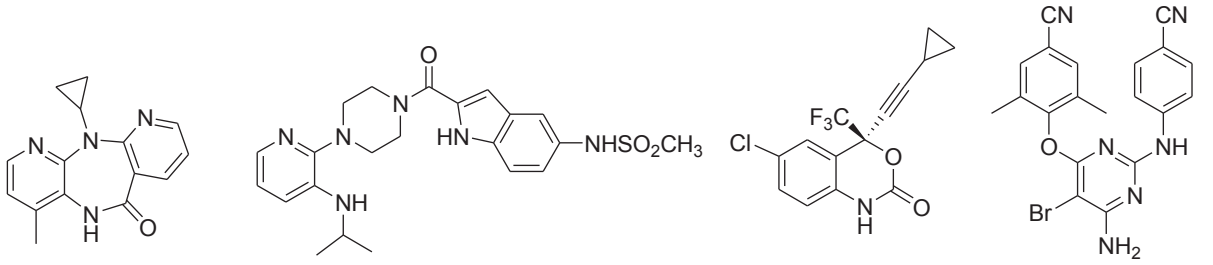


Figure 8. Structures, noms génériques et dates d'approbation des NNRTIs

La Rilpivirine est un dérivé de diarylpyrimidine qui fait partie de la seconde génération de NNRTIs, ainsi que quatre autres hétérocycles dont le composé IDX899 développé au sein des laboratoires Idenix. Ces composés sont actuellement en phase clinique

II ou III (Figure 9).[8,16,17]

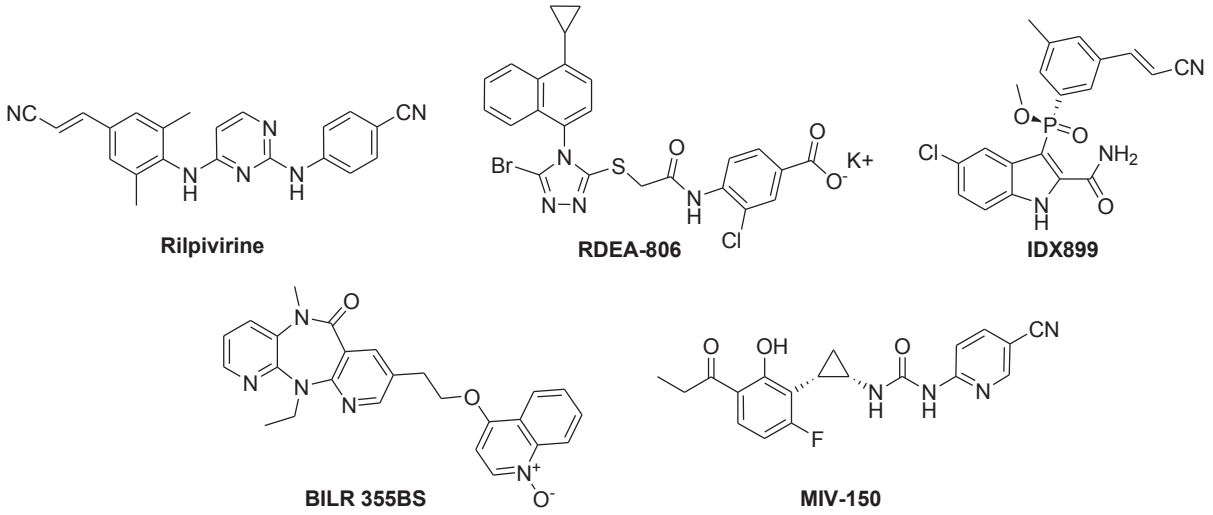


Figure 9. Stuctures des NNRTIs en étude clinique

II.A .2. Les inhibiteurs de la protéase (PIs)

La protéase participe à la synthèse des protéines virales, en clivant notamment les polyprotéines Gag et Gag-Pol en composants protéiques individuels. Les inhibiteurs de la protéase sont des analogues structuraux des séquences peptidiques clivées par la protéase. En se fixant au site catalytique de la protéase, ils bloquent de façon sélective et réversible son activité protéolytique, indispensable à la production des virus matures et fonctionnels.[18,19] L'ajout des inhibiteurs de protéase à la gamme des traitements antiviraux est à l'origine de progrès importants dans la prise en charge de patients infectés par le VIH. La grande majorité des traitements HAART inclut à présent ces molécules. Dix agents antirétroviraux rentrent actuellement dans cette classe et sont représentés Figure 10.[8,9]

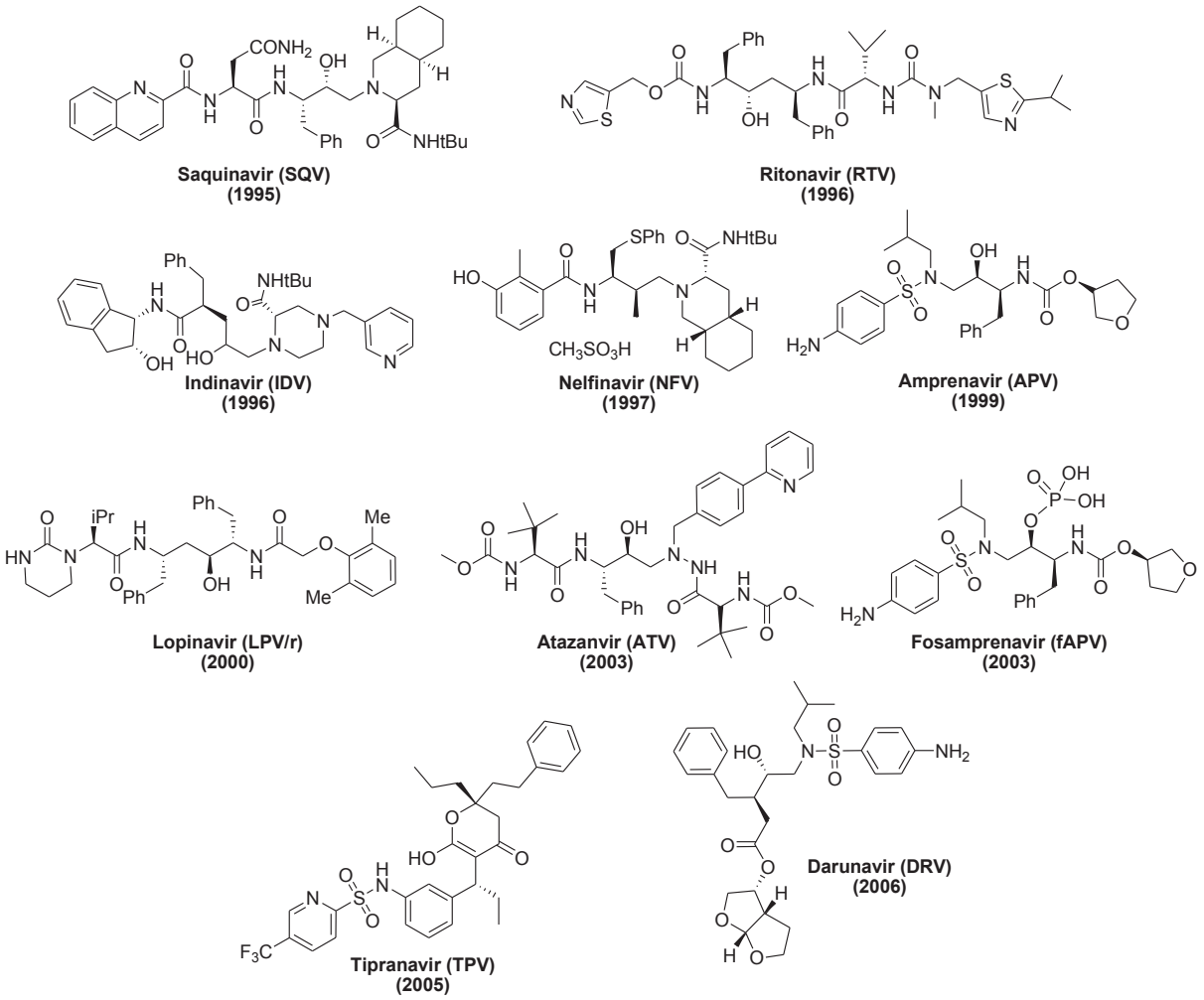
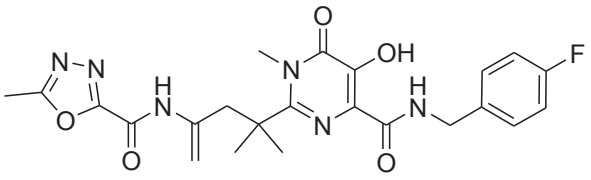


Figure 10. Structures, noms génériques et dates d'approbation des PIs

La combinaison des inhibiteurs de la transcriptase inverse et de la protéase sous la forme de trithérapie HAART a permis de diminuer considérablement la mortalité liée à l'infection par le VIH-1 et d'améliorer la qualité de vie des patients infectés. Cependant, ces traitements administrés de façon chronique, provoquent à long terme de nombreux effets secondaires tels que des désordres métaboliques (hyperglycémie, insulino-résistance, hypercholestérolémie,…) ou de lipodystrophie (redistribution des masses graisseuses).[20] De plus, le virus peut être intégré dans les lymphocytes T formant un réservoir de cellules mémoires ne pouvant pas être ciblé par des molécules antivirales.[21] Et enfin, l'apparition de nouvelles souches virales mutantes multi-résistantes aux anti-rétroviraux observée lors de ces thérapies combinées rend cette approche délicate dans son application à long terme.[22] Ainsi, il convient de continuer à compléter les traitements actuels en bloquant le virus lors d'un maximum d'étapes clés de son cycle réplicatif.

II.B. Les inhibiteurs de l'intégrase (INIs)

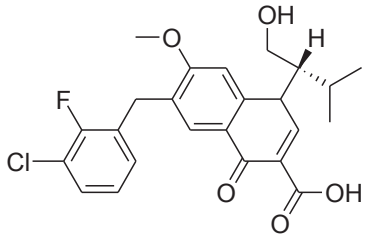
L'intégrase est une enzyme spécifique au VIH qui permet à l'ADN proviral de s'intégrer dans l'ADN génomique cellulaire, une étape cruciale pour la persistance du virus. Cette enzyme est devenue ces dernières années une cible prometteuse dans la recherche de nouveaux antirétroviraux. Actuellement le Raltegravir est le premier inhibiteur de l'intégrase rentrant dans un traitement anti-VIH (Figure 11). [8,9]



Raltegravir (RAL)
(2007)

Figure 11. Structure et date d'approbation du Raltegravir

D'autres composés font également l'objet d'études cliniques, dont l'Elvitegravir, actuellement en phase III (Figure 12).[8]



Elvitegravir

Figure 12. Stucture de l'Elvitegravir

II.C. Les inhibiteurs de l'entrée virale

Les effets secondaires liés à l'usage d'inhibiteurs de la réplication virale, la découverte des récepteurs et la compréhension du mécanisme d'entrée du virus dans la cellule hôte ont encouragé la recherche sur de nouveaux inhibiteurs de l'entrée virale. Trois classes de composés ciblent cette étape : les inhibiteurs de l'attachement, les inhibiteurs des co-récepteurs et les inhibiteurs de fusion.[23,24] Actuellement, les inhibiteurs des co-récepteurs et les inhibiteurs de fusion sont les deux classes présentant un agent anti-VIH approuvé par la FDA. Les exemples des composés discutés ci-après sont non exhaustifs, le choix s'est porté sur ceux les plus cités au travers différentes revues parues récemment.[8,24,25,26]

II.C .1. Les inhibiteurs de l'attachement

Diverses stratégies permettent d'inhiber l'interaction CD4-gp120. Ainsi les inhibiteurs de l'attachement tels que les composés BMS-378806 ou BMS-488043 (Figure 13)[24] ciblent une région de gp120 qui empêche la reconnaissance entre la glycoprotéine virale et le récepteur CD4. Le composé BMS-378806 est actuellement en phase II d'étude clinique.

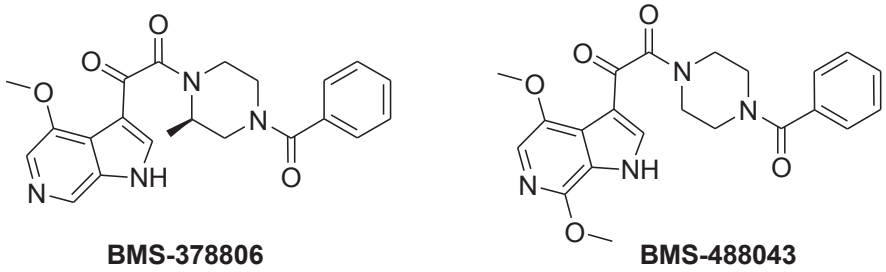


Figure 13. Structure des inhibiteurs de l'interaction CD4-gp120

L'utilisation d'anticorps a également été exploré, cependant les mécanismes régissant la neutralisation virale restent encore flou. L'anticorps monoclonal TNX-355 ne bloque pas l'interaction CD4-gp120 mais plutôt les changements conformationnels de gp120 induits par la fixation à CD4. Cet agent est actuellement en phase II d'étude clinique.[24,26]

II.C .2. Les inhibiteurs des co-récepteurs

La découverte du rôle joué par les co-récepteurs CCR5 et CXCR4 dans l'infection virale a ouvert la voie vers la conception de nouvelles stratégies antivirales. Actuellement, seul le Maraviroc (Figure 14),[8,9] inhibiteur de faible poids moléculaire, est utilisé dans les traitements anti-VIH en tant qu'antagoniste du corécepteur CCR5.

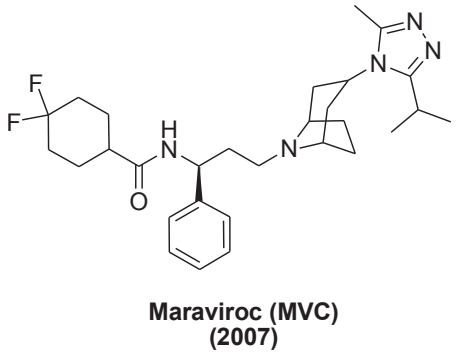


Figure 14. Structure et date d'approbation du Maraviroc

D'autres composés font également l'objet d'études cliniques, dont le Vicriviroc (Figure 15), composés de la même classe, qui est en phase III, et le composé PSC-RANTES, appartenant à la famille de ligand naturel des *β*-chimiokines, actuellement en développement en tant qu'agent microbicide.[24]

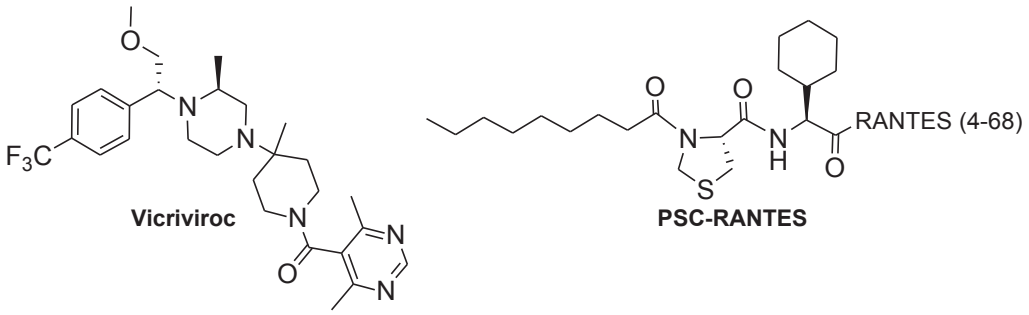


Figure 15. Structures du Vicriviroc et de PSC-RANTES

Plusieurs antagonistes de CXCR4 ont également été décrits, notamment le composé AMD070 (Figure 16)[8] qui présente la propriété d'être cationique et de pouvoir se fixer sur les régions anioniques de CXCR4. Ce composé de faible poids moléculaire est actuellement en phase II d'études cliniques.

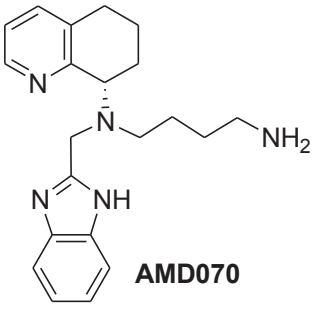


Figure 16. Structure de AMD070

Par ailleurs, des anticorps monoclonaux dirigés contre les co-récepteurs ont également été utilisés pour tenter de limiter l'entrée du virus. Parmi les anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur CCR5, le PRO-140 a montré un effet inhibiteur sur la liaison de gp120 sur CCR5 sans bloquer l'activité du ligand CCR5. Cet agent est actuellement en phase II d'études cliniques.[24]

III. L'étape de fusion

La fusion de gp41 avec la membrane de la cellule hôte est une étape décisive de l'entrée du VIH dans les cellules cibles. La compréhension de ce processus a permis d'envisager la conception de nouveaux agents thérapeutiques dans la lutte anti-VIH.

III.A. Structure de la gp41

Structurellement, la glycoprotéine virale gp41 est constituée de domaines extracellulaires, transmembranaires (TM) et cytoplasmiques (CT) (Figure 17).[27] Son domaine extracellulaire (ectodomaine) contient 3 principales régions fonctionnelles : un peptide de fusion hydrophobe (FP), une région N-terminale « N-terminal heptad region » (NHR, HR1) et une région C-terminale « C-terminal heptad region » (CHR, HR2). Les extrémités NHR et CHR sont constituées de séquences d'acides aminés hydrophobes prédisposées à former des hélices α au cours de l'étape de fusion.[27,28,29]

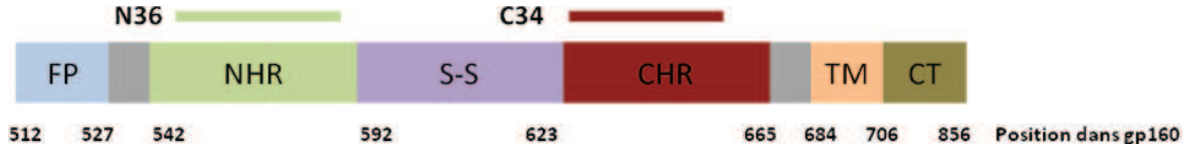


Figure 17. Structure de gp41

III.B. Mécanisme de fusion

Lors de l'approche du virus vers la cellule hôte, la reconnaissance s'effectue par des interactions spécifiques entre la glycoprotéine virale gp120 et les récepteurs cellulaires CD4, ce qui déclenche l'activation de la fusion. Ces interactions induisent un changement conformationel de gp120, libérant gp41 et activant le processus de fusion membranaire (Figure 18).[30] A ce stade, gp41 adopte une conformation active étendue et ancre le peptide de fusion (FP) dans la membrane de la cellule hôte formant l'intermédiaire « prehairpin ». Les membranes virale et cellulaire sont liées. Par la suite, les régions *N*- et *C*-terminales (NHR et CHR) de gp41 se replient de manière antiparallèle et forment l'intermédiaire « hairpin », hautement stable. Cet intermédiaire fusogène induit le rapprochement des membranes puis la fusion.[31]

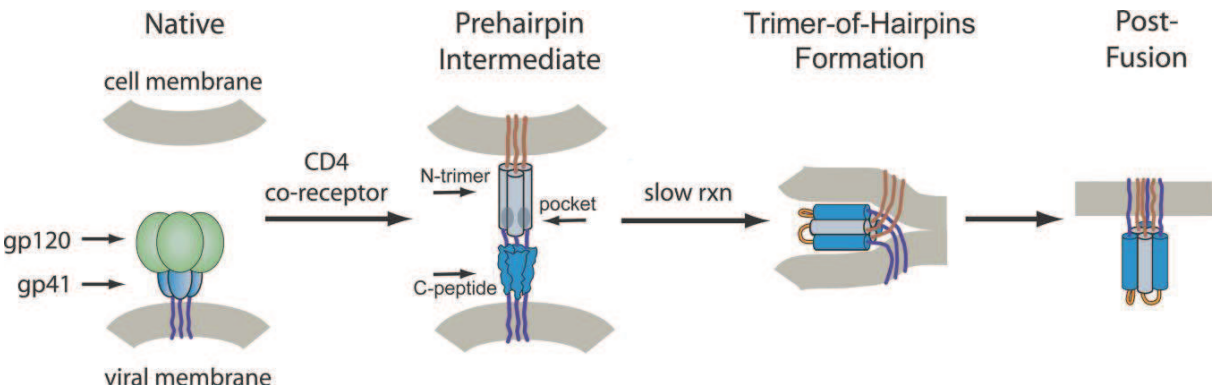


Figure 18. Mécanisme de l'étape de fusion

Des études cristallographiques décrivent la structure de l'intermédiaire « hairpin » comme un assemblage de 6 hélices α (« six-helix bundle ») (Figure 19).[32] Trois hélices α de la région NHR forment un trimère central « coiled coil »[32,33] présentant à la surface trois poches hydrophobes symétriques. Ce trimère central est enveloppé par trois hélices α de la région CHR regroupées de façon antiparallèle autour des parties NHR. Pour chaque hélice C, trois résidus (Trp-628, Trp-631 et Ile-635) sont insérés dans chaque poche hydrophobe du trimère N.[32,34,35]

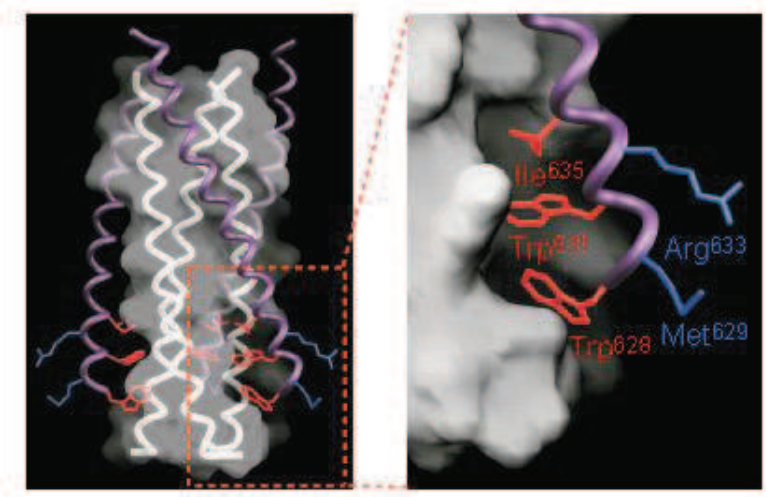


Figure 19. Structure cristallographique de l'intermédiaire « hairpin » N36/C34

III.C. Les inhibiteurs de fusion

Les inhibiteurs de fusion ont pour rôle d'interagir avec les extrémités NHR ou CHR de gp41 au stade « prehairpin », inhibant la formation de l'intermédiaire « hairpin » et bloquant ainsi la fusion. Ces composés sont principalement des peptides, dérivés respectivement des extrémités NHR ou CHR (Figure 20).[34]

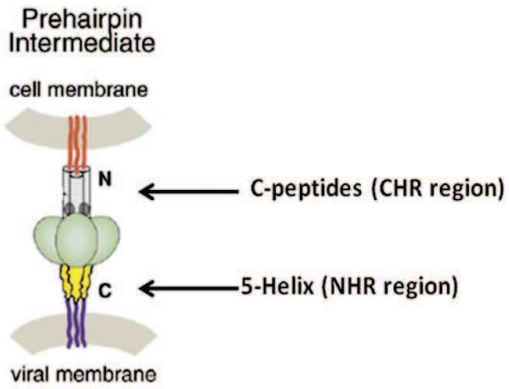


Figure 20. Modèle de l'intermédiaire « prehairpin » avec inhibiteurs

III.C .1. Les inhibiteurs de la région NHR

Le composé Enfuvirtide (T20, Fuzeon, Trimeris/Roche)[25] fut le premier inhibiteur d'entrée approuvé par la FDA en 2003 pour le traitement de l'infection par le VIH. Cette molécule est un peptide de 36 acides aminés (Figure 21) mimant la région CHR de gp41 (résidus 127-162 du CHR) et se fixant sur la région NHR. Bien que ce composé soit un antiviral puissant présentant un effet synergique avec les autres traitements HAARTs, il présente néanmoins de sérieuses limitations. En effet, son mode d'administration (injection sous cutanée deux fois par jour) et l'émergence de résistances, limitent ses applications et le classent en agent rétroviral de seconde classe.[25]

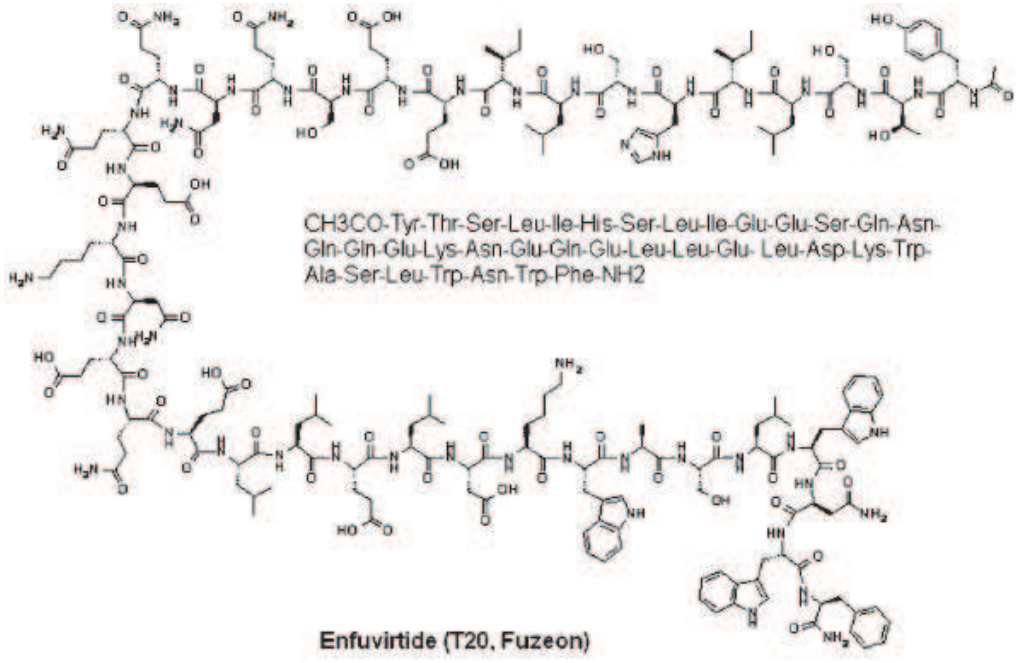


Figure 21. Structure de Enfuvirtide

De nouvelles générations de C-peptides (T-1249, T-2635, T-267221, T-267227) ont montré des propriétés pharmacodynamiques et thérapeutiques meilleures que l'agent Enfuvirtide.[25,36,37] Cependant, ces composés étant dégradés par les protéases, leur mode d'administration reste néanmoins limité, ce qui représente un inconvénient majeur pour une application clinique.

III.C .2. Les inhibiteurs de la région CHR

Le polypeptide « 5-helix », caractérisé par 5 des 6 hélices de l'intermédiaire « hairpin », est un inhibiteur de la région CHR de gp41 (Figure 22).[38]

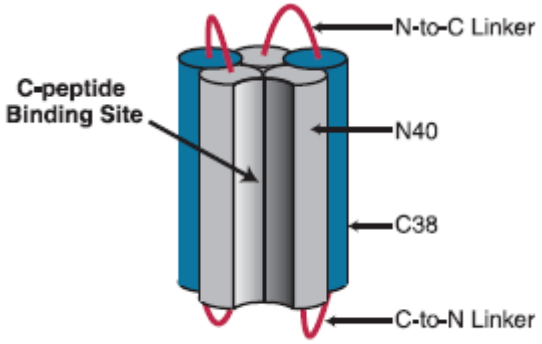


Figure 22. Modèle de la protéine « 5-helix »

Trois hélices de la région NHR et deux hélices de la région CHR sont connectées par un espaceur (Figure 22). L'hélice absente est une hélice de la région CHR avec laquelle peut s'attacher l'extrémité CHR de gp41.[39] Bien que ce polypeptide présente une activité de l'ordre du nanomolaire, il montre cependant les mêmes inconvénients que l'agent Enfuvirtide, à savoir l'impossibilité d'une administration orale et le coût de production.[36]

Sachant que les peptides inhibiteurs de fusion ne peuvent être administrés par voie orale mais seulement par injection, le développement de petites molécules inhibitrices de gp41 devient un challenge. Des analogues triterpènes dérivés de statine, RPR103611 et IC9564 (Figure 23), ont présenté une activité de l'ordre du nanomolaire, cependant leur mécanisme d'action reste encore flou.[25, 36]

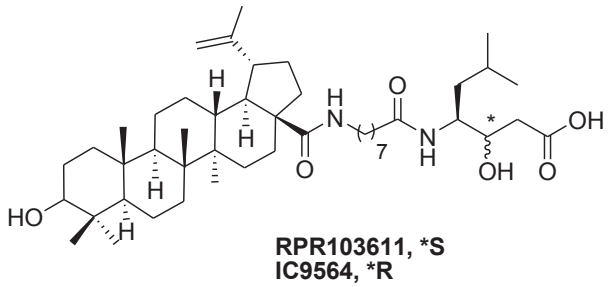


Figure 23. Structures de RPR103611 et IC9546

De plus, dans une stratégie de développement de vaccins, des études ont été menées sur la conception d'antigènes restreints mimant l'environnement stérique du N-trimer et capables d'induire des anticorps actifs.[40]

III.C .3. Les D-peptides

Une approche alternative aux inhibiteurs de fusion actuels est la génération de D-peptides, images dans un miroir des peptides naturels de série L, se positionnant spécifiquement dans les poches hydrophobes du trimère N (Figure 24).[24,34,36] En effet, ces poches présentent un intérêt certain en tant que cibles potentielles pour des inhibiteurs de par *(i)* une séquence définie *(ii)* un rôle essentiel dans le mécanisme d'entrée *(iii)* un site de fixation compact accessible aux petites molécules et aux peptides courts et *(iv)* la conception de N peptides mimant parfaitement la structure de ces poches (IQN17, IZN17 et « 5-helix »).[30,41]

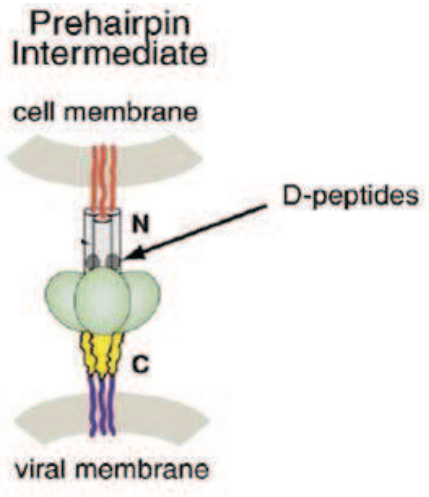


Figure 24. Modèle de l'intermédiaire « prehairpin » avec inhibiteurs

En 1999, Eckert et *coll.* ont identifié une première génération de D-peptides ciblant la poche hydrophobe de gp41 en utilisant la technique phage « mirror-image phage-display ».[31,42] Ces peptides ont été conçus par le procédé décrit sur la Figure 25. La protéine IQN17, mime du trimère N, est synthétisée avec des acides aminés de série D conduisant à la protéine inverso D-IQN17. Une librairie de phage exprimant des L-peptides est alors passée au crible, et le phage se liant à D-IQN17 séquencé. Après des tests de spécificité de liaisons, l'image dans un miroir du phage exprimant les L-peptides est chimiquement synthétisée avec des acides aminés D, les D-peptides ainsi obtenus sont testés pour leur activité anti-VIH.[31,42]

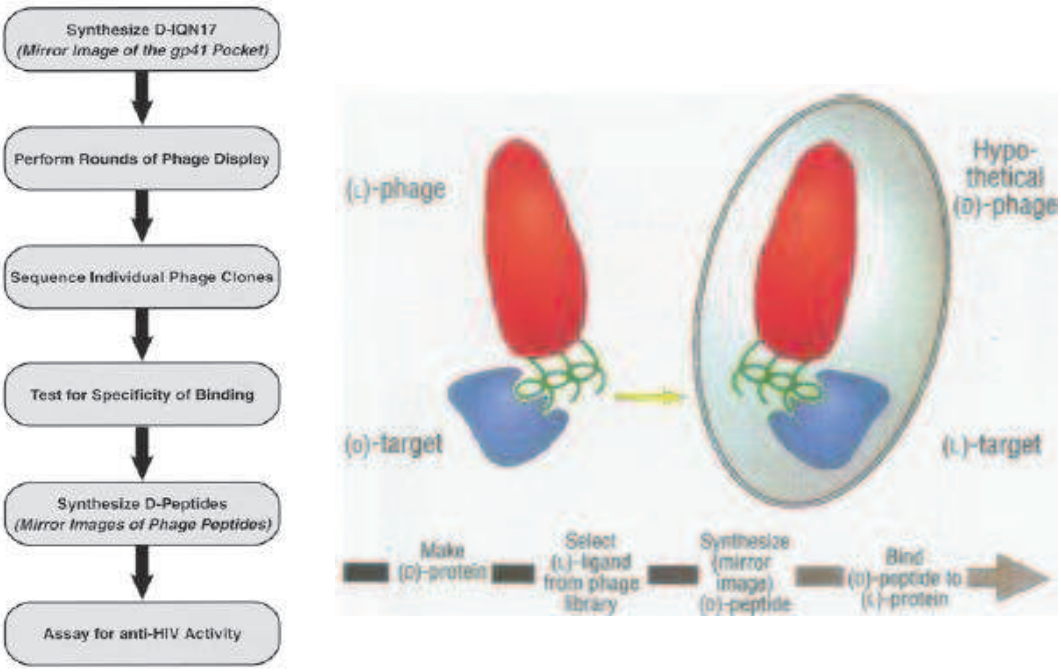


Figure 25. Principe et modèle de la technique « mirror-image phage display »

Une première série de D-peptides a ainsi été identifiée et a permis d'établir une séquence consensuelle de 10 résidus, 10-mer, cyclisée par un pont disulfure et présentant 4 acides aminés récurrents : **D-Glu9, D-Trp10, D-Trp12** et **D-Leu13** ($cx_5ewxwlc$) (Tableau 1).[31] La numérotation de ces acides aminés sera celle utilisée tout au long de ce manuscrit. L'activité mesurée pour ces composés est comprise entre 11 et 270 µM.

D-peptide	**Séquence de 10-mer**																			**CI_{50} (µM)**
D10-p1-2K	Ac-	k	k	g	a	**c**	e	a	r	h	r	**e**	**w**	a	**w**	**l**	**c**	a	a	$-NH_2$	85
D10-p3-2K	Ac-	k	k	g	a	**c**	g	l	g	q	e	**e**	**w**	f	**w**	**l**	**c**	a	a	$-NH_2$	39
D10-p4-2K	Ac-	k	k	g	a	**c**	d	l	k	a	k	**e**	**w**	f	**w**	**l**	**c**	a	a	$-NH_2$	160
D10-p5-2K	**Ac-**	**k**	**k**	**g**	**a**	**c**	**e**	**l**	**l**	**g**	**w**	**e**	**w**	**a**	**w**	**l**	**c**	**a**	**a**	**$-NH_2$**	**11**
D10-p6-2K	Ac-	k	k	g	a	**c**	s	r	s	q	p	**e**	**w**	e	**w**	**l**	**c**	a	a	$-NH_2$	210
D10-p7-2K	Ac-	k	k	g	a	**c**	l	l	r	a	p	**e**	**w**	g	**w**	**l**	**c**	a	a	$-NH_2$	-
D10-p10-2K	Ac-	k	k	g	a	**c**	m	r	g	e	w	**e**	**w**	s	**w**	**l**	**c**	a	a	$-NH_2$	96
D10-p12-2K	Ac-	k	k	g	a	**c**	p	p	l	n	k	**e**	**w**	a	**w**	**l**	**c**	a	a	$-NH_2$	270
Séquence consensuelle				**g** **1**	**a**	**c**	**x**	**x**	**x**	**x**	**x**	**e** **9**	**w** **10**	**x**	**w** **12**	**l** **13**	**c**	**a**	**a** **16**		

Tableau 1. Série de D-peptides 10-mer

La structure cristalline du complexe IQN17/D10-p1-2K montre que les trois résidus **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13** sont ancrés dans la poche hydrophobe de IQN17 (Figure 26) et s'avèrent ainsi essentiels dans la séquence.[31]

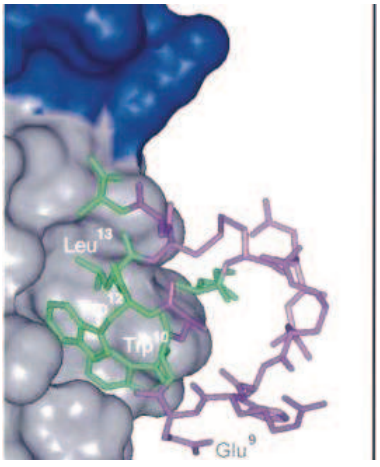


Figure 26. Modélisation du complexe IQN17/D10-p1-2K

Sur la base de ces travaux, Kay et *coll*. ont optimisé cette séquence par la même technique, et ont abouti, en 2007, à une série de D-peptides 8-mer ($cx_3ewxwlc$), contenant les quatre résidus **D-Glu-9, D-Trp-10, D-Trp-12** et **D-Leu-13** présents dans la séquence originale (Tableau 2).[30] Les activités mesurées ont démontrées une meilleure affinité entre ces D-peptides et la poche du trimère N, notamment avec le composé PIE7 qui présente une CI_{50} de 0,62 µM.

Considérant la nature trimérique de gp41, des versions di- et trimérique du D-peptide PIE7 ont été proposées. Dans ce cas, le polyéthylène gycol (PEG) polymère flexible, soluble et non immunogène, a été utilisé en tant qu'espaceur. D'excellentes activités ont été mesurées, plus particulièrement avec le trimère qui présente une CI_{50} de l'ordre du picomolaire ($(PIE7)_3PEG$, CI_{50}=250 pM).

D-Peptide	**Séquence de 8-mer**	**CI_{50} (µM)**
D10-p5-2K	Ac- k k g a **c** e l l g w **e** **w** a **w** **l** **c** a a -NH_2	9,5
2K-PIE1	Ac- k k g a **c** e s p **e** **w** r **w** **l** **c** a a -NH_2	2,2
2K-PIE2	Ac- k k g a **c** d y p **e** **w** r **w** **l** **c** a a -NH_2	2,6
PIE2	Ac- k g a **c** d y p **e** **w** r **w** **l** **c** a a -NH_2	1,3
PIE7	**Ac- k g a c d y p e w q w l c a a -NH_2**	**0,62**
PIE8	Ac- k g a **c** d y k **e** **w** q **w** **l** **c** a a -NH_2	1,7
PEG-PIE7	PEG- (k g a **c** d y p **e** **w** q **w** **l** **c** a a)	0,94
$(PIE7)_2PEG$	PEG- (k g a **c** d y p **e** **w** q **w** **l** **c** a a $)_2$	0,0019
$(PIE7)_3PEG$	PEG- (k g a **c** d y p **e** **w** q **w** **l** **c** a a $)_3$	0,00025
Séquence consensuelle	**g a c x x x e w x w l c a a**	

Tableau 2. Série de D-peptides 8-mer

Par la suite et durant nos travaux, d'autres D-peptides 8-mer, différents des séquences précédentes sur leurs extrémités *N*- et *C*-terminales ont été décrits par Kay et *coll.*[43] et ont présenté de meilleurs activités avec notamment le D-peptide PIE14 (CI_{50}=33 nM) (Tableau 3).[43]

D-Peptide	Séquence 8-mer	CI_{50}(µM)
PIE7	Ac k g a **c** d y p **e w** q **w l c** a a -NH_2	0,620
PIE12	Ac h p **c** d y p **e w** q **w l c** e l g k -NH_2	0,037
PIE13	Ac h p **c** d y p **e w** q **w l c** k l g k -NH_2	0,041
PIE14	**Ac h p c d y p e w q w l c r l g k -NH_2**	**0,033**
PIE15	Ac h a **c** d y p **e w** q **w l c** e l g k -NH_2	0,066

Tableau 3. Série de D-peptides 8-mer

Ces résultats mettent en évidence la spécificité et la haute affinité des interactions entre les D-peptides et la glycoprotéine virale gp41, confirmant le fort potentiel de ces composés en tant que nouveaux inhibiteurs de fusion du VIH. De plus, sachant que les D-peptides sont résistants aux protéases et non immunogènes, la possibilité d'une administration de ces composés par voie orale rend cette approche prometteuse.

Références Bibliographiques

(1) Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983,** *220* (4599), 868-71.

(2) Poiesz, B. J.; Ruscetti, F. W.; Reitz, M. S.; Kalyanaraman, V. S.; Gallo, R. C., Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia. *Nature* **1981,** *294* (5838), 268-71.

(3) Wain-Hobson, S.; Sonigo, P.; Danos, O.; Cole, S.; Alizon, M., Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* **1985,** *40* (1), 9-17.

(4) Strebel, K., Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *AIDS* **2003,** *17*, S25-S34.

(5) Varmus, H., Regulation of HIV and HTLV gene expression. *Genes. Dev.* **1988,** *2* (9), 1055-62.

(6) Pomerantz, R. J.; Horn, D. L., Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat. Med.* **2003,** *9* (7), 867-73.

(7) Klatzmann, D.; Champagne, E.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Guetard, D.; Hercend, T.; Gluckman, J. C.; Montagnier, L., T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **1984,** *312* (5996), 767-8.

(8) Mehellou, Y.; De Clercq, E., Twenty-six years of anti-HIV drug discovery: where do we stand and where do we go? *J. Med. Chem.* **2010,** *53* (2), 521-38.

(9) Santos, A. F.; Soares, M. A., HIV Genetic Diversity and Drug Resistance. *Viruses* **2010,** *2* (2), 503-531.

(10) Fauci, A., HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat. Med.* **2003,** *9* (7), 839 - 843.

(11) Mitsuya, H.; Weinhold, K. J.; Furman, P. A.; St Clair, M. H.; Lehrman, S. N.; Gallo, R. C.; Bolognesi, D.; Barry, D. W.; Broder, S., 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985,** *82* (20), 7096-7100.

(12) Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; St Clair, M. H.; Weinhold, K.; Rideout, J. L.; Freeman, G. A.; Lehrman, S. N.; Bolognesi, D. P.; Broder, S.; Mitsuya, H., Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986,** *83* (21), 8333-8337.

(13) Robbins, B. L.; Srinivas, R. V.; Kim, C.; Bischofberger, N.; Fridland, A., Anti-human immunodeficiency virus activity and cellular metabolism of a potential prodrug of the acyclic nucleoside phosphonate 9-R-(2-phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA),

Bis(isopropyloxymethylcarbonyl)PMPA. *Antimicrob. Agents Chemother* **1998,** *42* (3), 612-7.

(14) Barditch-Crovo, P.; Deeks, S. G.; Collier, A.; Safrin, S.; Coakley, D. F.; Miller, M.; Kearney, B. P.; Coleman, R. L.; Lamy, P. D.; Kahn, J. O.; McGowan, I.; Lietman, P. S., Phase i/ii trial of the pharmacokinetics, safety, and antiretroviral activity of tenofovir disoproxil fumarate in human immunodeficiency virus-infected adults. *Antimicrob. Agents Chemother* **2001,** *45* (10), 2733-9.

(15) De Clercq, E., Toward improved anti-HIV chemotherapy: therapeutic strategies for intervention with HIV infections. *J. Med. Chem.* **1995,** *38* (14), 2491-517.

(16) Adams, J.; Patel, N.; Mankaryous, N.; Tadros, M.; Miller, C. D., Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance and the role of the second-generation agents. *Ann Pharmacother* **2010,** *44* (1), 157-65.

(17) Bhattacharya, S.; Osman, H., Novel targets for anti-retroviral therapy. *J. Infect.* **2009,** *59* (6), 377-86.

(18) Lebon, F.; Ledecq, M., Approaches to the design of effective HIV-1 protease inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2000,** *7* (4), 455-77.

(19) Mastrolorenzo, A.; Rusconi, S.; Scozzafava, A.; Barbaro, G.; Supuran, C. T., Inhibitors of HIV-1 protease: current state of the art 10 years after their introduction. From antiretroviral drugs to antifungal, antibacterial and antitumor agents based on aspartic protease inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2007,** *14* (26), 2734-48.

(20) Gougeon, M. L.; Penicaud, L.; Fromenty, B.; Leclercq, P.; Viard, J. P.; Capeau, J., Adipocytes targets and actors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy and metabolic alterations. *Antiviral. Ther.* **2004,** *9* (2), 161-77.

(21) Finzi, D.; Blankson, J.; Siliciano, J. D.; Margolick, J. B.; Chadwick, K.; Pierson, T.; Smith, K.; Lisziewicz, J.; Lori, F.; Flexner, C.; Quinn, T. C.; Chaisson, R. E.; Rosenberg, E.; Walker, B.; Gange, S.; Gallant, J.; Siliciano, R. F., Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* **1999,** *5* (5), 512-7.

(22) Iversen, A. K.; Shafer, R. W.; Wehrly, K.; Winters, M. A.; Mullins, J. I.; Chesebro, B.; Merigan, T. C., Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J. Virol.* **1996,** *70* (2), 1086-90.

(23) Pang, W.; Tam, S. C.; Zheng, Y. T., Current peptide HIV type-1 fusion inhibitors. *Antiviral Chem. Chemother* **2009,** *20* (1), 1-18.

(24) Tilton, J. C.; Doms, R. W., Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral. Res.* **2010,** *85* (1), 91-100.

(25) Qian, K.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K. H., HIV entry inhibitors and their potential in HIV therapy. *Medicinal Research Reviews* **2009,** *29* (2), 369-393.

(26) Lobritz, M. A.; Ratcliff, A. N.; Arts, E. J., HIV-1 Entry, Inhibitors, and Resistance.

Viruses **2010,** *2* (5), 1069-1105.

(27) He, Y.; Liu, S.; Li, J.; Lu, H.; Qi, Z.; Liu, Z.; Debnath, A. K.; Jiang, S., Conserved salt bridge between the N- and C-terminal heptad repeat regions of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 core structure is critical for virus entry and inhibition. *J. Virol.* **2008,** *82* (22), 11129-39.

(28) Jiang, S.; Debnath, A. K., Development of HIV entry inhibitors targeted to the coiled-coil regions of gp41. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2000,** *269* (3), 641-6.

(29) Delcroix-Genete, D.; Quan, P. L.; Roger, M. G.; Hazan, U.; Nisole, S.; Rousseau, C., Antiviral properties of two trimeric recombinant gp41 proteins. *Retrovirology* **2006,** *3*, 16.

(30) Welch, B. D.; VanDemark, A. P.; Heroux, A.; Hill, C. P.; Kay, M. S., Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007,** *104* (43), 16828-16833.

(31) Eckert, D. M.; Malashkevich, V. N.; Hong, L. H.; Carr, P. A.; Kim, P. S., Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell* **1999,** *99* (1), 103-15.

(32) Chan, D. C.; Chutkowski, C. T.; Kim, P. S., Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998,** *95* (26), 15613-15617.

(33) Eckert, D. M.; Malashkevich, V. N.; Kim, P. S., Crystal structure of GCN4-pIQI, a trimeric coiled coil with buried polar residues. *J. Mol. Biol.* **1998,** *284* (4), 859-65.

(34) Eckert, D.; Kim, P., Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* **2001,** *70*, 777 - 810.

(35) Liu, S.; Jiang, S., High throughput screening and characterization of HIV-1 entry inhibitors targeting gp41: theories and techniques. *Curr. Pharm. Des.* **2004,** *10* (15), 1827-43.

(36) Jiang, S.; Zhao, Q.; Debnath, A. K., Peptide and non-peptide HIV fusion inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2002,** *8* (8), 563-80.

(37) Kaushik-Basu, N.; Basu, A.; Harris, D., Peptide inhibition of HIV-1: current status and future potential. *BioDrugs* **2008,** *22* (3), 161-75.

(38) Root, M.; Kay, M.; Kim, P., Protein design of an HIV-1 entry inhibitor. *Science* **2001,** *291* (5505), 884 - 888.

(39) Cooley, L. A.; Lewin, S. R., HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy. *J. Clin. Virol.* **2003,** *26* (2), 121-32.

(40) Eckert, D. M.; Shi, Y.; Kim, S.; Welch, B. D.; Kang, E.; Poff, E. S.; Kay, M. S., Characterization of the steric defense of the HIV-1 gp41 N-trimer region. *Protein Science* **2008,** *17* (12), 2091-2100.

(41) Eckert, D. M.; Kim, P. S., Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-

peptide region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001,** *98* (20), 11187-11192.

(42) Schumacher, T. N.; Mayr, L. M.; Minor, D. L., Jr.; Milhollen, M. A.; Burgess, M. W.; Kim, P. S., Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display. *Science* **1996,** *271* (5257), 1854-7.

(43) Kay, M. S.; Welch, B. D. Methods and compositions related to inhibition of viral entry **2008**. WO/2008/098182.

Chapitre 2: Etude des D-peptides

I. Objectifs

Les travaux menés par Eckert et *coll.*, puis par Kay et *coll*, ont permis d'établir, *via* la technique phage, une séquence consensuelle de D-peptides $cx_{3/5}$ewxwlc, inhibiteurs de fusion, avec une activité de l'ordre du nM (Tableau 4).[1,2,3] Ces D-peptides sont constitués d'une partie 10-mer, pour le D-peptide D10-P1-2K, ou 8-mer commune pour les D-peptides les plus actifs PIE7, PIE12, PIE14 et PIE15. Tous sont cyclisés par un pont disulfure et présentent quatre résidus récurrents : **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13**.

L'objectif de cette thèse a été d'optimiser cette séquence consensuelle $cx_{3/5}$ewxwlc. Le but de ce travail était double :

(i) Diminuer la nature peptidique de cette séquence et par conséquent améliorer ses propriétés pharmaceutiques (administration orale)

(ii) Augmenter l'activité antivirale en tant qu'inhibiteur de fusion du VIH

D-Peptide	**Séquences 8-mer et 10-mer**	**CI_{50}(µM)**
D10-P1-2K	Ac- k k g a **c** e a r h r **e w a w l c** a a -NH_2	85
PIE7	Ac- k g a **c** d y p **e w** q **w l c** a a -NH_2	0,620
PIE12	Ac- h p **c** d y p **e w** q **w l c** e l g k -NH_2	0,037
PIE14	Ac- h p **c** d y p **e w** q **w l c** r l g k -NH_2	0,033
PIE15	Ac- h a **c** d y p **e w** q **w l c** e l g k -NH_2	0,067

Tableau 4. Séquences de référence

Au vu des activités des différents D-peptides, notre travail s'est porté dans un premier temps sur l'étude de ces séquences (Tableau 4) afin de déterminer les éléments essentiels à l'activité des composés. Deux approches complémentaires ont alors été menées : une étude de modélisation moléculaire suivie de la synthèse et de l'évaluation biologique d'une série de D-peptides modifiés au niveau de leur séquence.

II. Etude de modélisation moléculaire

L'étude de modélisation moléculaire a été réalisée au sein des laboratoires Idenix par le Dr Thierry Convard. Ce travail avait pour objectif de mieux comprendre les différentes interactions entre les D-peptides et le trimère N, et ce afin de déterminer le rôle des quatre

résidus récurrents **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-3**, et d'évaluer l'influence des extrémités *N*- et *C*- terminales.

Tout d'abord, l'étude des interactions entre le D-peptide D10-P1-2K et la protéine IQN17 a été réalisée à partir des travaux de Eckert et *coll.*.[1] Puis un calcul de dynamique moléculaire a été effectué sur les quatre D-peptides les plus actifs (PIE7, PIE12, PIE14 et PIE15) décrits par Kay.[3]

II.A. Etude du complexe IQN17/D10-P1-2K

Cette étude a été réalisée au sein d'Idenix, à partir des données cristallographiques de la protéine IQN17 seule (PDB ID : 2Q7C, « Protein Data Bank ») et en co-cristal (PDB ID=1CZQ) avec le peptide 10 mer D10-P1-2K (Tableau 5).[1] Pour cette dernière structure, un seul monomère de IQN17 a été cristallisé avec le D-peptide. L'objectif était de comprendre le rôle des quatre acides aminés récurrents **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13** présents dans les D-peptides.

D-peptide	**Séquence 10-mer cx$_5$ewxwlc**																	**CI$_{50}$ (µM)**
D10-p1-2K	Ac-	k	k	g	a	**c**	e	a	r	h	r	**e**	**w**	a	**w**	**l**	**c**	a a-NH_2	85
			1							**7**		**9**	**10**		**12**	**13**		**16**	

Tableau 5. Séquence D-peptide D10-P1-2K

Les images présentées dans la figure 27 montrent le D-peptide D10-P1-2K en interaction avec la protéine IQN17. D'après la modélisation, les interactions entre le D-peptide et la protéine sont faibles (Figure 27-a et -b) puisque seuls quelques résidus rentrent dans la poche hydrophobe de IQN17. Parmi eux, les acides aminés essentiels **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13**, à l'origine d'interactions de type hydrophobe (Figure 27-c). Plus précisément, il apparaît que les deux tryptophanes **D-Trp-10** et **D-Trp-12** (en jaune) sont orientés du même côté, vers l'intérieur de la poche.

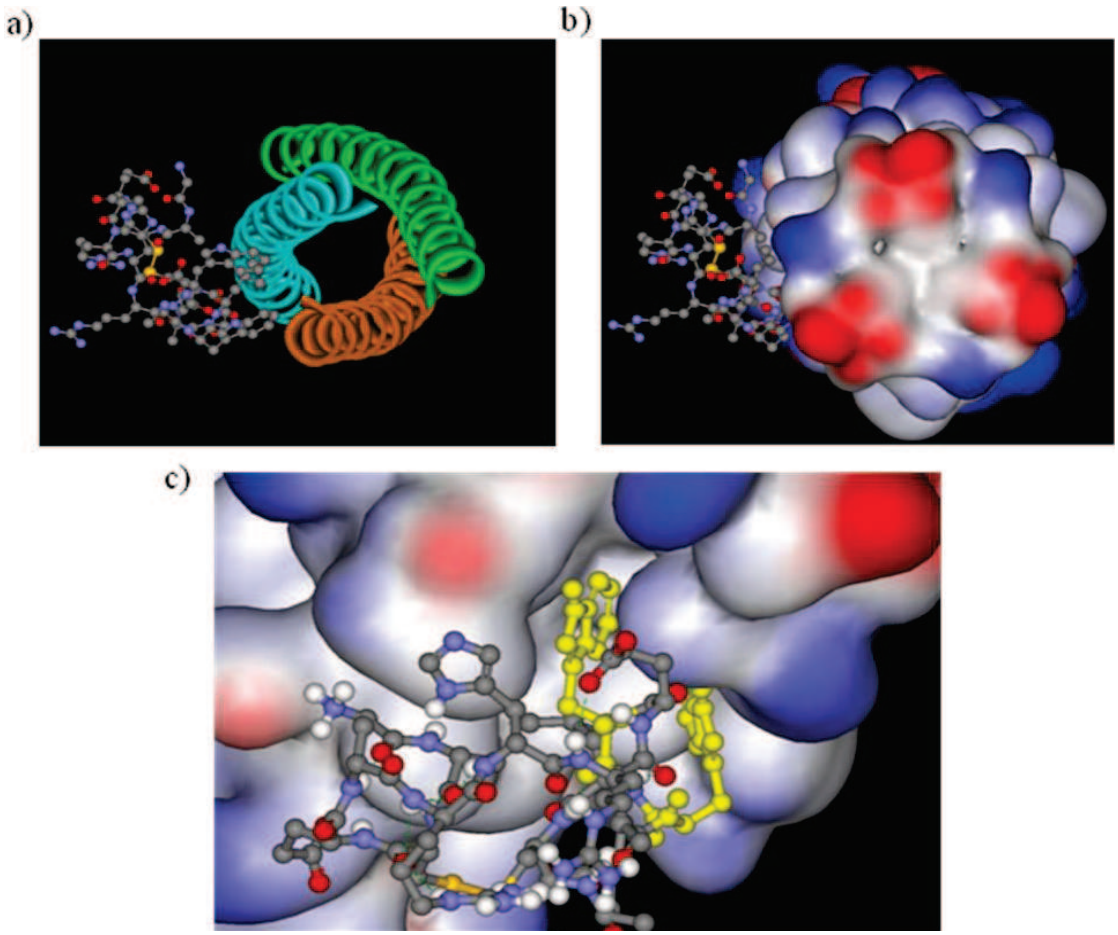


Figure 27. Images du complexe IQN17/D10-P1-2K. a) Image de D10-P1-2K avec le trimère IQN17, b) Image du complexe avec la surface de Van Der Waals (VDW) de IQN17, c) Zoom de la poche hydrophobe de IQN17 avec D10-P1-2K

Plusieurs interactions caractéristiques entre la protéine et le D-peptide ont été observées.

La Figure 28 montre des interactions de type π-stacking entre le Trp-35 de IQN17 situé aux bords de la poche hydrophobe, et deux résidus du 10-mer, le **D-Trp-10** et la D-His-7, en jaune.

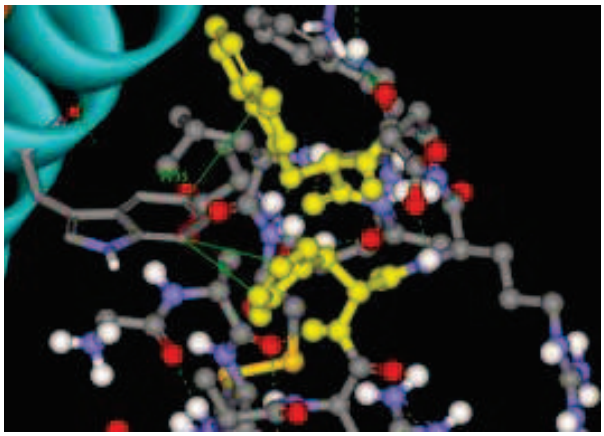


Figure 28. Interaction π-stacking entre le Trp35 de IQN17 et les résidus **D-Trp10** et D-His7 de D10-P1-2K

Une étude comparative entre IQN17 seule (apo) et complexée au 10-mer (holo) a permis de mettre en évidence un changement conformationel du résidu Trp-35 lors de l'interaction avec le D-peptide. Le Trp-35 observé sous deux conformations pour la protéine en apo (Figure 29-a) voit sa conformation basculer en holo (Figure 29-b, en jaune et Figure 29-c). Plus précisément, il apparaît une interaction π-stacking de type « T-shape » entre Trp-35 et **D-Trp-10** (Figure 29-c).

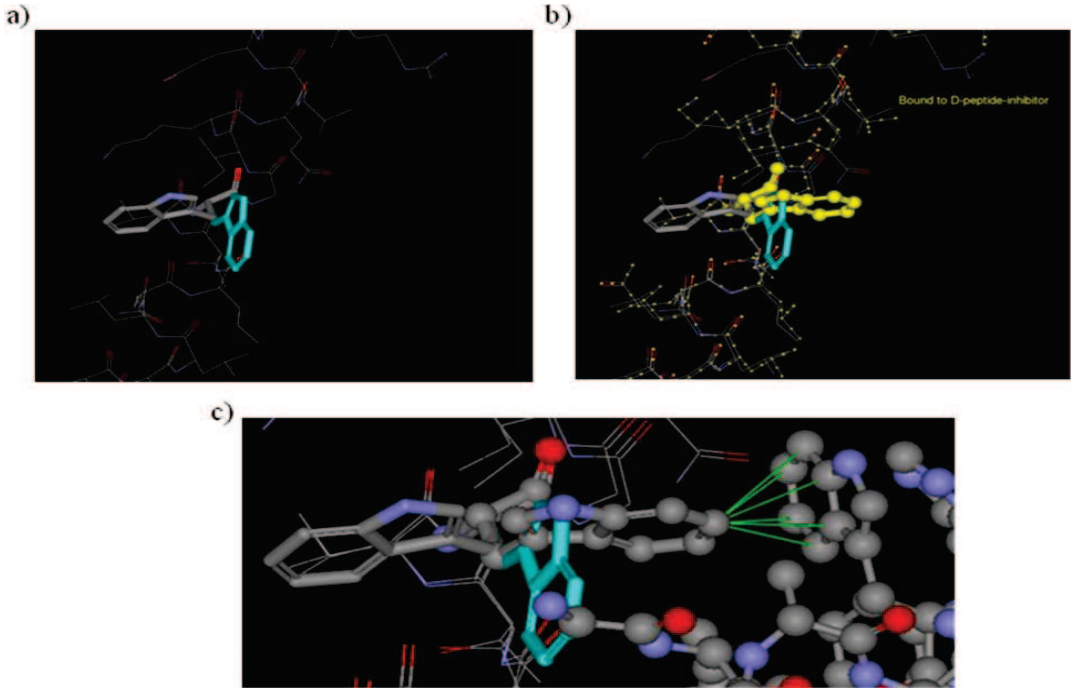


Figure 29. Images de IQN17 seul (apo) et du complexe IQN17/D10-P1-2K (holo). a) Représentation des deux conformations de Trp35 dans IQN17 en apo, b) Superposition des conformations de Trp35 dans IQN17 en apo et holo (jaune), c) Interaction π-stacking entre le Trp35 et le D-Trp10

Les deux autres interactions observées se situent également aux abords de la poche hydrophobe. Il est distingué une liaison hydrogène entre Gln-41 et **D-Glu-9** et une interaction de type cation π entre Lys-38 et **D-Trp-12** (Figure 30). Il est à noter également une liaison hydrogène stabilisante entre Gln-41 et Lys-38 de IQN17.

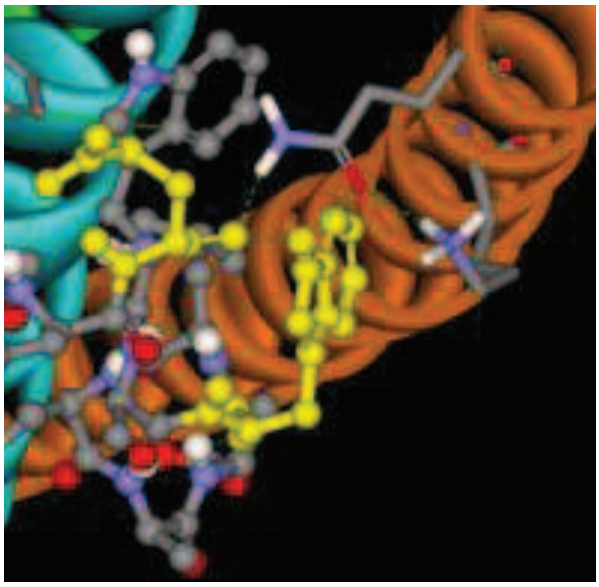


Figure 30. Interaction entre Gln-41/D-Glu-9 et Lys-38/D-Trp-12

En résumé, l'étude du complexe IQN17/D10-P1-2K confirme que les acides aminés **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp12** et **D-Leu-13** jouent un rôle essentiel dans la séquence. Les trois résidus **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13** sont inclus dans la poche hydrophobe d'IQN17. Ces trois résidus, ainsi que l'acide glutamique **D-Glu-9**, interagissent par des interactions de type hydrophobe, π-stacking, cation π ou par liaison hydrogène avec des résidus de IQN17 situés dans ou aux bords de la poche.

II.B. Etude de dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire a été réalisée par le Dr Thierry Convard, avec le programme CHARMn[4] sur les séquences des D-peptides les plus actives (PIE7, PIE12, PIE14 et PIE15) décrites par Kay et *coll.*(Tableau 6).[3] Le calcul a été effectué pour une simulation portant sur 4 ns.

D-Peptide	Séquence													CI_{50}(µM)
PIE7	Ac- k	g	a	**c**	d	y	p	**e**	**w**	q	**w**	**l**	**c**	a a -NH_2	0,620
PIE12	Ac-	h	p	**c**	d	y	p	**e**	**w**	q	**w**	**l**	**c**	e l g k -NH_2	0,037
PIE14	**Ac-**	**h**	**p**	**c**	**d**	**y**	**p**	**e**	**w**	**q**	**w**	**l**	**c**	**r l g k -NH_2**	**0,033**
PIE15	Ac-	h	a	**c**	d	y	p	**e**	**w**	q	**w**	**l**	**c**	e l g k -NH_2	0,067
						7		**9**	**10**		**12**	**13**	**14**		

Tableau 6. Série de D-peptides 8-mer

La Figure 31 représente la variation au cours du temps de l'angle de torsion ψ du résidu D-Tyr-7 pour chaque composé. Cet angle ψ traduit la modification comportementale des résidus 7 à 14 qui, pour tous les composés, adoptent au début de la simulation une structure en hélice.[1,2] Cette structure en hélice présente la particularité d'orienter les chaînes latérales des résidus, et de favoriser leur maintien dans une direction privilégiée qui sied à la protéine.

Nous pouvons constater que les D-peptides PIE12 (en jaune) et PIE14 (en rouge), les plus actifs, ont un comportement similaire, leur structure en hélice perdure tout au long de la simulation. Le D-peptide PIE7 (en bleu), le moins actif, se démarque complètement des autres composés en basculant cet angle ψ au bout de 1ns et en perdant cette structure en hélice. Le D-peptide PIE15, bien qu'ayant rejoint provisoirement PIE7, revient vers PIE12 et PIE14 à la fin du temps de simulation, il oscille entre ces deux positions.

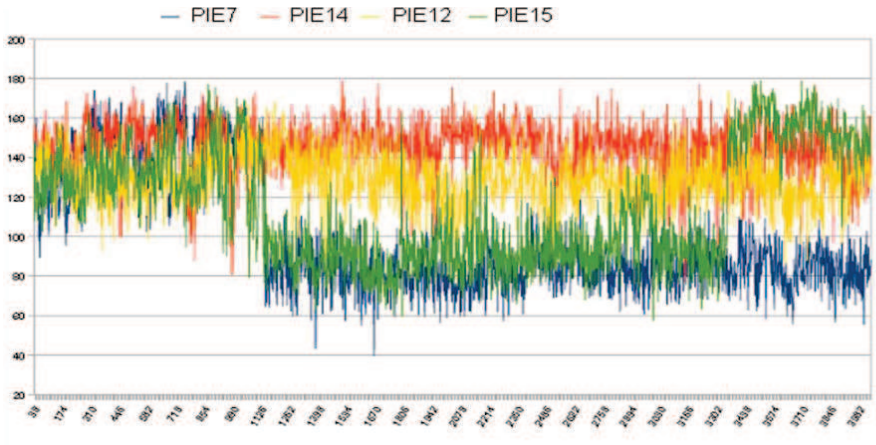


Figure 31. Variation au cours du temps de l'angle de torsion ψ du résidu D-Tyr-7 pour les composés PIE7, PIE12, PIE14 et PIE15

Cette différence comportementale, représentative de l'activité de ces composés, est d'autant plus intéressante que toute la partie cyclisée est commune. Les résidus périphériques influencent donc la modification structurale de la partie cyclique, expliquant que les extrémités *N*- et *C*-terminales jouent donc un rôle essentiel sur l'activité de ces composés.

III. Synthèse des D-peptides

En parallèle de l'étude de modélisation, nous avons réalisé la synthèse d'une série de D-peptides dans l'objectif de confirmer, d'une part, que les quatre résidus **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13** sont essentiels dans la séquence, de mesurer ensuite l'impact des formes cycliques par rapport aux peptides linéaires et enfin, d'évaluer l'influence des extrémités *N*- et *C*-terminales sur l'activité de ces composés (Figure 32).

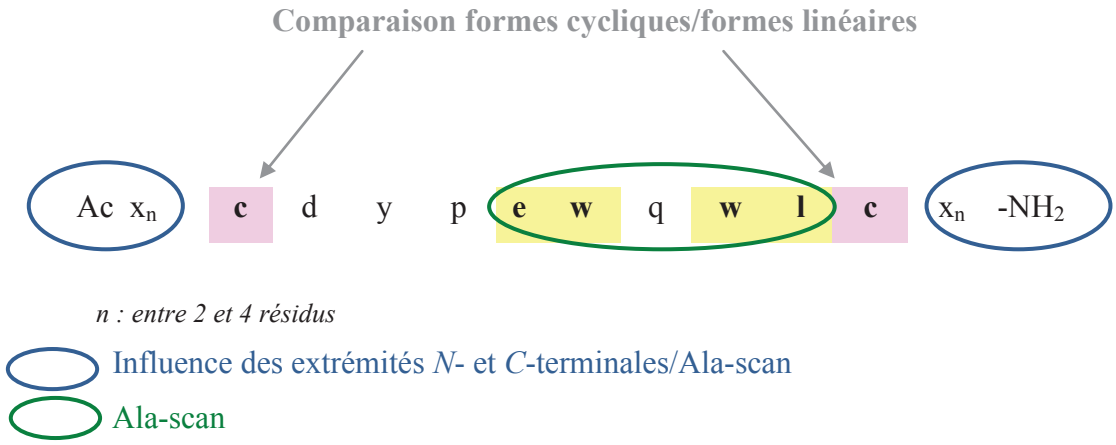


Figure 32. Stratégie de synthèse des D-peptides

Ainsi, une série de D-peptides cycliques et linéaires a été synthétisée à partir des deux séquences de référence PIE7 et PIE14. Ces synthèses ont été réalisées sur support solide, au micro-onde. Dans cette partie, nous décrirons dans un premier temps, le principe de la synthèse peptidique sur support solide, le type de résine utilisé, l'activation micro-onde et les différents appareils de synthèse automatique, puis dans un second temps, la synthèse de ces différents D-peptides.

III.A. Synthèse peptidique sur support solide

La synthèse de peptides à des fins de criblage biologiques, comme têtes de séries ou encore comme outil d'investigation de mécanismes biologiques, requiert des techniques rapides et efficaces. L'introduction de la synthèse peptidique sur support solide par Merrifield[5] a permis d'adapter ces synthèses à l'automatisation et d'ouvrir la voie au haut débit. L'adaptation au support solide a changé radicalement les stratégies de synthèse et a simplifié les étapes fastidieuses de purification associées à la synthèse en solution. De nos jours, la synthèse de peptides en solution représente une part négligeable de la production des peptides.

III.A .1. Principe

Ce principe repose sur une addition successive d'acides aminés N-protégés sur un support solide (Schéma 1).[6,7] L'acide aminé *C*-terminal est ancré *via* sa fonction acide carboxylique au linker (ou bras fonctionnalisé) de la résine pour donner respectivement une liaison amide ou ester qui, après clivage, conduit à une extrémité *C*-terminale amide ou acide. Après ancrage du premier acide aminé, la séquence peptidique est assemblée pas à pas de l'extrémité *C*-terminale à l'extrémité *N*-terminale par des cycles répétitifs de :

- **déprotection** du groupement temporaire de la fonction amine *N*-terminale du peptide en cours d'élongation
- **couplage** de l'acide aminé suivant, dont la fonction acide est activée généralement par un agent de couplage de type carbodiimide (DIC), phosphonium (BOP, PyBOP) ou uronium (HBTU, HATU)

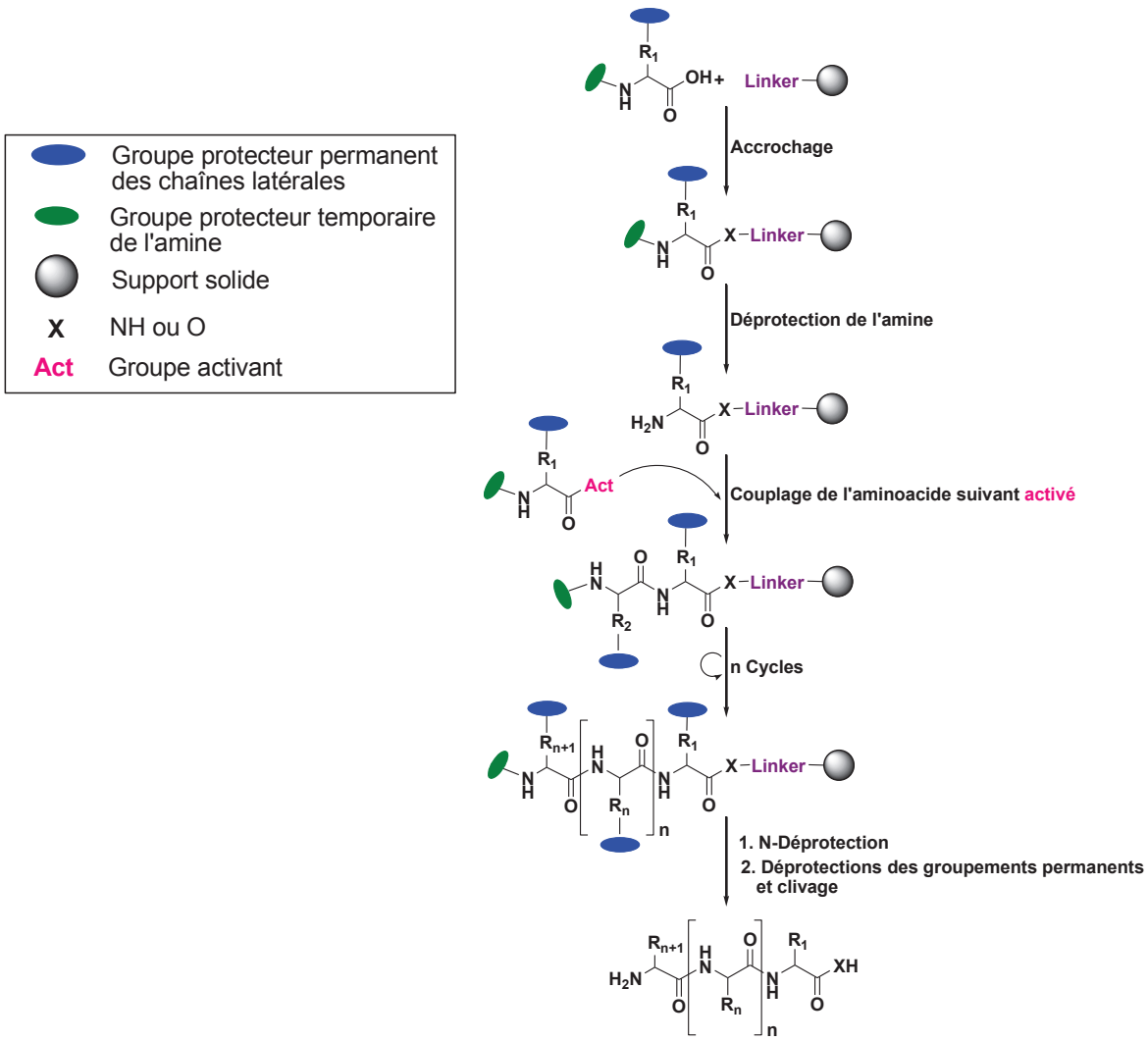


Schéma 1. Principe de la synthèse peptidique sur support solide

Les groupements fonctionnels présents sur les chaînes latérales des acides aminés sont protégés par des groupements permanents stables dans les conditions de réactions utilisées pour l'élongation du peptide. La fonction amine *N*-terminale est protégée par une protection dite temporaire qui est généralement un dérivé uréthane, le groupement temporaire peut alors être facilement éliminé dans des conditions douces préservant l'intégrité du peptide. De plus, l'utilisation de ce type de groupement réduit le taux de racémisation survenant *via* la formation de l'oxazolone (Schéma 2). Ce problème se produit lors de l'étape de formation de la liaison amide, plus précisément lors de l'activation de la fonction acide de l'aminoacide à coupler. En effet, une fois l'oxazolone formée, l'abstraction du proton α devient possible, même par une base faible, du fait de la stabilisation par résonance du carbanion formé. L'épimérisation de l'oxazolone peut être largement réduite si la fonction amine de l'acide aminé activé est protégée par un groupement électrodonneur (déstabilisation du carbanion).

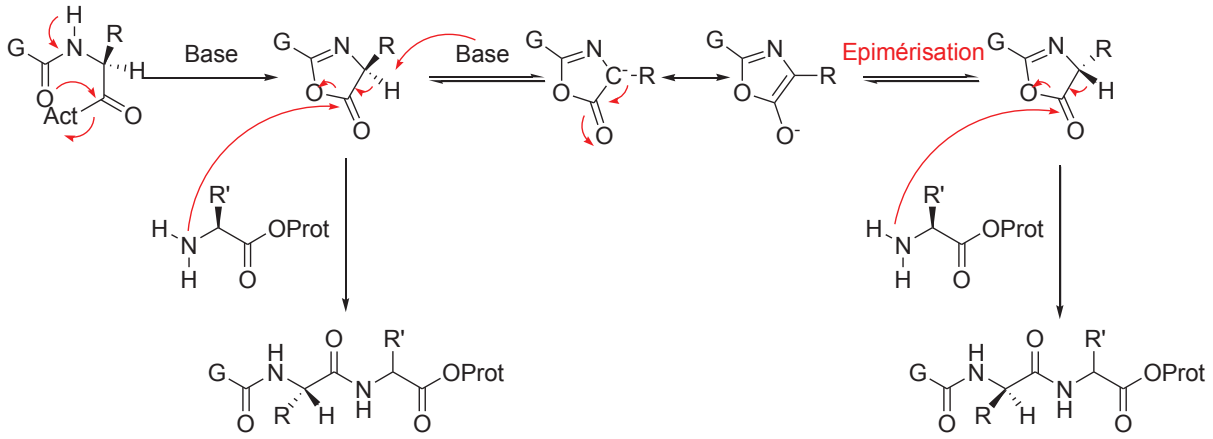


Schéma 2. Epimérisation du carbone α par formation de l'oxazolone

C'est pourquoi les groupements protecteurs des fonctions amines de type uréthane sont privilégiés et la synthèse s'effectue de l'extrémité *C*-terminale vers l'extrémité *N*-terminale ; ainsi, la fonction amine n'est pas impliquée dans une liaison amide et peut être protégée de façon adéquate.

Au cours de l'étape finale, le peptide est clivé de la résine et les groupements protecteurs permanents des chaînes latérales sont éliminés.

En synthèse peptidique sur phase solide, deux principales stratégies sont utilisées : la stratégie Fmoc/tBu et la stratégie Boc/Bzl (Tableau 7). Ces stratégies dépendent des conditions de déprotection des groupements permanents et temporaires. En stratégie Boc/Bzl, le groupement temporaire Boc est éliminé par une solution de TFA et les protections permanentes ainsi que la résine, par un traitement par un acide fort tel que l'acide hydrofluorique HF. Bien que cette méthode soit efficace pour la synthèse de longues séquences, l'utilisation de HF est hautement toxique et nécessite une verrerie spécifique (en polytetrafluoroéthylène), rendant cette approche peu accessible. De plus, l'utilisation d'acides forts peut produire des changements délétères dans l'intégrité structurale des peptides contenant des séquences fragiles.

Stratégie	**Conditions de déprotection**	
	Groupements temporaires *à chaque cycle*	**Groupements permanents** *en fin de synthèse*
Boc/Bzl	TFA	HF
Fmoc/tBu	Amine secondaire: Pipéridine	TFA

Tableau 7. Stratégie de synthèse

La stratégie Fmoc/tBu est basée sur un système de protection orthogonal. Cette approche utilise le groupement temporaire Fmoc, baso-labile et des groupements permanents acido-labiles. Cette dernière stratégie présente l'avantage que les groupements protecteurs orthogonaux, temporaires et permanents, sont éliminés par différents mécanismes, permettant l'utilisation de conditions acides plus douces pour la déprotection finale et le clivage de la résine. Pour toutes ces raisons, la stratégie Fmoc-tBu est devenue une méthode de choix pour la synthèse en routine de peptides sur phase solide.

III.A .2. Supports solides

Les supports solides les plus classiques et les plus répandus sont les résines. Elles se présentent sous la forme de billes sphériques dont la taille et la structure diffèrent en fonction du type de résine. Le nombre de sites utilisables pour la synthèse est déterminé par la charge de la résine, donnée en mmol par gramme de résine. La quantité de peptide obtenue en fin de synthèse est directement liée à cette charge. Les résines se composent d'une matrice polymérique de base et d'un bras fonctionnalisé.

- Matrice polymérique

La matrice la plus utilisée est un polymère de polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB). Il est préparé par polymérisation du styrène et réticulation par le divinylbenzène. Cependant, le caractère hydrophobe de ce type de matrice limite leur utilisation notamment pour la synthèse de séquences difficiles ou de longs peptides en raison de problème d'agrégation, de solvatation et d'association des peptides à la matrice.[8] Des supports plus hydrophiles ont été développés, comme les résines polyamides réticulées[9] mais également des résines composites PEG-PS (polyéthylène glycol-plystyrène) commercialisées sous le nom de TentaGel[10] sont également disponibles. Elles se composent de polystyrène (1-2% DVB) fonctionnalisé avec de longues chaînes PEG au bout desquelles est accroché le bras fonctionnalisé rendant ces résines compatibles avec un grand nombre de solvants. Plus récemment, Meldal et *coll.* ont développé une matrice constituée uniquement de PEG et commercialisée sous le nom de ChemMatrix. La nature amphiphile du PEG confère à ces résines une bonne solvatation à la fois dans les solvants polaires et non polaires. De plus, ces résines offrent une bonne accessibilité aux sites réactionnels, ce qui les rend performantes pour la préparation de peptides hydrophobes, hautement structurés et stériquement encombrés.[8]

- Bras fonctionnalisé

Le choix du bras fonctionnalisé dépend de la fonction *C*-terminale désirée pour le peptide et du type de clivage envisagé dans la stratégie de synthèse.

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé principalement trois résines : les deux résines polystyrènes 2-chloro chlorotrityle et Wang, et la résine Rink Amide-ChemMatrix. Les bras fonctionnalisés de ces résines sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 8).

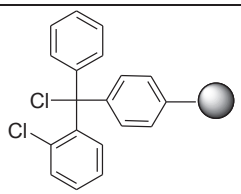
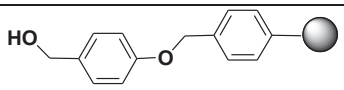
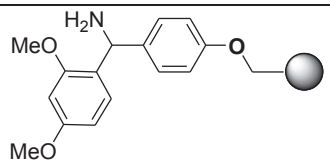
Nom	**Structure**	**Fonction C-ter.**
2-chloro chlorotrityle		acide
Wang		acide
Rink Amide		amide primaire

Tableau 8. Bras fonctionnalisés des résines polystyrènes 2-Chloro chlorotrityle, Wang, et de la résine Rink Amide-ChemMatrix

III.A .3. Activation micro-ondes

Depuis ces dernières années, l'activation par micro-ondes en synthèse peptidique sur phase solide devient une technique de plus en plus appliquée. Des améliorations conséquentes en terme de temps de couplage/déprotection et en terme de pureté/rendement ont été décrites.[11,12] Il a de plus été démontré récemment la supériorité du chauffage par micro-onde par rapport aux méthodes de couplage/déprotection conventionnelles, à température ambiante, pour la synthèse de séquences dites difficiles (longs peptides, séquences hydrophobes, stériquement encombrées ou présentant une grande proportion de résidus Ala, Val, Ile, Asn ou Gln), sujets à des problèmes d'agrégation inter et/ou intramoléculaire.[13-18]

Le principe de l'activation micro-onde repose sur la propriété de certains matériaux liquides ou solides de transformer une énergie électromagnétique en chaleur.[11] Les micro-ondes produisent le chauffage par interactions avec les molécules du milieu réactionnel. Le chauffage peut donc se faire au cœur du milieu, contrairement au chauffage par transfert de chaleur (bain d'huile) qui produit des « effets de paroi », c'est-à-dire que la chaleur est bien plus importante le long des parois proche de la source de chaleur qu'au centre du réacteur. Le chauffage se fait alors par convection de la chaleur de l'extérieur du réacteur vers l'intérieur. La Figure 33 montre cette répartition de la chaleur dans les deux cas, à gauche avec une irradiation micro-onde, à droite avec un chauffage par bain d'huile.[19]

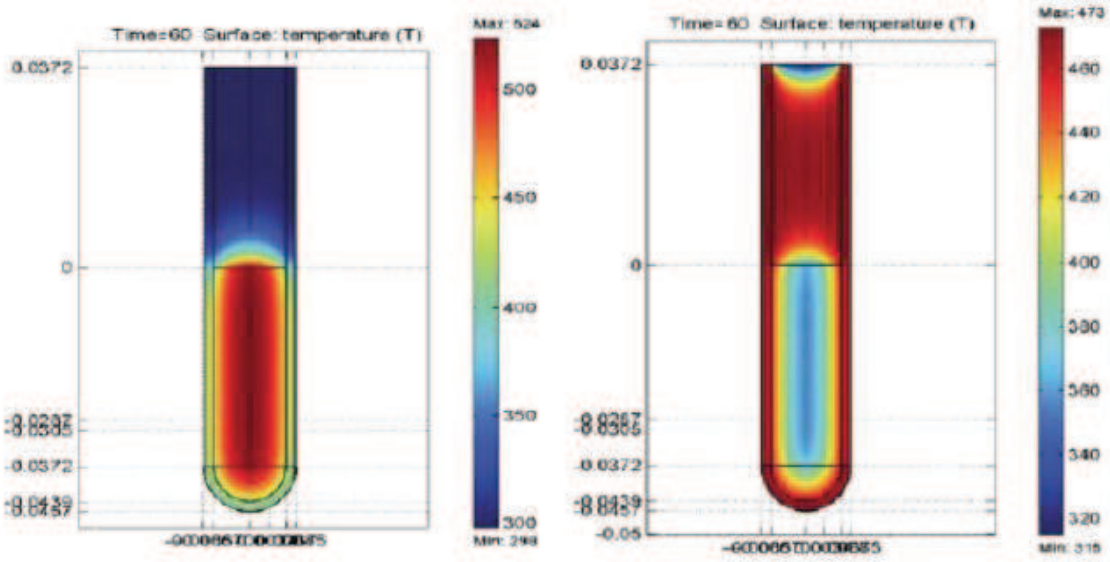


Figure 33. Comparaison de la répartition des températures après 1 min d'irradiation au micro-onde (à gauche) et dans un bain d'huile (à droite)

Kappe et *coll.* ont récemment confronté l'activation micro-onde au chauffage conventionnel pour la synthèse de séquences difficiles (9-mer, 15-mer et 24-mer).[20] Ils ont réalisé une étude comparative sur le type de résine utilisé (PS, TentaGel ou ChemMatrix) et le mode d'activation, à température identique (évalué in situ *via* une sonde spécifique). Ils ont démontré tout d'abord la nette supériorité de la résine ChemMatrix pour la synthèse de séquences hydrophobes. Ils ont obtenu pour la synthèse d'un nonapeptide une pureté HPLC >95% sans formation de produits secondaires tels que les peptides de délétion observés avec les résines PS et TentaGel. Ils ont de plus établi que pour des températures de couplage et de déprotection quasiment identiques, les puretés HPLC et les taux de racémisation sont comparables, mettant en évidence l'effet thermique de l'activation micro-onde.[20]

A l'heure actuelle, ce mode d'activation représente une méthode rapide et efficace pour la synthèse de peptides sur support solide.

III.A .4. Synthèses automatisées

De nos jours, de nombreux appareils automatisés sont disponibles pour la synthèse peptidique sur support solide.[21] Il existe différents types de robots adaptés pour la synthèse parallèle multiple de peptides en « flux continu » et en « batch ».

Dans l'approche « flux continu », le support solide est conditionné dans une colonne de verre munie de deux frittés aux deux extrémités. Les solvants et réactifs mouillent constamment la résine qui n'est jamais essorée durant la synthèse. Le flux de solvant traverse de bas en haut, permettant l'agitation de la résine. Les synthétiseurs travaillant en « flux continu » fonctionnent en général sur un nombre limité de réacteurs en parallèle (1 à 4). En contrepartie, ils sont capables de travailler avec des réacteurs de taille importante et ainsi de produire une plus grosse quantité de peptides. Le Pioneer est un des synthétiseurs utilisant ce principe (Figure 34). Il permet l'utilisation de deux colonnes en parallèle contenant jusqu'à 2 mmol de peptide.



Figure 34. Synthétiseur Pioneer

La synthèse de peptides en « batch » est réalisée dans des réacteurs munis d'un fritté, l'addition et l'élimination des réactifs et des solvants sont effectuées par le vide ou par une pression d'azote. L'agitation du support solide est réalisée par oscillation, secouement, au vortex ou en faisant buller de l'azote. Les robots actuellement commercialisés peuvent être divisé en deux grandes catégories :

- Les robots utilisant une technologie de seringues et d'aiguilles, reliés à un bras robot pouvant se déplacer et pipeter dans des flacons ouverts contenant les réactifs

- Les robots utilisant une technologie d'électrovannes où tous les fluides et réactifs nécessaires à la synthèse sont reliés par des tubes à la colonne de synthèse.

Dans la première catégorie, nous pouvons citer le synthétiseur Overture qui permet la synthèse de 95 peptides en parallèle, à une échelle de 0,005 à 24 mmol (Figure 35). Ce robot est équipé d'un bras multiaiguilles qui distribue rapidement les solvants et les réactifs communs.



Figure 35. Synthétiseur Overture

Source : http://www.peptideresource.com/synthesizer.html

Dans la seconde catégorie, nous pouvons citer le synthétiseur micro-ondes CEM Liberty pouvant synthétiser jusqu'à 12 peptides sur une échelle de 0,025 à 5 mmoles (Figure 36). Les solvants et réactifs sont distribués dans le réacteur par pression d'azote *via* un système d'électrovannes, la synthèse des peptides est effectuée une par une. La synthèse de nos peptides a été réalisée sur cet appareil.



Figure 36. Synthétiseur micro-onde Liberty

Source : http://www.peptideresource.com/synthesizer.html

Enfin, il existe également des robots tels que l'Autospot ou le pepsy de Zinsser permettant la synthèse de banques de peptides en utilisant des technologies mettant en jeu la miniaturisation destinée à la production de grandes collections.

III.B. Synthèse des D-peptides

Afin de répondre aux différents points évoqués précédemment, nous avons synthétisé une série de D-peptides à partir des deux composés de référence PIE7 et PIE14. Pour la suite de ce manuscrit, les deux D-peptides PIE7 et PIE14, ayant été synthétisés au laboratoire, prendront les noms d' IDX15971 (PIE7) et IDX16761 (PIE14).

Tout d'abord, à partir du D-peptide IDX15971, nous avons effectué une étude Ala-scan des résidus **D-Glu-9**, **D-Trp10**, D-Gln-11, **D-Trp12** et **D-Leu-13** (Tableau 9). Plus précisément nous avons remplacé successivement chaque résidu par une D-alanine pour évaluer son importance dans la séquence peptidique. La synthèse de cette série de composés, a été externalisée et synthétisée par la société GenePep.

D-Peptide	**Séquence**															
IDX15971	**Ac-**	**k**	**g**	**a**	**c**	**d**	**y**	**p**	**e**	**w**	**q**	**w**	**l**	**c**	**a**	**a**	**-NH$_2$**
IDX15970	Ac-	k	g	a	**c**	d	y	p	**a**	**w**	q	**w**	**l**	**c**	a	a	-NH$_2$
IDX15836	Ac-	k	g	a	**c**	d	y	p	**e**	**a**	q	**w**	**l**	**c**	a	a	-NH$_2$
IDX16120	Ac-	k	g	a	**c**	d	y	p	**e**	**w**	**a**	**w**	**l**	**c**	a	a	-NH$_2$
IDX16121	Ac-	k	g	a	**c**	d	y	p	**e**	**w**	q	**a**	**l**	**c**	a	a	-NH$_2$
IDX15835	Ac-	k	g	a	**c**	d	y	p	**e**	**w**	q	**w**	**a**	**c**	a	a	-NH$_2$

Tableau 9. Ala-scan des résidus 9 à 13 d' IDX15971

Nous avons ensuite réalisé la synthèse de D-peptides cycliques ou linéaires dépourvus des extrémités *N*- et/ou *C*-terminales (Tableau 10). Pour les séquences linéaires, les deux cystéines, formant naturellement des ponts disulfures, ont simultanément été substituées par deux D-sérines.

D-Peptide	Séquence
IDX15971	**Ac k g a c d y p e w q w l c a a -NH$_2$**
IDX16417	Ac k g a **c** d y p **e w** q **w l c** -NH$_2$
IDX16418	Ac **c** d y p **e w** q **w l c** a a -NH$_2$
IDX16625	Ac **c** d y p **e w** q **w l c** -NH$_2$
IDX16413	Ac k g a **s** d y p **e w** q **w l s** a a -NH$_2$
IDX16414	Ac k g a **s** d y p **e w** q **w l s** -NH$_2$
IDX16415	Ac **s** d y p **e w** q **w l s** a a -NH$_2$
IDX16416	Ac **s** d y p **e w** q **w l s** -NH$_2$

Tableau 10. Analogues cycliques et linéaires de IDX15971

Enfin, une étude Ala-scan des résidus présents sur les extrémités *N*- et *C*-terminales a été effectuée à partir du composé IDX16761 (Tableau 11).

D-Peptide	Séquence
IDX16761	**Ac h p c d y p e w q w l c r l g k -NH$_2$**
IDX18307	Ac **a** p **c** d y p **e w** q **w l c** r l g k -NH$_2$
IDX18308	Ac h **a** **c** d y p **e w** q **w l c** r l g k -NH$_2$
IDX18309	Ac h p **c** d y p **e w** q **w l c** **a** l g k -NH$_2$
IDX18310	Ac h p **c** d y p **e w** **q** **w l c** r **a** g k -NH$_2$
IDX18619	Ac h p **c** d y p **e w** **q** **w l c** r l **a** k -NH$_2$
IDX18620	Ac h p **c** d y p **e w** **q** **w l c** r l g **a** -NH$_2$

Tableau 11. Ala-scan des résidus des extrémités *N*- et *C*-terminales de IDX16761

- Synthèse des précurseurs linéaires

La synthèse des D-peptides a été effectuée selon une stratégie de synthèse Fmoc/tBu, au micro-onde, sur le système automatisé CEM liberty. Sachant que nous travaillons sur des séquences relativement longues, le choix de la résine s'est porté sur la résine Rink Amide ChemMatrix. Après synthèse du précurseur linéaire sur phase solide, les peptides ont été acétylés sur leurs extrémités *N*-terminales. La déprotection des chaînes latérales et le clivage du support a été effectuée en milieu acide en présence de « scavengers » (Schéma 3). Ces derniers ont pour rôle d'éviter les réactions secondaires d'additions électrophiles entre les

carbocations, provenant des groupes protecteurs, et les chaînes latérales des acides aminés riches en électrons, tels que les résidus Cys, Ser et Trp. L'utilisation de la résine ChemMatrix alliée à une synthèse peptidique par activation micro-onde nous a permis d'obtenir rapidement et efficacement les précurseurs linéaires avec des puretés HPLC supérieures à 80%.

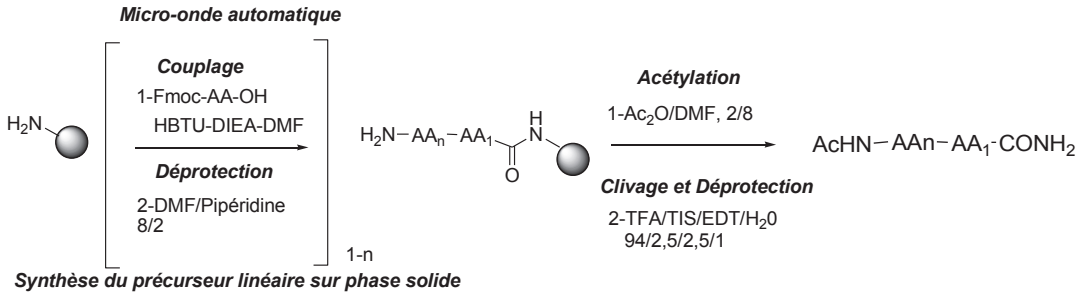


Schéma 3. Synthèse des précurseurs linéaires

- Cyclisation

Pour l'obtention de D-peptides cycliques, la formation des ponts disulfures a été effectuée après clivage de la résine, en haute dilution par oxydation avec du DMSO, dans une solution tampon (Schéma 4).

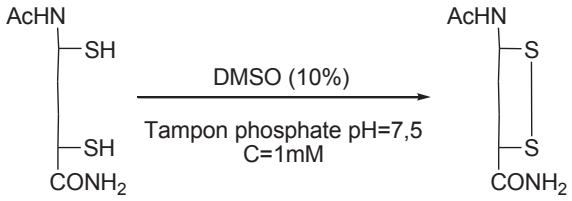


Schéma 4. Cyclisation

Après une dernière étape de purification par HPLC préparative, les composés linéaires et cycliques ont été testés en culture cellulaire afin d'évaluer leurs propriétés antivirales.

IV. Evaluation biologique des D-peptides

L'évaluation biologique de ces D-peptides a été réalisée par deux laboratoires : les laboratoires Idenix et par la société SPI-Bio (BERTIN Pharma).

IV.A. Evaluation biologique du D-peptide IDX15971 et de ses analogues

IV.A .1. Evaluation biologique du D-peptide IDX15971 et des D-peptides issus de l'étude Ala-scan

Tout d'abord, les évaluations biologiques effectuées sur le D-peptide de référence IDX15971 confirment son activité (CE_{50}=1,8 µM et 12,5 µM, littérature[2] CI_{50}=0,62 µM) (Tableau 12). Afin de s'assurer de la stabilité du D-peptide au cours du processus d'incubation, une étude de stabilité a été réalisée (le protocole et les résultats sont détaillés dans la partie expérimentale, paragraphe VII.E). Ce test a montré que le D-peptide IDX15971 est stable dans le milieu de culture, au cours du processus d'incubation.

D-Peptide	**Séquence**			
IDX15971	Ac k g a **c** d y p **e w** q **w l** **c** a a -NH_2			
Evaluation biologique	**Idenix**		**SPI-Bio**	
	CC_{50}[a] (µM)	**CE_{50}[b] (µM)**	**CC_{50}[a](µM)**	**CE_{50}[b] (µM)**
	>150	1,8	>50	12,5

[a] Concentration Cytotoxique : concentration nécessaire pour réduire de 50% la viabilité des cellules non infectées

[b] Concentration Effective : concentration nécessaire pour inhiber de 50% la cytopathogénicité induite par le virus dans les cellules MT-4(Idenix) ou la production de la protéine p24 (SPI-Bio)

Tableau 12. Evaluation biologique du D-peptide IDX15971

Par ailleurs, les résultats biologiques des D-peptides issus de l'étude Ala-scan, réalisés au sein d'Idenix (Tableau 13), corroborent ceux de l'étude de modélisation moléculaire. En effet, il apparaît que lorsque nous remplaçons la **D-Glu 9**, le **D-Trp-10**, le **D-Trp-12** et la **D-Leu-13** par la D-Ala, les D-peptides correspondants (IDX15970, IDX15836, IDX16121, IDX15835) ne sont plus actifs. De plus, nous confirmons que la D-Gln-11 n'est pas essentielle dans la séquence puisque l'activité du D-peptide correspondant (IDX16120) est maintenue.

D-Peptide	Séquence																CC_{50}[a] (µM)	CE_{50}[b] (µM)
IDX15971	**Ac**	**k**	**g**	**a**	**c**	**d**	**y**	**p**	**e**	**w**	**q**	**w**	**l**	**c**	**a**	**a**	**-NH_2**	**>150**	**1,8**
IDX15970	Ac	k	g	a	**c**	d	y	p	**a**	**w**	q	**w**	**l**	**c**	a	a	-NH_2	>150	81,19
IDX15836	Ac	k	g	a	**c**	d	y	p	**e**	**a**	q	**w**	**l**	**c**	a	a	-NH_2	>75	>75
IDX16120	Ac	k	g	a	**c**	d	y	p	**e**	**w**	**a**	**w**	**l**	**c**	a	a	-NH_2	93,19	1,25
IDX16121	Ac	k	g	a	**c**	d	y	p	**e**	**w**	q	**a**	**l**	**c**	a	a	-NH_2	>150	>150
IDX15835	Ac	k	g	a	**c**	d	y	p	**e**	**w**	q	**w**	**a**	**c**	a	a	-NH_2	>75	>75

[a] Concentration Cytotoxique : concentration nécessaire pour réduire de 50% la viabilité des cellules non infectées

[b] Concentration Effective : concentration nécessaire pour inhiber de 50% la cytopathogénicité induite par le virus dans les cellules MT-4

Tableau 13. Evaluation biologique des D-peptides issus de l'étude Ala-scan

IV.A .2. Influence des extrémités *N*- et *C*-terminales et comparaison des formes cycliques par rapport aux formes linéaires

Les D-peptides linéaires ou cycliques modifiés sur leurs extrémités *N*- ou *C*-terminales ont été évalués au sein des laboratoires Idenix (Tableau 14). Aucun d'entre eux n'a présenté d'activité. Ainsi, les D-peptides dépourvus successivement des extrémités *C*-terminales (IDX16417), *N*-terminales (IDX17418) puis des deux (IDX16625), semblent subir des changements conformationels défavorables aux interactions avec la protéine virale, prouvant l'importance de ces extrémités dans la séquence. De même, les études menées sur les analogues linéaires (IDX16413, IDX16414, IDX16415 et IDX16416) n'ont pas montré d'affinité. L'absence d'activité du D-peptide IDX16413 met en avant l'importance des contraintes conformationnelles induites par la structure cyclique du D-peptide IDX15971, favorables aux interactions avec la protéine.

D-Peptide	Séquence	CC_{50} [a] (µM)	CE_{50} [b] (µM)
IDX15971	**Ac- k g a c d y p e w q w l c a a -NH_2**	**>150**	**1,8**
IDX16417	Ac- k g a c d y p e w q w l c -NH_2	>150	32,43
IDX16418	Ac- c d y p e w q w l c a a -NH_2	>150	41,95
IDX16625	Ac- c d y p e w q w l c -NH_2	N.D.	>84,1
IDX16413	Ac- k g a s d y p e w q w l s a a -NH_2	>150	>150
IDX16414	Ac- k g a s d y p e w q w l s -NH_2	>150	>150
IDX16415	Ac- s d y p e w q w l s a a -NH_2	>150	>150
IDX16416	Ac- s d y p e w q w l s -NH_2	>150	>150

[a] Concentration Cytotoxique : concentration nécessaire pour réduire de 50% la viabilité des cellules non infectées

[b] Concentration Effective : concentration nécessaire pour inhiber de 50% la cytopathogénicité induite par le virus dans les cellules MT-4

N.D. Non Déterminé

Tableau 14. Evaluation biologique des D-peptides analogues du D-peptide IDX15971

IV.B. Evaluation biologique du D-Peptide IDX16761 et de ses analogues

L'évaluation biologique du D-peptide IDX16761 ainsi que les analogues correspondants à l'étude Ala-scan des extrémités *N*- et *C*-terminales a été effectuée par la société SPI-Bio (BERTIN Pharma).

Les activités observées sur cette série de composés confirment, dans un premier temps, l'activité du D-peptide de référence IDX16761 (CE_{50}= 0,2µM, littérature[3] CI_{50}= 0,033µM). De plus, cette étude Ala-scan nous permet de mesurer l'importance des extrémités *N*- et *C*-terminales (Tableau 15). En effet, une diminution notable de l'activité est commune à tous ces D-peptides (IDX18307, IDX18308, IDX18309, IDX18310, IDX18619 et IDX18620).

D-Peptide	Séquence																	CC_{50} [a] (µM)	CE_{50} [b] (µM)
IDX16761	**Ac-**	**h**	**p**	**c**	**d**	**y**	**p**	**e**	**w**	**q**	**w**	**l**	**c**	**r**	**l**	**g**	**k**	**-NH_2**	**>100**	**0,2**
IDX18307	Ac-	**a**	p	**c**	d	y	p	**e**	**w**	q	**w**	**l**	**c**	r	l	g	k	-NH_2	>150	7,8
IDX18308	Ac-	h	**a**	**c**	d	y	p	**e**	**w**	q	**w**	**l**	**c**	r	l	g	k	-NH_2	>150	6,4
IDX18309	Ac-	h	p	**c**	d	y	p	**e**	**w**	q	**w**	**l**	**c**	**a**	l	g	k	-NH_2	>150	2,1
IDX18310	Ac-	h	p	**c**	d	y	p	**e**	**w**	**q**	**w**	**l**	**c**	r	**a**	g	k	-NH_2	>150	8,4
IDX18619	Ac-	h	p	**c**	d	y	p	**e**	**w**	**q**	**w**	**l**	**c**	r	l	**a**	k	-NH_2	>150	1,4
IDX18620	Ac-	h	p	**c**	d	y	p	**e**	**w**	**q**	**w**	**l**	**c**	r	l	g	**a**	-NH_2	54,4	1,4

[a] Concentration Cytotoxique : concentration nécessaire pour réduire de 50% la viabilité des cellules non infectées

[b] Concentration Effective : concentration nécessaire pour inhiber de 50% la production de la protéine p24

Tableau 15. Evaluation biologique du D-peptide IDX16761 et de ses analogues

V. Conclusion

A travers les deux études réalisées, nous avons pu mettre en évidence et comprendre les caractéristiques essentielles à l'activité de ces composés de référence.

Tout d'abord, la modélisation du complexe IQN17/D10-P1-2K et l'étude Ala-scan du composé IDX15971 confirment l'importance des quatre aminoacides récurrents **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13**. Les trois résidus **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13** inclus dans la poche hydrophobe d'IQN17, ainsi que le résidu **D-Glu-9**, interagissent par des interactions de type hydrophobe, π-stacking, cation π ou par liaison hydrogène avec des résidus de IQN17 situés dans et aux bords de la poche.

De plus, la mesure des activités biologiques des analogues linéaires d'IDX15971 montre l'intérêt de la contrainte conformationnelle apportée par la structure cyclique sur l'activité de ces D-peptides.

Enfin, à partir d'un calcul de dynamique moléculaire sur les D-peptides décrits par Kay et *coll.*, et des activités mesurées pour les analogues d'IDX15971 et d'IDX16761, il apparaît clairement que les extrémités *N*- et *C*- terminales gouvernent les modifications structurales de la partie cyclique.

VI. Stratégie de synthèse

A partir de l'étude présentée dans ce chapitre, mes travaux de thèse se sont orientés vers deux nouveaux axes de recherche.

Tout d'abord, notre travail s'est porté sur la synthèse d'analogues des D-peptides (Figure 37) et nous avons réalisé la synthèse de séquences rétro, inverso, rétro-inverso et de séquences 7-mer. Puis, nous nous sommes orientés sur la synthèse de composés 8-mer incorporant des analogues des deux résidus essentiels le **D-Trp-10** et la **D-Leu-13**, afin de renforcer l'interaction de ces aminoacides avec la protéine.

Ces travaux sont décrits dans le chapitre 3.

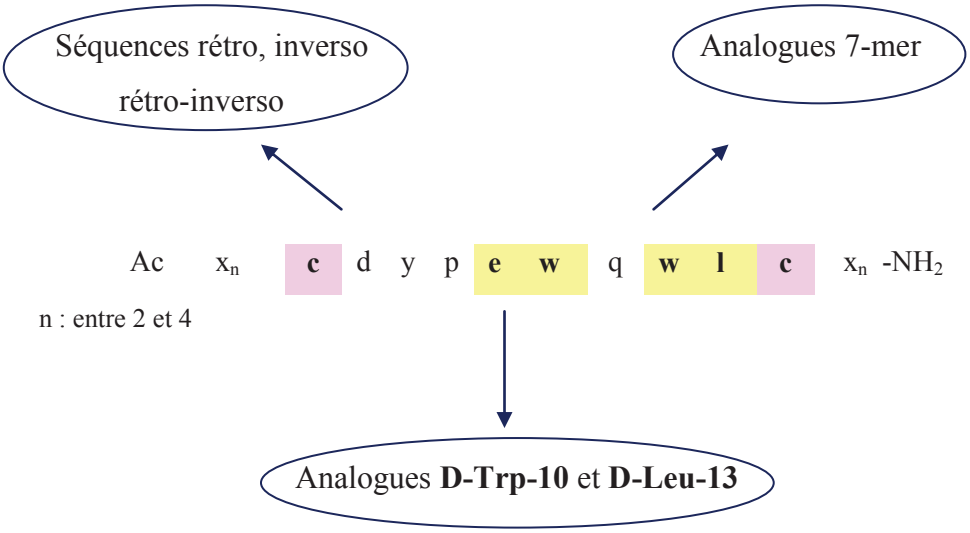


Figure 37. Analogues des D-peptides

Dans un second temps, dans le but de réduire la nature peptidique de ces séquences tout en améliorant l'activité antivirale, nous avons réalisé la synthèse d'une série de macrocycles inédits présentant les quatre résidus essentiels **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13** cyclisés *via* un ou deux linkers de type aliphatique (Figure 38).

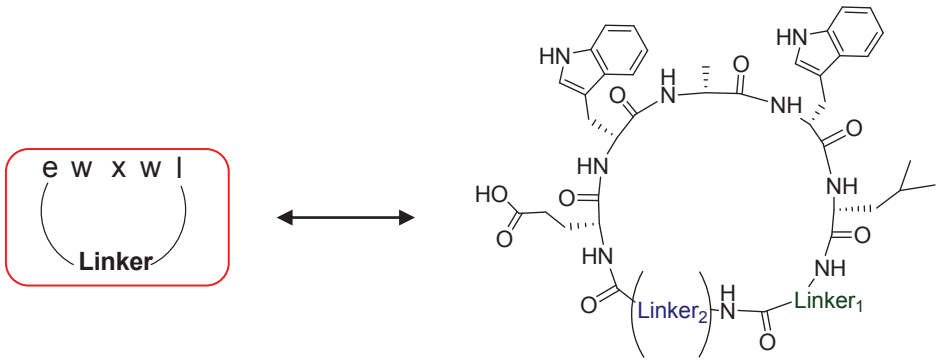


Figure 38. Macrocycles incorporant les quatre résidus essentiels **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13**

De plus, nous avons également développé une nouvelle méthode de cyclisation/décrochage de peptides par une réaction de métathèse cyclisante (RCM) faisant intervenir un nouveau linker, le composé *cis*-Apa (Schéma 5).

Ces travaux font l'objet du chapitre 4.

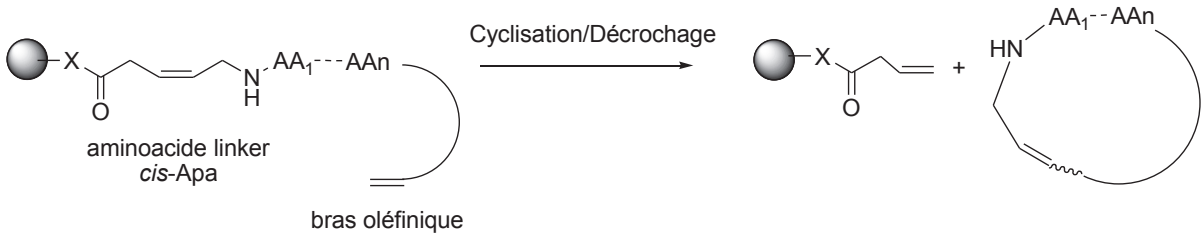
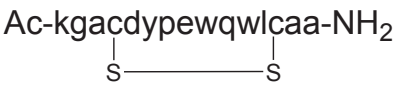


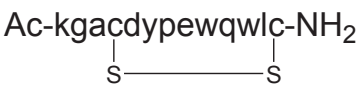
Schéma 5. Cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante

VII. Partie expérimentale

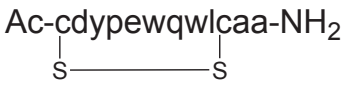
VII.A. Index des molécules synthétisées



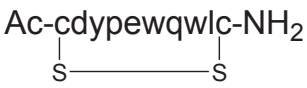
IDX15971



IDX16417



IDX16418



IDX16625



IDX16413



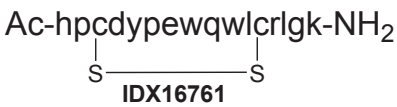
IDX16414



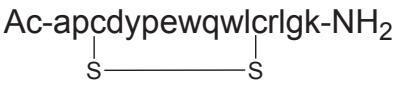
IDX16415



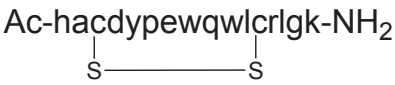
IDX16416



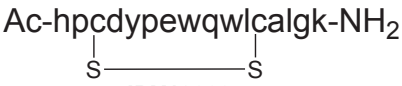
IDX16761



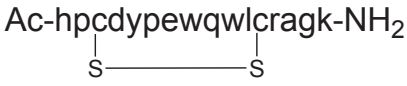
IDX18307



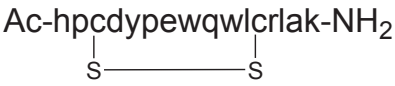
IDX18308



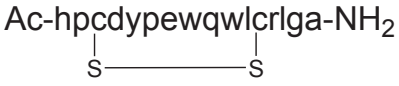
IDX18309



IDX18310



IDX18619



IDX18620

VII.B. Conditions Générales

Les dérivés d'acides aminés Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Gly-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-D-Cys(Trt)-OH, Fmoc-D-Asp(tBu)-OH, Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-D-Glu(tBu)-OH, Fmoc-D-Trp(Boc)-OH, Fmoc-D-Gln(Trt)-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-D-His(Trt)-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-D-Ser(tBu)-OH sont commercialisés par Iris Biotech, Novabiochem et NeoMPS. Les solvants et autres réactifs sont commercialisés par Merck, Fluka, Riedeil-de Haën, Sigma-Aldrich, Acros Organics, Interchim, AdvancedChem Tech, Novabiochem, VWR Prolabo. Tous de qualité analytique, ils ont été utilisés sans purification préalable. La résine Rink Amide-ChemMatrix (0,47mmol/g, 100-200 mesh dry) a été fournie par PCAS Biomatrix.

La synthèse des D-peptides a été effectuée au micro-onde, sur un système automatisé Liberty™ (CEM Corporation, Matthews, NC) allié à un module additionnel Discover™ (CEM Corporation, Matthews, NC) permettant de combiner l'énergie micro-onde à 2450 MHz à la synthèse peptidique sur phase solide, suivant la stratégie Fmoc/tBu. Le système est entièrement piloté par le logiciel PepDriver.

Les purifications par HPLC préparative ont été réalisées sur une chaîne Waters Delta-Prep 4000, équipée d'une colonne Deltapak C_{18} (100 mm x 40 mm, 15 µM, 100 Å) et d'un détecteur UV Waters 486 réglé à 214 ou 254 nm. L'élution est réalisée en mode gradient à un débit de 50 mL/min avec pour système d'éluants H_2O-0,1% TFA (A)/CH_3CN-0,1% TFA (B).

Les analyses LC/MS ont été effectuées sur un système constitué d'une HPLC Waters Alliance 2695 équipé d'une pompe, d'un dégazeur, d'un passeur d'échantillon et d'un détecteur à longueur double longueur d'onde (UV Waters 2489). Le spectromètre de masse Waters ZQ est équipé d'une source d'ionisation électrospray et d'un analyseur simple quadrupôle. Les analyses LC/MS sont effectuées sur une colonne Onyx C_{18}, 25mm x 4,6mm avec un débit de 3mL/min et un gradient linéaire (H_2O-0,1% HCO_2H (A)/ CH_3CN-0,1% HCO_2H (B)) allant de 0 à 100% B en 2,5 minutes. La tension de cône est de 20V, la température de la source est de 120°C et la température de solvatation de 500°C.

Les expériences MALDI-MS ont été réalisées sur un spectromètre de masse Ultraflex III équipé d'un laser à azote de longueur d'onde de 337 nm et d'une fréquence de 20 Hz. Le laser est accompagné d'un système de lentilles (ou atténuateur). L'appareil est équipé d'une source MALDI et d'un analyseur en temps de vol (Tof). Les échantillons sont déposés sur une plaque en acier inoxydable comprenant 384 positions de dépôts en mélange avec une matrice qui participe à la désorption/ionisation des peptides. Les solutions de matrice MALDI sont préparées à chaque nouvelle série d'expérience. La matrice utilisée est le CHCA (Fluka) en suspension dans un mélange eau/acétonitrile (70/30, v/v). Une solution saturée à 10 mg/ml est ainsi obtenue. Le calibrant est un mélange de peptides (peptide calibrant 1) commercialisé par Bruker couvrant une gamme de masse de 700 à 3500 Da. Les expériences ont été réalisées en mode dépôt goutte sèche, le dépôt est effectué par le procédé suivant : une goutte de 0.5 µL de solution de matrice est déposée sur la plaque MALDI en acier inoxydable, puis 0.5 µL de la solution de peptide est rapidement ajoutée par-dessus et le dépôt est laissé sécher à l'air libre.

VII.C. Synthèse des D-peptides

Procédure générale de synthèse des D-peptides sur phase solide par activation micro-ondes, méthode A.

Elongation de la chaîne peptidique

Les synthèses ont été effectuées sur une échelle de 0,1 mmol de résine Rink Amide-ChemMatrix (213 mg, 0,47 mmol/g). Les déprotections ont été réalisées avec une solution de DMF/Pipéridine (80/20 v/v) (7 mL). Les réactions de couplage ont été effectuées dans du DMF par introduction de l'aminoacide à coupler (2,5 mL, 0,5 mmol, 0,2 M, 5 éq.), d'HBTU (1 mL, 0,5 mmol, 0,5 M, 5 éq.) et de DIEA, diluée dans de la NMP, (0,5 mL, 1 mmol, 2 M, 10 éq.).
Chaque déprotection et couplage a été réalisé au micro-onde sous atmosphère d'azote. Le cycle de micro-onde se compose de deux étapes de déprotection ; une première de 30 s (40 W, 75°C) et une deuxième de 180 s (40 W, 70°C) puis une étape de couplage sur une durée de 300 s (23W, 70°C), sauf dans le cas des aminoacides D-Histidine et D-Cystéine (360 s, 50°C, 25 W). Entre chaque étape, des lavages au DCM et au DMF ont été effectués.

Acétylation et clivage de la résine Rink Amide-ChemMatrix

Après assemblage des peptides, les résines sont lavées au DCM puis les D-peptides sont acétylés sur leurs extrémités *N*-terminales avec une solution de DMF/Ac_2O (8/2 v/v) (5 mL). Le clivage des peptides de la résine et la déprotection des groupements protecteurs sur les chaînes latérales ont été réalisés avec une solution de TFA/H_2O/TIS/EDT (94/2,5/2,5/1 v/v/v/v) (25 mL/g de résine). Les résines sont placées dans un ballon pourvu d'une agitation magnétique, 6 mL de solution TFA/scavengers sont ajoutés pour 200 mg de résine à cliver. Après 3 h sous agitation à température ambiante, les résines sont lavées avec du TFA, filtrées et concentrées. Les produits bruts sont précipités par addition d'éther diéthylique puis filtrés et utilisés directement pour la réaction de cyclisation. Les D-peptides linéaires évalués biologiquement sont purifiés par HPLC préparative et lyophilisés pour obtenir des sels blancs.

Procédure générale de cylisation des ponts disulfures, méthode B.

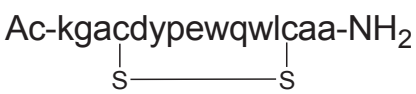
A une solution de D-peptide linéaire dans une solution tampon phosphate pH=7,5 (1mM) est ajoutée du DMSO (10% par volume). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24°C. Après évaporation, les bruts réactionnels sont purifiés par HPLC préparative et lyophilisés pour obtenir des sels blancs.

Toute cette série de composés a été caractérisée par LC/MS et MALDI. En raison de la limitation de la gamme de masse analysable en LC/MS, les D-peptides synthétisés présentant des masses monoisotopiques supérieures à 1500 Da sont observés sous forme d'ions multichargés ; les ions moléculaires ont été observés par la technique MALDI.

Pour chaque produit final, purifié par HPLC préparative, le rendement a été calculé par pesée du sel de TFA obtenu après lyophilisation et la masse molaire utilisée pour le calcul est la masse salifiée. Pour les produits finaux non isolés sous forme de sel (du fait de leur structure), le rendement a été calculé à partir de la masse molaire.

IDX15971

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2

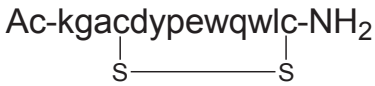


Formule brute : $C_{81}H_{110}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1780,03
Masse monoisotopique (Da) : 1778,77
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1894,05

Quantité : 20 mg, **Rendement :** 10%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,29 min
SM (ESI) : *m/z* 890,9 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1779,8 $[M+H]^+$

IDX16417

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-NH_2

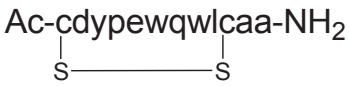


Formule brute : $C_{75}H_{100}N_{18}O_{20}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1637,88
Masse monoisotopique (Da) : 1636,69
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1751,9

Quantité : 16 mg, **Rendement :** 9%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,29 min
SM (ESI) : *m/z* 819,5 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1637,7 $[M+H]^+$

IDX16418

Ac-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2

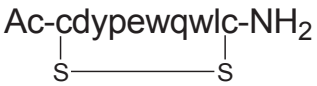


Formule brute : $C_{70}H_{90}N_{16}O_{19}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1523,73
Masse monoisotopique (Da) : 1522,62

Quantité : 13 mg, **Rendement :** 9%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,39 min
SM (ESI) : *m/z* 762,4 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1523,6 $[M+H]^+$

IDX16625

Ac-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-NH_2



Formule brute : $C_{64}H_{82}N_{14}O_{17}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1381,57
Masse monoisotopique (Da) : 1380,54

Quantité : 12 mg, **Rendement :** 9%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,39 min

SM (ESI) : *m/z* 691,6 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1381,5 $[M+H]^{+}$

IDX16413

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-D-Ser-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Ser-D-Ala-D-Ala-NH_2

Ac-kgasdypewqwlsaa-NH_2

Formule brute : $C_{81}H_{112}N_{20}O_{24}$

Masse molaire (g/mol) : 1749,90

Masse monoisotopique (Da) : 1748,82

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1862,84

Quantité : 19 mg, **Rendement :** 10%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

HPLC analytique t_R : 1,20 min

SM (ESI) : *m/z* 875,9 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1749,8 $[M+H]^{+}$

IDX16414

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-D-Ser-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Ser-NH_2

Ac-kgasdypewqwls-NH_2

Formule brute : $C_{75}H_{102}N_{18}O_{22}$

Masse molaire (g/mol) : 1607,74

Masse monoisotopique (Da) : 1606,74

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1721,76

Quantité : 20 mg, **Rendement :** 12%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

HPLC analytique t_R : 1,16 min

SM (ESI) : *m/z* 804,9 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1607,7 $[M+H]^{+}$

IDX16415

Ac-D-Ser-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Ser-D-Ala-D-Ala-NH_2

Ac-sdypewqwlsaa-NH_2

Formule brute : $C_{70}H_{92}N_{16}O_{21}$

Masse molaire (g/mol) : 1493,60

Masse monoisotopique (Da) : 1492,66

Quantité : 19 mg, **Rendement :** 13%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

HPLC analytique t_R : 1,27 min

SM (ESI) : *m/z* 747,7 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1493,7 $[M+H]^{+}$

IDX16416

Ac-D-Ser-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Ser-NH_2

Ac-sdypewqwls-NH_2

Formule brute : $C_{64}H_{82}N_{14}O_{19}$

Masse molaire (g/mol) : 1351,44

Masse monoisotopique (Da) : 1350,59

Quantité : 15 mg, **Rendement :** 11%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

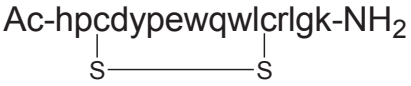
HPLC analytique t_R : 1,27 min

SM (ESI) : *m/z* 776,9 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1351,7 $[M+H]^{+}$

IDX16761

Ac-D-His-D-Pro-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Arg-D-Leu-D-Gly-D-Lys-NH_2



Formule brute : $C_{95}H_{132}N_{26}O_{23}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 2070,42

Masse monoisotopique (Da) : 2068,96

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 2298,46

Quantité : 9 mg, **Rendement :** 4**%, Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

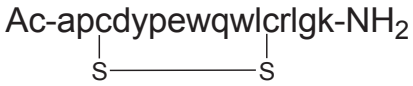
HPLC analytique t_R : 1,29 min

SM (ESI) : *m/z* 1036,1 $[M+2H]^{2+}$; 691,1 $[M+3H]^{3+}$

SM (MALDI) : *m/z* 2092,0 $[M+H+Na]^{+}$; 2070,0 $[M+H]^{+}$

IDX18307

Ac-D-Ala-D-Pro-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Arg-D-Leu-D-Gly-D-Lys-NH_2



Formule brute : $C_{92}H_{130}N_{24}O_{23}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 2004,34

Masse monoisotopique (Da) : 2002,93

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 2232,38

Quantité : 9 mg, **Rendement :** 4%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

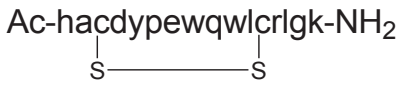
HPLC analytique t_R : 1,29 min

SM (ESI) : *m/z* 1002,99 $[M+2H]^{2+}$; 669,02 $[M+3H]^{3+}$

SM (MALDI) : *m/z* 2025,9 $[M+H+Na]^+$; 2003,9 $[M+H]^+$

IDX18308

Ac-D-His-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Arg-D-Leu-D-Gly-D-Lys-NH_2



Formule brute : $C_{93}H_{130}N_{26}O_{23}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 2044,36

Masse monoisotopique (Da) : 2042,94

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 2272,24

Quantité : 13 mg, **Rendement :** 6%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

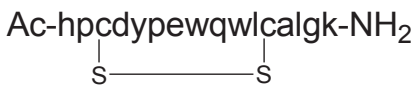
HPLC analytique t_R : 1,27 min

SM (ESI) : *m/z* 1023,1 $[M+2H]^{2+}$; 682,4 $[M+3H]^{3+}$

SM (MALDI) : *m/z* 2066,0 $[M+H+Na]^+$; 2044,0 $[M+H]^+$

IDX18309

Ac-D-His-D-Pro-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Leu-D-Gly-D-Lys-NH_2



Formule brute : $C_{92}H_{125}N_{23}O_{23}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1985,29

Masse monoisotopique (Da) : 1983,89

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 2099,3

Quantité : 8 mg, **Rendement :** 4%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

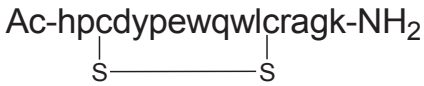
HPLC analytique t_R : 1,30 min

SM (ESI) : *m/z* 993,5 $[M+2H]^{2+}$; 662,6 $[M+3H]^{3+}$

SM (MALDI) : *m/z* 2006,9 $[M+H+Na]^{+}$; 1984,9 $[M+H]^{+}$

IDX18310

Ac-D-His-D-Pro-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Arg-D-Ala-D-Gly-D-Lys-NH_2



Formule brute : $C_{92}H_{126}N_{26}O_{23}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 2028,32

Masse monoisotopique (Da) : 2026,91

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 2256,36

Quantité : 9 mg, **Rendement :** 4%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

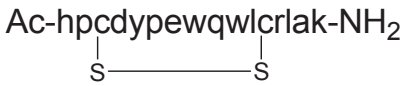
HPLC analytique t_R : 1,28 min

SM (ESI) : *m/z* 1015,0 $[M+2H]^{2+}$; 677,0 $[M+3H]^{3+}$

SM (MALDI) : *m/z* 2027,9 $[M+H]^{+}$

IDX18619

Ac-D-His-D-Pro-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Arg-D-Leu-D-Ala-D-Lys-NH_2



Formule brute : $C_{96}H_{134}N_{26}O_{23}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 2084,43

Masse monoisotopique (Da) : 2082,97

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 2312,47

Quantité : 11 mg, **Rendement :** 5%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

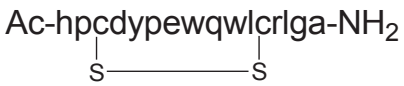
HPLC analytique t_R : 1,29 min

SM (ESI) : *m/z* 1042,6 $[M+2H]^{2+}$; 695,3 $[M+3H]^{3+}$

SM (MALDI) : *m/z* 2084,0 $[M+H]^{+}$

IDX18620

Ac-D-His-D-Pro-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Arg-D-Leu-D-Gly-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{92}H_{125}N_{25}O_{23}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 2013,31
Masse monoisotopique (Da) : 2011,90
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 2127,33

Quantité : 13 mg, **Rendement :** 6%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,27 min
SM (ESI) : *m/z* 1006,9 $[M+2H]^{2+}$; 671,6 $[M+3H]^{3+}$
SM (MALDI) : *m/z* 2012,9 $[M+H]^+$

VII.D. Protocoles évaluations biologiques

VII.D .1. Protocole évaluation biologique au sein d'Idenix

Préparation de l'échantillon

Les composés testés sont dissous dans du DMSO à une concentration de 15 mM puis dilués dans du milieu de culture RPMI 1640 complété avec 10% de sérum fœtal de veau (« fetal calf serum **»,** FCS), 2 g/L de $NaHCO_3$, 100 unités/mL de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 1,2% de DMSO.

Cellules

Les lignées cellulaires utilisées pour la réplication du VIH-1 sont les cellules MT-4 (NIH, Bethesda, MD).

Souche VIH

La souche VIH-1 BH10 a été achetée chez NIH (Bethesda, MD).

Essai de cytotoxicité

Les essais de cytotoxicité ont été réalisés en parallèle des essais antiviraux. Les cellules MT-4

ont été traitées de la même façon que pour le test anti-VIH mais n'ont pas été infectées par le virus. La valeur de CC_{50} a été déterminée à partir du pourcentage de cytotoxicité par rapport aux données de concentration *via* une courbe sigmoïde de régression non linéaire basée sur quatre paramètres avec le logiciel Tecan Magellan software.

Essai anti-VIH

L'activité des composés contre la réplication du VIH a été mesurée par l'inhibition de la cytopathogénicité induite par le virus dans les cellules MT-4, infectées avec le VIH (souche BH10, sous-type B) à une multiplicité de l'infection (m.o.i) aux environs de 0,05 qui conduit à un effet cytopathique de 90%.

Les cellules MT-4 ont été semées dans une plaque de culture de 96 puits, à une concentration de 104 cellules par puit dans 50 µL de milieu de culture RPMI 1640 complété avec 10% de sérum fœtal de veau (« fetal calf serum **»,** FCS), 2 g/L de $NaHCO_3$, 100 unités/mL de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.

Puis, des séries de composés dilués deux fois dans 50 µL (concentrations finales 0.29 µM à 75 µM) ont été ajoutées et les cellules ont été infectées avec 20 µL d'une suspension de VIH, à une dilution conduisant à 90% d'effet cytopathique. Dans cet essai, la concentration finale en DMSO est de 0,5% dans 120 µL. Les cultures cellulaires sont ensuite incubées à 37°C dans une atmosphère de CO_2 humidifiée à 5% pendant 4 jours.

La viabilité des cellules a été évaluée par la méthode colorimétrique « Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay » (Promega). Cette expérience est basée sur une réaction biochimique pour laquelle le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl-)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium en jaune est réduit en formazan violet par une enzyme mitochondriale réductase. Le taux de conversion est directement rattaché au nombre de cellules viables. La solution « One Solution Reagent » est additionnée directement aux puits de cultures (20 µL/puit), incubée pendant 4 heures, et l'absorbance est enregistrée à 492 nm à partir du spectrophotomètre Sunrise Tecan. Les valeurs de CE_{50} sont déterminées à partir du pourcentage d'inhibition par rapport aux données de concentration *via* une courbe sigmoïde de régression non linéaire basée sur quatre paramètres avec le logiciel Tecan Magellan.

VII.D .2. Protocole évaluation biologique au sein de SPI-Bio

Essai de cytotoxicité et essai anti-VIH

L'activité des composés contre le VIH a été mesurée par inhibition de l'effet cytopathogène induit par le virus (CPE, « Cytopathogen effects ») et par inhibition de la production de la nucléocapside virale la protéine p24, dans les cellules MT-4 infectées avec la souche HIV-1-LAI.[22] Les effets de cytotoxicité des composés ont été évalués en parallèle en utilisant des cellules MT-4 non infectées.

Les cellules MT-4 ont été semées dans une plaque de culture de 96 puits, à une concentration de 10,000 cellules par puit dans du milieu de culture RPMI1640 glutamax™ complété avec 10% de sérum fœtal de veau inactivé (« heat-inactivated »,+56°C, 45 min.) et un mélange de trois antibiotiques (pénicilline, streptomycine et néomycine, PSN)

Ces cellules sont traitées avec 6 séries de chaque composé, chacune diluée 3 fois (0,6 à 150 µM pour nos composés et 4 à 1,000 nM pour les composés de référence AZT et T20). Puis, les cellules sont infectées avec un aliquote de virus HIV-1-LAI à une dilution conduisant à un effet cytopathique (CPE) de 90%.

Auparavant, la souche virale a été titrée en utilisant les cellules MT4, et cette dilution correspond à 600 TCID50 (doses correspondant à 50% de tissu de culture infectieux). Ce titrage a été calculé en utilisant la formule de Kärber.[23]

Les cultures cellulaires ont ensuite été incubées à 37°C dans une atmosphère de CO_2 humidifiée à 5% pendant 4 jours. Après 4 jours, les supernageants des cultures cellulaires ont été collectés et stoqués à -20°C. L'effet cytopathique (CPE) a été quantifié en utilisant le titrage au méthyl-tétrazolium (MTT). Après le dégel des supernageants, la réplication du VIH-1 a été mesurée en quantifiant la production de p24 en utilisant le kit RETRO-TEK HIV-1 P24 Antigen (Gentaur).

En parallèle de ces mesures, la cytotoxicité de chaque composé a été évaluée sur des cellules MT-4 non infectées en utilisant le même titrage au MTT après 4 jours d'incubation.

Toutes ces expériences ont été réalisées trois fois et les données ont été traitées en utilisant le logiciel SoftMax®Pro 4.6. Les pourcentages d'inhibitions de l'activité rétrovirale ou de la viabilité des cellules ont été tracés par rapport à la concentration et ont été mesurés à partir de courbes d'équation du second degré. Les doses effectives (ED_{50}, ED_{70} et ED_{90}) et les doses cytotoxiques (CD_{50}, CD_{70} et CD_{90}) à 50, 70 et 90 % ont été ensuite calculées.

VII.E. Protocole des études de stabilité d'IDX15971

Les tests de stabilité ont été effectués à partir de cinq échantillons prélevés du milieu de culture à une concentration de 100 µM convenant 0,5% de DMSO (conditions testées *in vitro* au sein d'Idenix). Ces échantillons correspondent à des temps d'incubation différents (T_0, T_1j, T_2j, T_3j, T_4j) plus précisément au temps T_0 (pas d'incubation) et au temps T4 (après quatre jours d'incubation à 37°C). Les mêmes prélèvements ont été effectués pour le milieu de culture seul (étude témoin sans le D-peptide IDX15971).

Chaque échantillon contenant le composé IDX15971 et chaque échantillon témoin sont passés à travers une résine de type « catch and release » cartouche OASIS® HLB, Waters. Le procédé de cette extraction est présenté sur la Figure 39.

Après conditionnement de la résine dans une solution eau-méthanol (2 mL), les échantillons sont déposés sur la résine puis lavés successivement avec une solution tampon pH 3 (dilution ½) (1 mL) et une solution tampon pH 3 (dilution ½) convenant 10% de méthanol (1 mL). Après un lavage à l'eau (2 mL), le composé IDX15971 est collecté par désorption à pH basique par une solution d'acétonitrile avec 10% MeOH/NH_3 7N (2 mL).

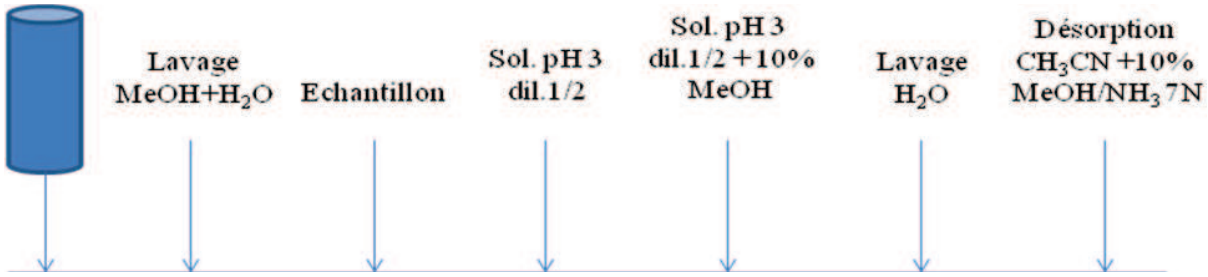


Figure 39. Protocole d'extraction sur résine Oasis® HLB

Après désorption du composé IDX15971, aux différents temps d'incubation, les échantillons ont été lyophilisés puis analysés en LC/MS, seuls les ions dichargés $[M+2H]^{2+}$ ont été observés (Tableau 16).

	IDX15971	
	Cyclique	**Linéaire**
$[M+H]^+$	1779.7	1781.7
$[M+2H]^{2+}$	890.4	891.4

Tableau 16. Masse molaire (g/mol) du composé IDX15971 sous forme cyclique et linéaire

Sur la Figure 40 ci-dessous sont représentées les analyses LC/MS des échantillons aux temps T_0 et T_{4j}, après traitement. Les analyses LC/MS montrent seulement la présence du D-peptide IDX15971 en plus des signaux correspondant au milieu de culture (CM). Aucun sous-produit de dégradation n'a été observé. Les analyses au temps T_{1j}, T_{2j} et T_{3j} ont présenté le même profil.

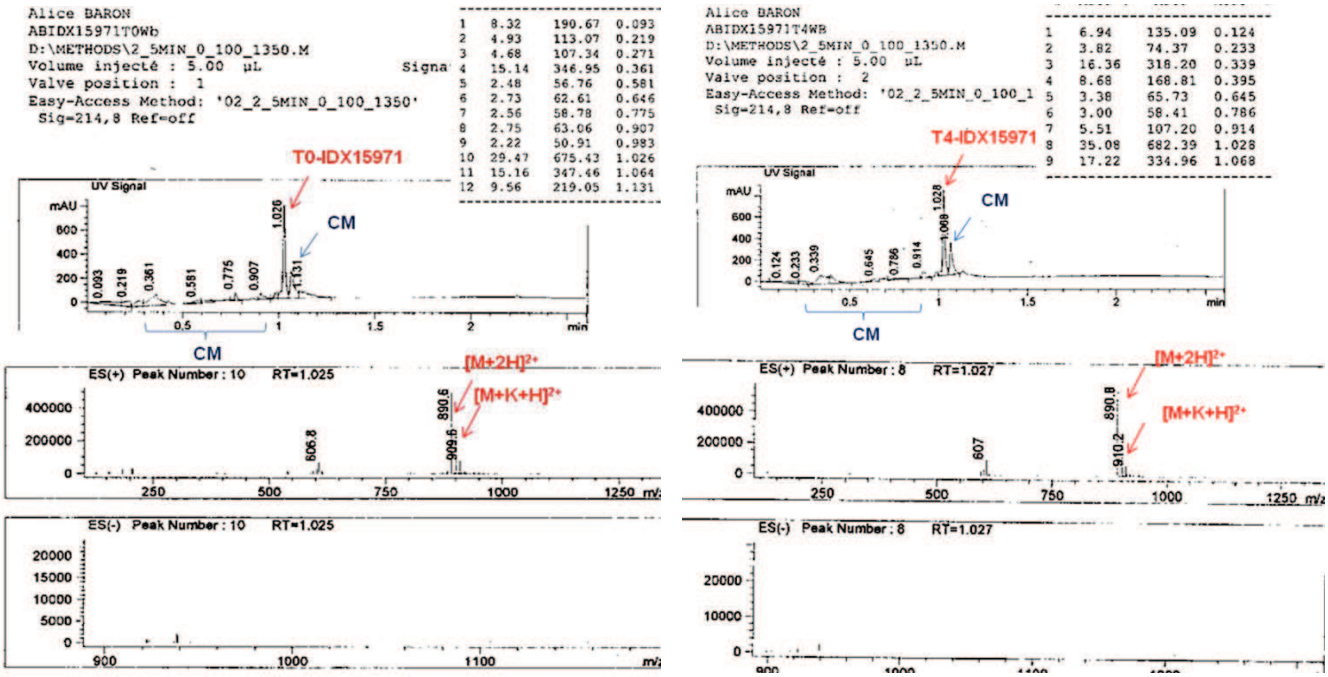


Figure 40. Analyses LC/MS d'IDX15971 aux temps T_0 (à gauche) et T_{4j} (à droite)

Les fractions aux temps T_0 et T_{4j} ont également été analysées par MALDI-MS et dans les deux cas, seul l'ion moléculaire correspondant au peptide cyclique IDX15971 a été observé (Figure 41 et Figure 42).

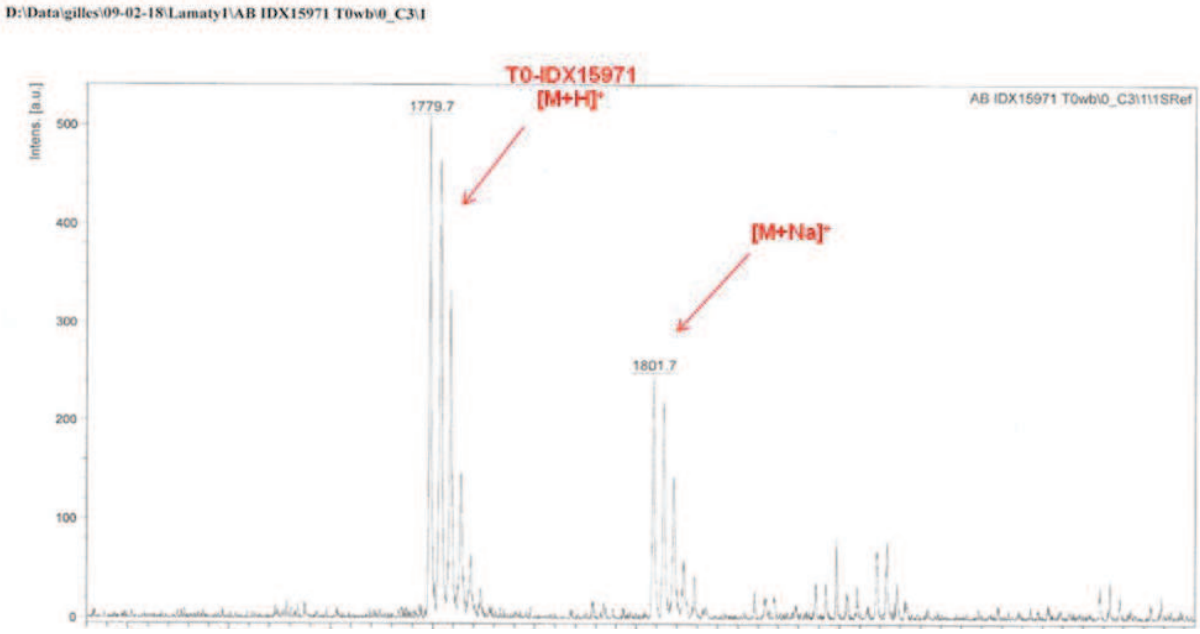


Figure 41. Spectre de masse MALDI d'IDX15971 au temps T_0

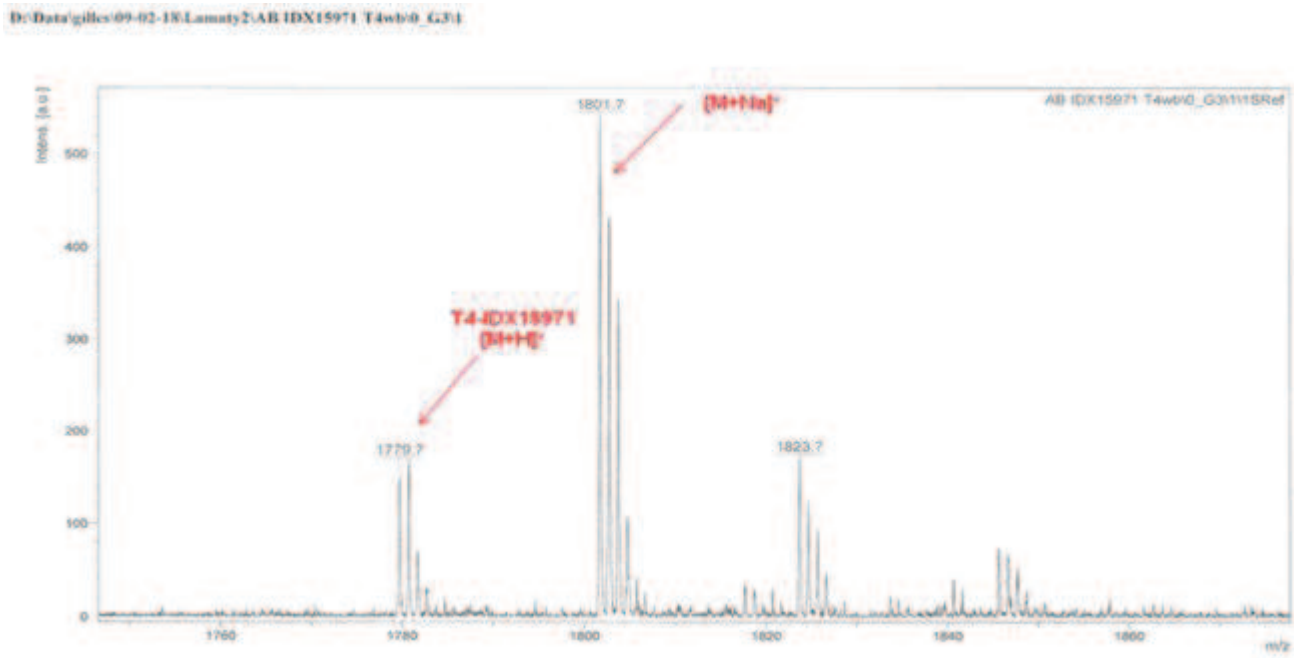


Figure 42. Spectre de masse MALDI d'IDX15971 au temps T_{4j}

Références Bibliographiques

(1) Eckert, D. M.; Malashkevich, V. N.; Hong, L. H.; Carr, P. A.; Kim, P. S., Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell* **1999,** *99* (1), 103-15.

(2) Welch, B. D.; VanDemark, A. P.; Heroux, A.; Hill, C. P.; Kay, M. S., Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry. *Proc Natl Acad Sci USA* **2007,** *104* (43), 16828-16833.

(3) Kay, M. S.; Welch, B. D. Methods and compositions related to inhibition of viral entry. 2008. WO/2008/098182

(4) Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S., et al., CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **1983,** *4* (2), 187-217.

(5) Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963,** *85* (14), 2149-2154.

(6) Howl, J.; Editor, *Peptide Synthesis and Applications, [In: Methods Mol. Biol. (Totowa, NJ, U. S.); 2005, 298]*. Humana Press Inc.: 2005; p 262.

(7) Kates, S. A.; Albericio, F.; Editors, *Solid-Phase Synthesis*. Dekker: 2000; p 826.

(8) Garcia-Martin, F.; Quintanar-Audelo, M.; Garcia-Ramos, Y.; Cruz, L. J.; Gravel, C., et al., ChemMatrix, a poly(ethylene glycol)-based support for the solid-phase synthesis of complex peptides. *J. Comb. Chem.* **2006,** *8* (2), 213-220.

(9) Atherton, E.; Clive, D. L. J.; Sheppard, R. C., Polyamide supports for polypeptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1975,** *97* (22), 6584-6585.

(10) Bayer, E., Towards the Chemical Synthesis of Proteins. *Angew. Chem. Inter. Edit. Engl.* **1991,** *30* (2), 113-129.

(11) Loupy, A.; Editor, *Microwaves in Organic Synthesis: Second, Completely Revised and Enlarged Edition, Volume 2*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2006; p 482 pp.

(12) Sabatino, G.; Papini, A. M., Advances in automatic, manual and microwave-assisted solid-phase peptide synthesis. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2008,** *11* (Copyright (C) 2010 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 762-770.

(13) Malik, L.; Tofteng, A. P.; Pedersen, S. L.; Sørensen, K. K.; Jensen, K. J., Automated 'X-Y' robot for peptide synthesis with microwave heating: application to difficult peptide sequences and protein domains. *J. Pept. Sci.* **2010,** *16* (9), 506-512.

(14) Rizzolo, F.; Sabatino, G.; Chelli, M.; Rovero, P.; Papini, A., A Convenient Microwave-Enhanced Solid-Phase Synthesis of Difficult Peptide Sequences: Case Study of Gramicidin A and CSF114(Glc). *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2007,** *13* (1), 203-208.

(15) Coantic, S.; Subra, G.; Martinez, J., Microwave-assisted Solid Phase Peptide Synthesis on High Loaded Resins. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2008,** *14* (2), 143-147.

(16) Katritzky, A. R.; Haase, D. N.; Johnson, J. V.; Chung, A., Benzotriazole-Assisted Solid-Phase Assembly of Leu-Enkephalin, Amyloid β segment 34−42, and other "Difficult" Peptide Sequences. *J. Org. Chem.* **2009,** *74* (5), 2028-2032.

(17) Galanis, A. S.; Albericio, F.; Grøtli, M., Solid-Phase Peptide Synthesis in Water Using Microwave-Assisted Heating. *Org. Lett.* **2009,** *11* (20), 4488-4491.

(18) Bacsa, B.; Bősze, S.; Kappe, C. O., Direct Solid-Phase Synthesis of the β-Amyloid (1−42) Peptide Using Controlled Microwave Heating. *J. Org. Chem.* **2010,** *75* (6), 2103-2106.

(19) De la Hoz, A.; Diaz-Ortiz, A.; Moreno, A., Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem. Soc. Rev.* **2005,** *34* (2), 164-178.

(20) Bacsa, B.; Horvati, K.; Bosze, S.; Andreae, F, Kappe, C. O., Solid-Phase Synthesis of Difficult Sequences at Elevated Temperatures: A Critical Comparison of Microwave and Conventional Heating Technologies. *J. Org. Chem.* **2008,** *73*, 7532-7542.

(21) Chan, W. C.; White, P. D.; Editors, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford Univ Press: **2000**; p 346 pp.

(22) Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. *Science* **1983**, *220*, 868-871.

(23) Kärber, G. *Arch. Exp. Path. Pharmak.* **1931**, *162*, 480-483.

Chapitre 3: Synthèse d’analogues des D-peptides

I. Objectifs

A travers les études menées dans le chapitre précédent, nous avons pu déterminer les caractéristiques essentielles responsables de l'activité des D-peptides décrits par Eckert et *coll.* puis par Kay et *coll.*[1,2] Sur la base de ces travaux, notre objectif a été d'améliorer l'activité biologique et de réduire la nature peptidique de ces composés de référence.

Ainsi, à partir de la séquence IDX15971 considérée au début de ce projet comme la plus active (12,5 µM, activité mesurée par la société SPI-Bio) (Tableau 17), notre travail s'est porté sur la synthèse d'analogues de ce composé. Par la suite, les modifications les plus intéressantes ont été appliquées au composé IDX16761, séquence décrite dans le brevet de Kay et *coll.*[3] paru durant nos travaux, et présentant une meilleure activité (0,2 µM, activité mesurée par la société SPI-Bio).

D-Peptide	**Séquence**															**EC_{50} (µM)**
IDX15971	Ac	k	g	a	**c**	d	y	p	**e**	**w**	q	**w**	**l**	**c**	a a -NH_2	12,5
IDX16761	Ac	h	p		**c**	d	y	p	**e**	**w**	q	**w**	**l**	**c**	r l g k -NH_2	0,2
Numérotation par analogie au 10-mer									**9**	**10**		**12**	**13**			

Tableau 17. Séquences de référence IDX15971 et IDX16761

Dans un premier temps, nous avons travaillé sur la synthèse des séquences rétro, inverso et rétro-inverso du D-peptide IDX15971 (Tableau 18).

Peptides	**Séquence**																
IDX15971	Ac	k	g	a	**c**	d	y	p	**e**	**w**	q	**w**	**l**	**c**	a	a	-NH_2
Rétro	Ac	a	a	c	l	w	q	w	e	p	y	d	c	a	g	k	-NH_2
Inverso	Ac	K	G	A	C	D	Y	P	E	W	Q	W	L	C	A	A	-NH_2
Rétro-inverso	Ac	A	A	C	L	W	Q	W	E	P	Y	D	C	A	G	K	-NH_2

Tableau 18. Séquences rétro, inverso et rétro-inverso

Notre étude s'est portée ensuite sur la synthèse d'analogues 7-mer. La stratégie, dans ce cas, a consisté à éliminer successivement un des trois résidus D-Asp-6, D-Tyr-7 ou D-Pro-8, présents dans la partie 8-mer du D-peptide IDX15971 (Figure 43).



Figure 43. D-peptide IDX15971

Enfin, la majeure partie de ce chapitre a été consacrée à la synthèse de dérivés du composé IDX15971 incorporant des analogues du **D-Trp-10** ou/et de la **D-Leu-13** (Figure 44). Le choix des résidus à modifier a été établi à partir d'une étude de modélisation moléculaire.

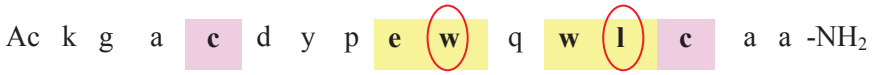


Figure 44. D-peptide IDX15971

Ce travail a nécessité la préparation d'acides aminés non naturels qui ont pu être obtenus à partir de trois principales réactions : l'alkylation par transfert de phase, la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) et la réaction d'alkylation de Friedel-Crafts. Une exemplification de la réaction de HWE, sans solvant, par activation mécanique est également décrite dans ce chapitre.

A partir de l'évaluation biologique des analogues synthétisés, les séquences les plus actives des dérivés du composé IDX15971 ont été incorporées dans le D-peptide IDX16761.

Ainsi, à travers ces travaux, la synthèse et l'évaluation biologique de 40 analogues cycliques a été réalisée.

II. Analogues rétro, inverso et rétro-inverso du D-peptide IDX15971

II.A. Principe et synthèse

Depuis maintenant de nombreuses années, la synthèse de séquences rétro-inverso fait partie des modifications peptidiques prises en compte par de nombreux chimistes bioorganiciens.

Par définition, un peptide rétro-inverso (c) est un isomère pour lequel la direction de la séquence d'aminoacide est inversée et la chiralité de chaque acide aminé est intervertie (Figure 45).[4]

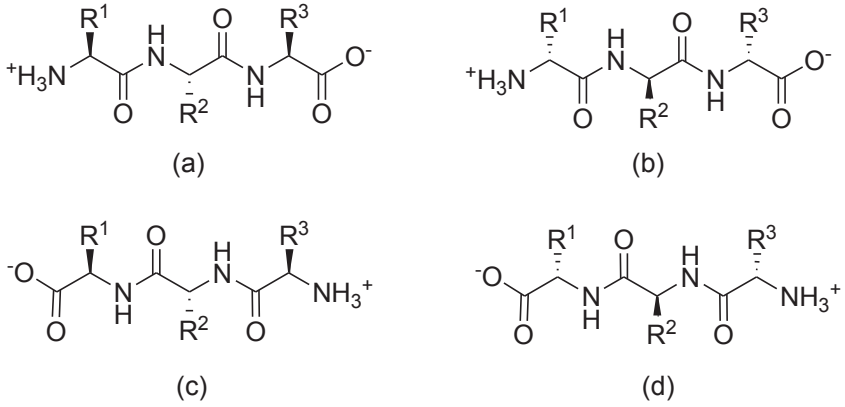


Figure 45. Tripeptide linéaire et ses isomères. (a) (-X(R^1)-Y(R^2)-Z(R^3)-), (b) énantiomère (-D-X(R^1)-D-Y(R^2)-D-Z(R^3)-), (c) rétro-inverso peptide (-D-Z(R^3)-D-Y(R^2)-D-X(R^1)-), (d) rétro-isomère (-Z(R^3)-Y(R^2)-X(R^1)-)

Ainsi, l'orientation dans l'espace des chaînes latérales entre le peptide parent (a) et l'isomère (c), est la même par contre les groupements terminaux sont non complémentaires.[5] La séquence rétro (d) correspond uniquement à l'inversion de la séquence d'aminoacides, et la séquence inverso (b), correspond à l'inversion de chiralité de chaque résidu.[4]

Nous nous sommes intéressés à la synthèse des séquences rétro (IDX18169), inverso (IDX18174) et rétro-inverso (IDX17849) du D-peptide IDX15971 (Tableau 19). Dans notre cas, l'objectif était d'optimiser l'activité, mais également d'exploiter une séquence de référence non décrite et de réduire par la suite sa nature peptidique.

Peptides	**Séquence**
IDX15971	Ac k g a **c** d y p **e** **w** q **w** **l** **c** a a -NH_2
IDX18169	Ac a a c l w q w e p y d c a g k -NH_2
IDX18174	Ac K G A C D Y P E W Q W L C A A -NH_2
IDX17849	Ac A A C L W Q W E P Y D C A G K -NH_2

Tableau 19. Séquences rétro, inverso et rétro-inverso du peptide IDX15971

La synthèse des composés mentionnés dans le tableau 19 a été effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre 2, paragraphe III.B. Plus précisément, ces synthèses ont été effectuées sur une résine Rink Amide-ChemMatrix et à l'aide d'un synthétiseur micro-onde CEM Liberty. Après *N*-acétylation, clivage et déprotection des groupements protecteurs des chaînes latérales, les peptides sont cyclisés *via* un pont disulfure par réaction d'oxydation au DMSO, puis purifiés avant d'être biologiquement évalués.

II.B. Evaluation biologique des séquences rétro, inverso et rétro-inverso

L'évaluation biologique des trois composés synthétisés en tant qu'inhibiteur de fusion du VIH, ainsi que ceux présentés dans le reste de ce chapitre, a été effectuée par la société SPI-Bio (BERTIN Pharma). Les activités mesurées pour ces trois composés s'avèrent supérieures à 150 µM (Tableau 20), nous avons conclu que les séquences rétro (IDX18169), inverso (IDX18174) et rétro-inverso (IDX17849) ne sont donc pas actives.

Peptide	**Séquence**	**CC_{50}[a] (µM)**	**CE_{50}[b] (µM)**
IDX15971	**Ac k g a c d y p e w q w l c a a -NH_2**	**>50**	**12,5**
IDX18169	Ac a a c l w q w e p y d c a g k -NH_2	>150	>150
IDX18174	Ac K G A C D Y P E W Q W L C A A -NH_2	>150	>150
IDX17849	Ac A A C L W Q W E P Y D C A G K -NH_2	>150	>150

[a] Concentration Cytotoxique : concentration nécessaire pour réduire de 50% la viabilité des cellules non infectées

[b] Concentration Effective : concentration nécessaire pour inhiber de 50% la production de la protéine p24

Tableau 20. Evaluation biologique des analogues rétro, inverso et rétro-inverso du D-peptide IDX15971

La non-complémentarité des extrémités *N*- et *C*-terminales, pour la séquence rétro-inverso IDX17849 (Figure 46), peut expliquer la perte d'affinité avec la protéine. Une autre raison peut être la présence de la proline. En effet, la position de la chaîne latérale de la proline, caractérisée par un cycle pyrrolidine incorporant l'atome d'azote inclus dans la liaison peptidique, est déplacée dans l'isomère rétro-inverso IDX17849 (Figure 46). Ainsi, la modification spatiale induite par le changement de position de l'atome d'azote avec le carbonyle, pourrait expliquer l'inactivité du peptide IDX17849.[4,5]

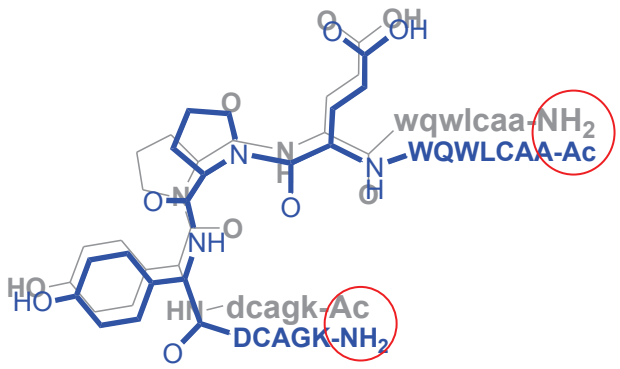


Figure 46. Représentation des extrémités *N*-et *C*-terminales et de la proline dans le D-peptide IDX15971 (en gris) et dans le peptide rétro-inverso IDX17849 (en bleu)

III. Synthèse et évaluation biologique des analogues 7-mer

Dans l'objectif de réduire la taille des D-peptides et d'optimiser leur activité antivirale, nous avons travaillé sur une série de composés 7-mer. Cette étude s'est appuyée sur les travaux successifs de Eckert et *coll.*, puis de Kay et *coll.*, montrant une très nette amélioration de l'activité lors du passage d'un composé 10-mer (D10-p5-2k, CI_{50}=9,5 µM) à un composé 8-mer (IDX15971 ou PIE7, CI_{50}=0,62 µM) (Tableau 21).[1,2]

D-Peptide																			**CI_{50} (µM)**
D10-p5-2K	Ac-	k	k	g	a	**c**	e	l	l	g	w	**e**	**w**	a	**w**	**l**	**c**	a	a	-NH_2	9,5
IDX15971	Ac-	k	g	a	**c**	d	y	p				**e**	**w**	q	**w**	**l**	**c**	a	a	-NH_2	0,62
Séquence consensuelle		**g**	**a**	**c**	**x**	**x**	**x**	**x**	**x**			**e**	**w**	**x**	**w**	**l**	**c**	**a**	**a**	**-NH_2**	
		1										**9**	**10**		**12**	**13**			**16**		

Tableau 21. Séquences 8- et 10-mer

Sachant que les extrémités *N*- et *C*-terminales gouvernent l'orientation conformationnelle de la partie cyclique, et que les acides aminés essentiels, **D-Glu-9, D-Trp-10, D-Trp-12** et **D-Leu-13**, jouent un rôle clé dans les interactions avec IQN17 (résultats présentés dans le chapitre 2), notre choix s'est porté sur la suppression successive des résidus D-Asp-6, D-Tyr-7 et D-Pro-8 (Figure 47).

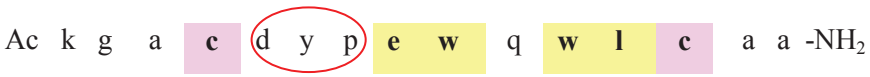


Figure 47. D-peptide IDX15971

La synthèse des D-peptides cycliques a été réalisée dans des conditions identiques à celles décrites dans le chapitre 2, paragraphe III.B. A travers les évaluations biologiques menées sur ces composés (Tableau 22), il apparaît qu'aucun de ces nouveaux D-peptides n'est actif. L'élimination d'un des trois résidus D-Asp-6, D-Tyr-7 ou D-Pro-8 provoque probablement un changement conformationnel de la partie cyclique ce qui diminue les interactions avec la protéine et rend ces composés inactifs.

D-Peptide	**Séquence**	**CC_{50} (µM)**	**CE_{50} (µM)**
IDX15971	**Ac k g a c d y p e w q w l c a a -NH_2**	**>50**	**12,5**
IDX16760	Ac k g a **c** y p **e w** q **w l c** a a -NH_2	>150	71,58
IDX16488	Ac k g a **c** d p **e w** q **w l c** a a -NH_2	>150	52,37
IDX16486	Ac k g a **c** d y **e w** q **w l c** a a -NH_2	>150	86,33

[a]Concentration Cytotoxique : concentration nécessaire pour réduire de 50% la viabilité des cellules non infectées

[b] Concentration Effective : concentration nécessaire pour inhiber de 50% la production de la protéine p24

Tableau 22. Evaluation biologique des composés 7-mer du D-peptide IDX15971

IV. Insertion d'analogues de la D-Leu-13 et du D-Trp-10 dans le D-peptide IDX15971

A partir de l'étude menée dans le chapitre 2, concernant la compréhension du rôle des résidus essentiels (**D-Glu-9, D-Trp-10, D-Trp-12** et **D-Leu-13**) présents dans les séquences de référence, et au vu des résultats biologiques obtenus avec les séquences rétro, inverso, rétro-inverso puis avec les séquences 7-mer, notre stratégie s'est orientée vers la modification de ces acides aminés essentiels afin d'améliorer l'activité antivirale des composés. Plus particulièrement, notre étude s'est portée sur l'incorporation d'analogues du **D-Trp-10** et de la **D-Leu-13** dans la séquence de référence IDX15971 (Figure 48), choix établi sur la base d'une étude de modélisation moléculaire.

Ac k g a **c** d y p **e** **w** q **w** **l** **c** a a -NH_2

Figure 48. D-peptide IDX15971

Ainsi, nous avons synthétisé, tout d'abord une série de peptides dérivés du composé IDX15971 incorporant des analogues de la **D-Leu-13** puis du **D-Trp-10**. Après évaluation biologique, les deux résidus présents dans les meilleures séquences ont été incorporés simultanément dans le composé IDX15971, puis dans le composé IDX16761, D-peptide plus actif (cf paragraphe I, tableau 17).

IV.A. Choix des cibles, étude de modélisation

Une étude de modélisation effectuée au sein d'Idenix par le Dr Thierry Convard a guidé notre choix des cibles. Le programme Discovery Studio version 2.5.5 (fournisseur Accelrys) utilisant un module dénommé ludi[6] a permis d'identifier les trois types d'interaction, hydrophobe (en bleu), accepteur de liaison hydrogène HBA (« Hydrogen Bond Acceptor », en vert) et donneur de liaison hydrogène HBD (« Hydrogen Bond Donor », en rose) qu'offre la protéine IQN17 à un ligand potentiel (Figure 49). Cette étude a été établie à partir des données des co-cristaux du complexe IQN17/D10-p1-2k pour lequel le D-peptide (D10-p1-2k) est enlevé de la protéine IQN17, et une identification des interactions autour de la protéine a été réalisée.

Il apparaît à travers ces images que les interactions prédominantes avec le D-peptide, dans la poche, sont les interactions de type hydrophobe. En effet la figure 49 b) montre que la protéine IQN17 présente majoritairement des interactions de type lipophile avec le D-peptide, en comparaison avec les figures 49 c) et d) où les interactions de la protéine avec des accepteurs ou donneurs de ligands du D-peptide sont nettement plus faibles.

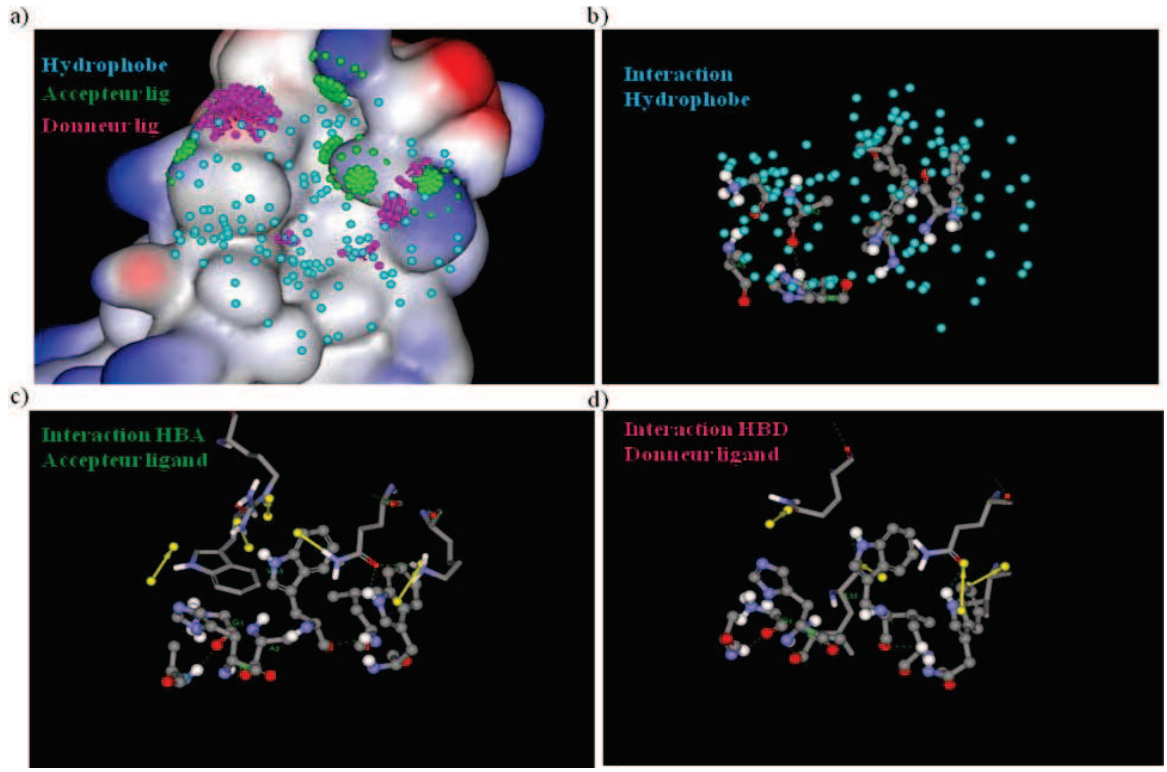


Figure 49. Représentations de la carte d'interaction du complexe IQN17/D10-P1-2k sans D10-P1-2k. a) Image des interactions hydrophobes, HBD et HBA dans et autour de la poche hydrophobe de IQN17, b) Image des interactions hydrophobes dans la poche de IQN17, c) Image des interactions HBA dans la poche de IQN17, d) Image des interactions HBD dans la poche de IQN17

Ainsi, l'objectif de notre travail était d'augmenter la lipophilie des résidus essentiels afin d'optimiser ces interactions D-peptide/protéine et améliorer l'activité. Pour cela, notre recherche s'est focalisée sur les résidus **D-Trp-10** et **D-Leu-13**, résidus à l'intérieur de la poche hydrophobe et susceptibles de capter le maximum d'interactions lipophiles.

Notre travail a été axé sur l'incorporation d'acides aminés modifiés substituant ces deux résidus de référence, acides aminés commerciaux, dans la majorité des cas. D'autres dérivés d'acides aminés ont du être synthétisés selon trois voies de synthèse passant par les étapes clés suivantes: la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) (analogues **D-Leu-13**), la réaction d'alkylation par transfert de phase (analogues **D-Trp-10** et analogues **D-Leu-13**) et la réaction d'alkylation de Friedel-Crafts (analogues **D-Trp-10**). Une application de la réaction de HWE sans solvant par activation mécanique pour la synthèse d'une série d'aminoacides α,*β*-insaturés a également été étudiée.

IV.B. Synthèse d'analogues de la D-Leu-13 et insertion dans le D-peptide IDX15971

Dans un premier temps, notre travail s'est porté sur la synthèse de D-peptides incorporant des analogues de la **D-Leu-13**. Pour cela, une série de molécules hydrophobes ont été sélectionnées comprenant des structures aliphatiques saturées ou insaturées, aromatiques et cycloalkyles, ou encore des héréroatomes (Figure 50). Certains de ces analogues sont des composés commerciaux (en noir) d'autres ont été synthétisés (en rose et vert). L'intérêt de ce travail était d'optimiser les interactions hydrophobes avec la protéine mais également d'induire de nouvelles interactions grâce à l'introduction, par exemple, d'un groupement cyano, accepteur de ligand ou d'un groupement trifluorométhyle, électroattracteur. Les analogues insaturés éthyléniques ont été préparés, à l'origine en tant qu'intermédiaires de synthèse.

Dans ce chapitre, nous présenterons tout d'abord, les deux voies de synthèse permettant l'accès aux analogues non commerciaux, puis l'incorporation de l'ensemble des aminoacides décrits dans la figure 50 dans la séquence de référence IDX15971. Ensuite, une étude de relation structure-activité (SAR) sera développée sur la base des évaluations biologiques de l'ensemble de ces composés.

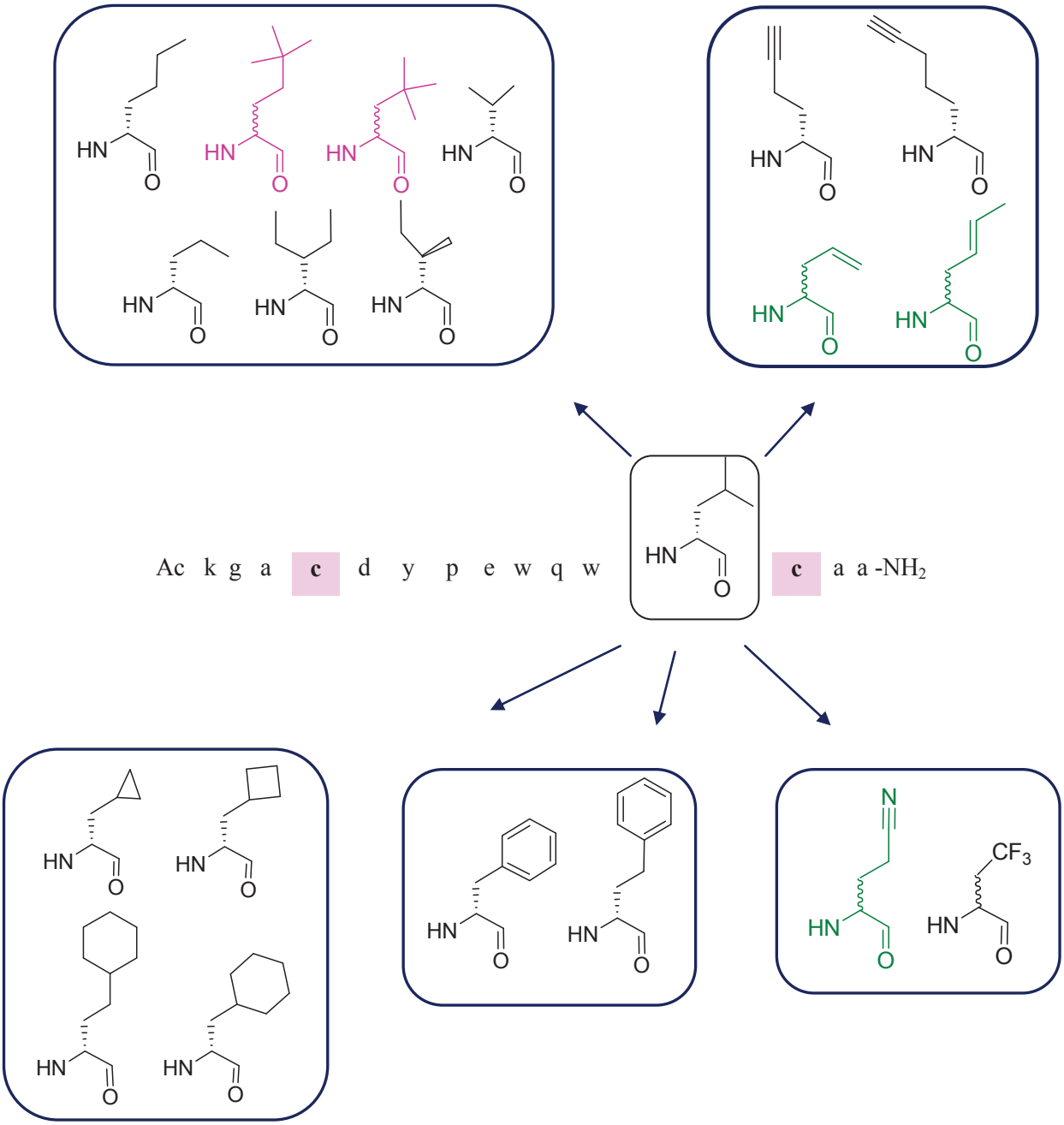


Figure 50. Analogues de la **D-Leu-13**

IV.B .1. Synthèse d'analogues de la D-Leu-13

Notre stratégie a été basée sur la synthèse d'analogues aminoacides sous forme racémique, de les incorporer dans la séquence de référence IDX15971 et de réaliser une évaluation biologique des peptides correspondants. L'objectif était d'obtenir rapidement des premières informations et de ne travailler par la suite sur la synthèse énantiosélective que si les composés s'avéraient actifs. Dans certains cas, les couples de diastéréoisomères

correspondants ont pu être séparés par HPLC préparative et évalués séparément.

Deux voies de synthèses ont été étudiées (Schéma 6). Elles utilisent les réactions suivantes: une réaction d'alkylation d'une base de Schiff catalysée par transfert de phase (CTP) (Voie A) ou une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons selon les conditions de Schmidt (Voie B). Les analogues de la **D-Leu-13** ainsi obtenus ont ensuite été convenablement protégés afin de pouvoir être incorporés dans une stratégie Fmoc/tBu.

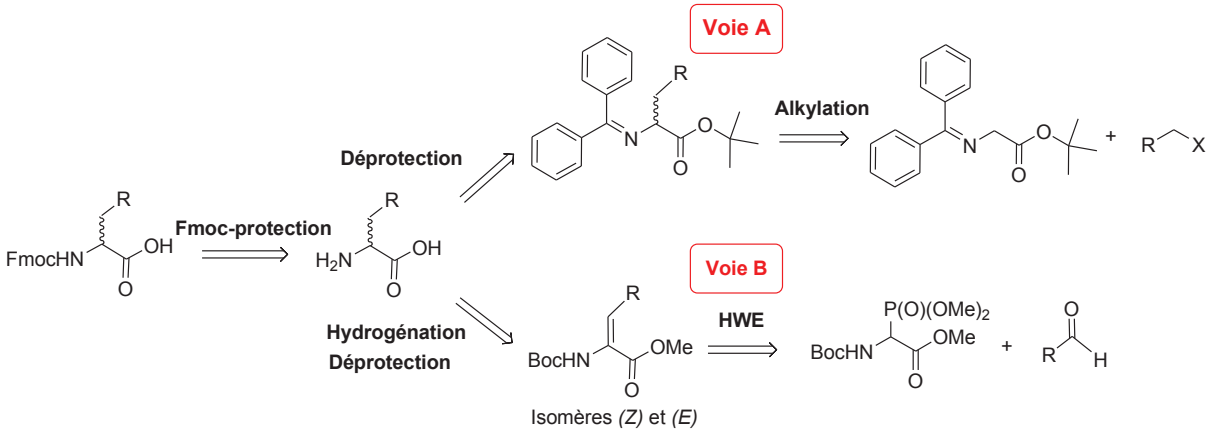


Schéma 6. Voies de synthèse des analogues de la **D-Leu-13**

IV.B.1.1. Synthèse *via* l'alkylation par Catalyse par Transfert de Phase (CTP)

IV.B.1.1.(i) Principe

Depuis maintenant de nombreuses années, la réaction d'alkylation par transfert de phase d'imines de la glycine ou de bases de Schiff est devenue une méthode efficace pour la synthèse d'α-aminoacides (Figure 51).

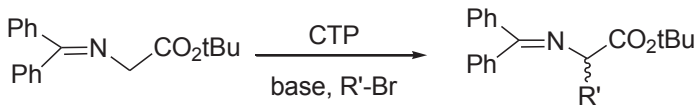


Figure 51. Alkylation d'une base de Schiff par CTP

Nous avons choisi les conditions décrites par O'Donnell et *coll.*, à savoir l'alkylation de bases de Schiff en présence de sels d'ammonium quaternaires et d'une base telle que NaOH, KOH ou CsOH dissoute dans l'eau. L'ajout de solvant permet de dissoudre les composés organiques et de créer une seconde phase. Le mécanisme de la réaction est illustré ci-dessous (Schéma 7). [7, 8]

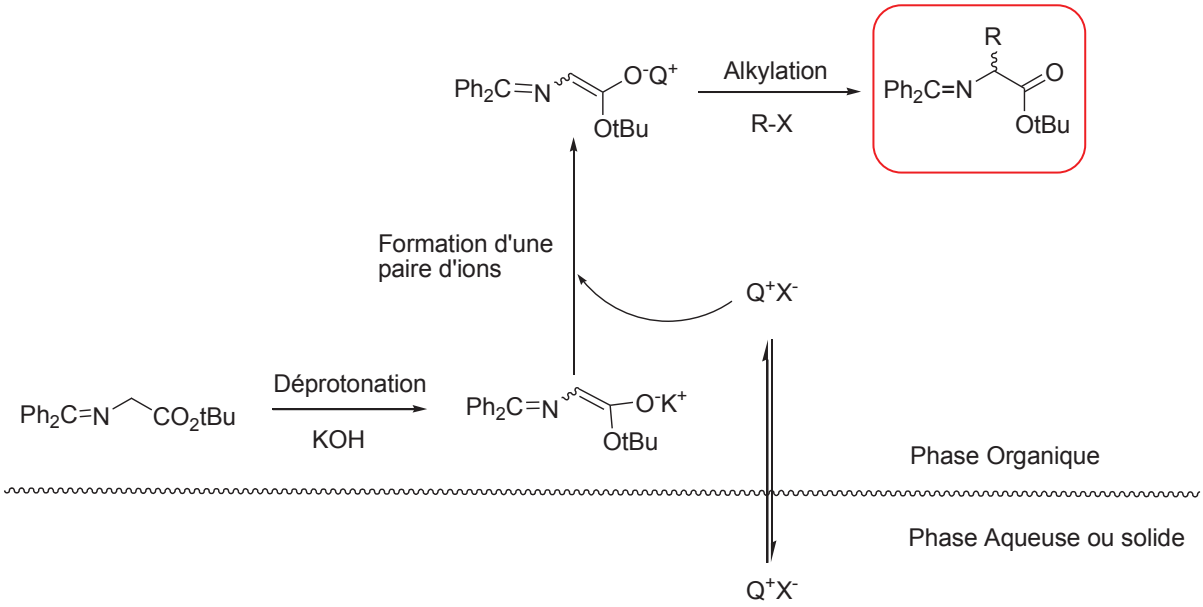
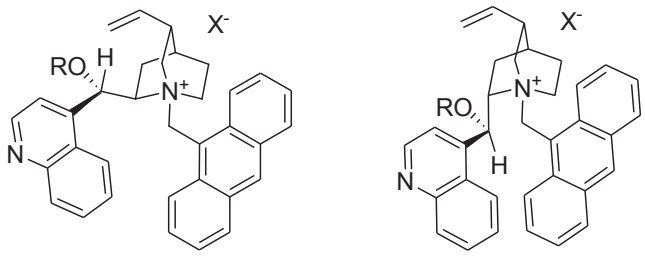


Schéma 7. Mécanisme de la réaction d'alkylation par CTP

La première étape se situe à l'interface des phases organique/aqueuse où la base de Schiff est déprotonée donnant l'énolate correspondant, puis complexée par le catalyseur pour former un complexe soluble en phase organique. La base de Schiff déprotonée réagit ensuite sur l'électrophile pour conduire au produit d'alkylation attendu.

Par ailleurs, un des intérêts de cette méthode est qu'il est possible d'utiliser des catalyseurs chiraux pour la synthèse énantiosélective d'α-aminoacides. En effet, les dernières générations de catalyseurs dérivés des alcaloïdes cinchonine et cinchonidine, développées par Lygo[9] (R=H) et Corey[10] (R= allyl) (Figure 52), permettent d'obtenir les α-aminoacides respectivement de configuration (*R*) ou (*S*).[11,12]



R= H ou allyl
Dérivés de la cinchonine

R= H ou allyl
Dérivés de la cinchonidine

Figure 52. Catalyseurs de transfert de phase dérivés de la cinchonine (gauche) et de la cinchonidine (droite)

IV.B.1.1.(ii) Synthèse d'analogues de la D-Leu-13

La synthèse des analogues de la **D-Leu-13** comporte quatre étapes (Schéma 8). Tout d'abord, la formation de la base de Schiff **3** par réaction de transimination du chlorhydrate de la *tert*-butylglycine triméthyl ester **2** avec la benzophenone imine **1** (Etape 1).[13] Cette réaction s'effectue à température ambiante et le seul sous-produit formé est du chlorure d'ammonium éliminé par filtration ou lavage aqueux. Ensuite, la réaction d'alkylation par transfert de phase avec différents dérivés halogénés conduit aux bases de Schiff alkylées correspondantes (Etape 2). Après deux étapes successives d'hydrolyse acide puis de protection Fmoc (Etape 3 et 4), les analogues de la **D-Leu-13** sont prêts à être incorporés dans la séquence de référence IDX15971.

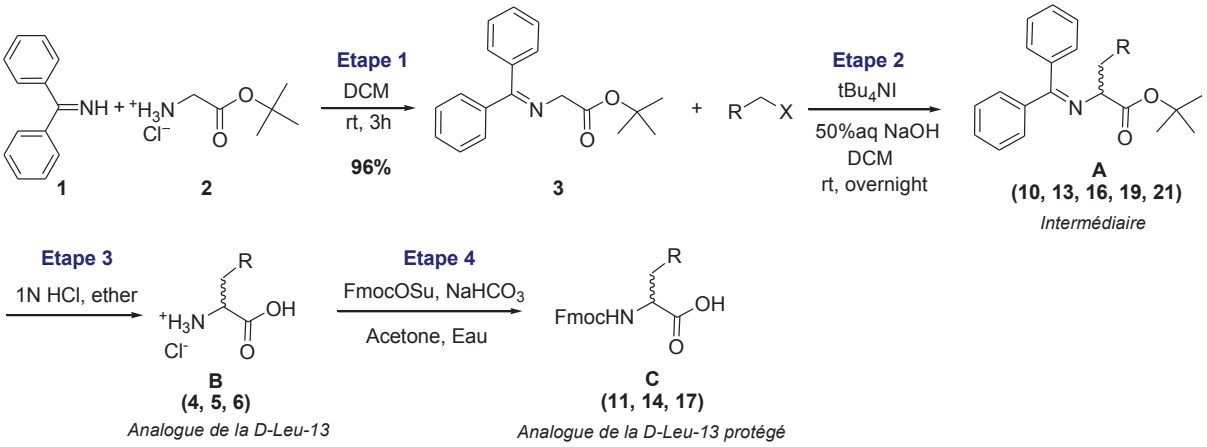


Schéma 8. Voie de synthèse d'alkylation par CTP

A partir de l'intermédiaire **3**, nous avons envisagé la synthèse des analogues aminoacides présentés dans la Figure 53.

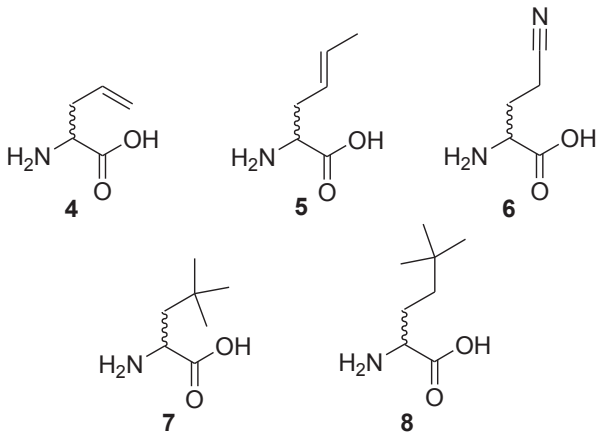


Figure 53. Analogues **D-Leu-13**, voie d'alkylation par CTP

Les structures des intermédiaires et des produits formés, ainsi que les rendements pour chaque étape, sont reportés dans le Tableau 23.

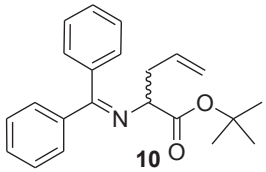
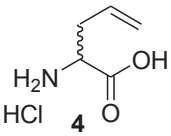
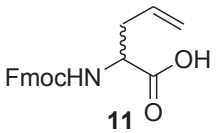
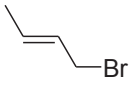
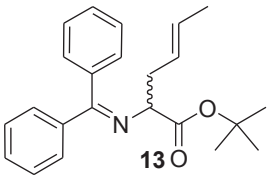
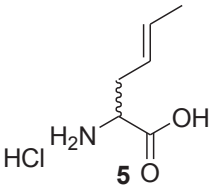
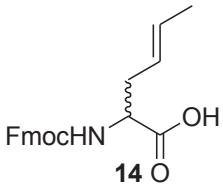
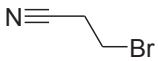
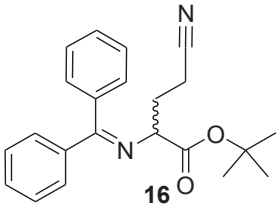
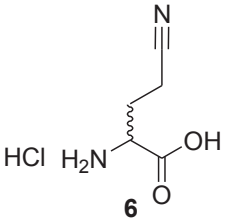
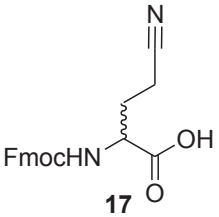
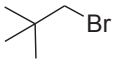
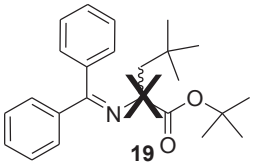
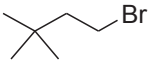
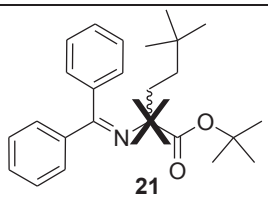
Halogénure d'alkyle	**Etape 2 Intermédiaire A**	**Etape 3 Analogue B**	**Etape 4 Analogue C**
 **9**	 **10** **83%**	 **4** **Quantitatif**	 **11** **62%**
 **12**	 **13** **84%**	 **5** **82%**	 **14** **66%**
 **15**	 **16** **98%**	 **6** **99%**	 **17**
 **18**	 **19**	-	-
 **20**	 **21**	-	-

Tableau 23. Structures des composés A, B et C et des rendements obtenus

Ces conditions nous ont permis d'obtenir rapidement et efficacement les différents analogues **11**, **14** et **17** pour les incorporer dans la séquence de référence IDX15971. Par contre, cette méthode ne nous a pas permis d'accéder aux composés **7** et **8** puisque la réaction d'alkylation par transfert de phase avec les halogénures correspondants n'a pas conduit aux bases de Schiff alkylées **19** et **21**. L'encombrement stérique lié aux groupements *tert*-butyles,

ainsi que le faible caractère électrophile de ces halogénures d'alkyles, peuvent expliquer le manque de réactivité. La synthèse de ces analogues **7** et **8** a alors été réalisée à partir des aldéhydes correspondants, plus électrophiles, *via* la réaction d'Horner-Wadsworth-Emmons. Cette synthèse est présentée dans le paragraphe suivant.

Les analogues insaturés **4** et **5** devaient permettre ensuite d'accéder *via* des réactions de Heck[14] ou de métathèse[15,16] à d'autres analogues comme représentés sur le Schéma 9.

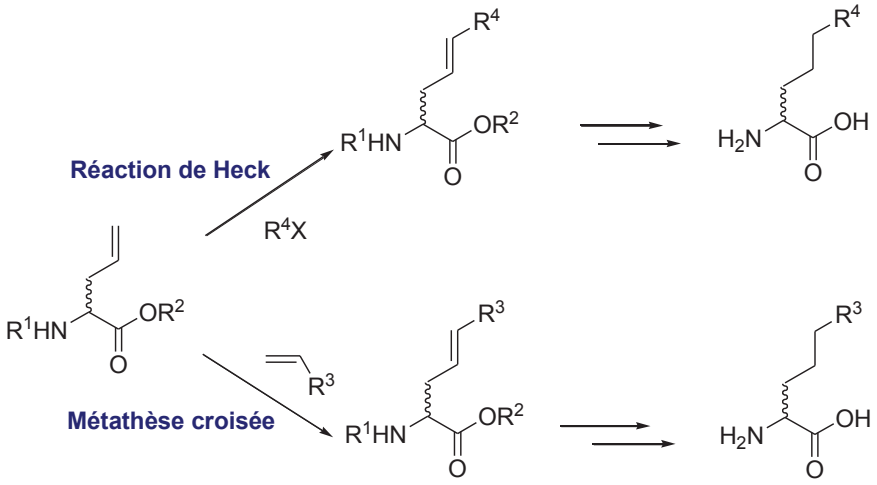


Schéma 9. Exemple de fonctionnalisation

Cependant ce projet n'a pas été poursuivi suite aux résultats des évaluations biologiques décrits dans le paragraphe IV.B.4.

IV.B.1.2. Synthèse *via* la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons

IV.B.1.2.(i) Principe

La réaction de Horner-Wadsworth-Emmons fait partie des réactions les plus étudiées, en synthèse organique, pour la synthèse d'esters α,*β*-insaturés. Cette réaction s'appuie sur l'utilisation d'un phosphonate stabilisé par un groupement électroattacteur (EWG), tel que CO_2R (Schéma 10).[17]

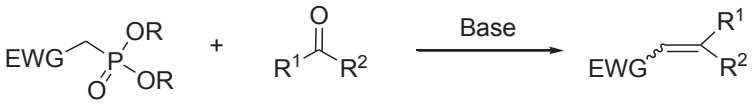


Schéma 10. Réaction de HWE

La synthèse des aminoacides **7** et **8** a été effectuée suivant les conditions décrites par Schmidt et *coll.*, lors de la synthèse de déhydroaminoacides (Schéma 11).[18]



Schéma 11. Réaction de HWE selon les conditions de Schmidt

Selon ces conditions, une série de déhydroaminoacides a été obtenue avec de bons rendements et une bonne sélectivité en faveur de l'isomère *(Z)*. Le mécanisme de la réaction est illustré ci-dessous.[17]

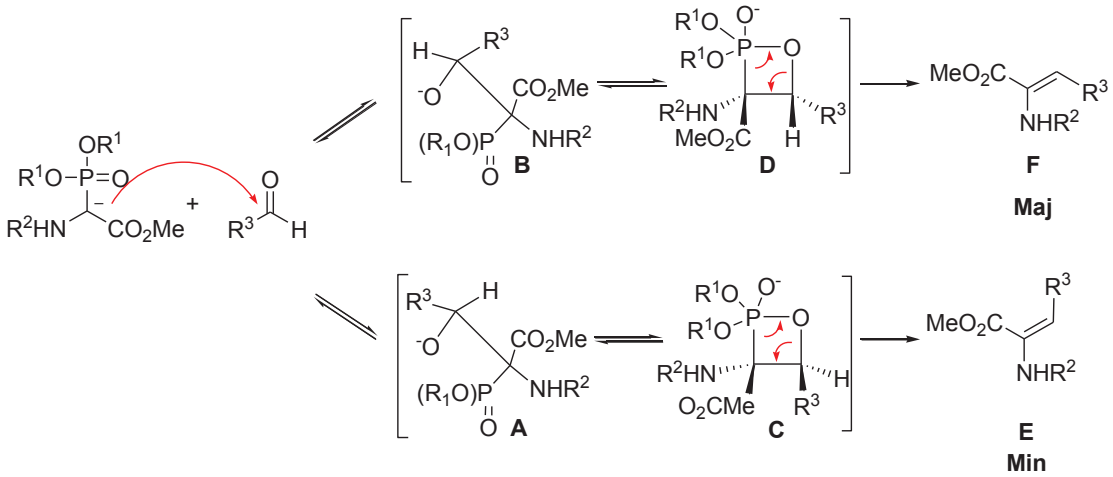


Schéma 12. Mécanisme réaction HWE

Le carbanion phophonate stabilisé attaque le carbonyle pour former l'intermédiaire oxyanion **A/B** qui, par la suite, se décompose *via* la formation de l'oxaphosphétane **C/D** pour donner l'oléfine **E/F**. La stéréochimie est déterminée par une association entre la stéréosélectivité de l'étape initiale de formation de la liaison carbone-carbone et la réversibilité des intermédiaires oxyanions et oxaphosphétanes.[17]

Par la suite, l'hydrogénation énantiosélective des α,β-déhydroaminoacides correspondants (DDAA), à partir de catalyseurs au Rhodium [Rh(1,5-COD)(DIPAMP)]$^{+}BF_4^{-}$], permet d'obtenir les α-aminoacides de configuration *(R)* ou (*S*).[18]

IV.B.1.2.(ii) Synthèse des analogues de la D-Leu-13

La synthèse des analogues *tert*-butyl de la **D-Leu-13** a été réalisée selon les conditions de Schmidt en quatre étapes (Schéma 13). La réaction de HWE entre le dérivé

phosphonoglycine ester **22** et les aldéhydes correspondants **23** et **24**, en présence de DBU, à basse température a conduit aux acides aminés insaturés **25** et **26**, l'isomère *(Z)* étant majoritaire comme décrit pas Schmidt et *coll.*[18] Un faible rendement a été obtenu lors de la réaction de HWE avec le *tert*-butyraldéhyde **23**, peut-être en raison d'un problème d'encombrement stérique. Par la suite, une réaction d'hydrogénation, puis deux étapes successives de déprotection et de protection ont finalement conduit aux acides aminés protégés correspondants **29** et **30** prêts à être intégrés selon une stratégie de synthèse peptidique sur phase solide.

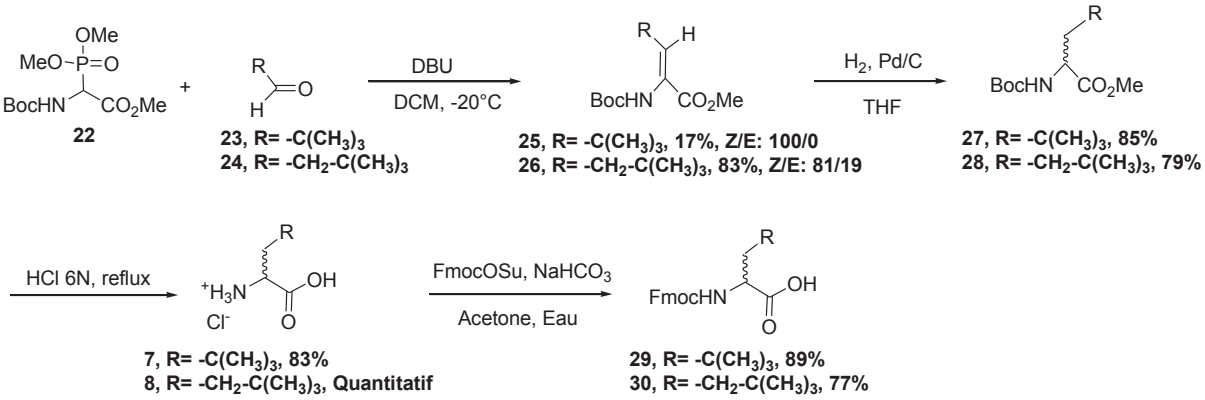


Schéma 13. Voie de synthèse réaction HWE

Parallèlement à ce travail, nous avons réalisé une application de la réaction de HWE sans solvant *via* une activation mécanique.

IV.B .2. Réaction de Horner-Wadsworth-Emmons sans solvant

Dans la continuité des travaux de recherche préalablement effectués au sein du Département des Acides Aminés, Peptides et Protéines (DAPP) concernant l'étude de l'activation mécanique et de ses applications en synthèses organique et peptidique, nous nous sommes intéressés à la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons au broyeur planétaire pour la synthèse d'acides aminés α,*β*-insaturés.

Ainsi, les conditions de synthèse étudiées précédemment pour l'obtention des analogues de la **D-Leu-13**, ont été appliquées avec un broyeur planétaire, en conditions sans solvant, en présence d'une base carbonatée (Schéma 14).

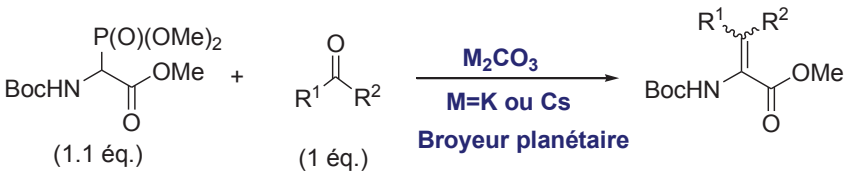


Schéma 14. Réaction de HWE sans solvant

IV.B.2.1. Activation mécanique : principe et exemples

La mise en œuvre de réactions sans solvant organique permet de développer une technologie propre, efficace et économique, s'inscrivant dans le contexte général de la chimie verte.[19] La sécurité est améliorée, les traitements simplifiés, les coûts réduits.

IV.B.2.1.(i) Principe

L'activation mécanique est une des principales méthodes permettant de travailler sans solvant. Historiquement, les premières réactions ont été effectuées à l'aide d'un mortier, les frottements entre le pilon et le bol du mortier fournissant l'énergie nécessaire à l'avancée de la réaction et le produit final pouvant être récupéré directement dans le mortier sans utilisation de solvants. On peut citer l'un des premiers exemples réalisé par Toda et *coll*., la réduction de cétones par simple broyage au mortier d'une cétone avec 10 équivalents de $NaBH_4$ (Schéma 15).[20]

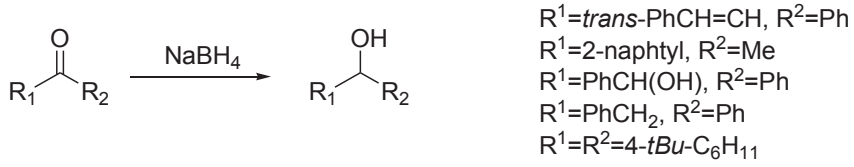


Schéma 15. Réduction de cétones en alcools

De nombreux types de broyeurs mécanisés existent aujourd'hui, tels que les broyeurs à disques, les concasseurs à mâchoires ou, les broyeurs à billes. Ces derniers représentent la plupart des exemples en synthèse organique, et les travaux de recherche menés au sein du laboratoire sont réalisés avec ce type d'appareil. Les réactifs sont introduits dans un bol de broyage avec des billes, le bol est mis en mouvement par un moteur créant des chocs entre réactifs, billes et parois. Il existe deux grandes familles de broyeur à billes, la distinction parmi les broyeurs à billes se fait selon le mouvement imprimé :

- Les vibro-broyeurs (Figure 54) : le mouvement du bol est transversal, des mouvements horizontaux vont entraîner des chocs entre billes, parois et réactifs permettant l'avancement de la réaction. La fréquence de vibration varie de 3 à 30 Hz.

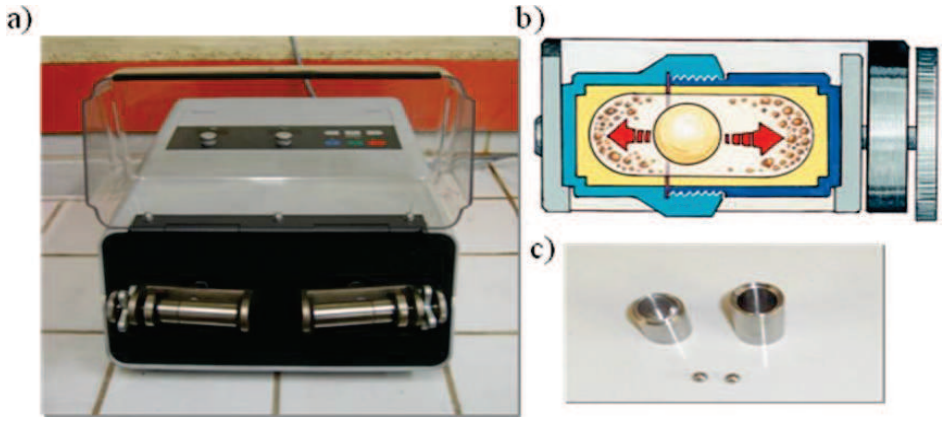


Figure 54. a) Photographie d'un vibro-broyeur (Retsch MM200), b) Mécanisme d'action, c) Photographie de bols MM200

- Les broyeurs à rotation planétaire (Figure 55): plusieurs bols (un à huit) contenant des billes et réactifs tournant sur leur propre axe sont entraînés par un disque central tournant dans le sens opposé, démultipliant ainsi la force centrifuge générée. Les vitesses de rotation généralement observées sont comprises entre 100 et 1000 rpm (« rounds per minutes » ou tours par minutes).

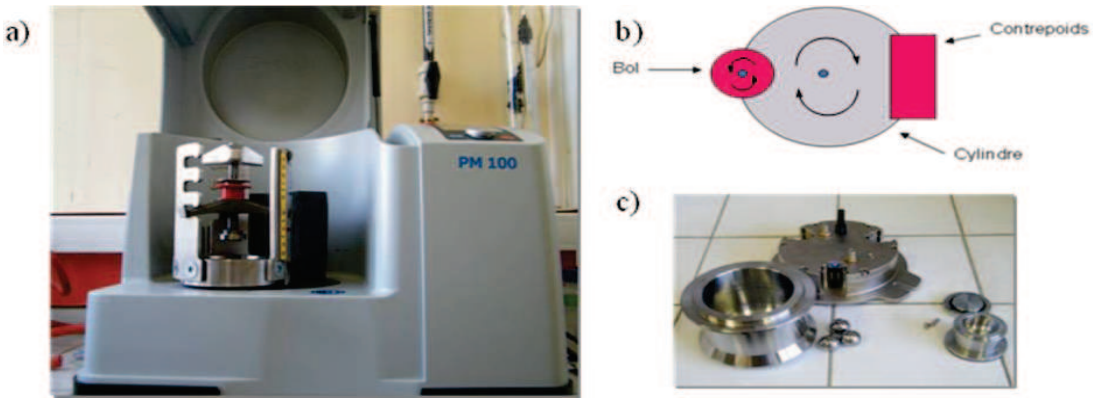


Figure 55. a) Photographie d'un broyeur planétaire Retsch PM100, b) Mécanisme d'action, c) Photographie de bols PM100 12 et 250 mL

Notre étude a été menée sur ce dernier type d'appareil. Il présente l'avantage de pouvoir être utilisé pour des temps de réaction longs, sans interruption, et d'être accessible à haute échelle.

L'utilisation de broyeurs à billes connait un certain développement depuis ces dernières années en chimie organique,[19,21] bien que leur utilisation première soit plutôt la chimie inorganique et la préparation de matériaux et de milieux biologiques.[22] Ces appareils permettent aujourd'hui d'effectuer un grand nombre de synthèses sans solvant en améliorant le plus souvent les résultats obtenus par rapport aux conditions classiques. En effet, l'utilisation de ce type d'action mécanique permet d'augmenter les surfaces de contact entre les solides, tout en augmentant la température et la pression locale.

Le processus exact et l'effet réel du broyage sur les réactifs ne sont pas encore complètement expliqués. Cependant, un nombre de paramètres importants doit être pris en compte pour estimer l'énergie apportée, tels que la fréquence ou la vitesse de rotation, le temps de broyage, la taille et le nombre de billes, le volume du bol,….[22-25] Le modèle décrit par Urukaev et *coll.* permet d'estimer que lors d'un broyage, la température locale peut être comprise entre 130°C et 1300°C, et que la pression peut monter jusqu'à quelques milliers d'atmosphère. Des études menées au sein du laboratoire ont permis d'estimer que la température globale lors d'un broyage est comprise entre 30 et 60°C, sans régulation externe de la température.[26]

Les réactions sans solvant peuvent être réalisées avec des composés liquides ou des réactifs dont le point de fusion est plus faible que la température atteinte dans le bol de broyage.[27] Le mélange réactionnel devient alors visqueux, il est en de même pour les réactions produisant de l'eau. L'action mécanique n'a alors plus le même effet et joue le rôle d'agitateur. On parle alors de conditions « neat », le mélange réactionnel est visqueux et l'action homogénéisante provoquée par les billes devient moins efficace.

Actuellement, il n'existe pas de mécanisme modèle, tant le comportement des réactifs est différent selon leurs propriétés physico-chimiques et selon la réaction et les conditions dans lesquelles ils sont utilisés.

IV.B.2.1.(ii) Exemples

De nombreux exemples démontrent aujourd'hui l'intérêt de cette technique et l'étendue du domaine d'application des broyeurs en conditions sans solvant.[19, 21, 28, 29, 30] Ainsi, nous pouvons citer l'utilisation d'un broyeur dans des réactions telles que les couplages de Heck,[31,32] Suzuki,[33,34] et Sonogashira,[35,36] la réaction de Knoevenagel,[37] l'addition de Michael,[37] ou la condensation d'aldol[38] et sa version asymétrique.[39]

Au sein du DAPP, des travaux menés sur la synthèse de nitrones[26] et de peptides[40] ont

permis de mettre en évidence l'efficacité de ce type d'activation mécanique.

Ainsi, l'intérêt de cette méthode a été démontré dans la synthèse de divers nitrones de type *C*-alkyle ou *C*-aryle, par condensation d'aldéhydes et d'hydroxylamines *N*-substituées, en présence d'une base carbonatée, au broyeur à billes, sans solvant (Schéma 16).[26]

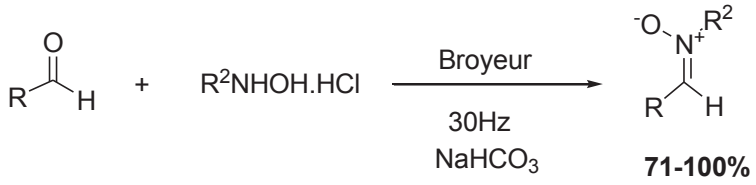


Schéma 16. Synthèse de nitrones au broyeur

Pour des temps de réaction courts (30 min à 2 heures), et après un simple traitement, les rendements obtenus sont bons à excellents, sans étape de purification. Une étude comparative avec l'activation par les micro-ondes, sans-solvant, a permis de démontrer la supériorité de l'activation mécanique.

La synthèse de dipeptides a également été développée sans solvant, au broyeur, *via* le couplage entre des α-amino-acides protégés sous forme d'anhydrides *N*-carboxy uréthanes (UNCA) avec divers esters aminés, en présence de $NaHCO_3$ (Schéma 17).[40]

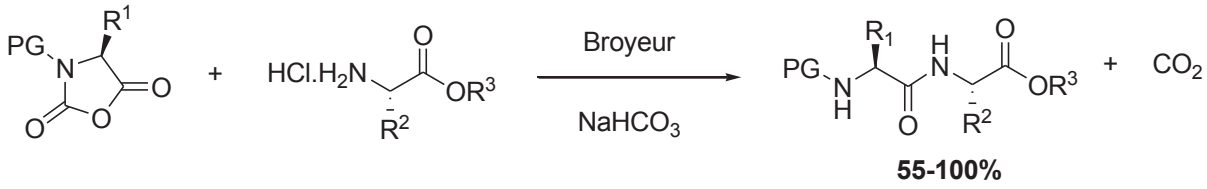


Schéma 17. Synthèse de dipeptides au broyeur

Ces réactions ont conduit à la préparation de dipeptides et de tripeptides, sans épimérisation et avec de bons rendements. Ces conditions ont été exemplifiées avec la préparation de l'aspartame (édulcorant artificiel de structure dipeptide), en trois étapes, sans utilisation de solvant organique ni d'étape de purification.

Enfin, un exemple présenté par Pécharsky et *coll.* a eu pour objet la réaction de Wittig, réaction largement décrite en synthèse totale pour la formation de liaison C-C.[41] Pécharsky et *coll.* ont montré que la formation d'ylures de phosphores stabilisés et non-stabilisés était possible au broyeur en utilisant une base faible carbonatée (K_2CO_3) (Schéma 18).

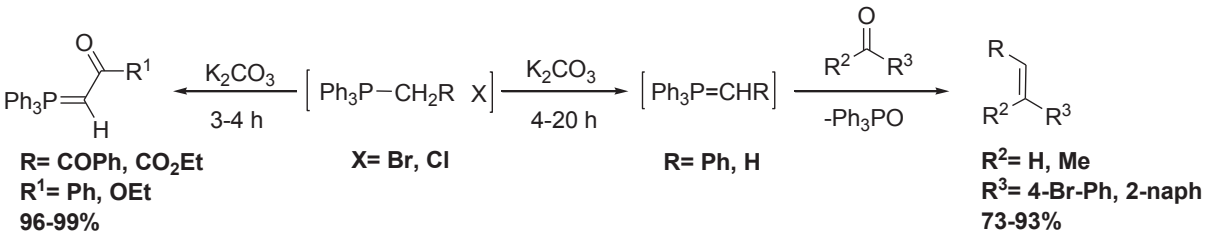


Schéma 18. Préparation d'ylures de phosphore stabilisés (gauche) et non stabilisés suivi de réaction de Wittig (droite)

Les ylures stabilisés sont obtenus en moins de 4h à 60 Hz avec d'excellents rendements (>96%). Les ylures non-stabilisés réagissent directement sur un composé carbonylé dans une réaction de Wittig. Une série de composés éthyléniques aromatiques a ainsi été préparée avec de bons rendements et une bonne sélectivité pour le stéréoisomère *(E)*. Les conditions utilisées permettent d'ores et déjà d'envisager la faisabilité de la réaction de Horner-Wadswoth-Emmons au broyeur planétaire pour la préparation d'acides aminés insaturés.

IV.B.2.2. Rappels bibliographiques concernant la réaction de HWE sans solvant

A ce jour, peu d'exemples de la réaction de HWE sans solvant ont été publiés et seul un exemple a été réalisé sous activation mécanique *via* l'utilisation d'un mortier.

En 2005, Jiang et *coll.* ont effectué la réaction de Wittig-Horner-Emmons au mortier pour la synthèse de molécules multicarbazole contenant plusieurs ponts vinyliques (Schéma 19).[42]

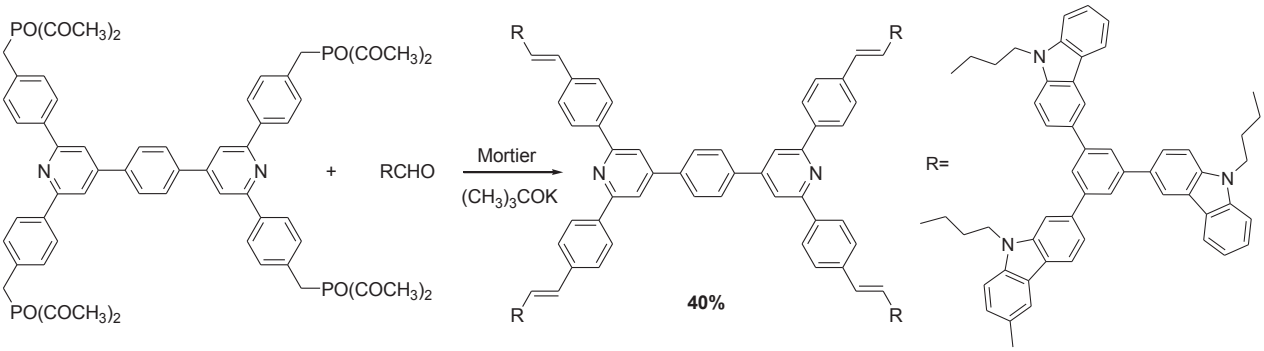


Schéma 19. Exemple de réaction de Wittig-Horner-Emmons

Après 10 minutes de broyage manuel à température ambiante, le composé a été obtenu avec un rendement de 40%.

En 2002, Inanaga et *coll.* ont effectué la réaction de HWE en présence d'une base organique, la DBU dans un gel de silice (Schéma 20).[43]

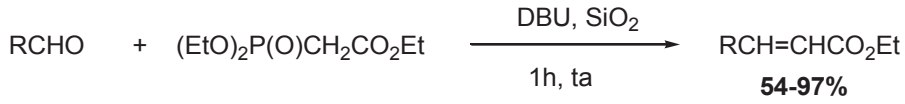


Schéma 20. Exemple de réaction de HWE

Divers aldéhydes aliphatiques et aromatiques ont été étudiés. Après filtration, les esters α,*β*-insaturés correspondants ont été obtenus avec de bons rendements et une bonne sélectivité pour le stéréoisomère *(E)*. Le recyclage de la silice s'est avéré efficace, tant au point de vue de son activité et que du nombre de réutilisations.

Yamada et *coll.* ont récemment repris ces conditions mais, cette fois-ci, sans ajout de gel de silice considéré comme hétérogène et limitant le mélange des réactifs (Schéma 21).[44]

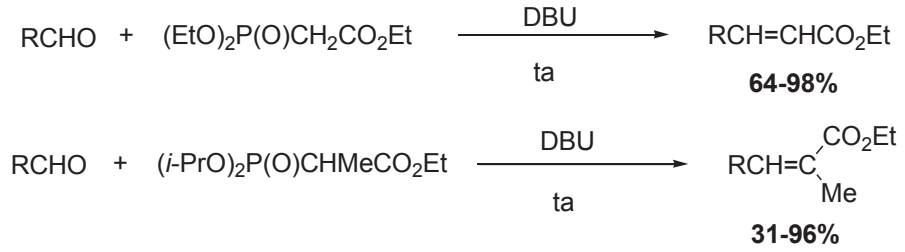


Schéma 21. Exemples de réactions de HWE

Ces conditions ont été appliquées sur une série d'aldéhydes et deux dérivés phosphonates. Les oléfines *(E)* di- et tri-substituées correspondantes ont été obtenues avec de bons rendements et une bonne sélectivité. Des premiers essais sur une cétone, la cyclohexanone, se sont avérés moins performants.

Enfin, le dernier exemple décrit par Benvegnu et *coll.*, propose la synthèse de *C*-glycosides conduisant à la formation à la fois de *C*-pyranoses et de *C*-furanoses (Schéma 22).[45]

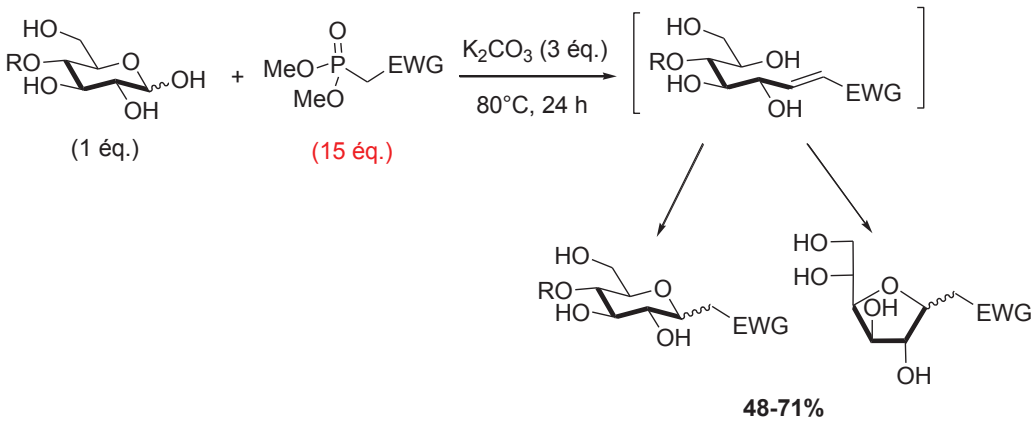


Schéma 22. Exemple de réaction de HWE

Cependant, ces conditions nécessitent l'introduction du phosphonate en excès (15 éq.), utilisé en tant que solvant.

IV.B.2.3. Résultats et discussion

La synthèse développée par l'équipe de Schmidt, basée sur la réaction de HWE, est une méthode efficace pour la synthèse de déhydroaminoacides à partir d'un dérivé carbonylé et d'un dérivé phosphonate de la glycine (cf paragraphe IV.B.1.2.(ii)).[18,46] Néanmoins, il requiert l'utilisation d'une base organique, la DBU, à basse température, pour l'étape de déprotonation (Schéma 23).

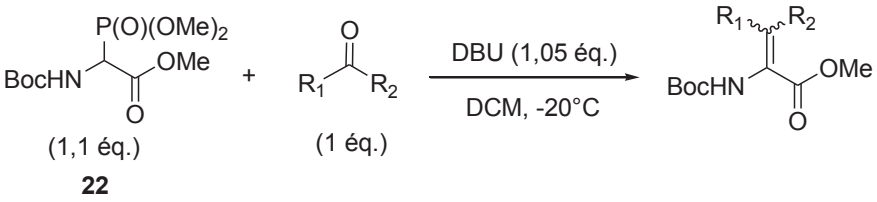


Schéma 23. Réaction de HWE en solution

Au vu des résultats obtenus par Pecharsky et *coll.* concernant la réaction de Wittig sous activation mécanique, nous avons présumé que la réaction de HWE pourrait être une approche efficace pour la préparation d'acides aminés insaturés à partir des dérivés carbonylés correspondants (Schéma 24).

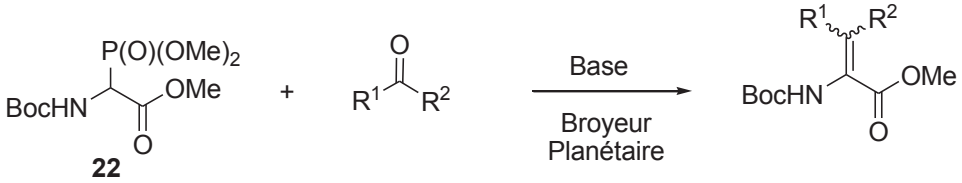


Schéma 24. Réaction de HWE sans solvant

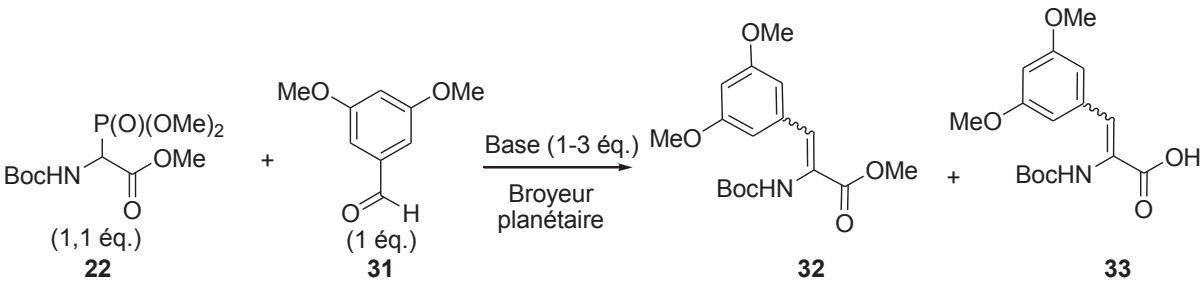
IV.B.2.3.(i) Mise au point de la réaction

Sachant que les réactions au broyeur donnent de meilleurs résultats entre deux phases solides, nous avons, dans un premier temps, réalisé la réaction de HWE en utilisant un broyeur planétaire avec un mélange de phosphonoglycine triméthyl ester (1,1 éq. condition identique à celle de Schmidt), de 3,5-diméthoxybenzaldéhyde (1 éq.) et d'une base (1-3 éq.). Le milieu réactionnel a été analysé par HPLC pour évaluer le taux de conversion. Les résultats sont présentés dans le Tableau 24.

Dans le but de simplifier les étapes de purification, une conversion proche ou égale à 100% a été imposée. Ainsi, des temps de broyage d'au moins 7h ont été nécessaires pour obtenir une complète conversion. Pour cette raison, et sachant que les temps de réaction au vibro-broyeur sont limités à 1h30, nous avons directement travaillé sur le broyeur planétaire qui peut fonctionner en continu, durant plusieurs heures.

Plusieurs bases minérales ($NaHCO_3$, K_2CO_3, Cs_2CO_3 et KOH) et organique (DBU) ont été testées. La réaction de HWE en présence de $NaHCO_3$ a montré une faible conversion (entrée 1), tandis que l'utilisation de K_2CO_3 a conduit à une conversion satisfaisante quoi qu'incomplète, même en augmentant le nombre d'équivalents (entrées 2 et 3). Dans le cas de la potasse (entrée 4), la réaction n'a pas été totale et le produit majoritaire observé correspond au sous produit de saponification de la fonction ester **33**.

Les meilleurs résultats ont été obtenus en présence du carbonate de césium (entrées 5-7) avec de très bon rendements et une quantité initiale de base pouvant être diminuée de 3 à 2 équivalents (entrée 7). Enfin, l'utilisation de DBU, base usuellement employée dans les conditions de Schmidt, a conduit à une conversion limitée (entrée 8).



Entrée	Base (éq.)	Conversion (32) (%)	Rendement (%)
1	$NaHCO_3$ (3)	5	n.d.[a]
2	K_2CO_3 (1)	91	n.d.
3	K_2CO_3 (3)	93	n.d.
4	KOH (3)	94 **(33)**	n.d.
5	Cs_2CO_3 (3)	100	95
6	Cs_2CO_3 (2)	100	94
7	Cs_2CO_3 (1,5)	94	n.d.
8	DBU	63	n.d.

[a] n.d. : non déterminé

Tableau 24. Optimisation réaction de HWE sans solvant

Afin d'évaluer le rôle de l'activation mécanique sur la réaction de HWE à l'état solide-solide, cette synthèse a été réalisée dans un ballon, avec un agitateur magnétique selon les meilleurs conditions (entrée 6, Cs_2CO_3, 2éq.) et même temps de réaction (Schéma 25).

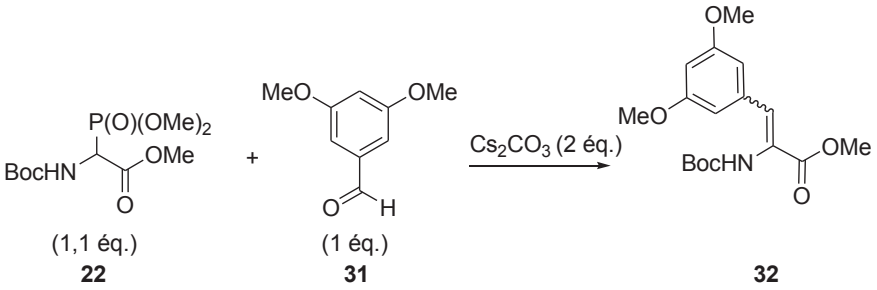


Schéma 25. Réaction de HWE au ballon

Deux essais ont été menés, à température ambiante et avec chauffage, à 50°C, en considérant que la température du milieu réactionnel à l'intérieur du bol se situe entre 30 et 60°C.[26] A température ambiante, une conversion incomplète a été obtenue (43%) et la conversion n'a été que faiblement augmentée à 50°C (45%). Ainsi ces deux résultats ont permis de mettre en évidence l'importance de l'activation mécanique dans cette réaction.

Dans l'intérêt de développer des conditions s'inscrivant dans le contexte de la chimie verte, un traitement utilisant le minimum de solvant a été effectué. Ainsi, une fois la réaction terminée, de l'acétate d'éthyle a été introduit dans le bol, la phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée, puis le brut a été filtré sur silice pour éliminer l'excès de phosphonate. L'acide aminé protégé a été obtenu avec un excellent rendement et une pureté > 95%. Au cours de cette réaction, seul l'isomère *(Z)* a été observé et caractérisé par RMN ^{1}H.

IV.B.2.3.(ii) La réaction de HWE

Suite à ces premiers essais, et afin d'exemplifier cette méthode sur une série de différents aldéhydes et cétones, nous avons effectué la réaction de HWE en présence de Cs_2CO_3 ou K_2CO_3 (Tableau 24), Cs_2CO_3 étant la base la plus efficace, et K_2CO_3 présentant de meilleurs aspects économique, écologique et toxicologique. Finalement, la supériorité de K_2CO_3 a été prouvée dans de nombreux cas. La préparation des acides aminés insaturés protégés est présentée dans le Tableau 25.

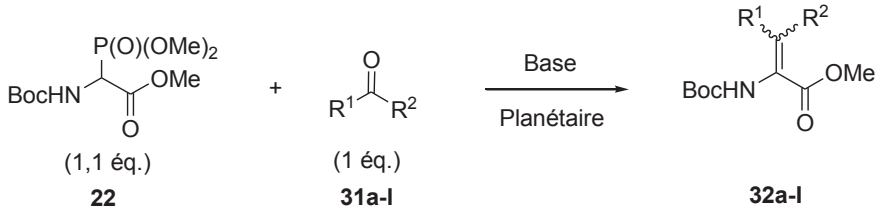


Figure 56. Schéma général réaction de HWE sans solvant

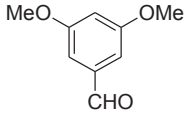
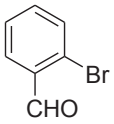
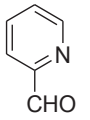
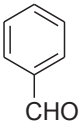
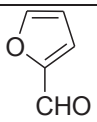
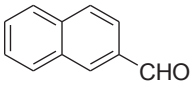
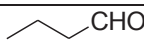
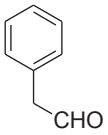
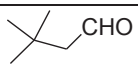
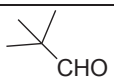
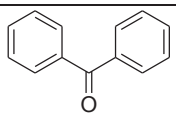
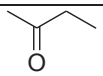
Entrée	Aldéhyde Cétone	Etat physique P.F. (°C)	Base	Conversion (%)	Produit	Rendement (%)	Ratio Z/E
1		solide 44-48	Cs_2CO_3	100	**32a**	95	100/0
2		solide 16-19	K_2CO_3	96	**32b**	85	100/0
3		liquide	K_2CO_3	100	**32c**	88	100/0
4		liquide	K_2CO_3	100	**32d**	82	100/0
5		liquide	K_2CO_3	100	**32e**	89	100/0
6		liquide	K_2CO_3	100	**32f**	76	82/18
7		liquide	K_2CO_3	100	**32g**	80	100/0
8		liquide	K_2CO_3	100	**32h**	61	66/44
9		liquide	K_2CO_3	100	**32i**	90	61/39
10		liquide	K_2CO_3	35	**32j**	n.d.	100/0
11		solide	K_2CO_3	0	**32k**	0	-
12		liquide	K_2CO_3	0	**32l**	0	-

Tableau 25. Réactions de HWE utilisant un broyeur planétaire sur divers aldéhydes et cétones

En ce qui concerne la sélectivité de la réaction, dans tous les cas, le stéréoisomère *(Z)* est majoritaire, le ratio *Z/E* est mesuré par RMN ^{1}H, le proton éthylénique étant plus déblindé pour l'isomère (*Z*) que pour l'isomère (*E*).[47] Ces résultats sont similaires aux conditions de Schmidt.[18] La réaction de HWE s'appuie sur l'utilisation d'un phosphonate stabilisé par un groupement électroattacteur (EWG) et conduit généralement à la synthèse d'oléfines substituées en faveur de l'isomère *(E)*. Nous pouvons considérer que nos résultats sont similaires à ceux décrits dans la littérature. En effet, si l'on compare les intermédiaires et les produits formés (le mécanisme de la réaction de HWE est décrit paragraphe IV.B.1.2.(i)),[17] le schéma 26, ci-dessous, montre que nous passons par les mêmes intermédiaires oxyanions **B** et oxaphosphétanes **D**, et qui conduisent dans notre cas, à partir des régles de Cahn-Ingold-Prelog, à la formation de l'isomère (*Z*) majoritaire.

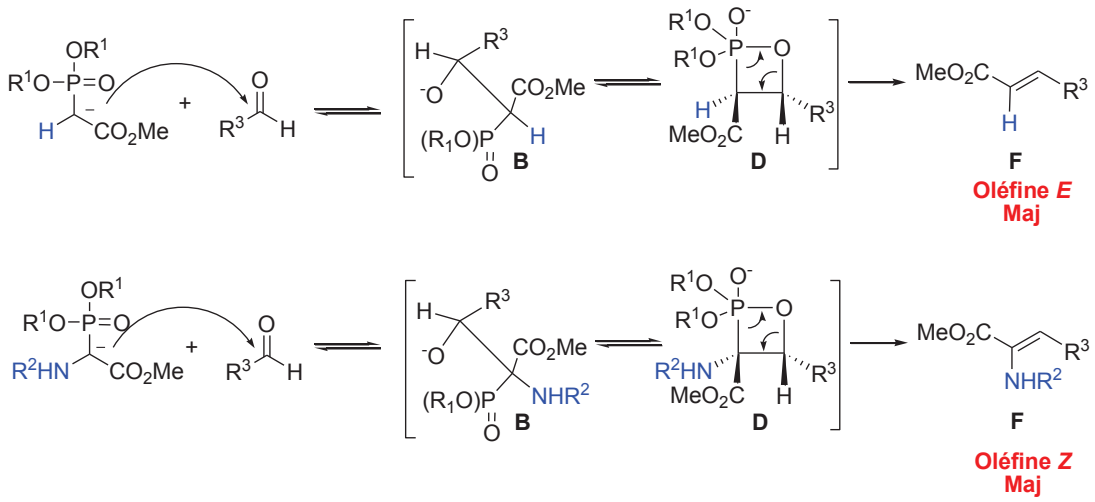


Schéma 26. Etude comparative de la réaction de HWE

De manière générale, il apparaît que les aldéhydes aromatiques (entrées 1-6) réagissent efficacement avec une conversion complète dans la plupart des cas. Même un aldéhyde aromatique ortho-substitué encombré, tel que le 2-bromobenzaldéhyde (entrée 2) a donné d'excellents résultats. Pour cette série, la sélectivité *Z/E* est élevée puisque seul l'isomère *(Z)* a été détecté, excepté dans le cas du naphtaldéhyde (entrée 6) où la proportion est en faveur du même isomère mais avec une sélectivité plus basse. Les aldéhydes liquides ont également conduit à des résultats satisfaisants (entrées 3-6).

Parmi les aldéhydes aliphatiques (entrées 7-10), le n-butyraldéhyde **31g**, aldéhyde linéaire, a donné de bons résultats en terme de rendements et de sélectivité (entré 7). Les conversions des méthanals monosubstitués **31h** et **31i** sont totales mais la sélectivité est faible.

Le *tert*-butyraldéhyde **31j**, très certainement trop encombré, n'est pas assez réactif et la conversion totale n'a pas pu être obtenue. Enfin, les deux cétones testées dans cette réaction ne se sont pas avérées réactives. En effet, la réaction de HWE pour la synthèse d'oléfines tétrasubstituées devient plus difficile en raison de la gène stérique entre les deux réactifs, la base utilisée dans ce cas n'étant pas adaptée. Ainsi, les premières études menées par Schmidt et *coll.*, sur des cétones, en solution, avec des bases telles que KOH n'ont pas abouties.[46] De meilleurs résultats ont été obtenus avec la base organique DBU, en utilisant la cétone correspondante en tant que solvant tel qu'illustré dans le Schéma 27.[18]

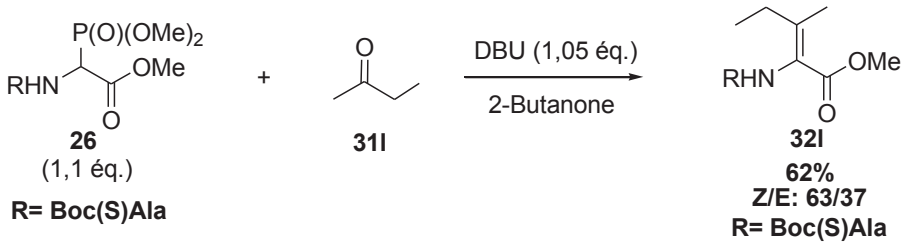


Schéma 27. Synthèse d'oléfines tétrasubstituées selon les conditions de Schmidt

Il est à noter que les applications de la réaction de Wittig par activation mécanique avec K_2CO_3, décrites par Pécharsky et *coll.* reportent uniquement la synthèse d'oléfines di- et tri- substituées.[41] Ces différents résultats nous permettent de supposer que la base carbonatée utilisée dans notre étude n'est certainement pas appropriée pour ces électrophiles, moins réactifs.

Pour conclure sur cette partie, nous avons proposé, à travers l'étude présentée, une nouvelle version de la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons sans solvant, par activation mécanique. Nous avons ainsi pu synthétiser une série d'acides aminés α,*β*-insaturés à partir d'aldéhydes aliphatiques et aromatiques, avec d'excellents rendements et une bonne sélectivité. Les résultats obtenus sont comparables à ceux décrits en solution. Nous avons développé ici des conditions douces et peu coûteuses s'inscrivant dans le contexte de la chimie verte.

IV.B .3. Synthèse des peptides incorporant les analogues de la D-Leu-13

Les aminoacides illustrés dans la Figure 57 ont été incorporés sous leur forme protégée dans la séquence de référence IDX15971. Les acides aminés en noir sont de source commerciale énantiopurs ou racémiques, les composés en vert, des acides aminés synthétisés

via la voie CTP, et les acides aminés en rose, ceux synthétisés *via* la voie HWE. Pour les deux voies de synthèse, les acides aminés ont été obtenus sous forme racémique.

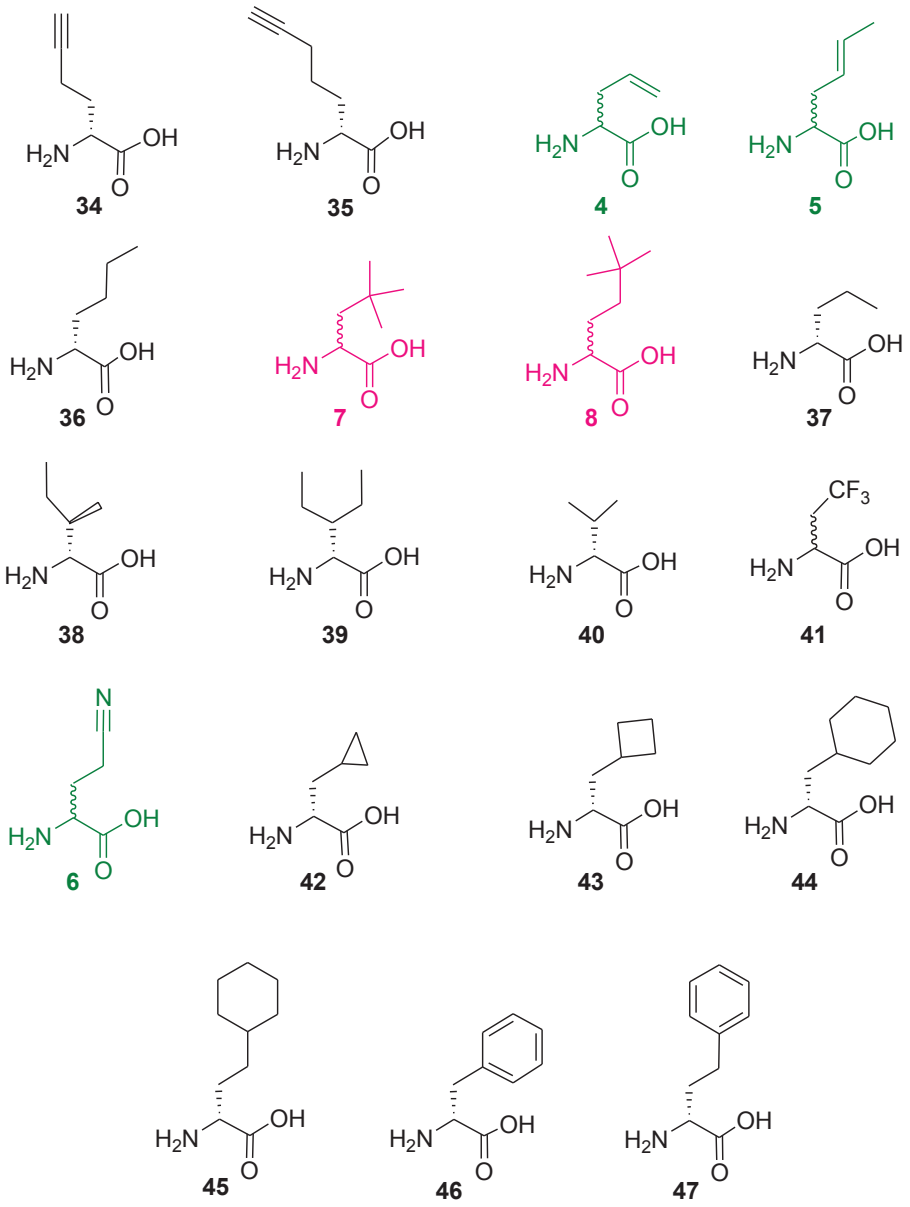


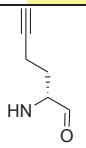
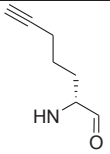
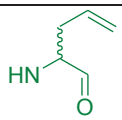
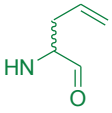
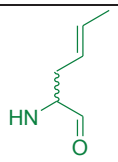
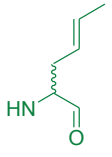
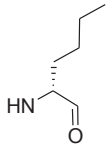
Figure 57. Analogues **D-Leu-13**

La synthèse des peptides a été réalisée dans des conditions identiques à celles présentées dans le chapitre 2 paragraphe III.B., à savoir au synthétiseur micro-onde automatique en utilisant la résine Rink Amide-ChemMatrix dans une stratégie de synthèse Fmoc/tBu. Après acétylation de l'extrémité *N*-terminal et clivage, les précurseurs linéaires sont cyclisés par formation d'un pont disulfure entre les deux cystéines puis purifiés par HPLC préparative. Pour la plupart des analogues synthétisés en série racémique, les

diastéréoisomères correspondants ont été séparés par HPLC préparative. Les peptides cycliques ainsi obtenu ont été testés en culture cellulaire afin d'évaluer leurs propriétés antivirales.

IV.B .4. Evaluation biologique

Les évaluations biologiques des différents peptides sont reportées dans le Tableau 26.

Peptide	Séquence	CC_{50}[a] (µM)	CE_{50}[b] (µM)
IDX15971	**Ac k g a c d y p e w q w l c a a -NH_2**	**>50**	**12,5**
IDX17524	Ac k g a **c** d y p e w q w  **c** a a -NH_2	>150	>150
IDX17523	Ac k g a **c** d y p e w q w  **c** a a -NH_2	>150	>150
IDX17519	Ac k g a **c** d y p e w q w  **c** a a -NH_2	>150	>150
IDX17520	Ac k g a **c** d y p e w q w  **c** a a -NH_2	>150	>150
IDX17521	Ac k g a **c** d y p e w q w  **c** a a -NH_2	>100	>100
IDX17522	Ac k g a **c** d y p e w q w  **c** a a -NH_2	>150	>150
IDX17717	Ac k g a **c** d y p e w q w  **c** a a -NH_2	>150	124

| | | |

| | | |

chaîne aromatique de type benzyle (IDX18311) ou homobenzyle (IDX18312). Par contre, des résultats intéressants ont été obtenus avec les substitutions de type cycloalkyle et plus particulièrement pour les composés cyclobutyle (IDX17525) et cyclohexyle (IDX17474) présentant des activités respectivement de 3 et 6 µM, valeurs inférieures au peptide de référence (CE_{50}=12,5 µM) (Figure 58). Ainsi, ces deux groupements ont permis d'augmenter l'affinité entre le D-peptide et la protéine.

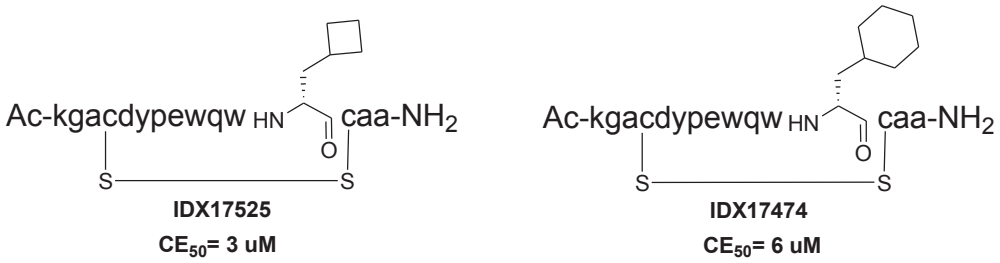


Figure 58. Structures et activités des meilleurs analogues de la **D-Leu-13**

Un calcul de dynamique moléculaire réalisé par le Dr Thierry Convard a permis de proposer une explication rationnelle sur la relation entre la structure et l'activité de ces composés. Ce calcul a été effectué à partir d'une première étude de modélisation moléculaire du composé inactif IDX17524, incorporant la D-propargylglycine (>150 µM) (Figure 59).

La modélisation de ce D-peptide a montré que ce composé existe sous différentes conformations, les deux tryptophanes **D-Trp-10** et **D-Trp-12**, pouvant être orientés soit du même côté (Figure 59-a), soit dans des directions opposées (Figure 59-b). De plus, il apparaît que lorsque les deux tryptophanes sont du même côté, ils se positionnent de façon à maximiser les interactions avec la protéine.

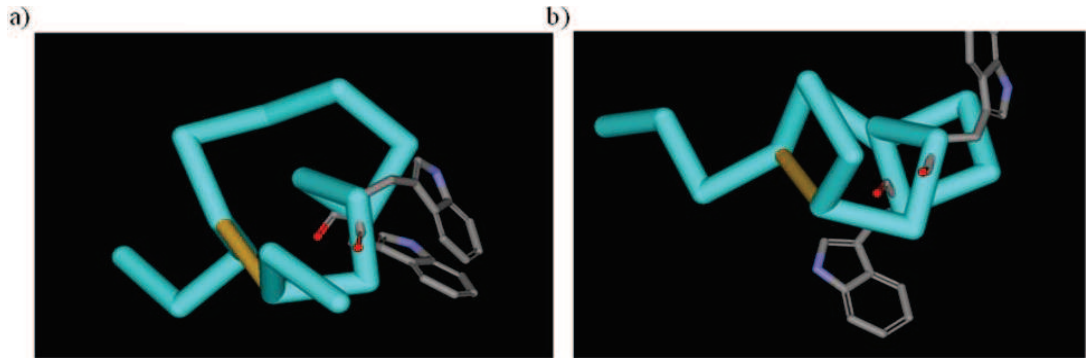


Figure 59. Représentations de deux conformations d' IDX17524. a) Conformation avec les deux D-Trp du même côté, b) Conformation avec les deux D-Trp du côté opposé.

Dans ce contexte, l'objectif était d'observer, à travers un calcul de dynamique moléculaire, l'évolution de l'angle de torsion entre les deux tryptophanes, **D-Trp-10** et **D-Trp-12** au cours du temps, afin d'identifier la capacité intrinsèque des peptides actifs et non actifs à exposer ou non les deux tryptophanes du même côté (Figure 60). Ce calcul de dynamique moléculaire a été réalisé avec le programme CHARMn[48] (durée de simulation 4 ns) sur le composé inactif IDX17524 (>150 µM) incorporant la D-propargylglycine, sur le composé actif IDX17474 (6 µM) incorporant l'analogue cyclohexyle, et enfin sur le D-peptide de référence IDX15971 (12,5 µM).

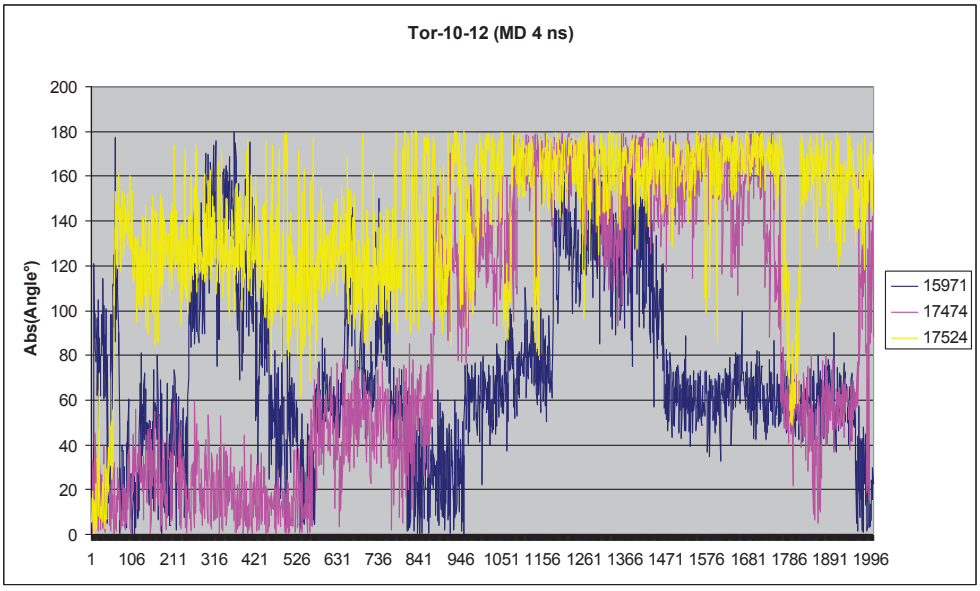


Figure 60. Variation au cours du temps de l'angle de torsion entre les résidus D-Trp-10 et D-Trp-12 pour les composés IDX15971, IDX17474 et IDX17524

Le profil des angles de torsion entre les deux tryptophanes permet d'évaluer leurs orientations relatives. Le composé inactif IDX17524 présente, tout au long de la simulation, un angle de torsion élevé entre les deux tryptophanes, montrant que les deux résidus sont, en permanence dans des orientations opposées, et ce contrairement aux composés actifs IDX15971 et IDX17474, dont les valeurs angulaires oscillent durant le temps de simulation, indiquant que ces structures adoptent fréquemment des conformations avec les deux tryptophanes orientés du même côté.

Un autre calcul évaluant le pourcentage de conformations des trois peptides en fonction de la valeur de l'angle de torsion entre les deux tryptophanes (Figure 61) a été réalisé. Cette étude a montré que les D-peptides actifs IDX15971 et IDX17474 présentent un pourcentage de conformations pour lesquelles les deux tryptophanes sont orientés du même

côté (valeurs angulaires faibles : 50-70°, encadré rouge), nettement supérieures (entre 20 et 60%) par rapport au composé inactif IDX17524 (< 5%).

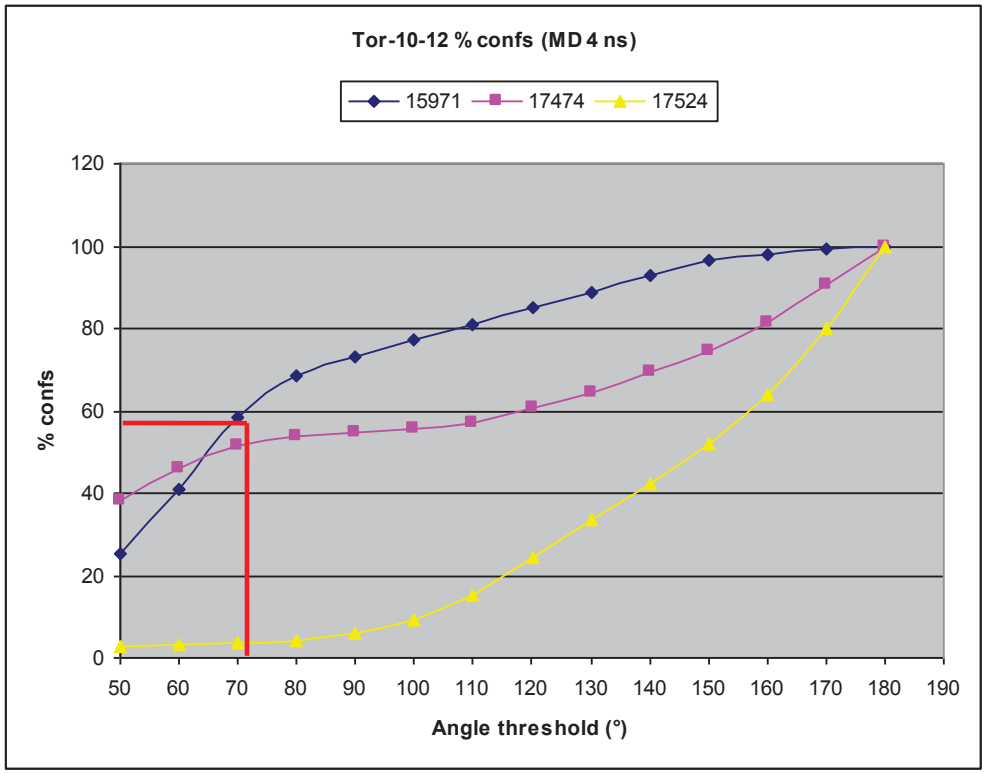


Figure 61. Pourcentage de conformations en fonction de la variation de l'angle de torsion entre le **D-Trp-10** et le **D-Trp-12** pour les composés IDX15971, IDX17474 et IDX17524

Ainsi, ces deux études de modélisation moléculaire permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'activité des composés IDX15971 et IDX17474 pourrait s'expliquer, entre autre, par le fait que leurs structures avantagent les conformations pour lesquelles les deux résidus **D-Trp-10** et **D-Trp-12** sont orientés dans la même direction, favorisant ainsi les interactions avec la poche hydrophobe de la protéine.

IV.C. Synthèse d'analogues du D-Trp-10 et insertion dans le D-peptide IDX15971

Notre travail de recherche s'est porté par la suite sur l'incorporation d'acides aminés analogues du **D-Trp-10**, toujours dans l'objectif d'améliorer l'activité antivirale des D-peptides de référence. De façon similaire à l'étude des analogues de la **D-Leu-13**, une série de peptides a été synthétisée pour être évaluée biologiquement afin d'établir une étude de relation structure-activité. Dans le but de favoriser les interactions hydrophobes, mais également d'optimiser l'interaction π-stacking avec le Trp-35 de la protéine (décrit dans le Chapitre 2, paragraphe II.A), cette nouvelle série a été constituée d'analogues présentant des noyaux indoles substitués en position 5 par des groupements méthyle, méthoxy ou bromé (Figure 62). Par ailleurs, le noyau indole a été également remplacé par des groupements de type cyclohexyle, 1- ou 2-naphtyle ou aryle, substitués en position ortho, méta ou para par des groupements électroattracteurs ou électrodonneurs.

Les trois molécules non commerciales (en rouge et vert) ont été synthétisées sous forme racémique, de façon similaire aux analogues de la **D-Leu-13**.

Selon les deux voies de synthèse représentées dans le schéma 28, l'ensemble de ces dérivés ont ensuite été incorporés dans la séquence de référence IDX15971. Enfin, l'évaluation biologique de ces peptides a permis d'établir une étude de relation structure-activité sur cette série de modifications.

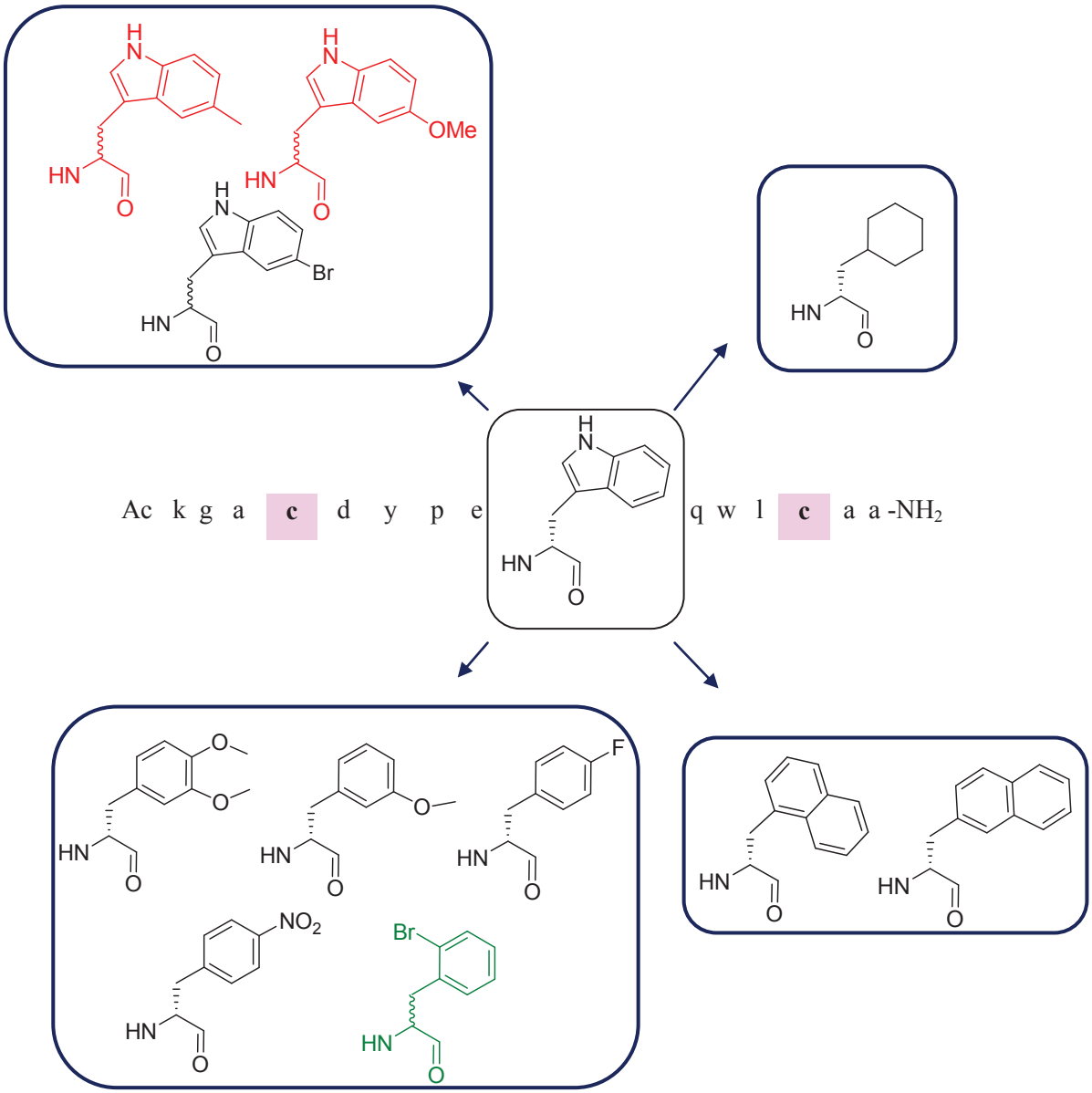


Figure 62. Analogues du **D-Trp-10**

IV.C .1. Synthèse d'analogues du D-Trp-10

Les analogues du **D-Trp-10** protégés ont été obtenus à partir de deux réactions clés : la réaction d'alkylation de Friedel-Crafts (Voie A) et la réaction d'alkylation catalysée par transfert de phase (Voie B), suivie d'une succession de protection et déprotection (Schéma 28).

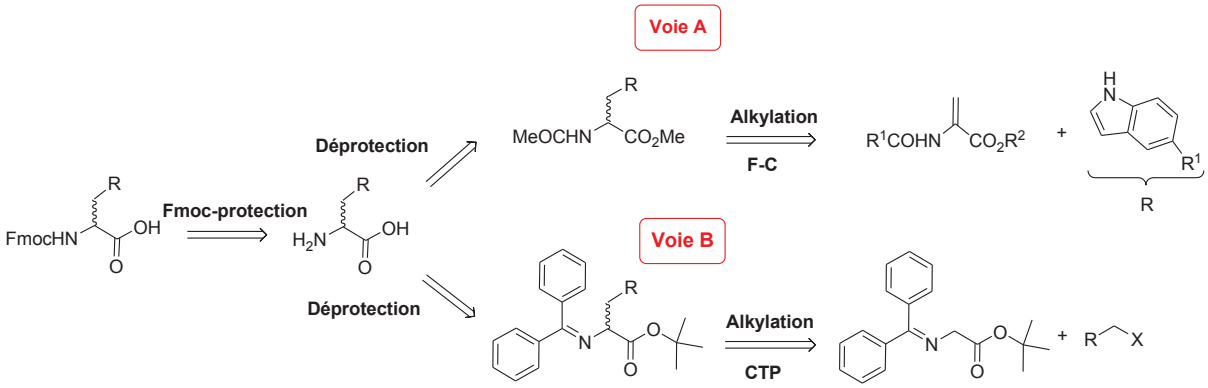


Schéma 28. Voies de synthèse des analogues du **D-Trp-10**

IV.C.1.1. Synthèse *via* l'alkylation de Friedel-Crafts

IV.C.1.1.(i) Principe

Les alkylations de Friedel-Crafts d'indoles avec un dérivé carbonylé α,*β*-insaturé tel que l'accepteur de Michael est une approche efficace pour la synthèse d'indoles substitués. Cette réaction est une substitution électrophile d'indoles avec un dérivé ester *N*-acétylé α,*β*-déhydroalanine induite par un acide de Lewis (Schéma 29).[49]

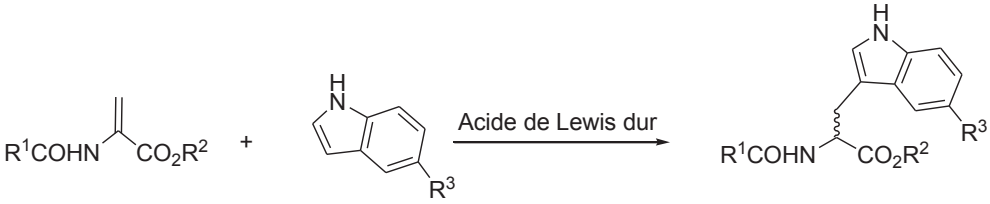


Schéma 29. Substitution du noyau indole par alkylation de Friedel-Crafts

Un choix approprié d'acide de Lewis a permis l'activation régiosélective sur des substrats enesters-enamides. En effet, deux équivalents d'un acide de Lewis dur sont nécessaires pour réaliser la réaction dont le mécanisme est illustré Schéma 30.[49]

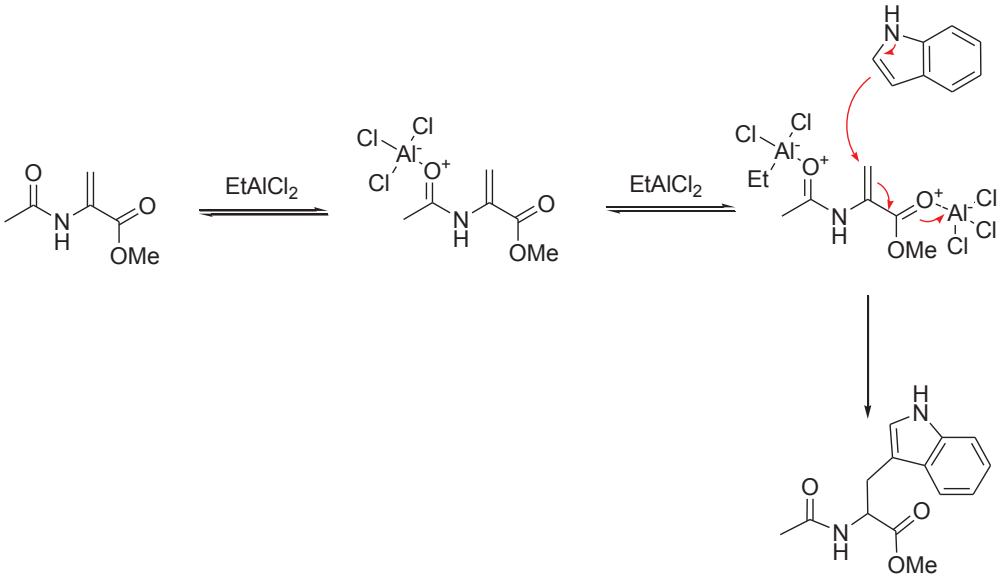


Schéma 30. Mécanisme réaction de Friedel-Crafts

La présence des groupements temporaires aminoacyles et esters complexés par les acides de Lewis, favorise l'attaque nucléophile de l'indole sur la position *β* du carbonyl *α,β*-insaturé conduisant à des *α*-aminoacides. Cette synthèse peut être appliquée à une large gamme de groupements fonctionnels. De plus, la résolution de ces acides aminés peut être réalisée par hydrolyse asymétrique enzymatique avec l'utilisation d'une α-chymotrypsine ou d'une carboxypeptidase A.[50]

IV.C.1.1.(ii) Synthèse d' analogues du D-Trp-10

La synthèse des deux analogues substitués en C5 par les groupements méthyle et méthoxy (Figure 63) a été réalisée selon cette méthode.

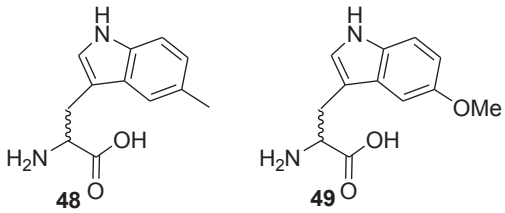


Figure 63. Analogues **D-Trp-10**

Après réaction d'alkylation de Friedel-Crafts sur le composé **50** pour conduire aux analogues peptidiques **55** et **56**, une hydrolyse acide à reflux et une étape de protection Fmoc ont été effectuées (Schéma 31).

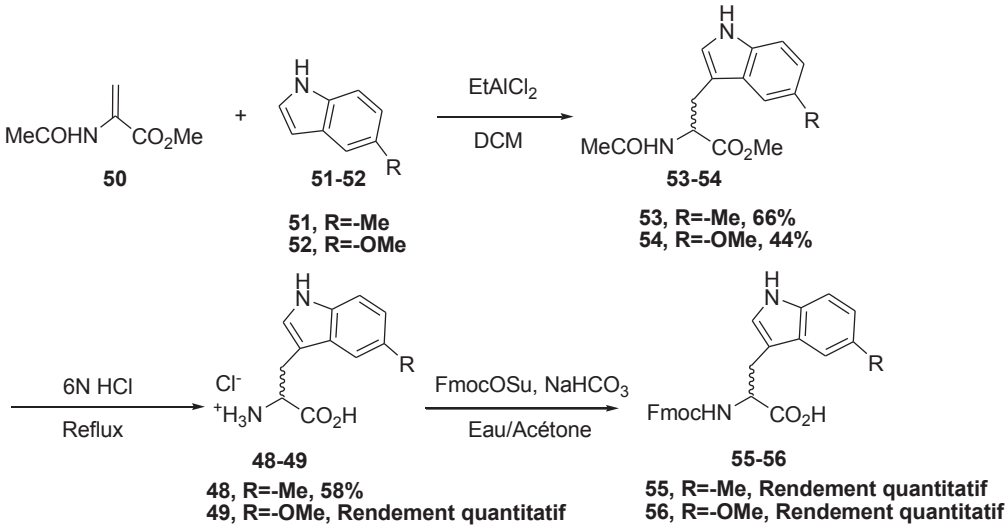


Schéma 31. Voie de synthèse alkylation de Friedel-Crafts

IV.C.1.2. Synthèse *via* l'alkylation par Catalyse par Transfert de phase (CTP)

La synthèse du dérivé de la phénylalanine substitué par un brome en position ortho (composé **59**, Schéma 32) a été réalisée par réaction d'alkylation par transfert de phase, dans les mêmes conditions que celles décrites dans le paragraphe IV.B.1.1.(ii). L'acide aminé protégé **60** est prêt à être intégré dans une synthèse sur phase solide utilisant une stratégie Fmoc/tBu.

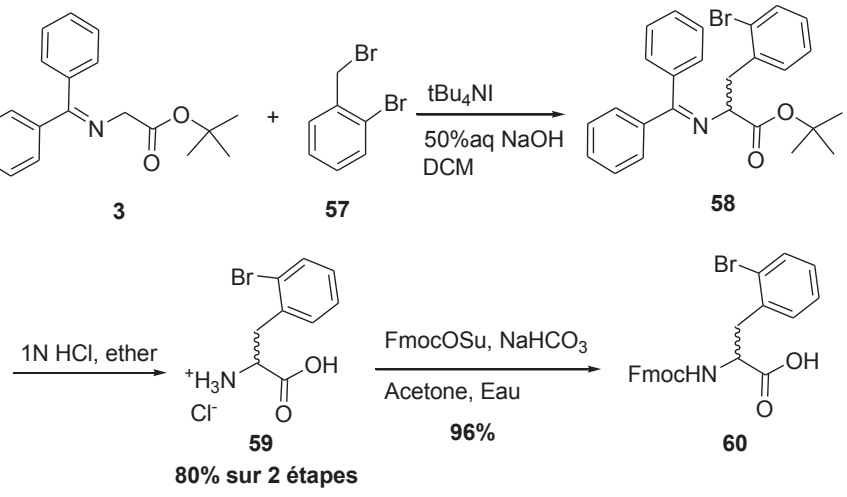


Schéma 32. Voie de synthèse de l'alkylation catalysée par transfert de phase

IV.C .2. Synthèse des peptides incorporant les analogues du D-Trp-10

Les acides aminés qu'ils soient commerciaux ou synthétisés (en rouge : voie alkylation Friedel-Crafts et vert : voie alkylation catalysé par transfert de phase), présentés dans le paragraphe IV.C, ont été incorporés dans la séquence de référence IDX15971 (Figure 64). La synthèse des peptides a été réalisée dans des conditions identiques à celles présentées dans le chapitre 2, paragraphe III.B. Ces composés ont ensuite été évalués en culture cellulaire pour leur activité anti-VIH.

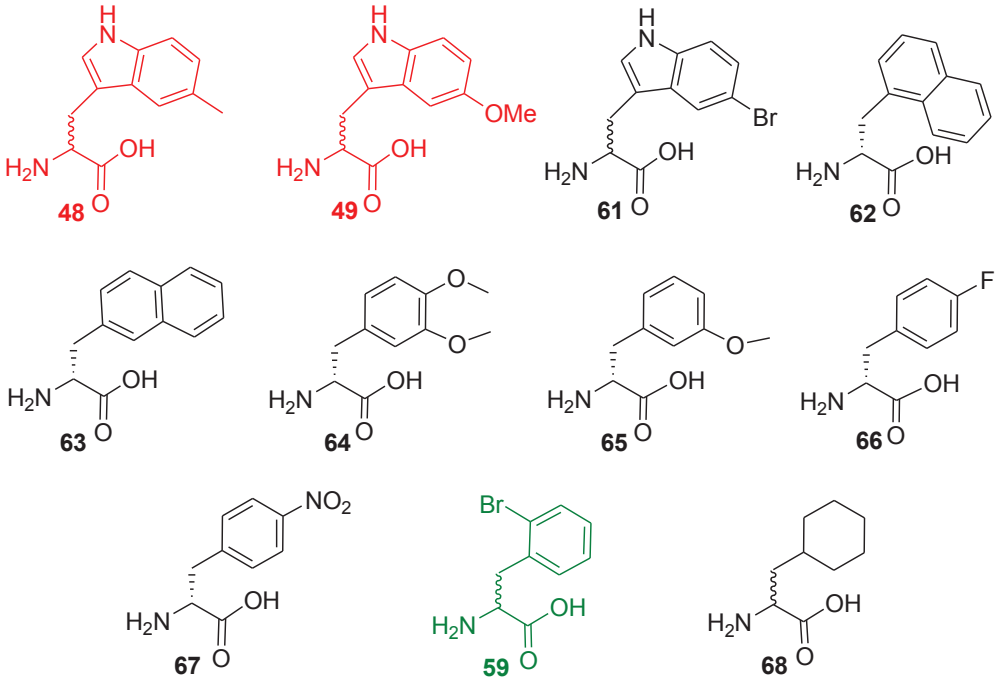
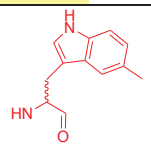
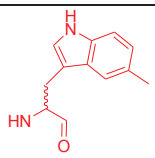
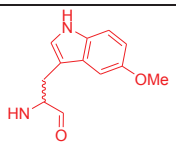
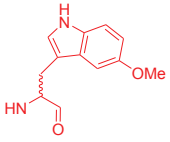
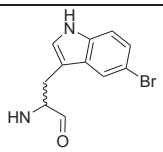
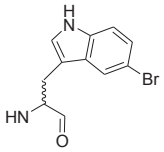
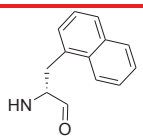
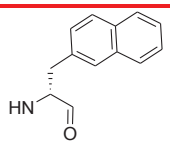
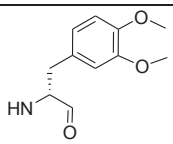
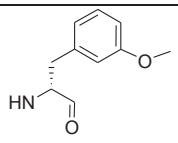


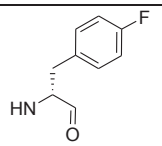
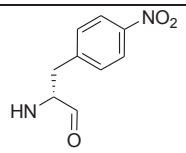
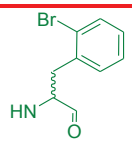
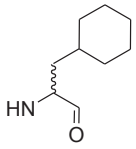
Figure 64. Analogues **D-Trp-10**

IV.C .3. Evaluation biologique

Les activités anti-VIH des peptides analogues sont reportées dans le Tableau 27.

.

Peptide	Séquence	CC_{50}[a] (µM)	CE_{50}[b] (µM)
IDX15971	**Ac k g a c d y p e w q w l c a a -NH_2**	**>50**	**12,5**
IDX18313	Ac k g a **c** d y p e  q w l **c** a a -NH_2	>150	>150
IDX18314	Ac k g a **c** d y p e  q w l **c** a a -NH_2	>150	>36,5
IDX18621	Ac k g a **c** d y p e  q w l **c** a a -NH_2	>150	>150
IDX18624	Ac k g a **c** d y p e  q w l **c** a a -NH_2	>150	>50
IDX18316	Ac k g a **c** d y p e  q w l **c** a a -NH_2	>150	>150
IDX18317	**Ac k g a c d y p e**  **q w l c a a -NH_2**	**>150**	**7,5**
IDX18167	**Ac k g a c d y p e**  **q w l c a a -NH_2**	**>150**	**5,9**
IDX18173	Ac k g a **c** d y p e  q w l **c** a a -NH_2	>150	47
IDX18172	Ac k g a **c** d y p e  q w l **c** a a -NH_2	>150	>150
IDX18166	Ac k g a **c** d y p e  q w l **c** a a -NH_2	>150	60

IDX18626	Ac k g a **c** d y p e  q w l **c** a a -NH_2	>150	110
IDX18171	Ac k g a **c** d y p e  q w l **c** a a -NH_2	>150	>150
IDX18627	**Ac k g a c d y p e**  **q w l c a a -NH_2**	**>50**	**5,9**
IDX18625	Ac k g a **c** d y p e  q w l **c** a a -NH_2	>150	13,1

[a] Concentration Cytotoxique : concentration nécessaire pour réduire de 50% la viabilité des cellules non infectées

[b] Concentration Effective : concentration nécessaire pour inhiber de 50% la production de la protéine p24

Tableau 27. Evaluation biologique des analogues du **D-Trp-10**

Une baisse d'activité a été observée pour les analogues du **D-Trp-10** possédant un noyau indole substitué en position 5 par des groupements méthyle (IDX18313, IDX18314) et méthoxy (IDX18621 et IDX18624). Par contre, l'introduction du brome, sur cette même position semble favorable puisque l'activité observée pour un des diastéréoisomères, le composé IDX18317 (7,5 µM), est supérieure à celle du peptide de référence IDX15971 (11 µM).

Il en est de même pour les dérivés de la phénylalanine puisque les divers composés substitués en ortho, méta et para par des groupements électroattracteurs ou électrodonneurs (IDX18172, IDX18266, IDX18626, IDX18171) induisent une diminution de l'activité, à l'exception du composé IDX18627 (5,9 µM) substitué en ortho par un brome. En effet, l'activité mesurée pour les deux diastéréoisomères est meilleure que celle du peptide de référence. Afin d'évaluer au mieux l'activité du composé actif, la séparation des deux diastéréoisomères par HPLC préparative est actuellement en cours.

Une baisse d'activité est également observée pour l'analogue cyclohexyle IDX18625 et pour le composé incorporant le groupement 2-naphtyl IDX18173. Par contre l'analogue 1-naphtyl IDX18167 s'est révélé aussi actif (5,9 µM) que le composé IDX18627.

Ainsi, à travers ces évaluations, trois peptides se détachent en présentant une activité supérieure à celle du peptide de référence IDX15971 : les composés IDX18317 et IDX18627,

incorporant un brome respectivement en positions C5 du noyau indole ou en ortho du noyau phényle, et le composé IDX18167 incorporant le groupement 1-naphtyle (Figure 65).

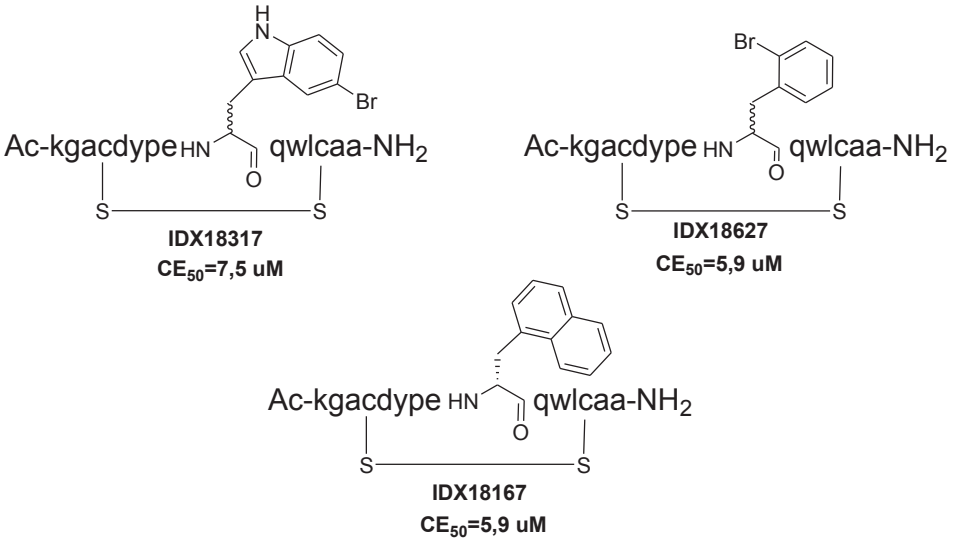
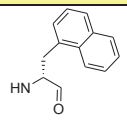
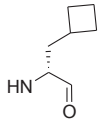
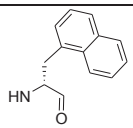
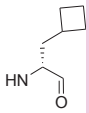


Figure 65. Structures et activités des meilleurs analogues du **D-Trp-10**

Au vu de ces activités, notre stratégie a été, par la suite, d'incorporer simultanément, dans la séquence de référence IDX15971, les analogues du **D-Trp-10** et de la **D-Leu-13** les plus actifs.

IV.D. Insertion simultanée des analogues de la D-Leu-13 et du D-Trp-10 dans le D-peptide IDX15971 et évaluation biologique

Pour cette étude, nous avons considéré la combinaison des analogues pour lesquels les meilleures activités ont été observées, plus précisément les composés incorporant le groupement cyclobutyle en lieu et place de la **D-Leu-13** (IDX17525, 3 µM) et le groupement 1-naphtyle comme analogue du **D-Trp-10** (IDX18167, 5,9 µM). Ainsi, le peptide IDX18630 correspondant a été synthétisé et évalué biologiquement (Tableau 28).

Peptide	Séquence	CC_{50}[a] (µM)	CE_{50}[b] (µM)
IDX15971	**Ac k g a c d y p e w q w l c a a -NH_2**	**>50**	**12,5**
IDX18167	Ac k g a **c** d y p e  q w l **c** a a -NH_2	>150	5,9
IDX17525	Ac k g a **c** d y p e w q w  **c** a a -NH_2	>150	3
IDX18630	**Ac k g a** **c** d y p e  qw  **c** a a -NH_2	**>150**	**1,6**

[a]Concentration Cytotoxique : concentration nécessaire pour réduire de 50% la viabilité des cellules non infectées

[b] Concentration Effective : concentration nécessaire pour inhiber de 50% la production de la protéine p24

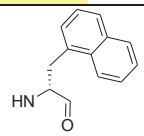
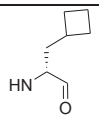
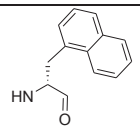
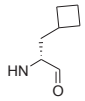
Tableau 28. Evaluation biologique de l'analogue IDX15971 incorporant analogues **D-Trp-10** et **D-Leu-13**

Conformément à nos espérances, l'introduction de ces deux acides aminés modifiés s'est traduit par une amélioration considérable de l'activité du peptide de référence (IDX15971, CE_{50}= 12,5 µM) puisque l'analogue peptidique IDX18630 inhibe le VIH avec une CE_{50} de 1,6 µM.

La séquence IDX15971 de référence ayant été optimisée, notre objectif a été ensuite d'appliquer ces modifications au D-peptide, plus actif, IDX16761.

V. Insertion des analogues de la D-Leu-13 et du D-Trp-10 dans le D-peptide IDX16761 et évaluation biologique

Suite aux résultats encourageants obtenus sur le D-peptide IDX15971, notre stratégie a ensuite été d'introduire consécutivement, puis simultanément, les analogues les plus actifs du **D-Trp-10** et de la **D-Leu-13** dans la séquence IDX16761. Les trois D-peptides IDX18628, IDX18631 et IDX18632 ont ainsi été synthétisés et leurs propriétés biologiques évaluées (Tableau 29).

D-Peptide	Séquence	CC_{50}[a] (µM)	CE_{50}[b] (µM)
IDX16761	**Ac h p c d y p e w q w l c r l g k -NH_2**	**>100**	**0,2**
IDX18628	Ac h p **c** d y p e  q w l **c** r l g k -NH_2	150	14,2
IDX18631	Ac h p **c** d y p e w q w  **c** r l g k -NH_2	>150	1,3
IDX18632	Ac h p **c** d y p e  q w  **c** r l g k -NH_2	10,1	5,4

[a]Concentration Cytotoxique : concentration nécessaire pour réduire de 50% la viabilité des cellules non infectées

[b] Concentration Effective : concentration nécessaire pour inhiber de 50% la production de la protéine p24

Tableau 29. Evaluation biologique des analogues d' IDX16761

Dans ce cas, les analogues qui étaient les plus actifs pour la séquence IDX15971 ne permettent pas d'améliorer l'activité de la séquence IDX16761. En effet, les activités mesurées pour les analogues IDX18628 et IDX18631, bien qu'étant de l'ordre du µM, sont inférieures à l'activité de la séquence de référence. Par ailleurs, l'apparition d'une toxicité a été observée pour le D-peptide IDX18632 (CC_{50}=10,1 µM), résultat qui doit être confirmé par une deuxième évaluation biologique qui est en cours.

VI. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était d'optimiser dans un premier temps l'activité du D-peptide de référence IDX15971, puis celle du D-peptide IDX16761. Au total 40 analogues cycliques ont été synthétisés et évalués biologiquement.

Les peptides rétro, inverso et rétro-inverso n'ont pas montré d'activité antivirale. L'absence d'activité résulte de modifications conformationnelles par rapport au peptide de référence, modifications qui provoquent une perte d'affinité entre ces composés et la protéine virale. Il en a été de même pour les séquences 7-mer puisque nos premiers essais de diminution de la taille de la séquence peptidique n'ont pas été concluants.

Dans un second temps, des modifications apportées au niveau des chaînes latérales de la **D-Leu-13** et du **D-Trp-10** du D-peptide IDX15971 ont été envisagées. Dans le but de

favoriser les interactions hydrophobes mais également d'optimiser ou d'induire de nouvelles interactions, deux séries de peptides cycliques incorporant des analogues de la **D-Leu-13** et du **D-Trp-10** ont été synthétisés et évalués biologiquement.

Concernant les peptides dont la **D-Leu-13** a été modifiée, les meilleures activités ont été observées pour les composés IDX17525 et IDX17474 qui possédent les groupements cyclobutyle et cyclohexyle sur les chaînes latérales de l'analogue aminoacide. D'après une étude de dynamique moléculaire, il semblerait que ces structures favorisent les conformations orientant les résidus **D-Trp-10** et **D-Trp-12** dans la même direction, ce qui optimise certainement les interactions dans la poche hydrophobe de la protéine virale.

Trois analogues du **D-Trp-10** ont ensuite été insérés dans le D-peptide de référence et ont conduit à une meilleure activité. Il s'agit des composés IDX18317 et IDX18627, incorporant un noyau indole bromé en position C5 ou un noyau phényl bromé en position ortho, et le composé IDX18167 incorporant le groupement 1-naphtyl sur la chaîne latérale de l'aminoacide. D'après ces observations, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'effet électrodonneur du brome, en plus de son caractère lipophile, augmente la densité électronique des aromatiques favorisant l'interaction π-stacking avec le Trp-35 de la protéine virale (cf Chapitre 2, paragraphe II.A.). En ce qui concerne le composé IDX18627, la séparation des deux diastéréoisomères par HPLC préparative est actuellement en cours et une meilleure activité est attendue pour l'un des deux peptides diastéréoisomériquement pur.

L'activité du composé IDX18630 a permis de corroborer les résultats précédents puisque l'incorporation des deux analogues les plus actifs, dans la séquence du D-peptide IDX15971, a permis d'améliorer l'activité. Par contre, des résultats décevants ont été obtenus lorsque ces mêmes modifications ont été introduites sur le D-peptide IDX16761. En effet, les séquences correspondantes IDX18628, IDX18631, et IDX18632 s'avèrent moins actives que le D-peptide de référence. Une deuxième évaluation biologique du D-peptide IDX18632, présentant une toxicité significative, est actuellement en cours.

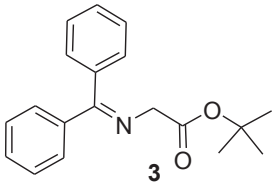
Ainsi, notre premier objectif qui était d'améliorer l'activité du D-peptide IDX15971 a été atteint et ouvre la voie vers d'autres études qui permettraient d'améliorer encore plus la séquence d'IDX16761.

Dans une seconde approche, nous avons tenté de réduire la nature peptidique de cette famille d'inhibiteurs en nous intéressant à la synthèse de macrocycliques peptidiques incorporant les quatre résidus essentiels, **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13** cyclisés par des linkers de type aliphatiques. Ces travaux sont détaillés dans le chapitre suivant.

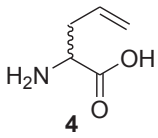
VII. Partie expérimentale

VII.A. Index des molécules synthétisées

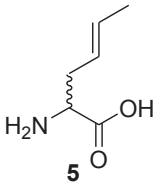
- Composés obtenus selon la voie de synthèse utilisant la réaction d'alkylation par transfert de phase



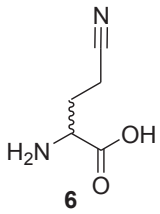
3



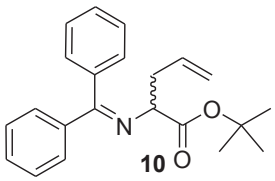
4



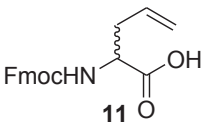
5



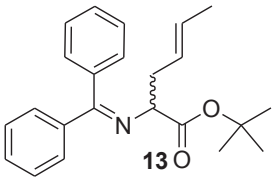
6



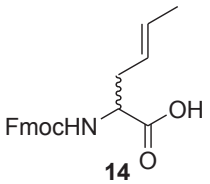
10



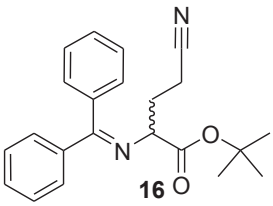
11



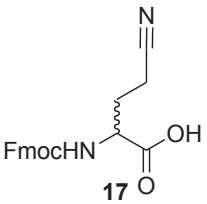
13



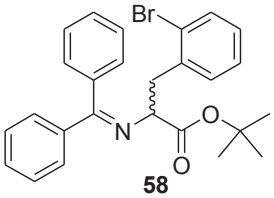
14



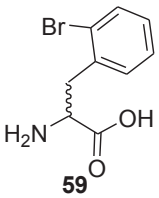
16



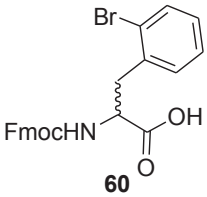
17



58

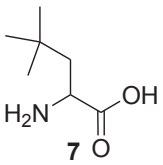


59

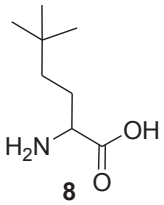


60

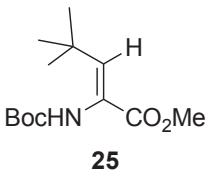
- Composés obtenus selon la voie de synthèse utilisant la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons



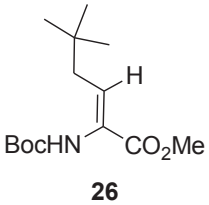
7



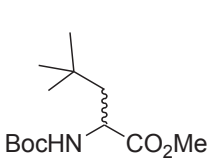
8



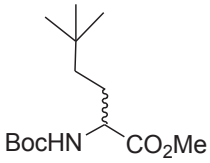
25



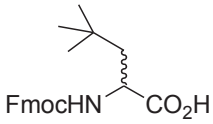
26



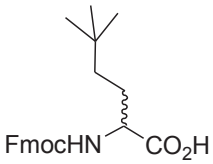
27



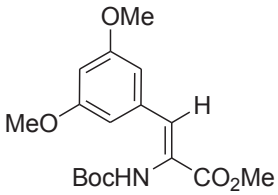
28



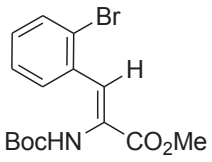
29



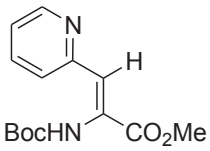
30



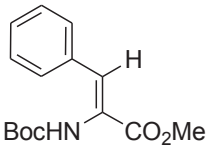
32a



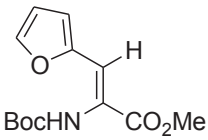
32b



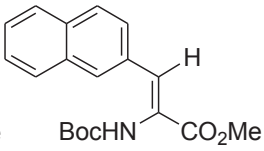
32c



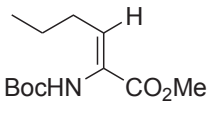
32d



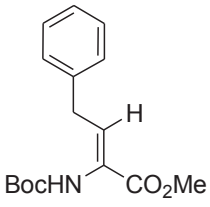
32e



32f

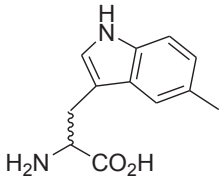


32g

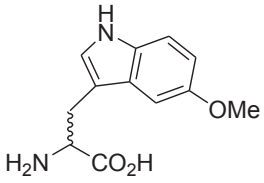


32h

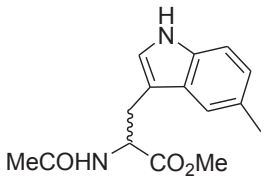
- Composés obtenus selon la voie de synthèse utilisant la réaction de Friedel-Crafts



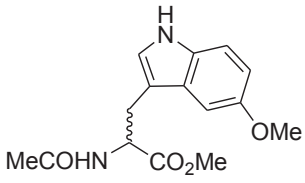
48



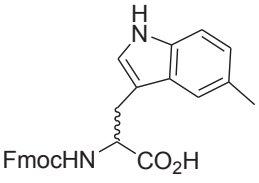
49



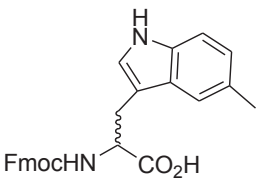
53



54

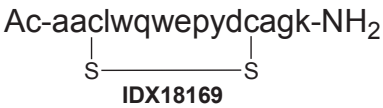


55



56

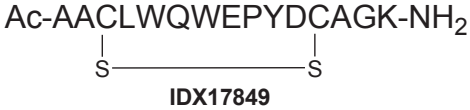
- Analogues rétro, inverso, rétro-inverso et analogues 7-mer d'IDX15971



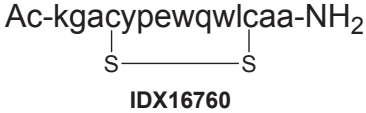
IDX18169



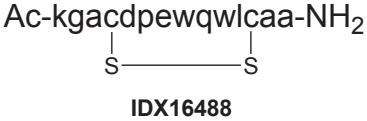
IDX18174



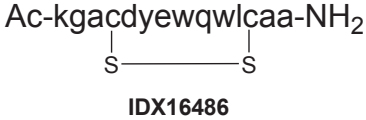
IDX17849



IDX16760

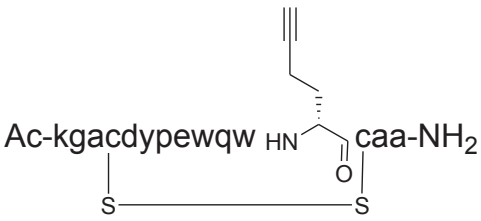


IDX16488

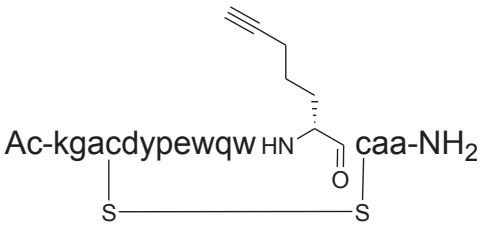


IDX16486

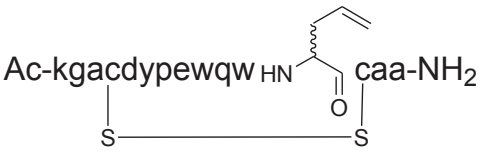
- Analogues d'IDX15971 modifiés sur la position de la **D-Leu-13**



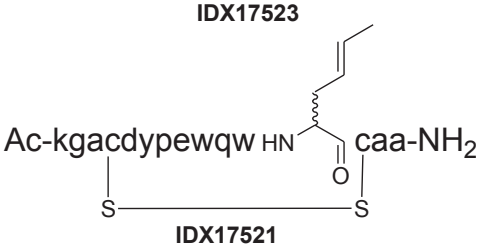
IDX17524



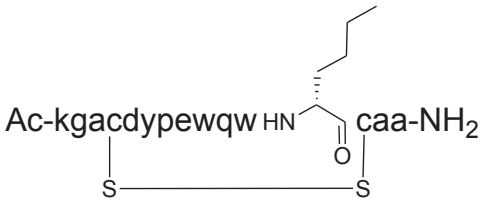
IDX17523



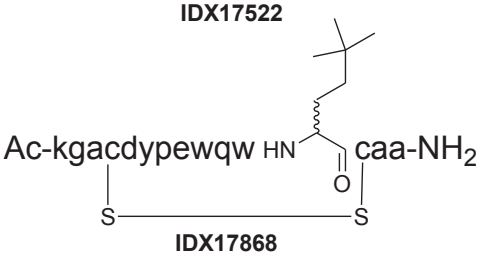
IDX17519
IDX17520



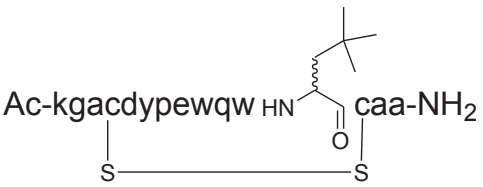
IDX17521
IDX17522



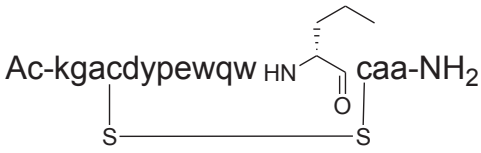
IDX17717



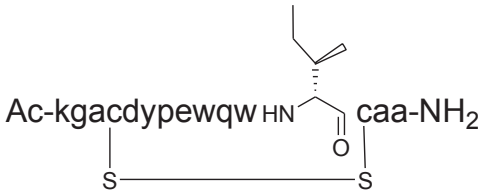
IDX17868



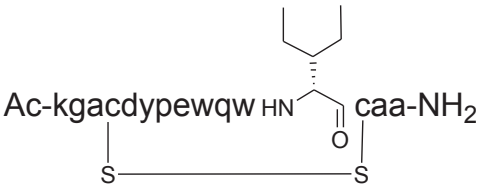
IDX17847
IDX17848



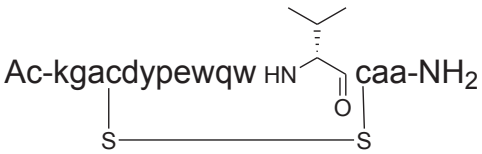
IDX17722



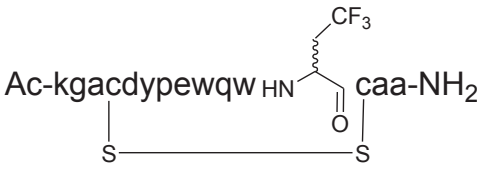
IDX17476



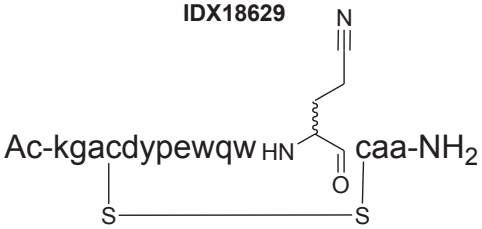
IDX17477



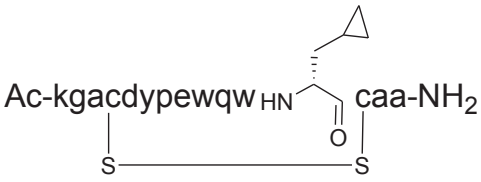
IDX18629



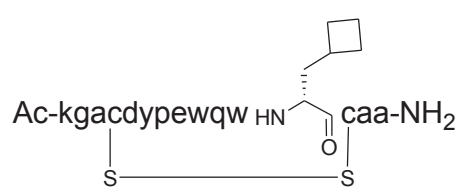
IDX17715
IDX17716



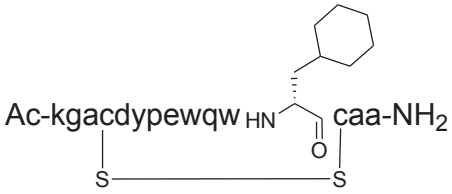
IDX17718
IDX17719



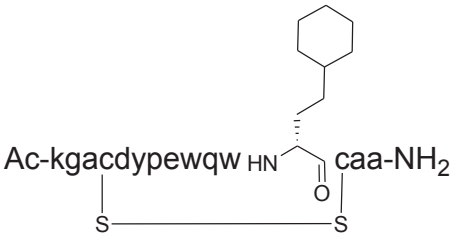
IDX17475



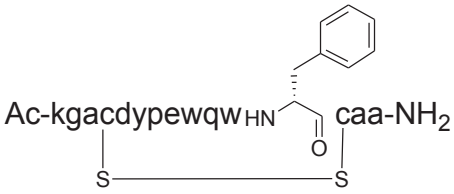
IDX17525



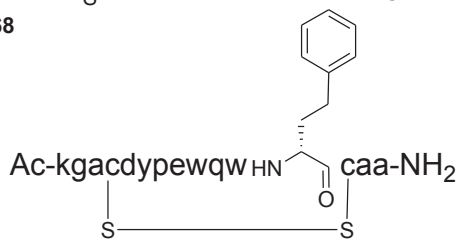
IDX17474



IDX18168

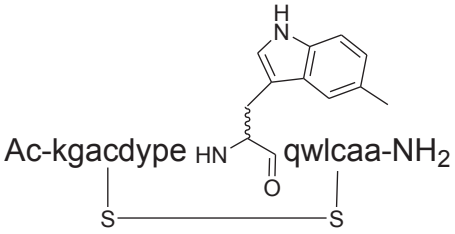


IDX18311

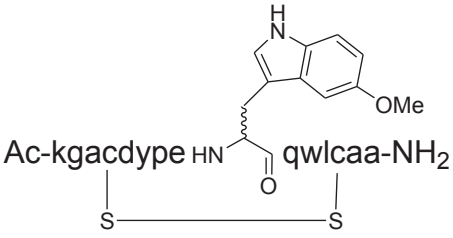


IDX18312

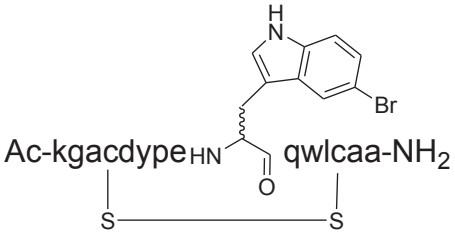
- Analogues d'IDX15971 modifiés sur la position du **D-Trp-10**



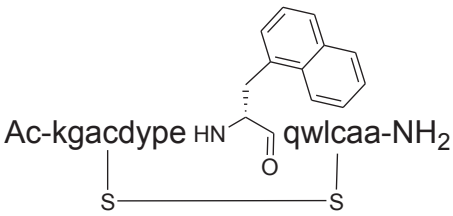
IDX18313
IDX18314



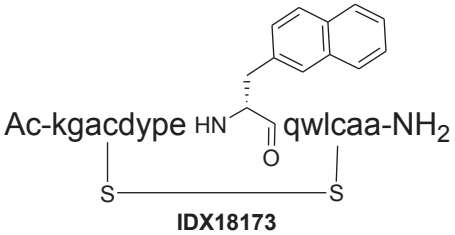
IDX18621
IDX18624



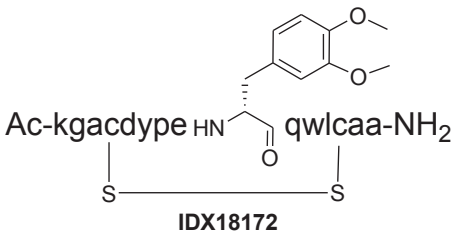
IDX18316
IDX18317



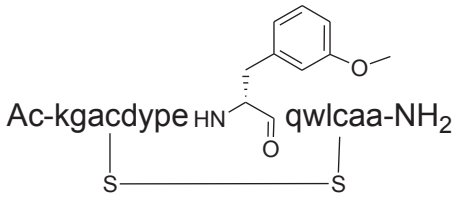
IDX18167



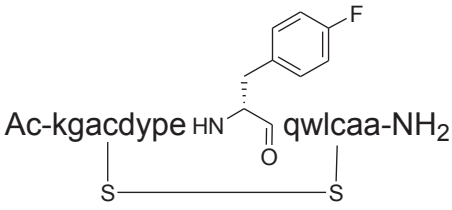
IDX18173



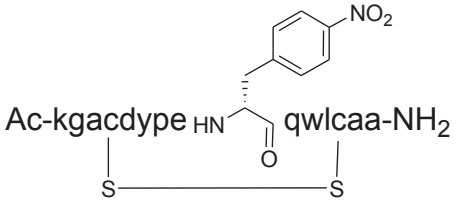
IDX18172



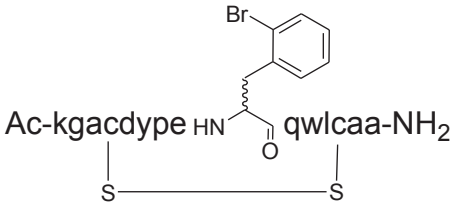
IDX18166



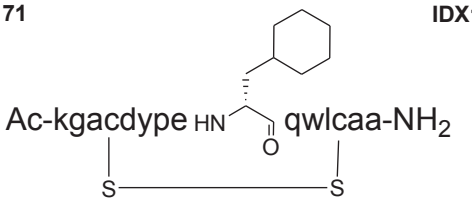
IDX18626



IDX18171

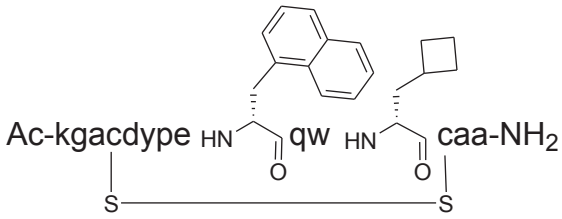


IDX18627



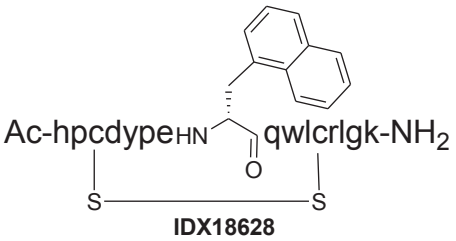
IDX18625

- Analogue d'IDX15971 modifiés sur les positions **D-Trp-10** et **D-Leu-13**

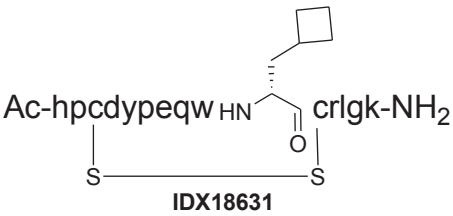


IDX18630

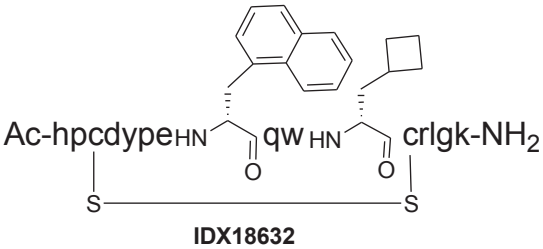
- Analogues d' IDX16761 modifiés sur les positions **D-Trp-10** et **D-Leu-13**



IDX18628



IDX18631



IDX18632

VII.B. Conditions générales

Les solvants, dérivés d'acides aminés et autres réactifs sont commercialisés par IrisBiotech, Merck, Fluka, Riedeil-de Haën, Sigma-Aldrich, Acros Organics, Interchim, NeoMPS, AdvancedChem Tech, Novabiochem, VWR Prolabo. Tous de qualité analytique, ils ont été utilisés sans purification préalable.

La chromatographie sur couche mince analytique a été réalisée sur des plaques aluminium de silice Merck 60 F_{254} de 0,2 mm d'épaisseur. Selon leur nature, la révélation des composés a été réalisée à la lumière ultra-violette à 254 nm et/ou par chauffage après pulvérisation d'une solution d'acide phosphomolybdique à 10% dans de l'éthanol.

La purification des composés par chromatographie a été réalisée sur colonne de gel de silice Merck Geduran Si (40-63 µM) sous pression à l'aide d'un courant d'azote. Les purifications ont été réalisées en gradient d'élution avec divers solvants.

Les purifications par HPLC préparative et les analyses LC/MS et MALDI ont été réalisées sur les mêmes appareils, dans des conditions identiques, à celles développées dans le chapitre II, paragraphe VII.B.

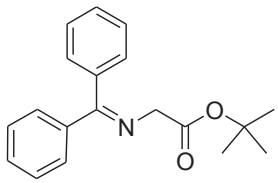
Les spectres RMN du proton (RMN ^{1}H) et du carbone (RMN ^{13}C) ont été enregistrés sur des appareils Bruker Avance DPX 200 MHZ et Bruker AC-300 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par millions (ppm) par rapport au signal de solvant résiduel ($CHCl_3$ fixé à 7,26 ppm, DMSO-d^6 fixé à 2,50 ppm, D_2O à 4,79 ppm) pris comme référence interne. Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est indiquée par une (ou plusieurs lettres) lettre(s) minuscules : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet), l (large).

VII.C. Synthèse d'analogues des D-peptides

VII.C .1. Synthèse des intermédiaires et acides aminés protégés *via* la voie alkylation par transfert de phase

tert-Butyl *N*-(diphénylméthylène)glycinate (3)[13]

A une solution de glycine triméthyl ester **2** (922 mg, 5,52 mmol, 1 éq.) dans du DCM (20 mL) est ajoutée de la benzophénone imine **1** (1 g, 5,52 mmol, 1 éq.). Après 24 h sous agitation à température ambiante, sous azote, le chlorure d'ammonium est filtré et le filtrat est évaporé. Le résidu est solubilisé dans de l'éther diéthylique, lavé à l'eau (2x) et la phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée à sec pour obtenir le composé **3**.



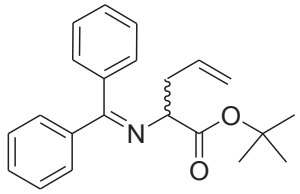
Formule brute : $C_{19}H_{21}NO_2$
Masse molaire (g/mol) : 295,38

Quantité : 1,57 g, **Rendement :** 96%, **Aspect :** solide blanc
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,49 (s, 9H) ; 4,15 (s, 2H) ; 7,16-7,24 (m, 2H) ; 7,31-7,43 (m, 3H) ; 7,44-7,52 (m, 3H) ; 7,69 (dd, 2H, ^3J = 6,8 Hz, ^4J = 1,6 Hz).
RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 28,1 ; 56,3 ; 81,0 ; 127,8 ; 128,0 ; 128,6 ; 128,8 ; 130,4 ; 136,2 ; 139,4 ; 169,8 ; 171,5.
SM (ESI) : *m/z* 296,2 $[M+H]^+$

Procédure générale de la réaction d'alkylation (10), (13), (16) et (58)

A une solution de *tert*-Butyl *N*-(diphénylméthylène)glycinate **3** (1 éq.) dans un mélange de DCM (10 mL/mmol) et de NaOH aqueux 50% (1 mL/mmol) est ajouté l'halogénure d'alkyle **9**, **12**, **15** ou **57** (2 éq.) et du tBu_4NI (0,1 éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation une nuit à température ambiante puis dilué dans de l'éther. La phase organique est lavée avec de l'eau (2x), une solution aqueuse de NaCl saturée (1x) puis séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée à sec pour donner la base de Schiff alkylée **10**, **13**, **16** ou **58**.
Le produit **58** bien que contaminé par l'halogénure d'alkyle de départ, est engagé pour l'étape d'hydrolyse acide.

(*R,S*)-*tert*-Butyl 2-(diphénylméthylèneamino)pent-4-énoate (10)[51]



Formule brute : $C_{22}H_{25}NO_2$

Masse molaire (g/mol) : 335,44

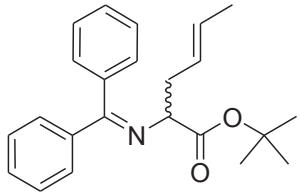
Quantité : 471 mg, **Rendement :** 83%, **Aspect :** huile incolore

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,36 (s, 9H) ; 2,51-2,59 (m, 2H) ; 3,93 (dd, 1H, ^3J=5,5 Hz, ^3J = 7,5 Hz) ; 4,93 (d, 1H, ^3J = 10,2Hz) ; 5,00 (d, 1H, ^3J = 18,2 Hz) ; 5,56-5,72 (m, 1H) ; 7,04-7,14 (m, 2H) ; 7,19-7,33 (m, 2H) ; 7,35-7,48 (m, 3H) ; 7,57-7,73 (m, 3H, ^3J = 7,8Hz).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 28,8 ; 38,8 ; 66,5 ; 81,7 ; 118,0 ; 128,6 ; 128,7 ; 129,0 ; 129,1 ; 129,2 ; 129,5 ; 130,8 ; 130,9 ; 133,1 ; 135,4 ; 138,3 ; 140,4 ; 170,8 ; 171,6.

SM (ESI) : *m/z* 336,3 $[M+H]^+$; 280,2 $[M+H\text{-}tBu]^+$

(*R,S*)-*(E)-tert*-Butyl 2-(diphénylméthylèneamino)hex-4-énoate (13)[52]



Formule brute : $C_{23}H_{27}NO_2$

Masse molaire (g/mol) : 349,47

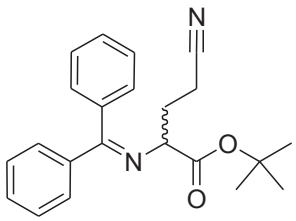
Quantité : 497 mg, **Rendement :** 84%, **Aspect :** huile incolore

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,36 (s, 9H) ; 1,53 (d, 3H, ^3J = 6,3 Hz) ; 2,32-2,54 (m, 2H) ; 3,88 (dd, 1H, ^3J =5,6 Hz, ^3J = 7,6 Hz) ; 5,13-5,29 (m, 1H) ; 5,31-5,47 (m, 1H) ; 7,02-7,11 (m, 2H) ; 7,16-7,36 (m, 6H) ; 7,56 (d, 2H, ^3J = 6,9 Hz).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 17,8 ; 27,9 ; 36,8 ; 66,2 ; 80,7 ; 126,9 ; 127,6 ; 127,8 ; 127,9 ; 128,2 ; 128,6 ; 129,9 ; 136,6 ; 139,7 ; 169,7 ; 170,9.

SM (ESI) : *m/z* 350,3 $[M+H]^+$; 294,3 $[M+H\text{-}tBu]^+$

(*R,S*)-*tert*-Butyl 4-cyano-2-(diphénylméthylèneamino)butanoate (16)[53]



Formule brute : $C_{22}H_{24}N_2O_2$

Masse molaire (g/mol) : 348,44

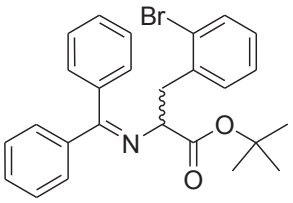
Quantité : 579 mg, **Rendement :** 98%, **Aspect :** huile jaune

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,47 (s, 9H) ; 2,18-2,31 (m, 2H) ; 2,46-2,53 (m, 2H) ; 4,08 (dd, 1H, ^{3}J = 4,7 Hz, ^{3}J = 7,7 Hz) ; 7,19-7,25 (m, 2H) ; 7,32-7,43 (m, 3H) ; 7,48-7,52 (m, 3H) ; 7,69 (d, 2H, ^{3}J = 7,8 Hz).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 28,1 ; 45,6 ; 63,9 ; 81,6 ; 119,7 ; 128,0 ; 128,3 ; 128,7; 128,9 130,2 ; 136,2 ; 139,7 ; 170,1 ; 171,4.

SM (ESI) : *m/z* 349,1 $[M+H]^+$; 293,3 $[M+H\text{-}tBu]^+$.

(*R,S*)-*tert*-Butyl 3-2-bromophényl)-2-(diphénylméthylèneamino)propanoate (16)[54]



Formule brute : $C_{26}H_{26}BrNO_2$

Masse molaire (g/mol) : 464,39

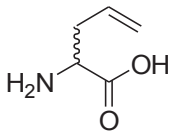
Quantité : 919 mg, **Aspect :** huile jaune

SM (ESI) : *m/z* 464,4 $[M+H]^+$; 408,3 $[M+H\text{-}tBu]^+$.

Procédure générale de la réaction d'hydrolyse (4), (5), (6) et **(59)**

A une solution de produit alkylé **10**, **13**, **16** ou **58** (1 éq.) dans de l'éther diéthylique (10 mL/mmol) est ajouté une solution aqueuse d'HCl 1N (10 mL/mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation une nuit à température ambiante puis la phase aqueuse est lavée à l'éther diéthylique (2x) et évaporée à sec pour obtenir l'acide aminé **4**, **5 6** ou **59** sous forme de sel de chlorhydrate.

(*R,S*)-Acide 2-aminopent-4-énoique (4)[55]



Formule brute : $C_5H_9NO_2$

Masse molaire (g/mol) : 115,06

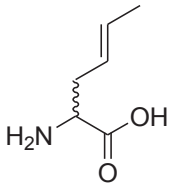
Masse molaire du sel de chlorhydrate : 151,04

Quantité : 214 mg, **Rendement :** Quantitatif, **Aspect :** solide blanc

RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ 2,52-2,63 (m, 2H) ; 3,99 (m, 1H) ; 5,22-5,29 (m, 2H) ; 5,57-5,72 (m, 1H).

RMN ^{13}C (300 MHz, D_2O) δ 37,5 ; 54,9 ; 122,3 ; 130,8 ; 175,7.

(*R,S*)-*(E)*-Acide 2-aminohex-4-énoique (5)[56]



Formule brute : $C_6H_{11}NO_2$

Masse molaire (g/mol) : 129,16

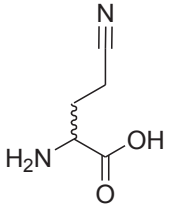
Masse molaire du sel de chlorhydrate : 165,62

Quantité : 193 mg, **Rendement :** 82%, **Aspect :** solide blanc

RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ 1,48 (d, 3H, ^3J = 6,2 Hz) ; 2,32-2,69 (m, 2H) ; 3,96 (m, 1H) ; 5,12-5,55 (m, 1H) ; 5,59-5,88 (m, 1H).

RMN ^{13}C (300 MHz, D_2O) δ 18,9 ; 37,2 ; 55,8 ; 123,6 ; 129,8 ; 174,6.

(*R,S*)-Acide 2-amino-4-cyanobutanoique (6)[57]



Formule brute : $C_5H_8N_2O_2$

Masse molaire (g/mol) : 128,13

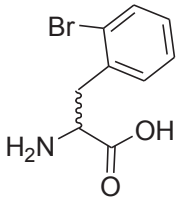
Masse molaire du sel de chlorhydrate : 164,59

Quantité : 271 mg, **Rendement :** 99%, **Aspect :** solide jaune

RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ 2,17-2,25 (m, 2H) ; 2,62-2,75 (m, 2H) ; 3,91 (m, 1H).

RMN ^{13}C (300 MHz, D_2O) δ 15,2 ; 32,1 ; 55,6 ; 120,9 ; 171,2.

(*R,S*)-Acide 2-amino-3-(2-bromophényl)propanoique (59)[58]



Formule brute : $C_9H_{10}BrNO_2$

Masse molaire (g/mol) : 244,09

Masse molaire du sel de chlorhydrate : 280,55

Quantité : 380 mg, **Rendement :** 80% (2 étapes), **Aspect :** solide blanc

RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ 3,04-3,15 (m, 1H) ; 3,31-3,43 (m, 1H) ; 4,12 (m, 1H) ; 7,08-7,15 (m, 2H) ; 7,19-7,25 (m, 1H) ; 7,51-7,58 (d, 1H, ^3J = 8,5 Hz).

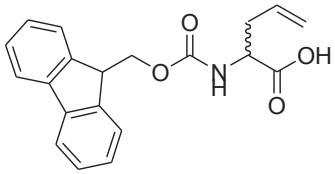
RMN ^{13}C (300 MHz, D_2O) δ 36,5 ; 53,6 ; 124,2 ; 128,2 ; 129,7 ; 131,8 ; 133,3 ; 134,1 ; 172,3.

SM (ESI) : *m/z* 244,3 $[M+H]^+$

Procédure générale de la réaction de protection Fmoc (11), (14), (17) et (60), méthode C

A une solution d'aminoacide **4**, **5**, **6** ou **59** (1 éq.) dans un mélange eau/acétone (1/1) (10 mL/mmol) est ajouté du $NaHCO_3$ (3,3 éq.) puis du 9-Fluorénylméthoxycarbonyl-N-hydroxysuccinimide (1 éq.) solubilisé dans de l'acétone (5 mL/mmol). Après 4 h sous agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré, dilué avec de l'AcOEt puis acidifié avec une solution aqueuse d'HCl 1 N à 0°C jusqu'à pH=1. La phase aqueuse est extraite à l'AcOEt (3x) et les phases organiques sont regroupées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et évaporées à sec. Le résidu est purifié par recristallisation dans du cyclohexane (pour les composés **11**, **14** et **60**) ou par chromatographie sur gel de silice (éluant : cyclohexane/AcOEt 3/7 avec 0,5% AcOH) (pour le composé **17**) pour donner l'acide aminé protégé **11**, **14**, **17** ou **60**.

(*R*,*S*)-Acide 2-[[(9H-fluorén-9-ylméthoxy)carbonyl]amino]-pent-4-énoique (11)



Formule brute : $C_{20}H_{19}NO_4$

Masse molaire (g/mol) : 337,37

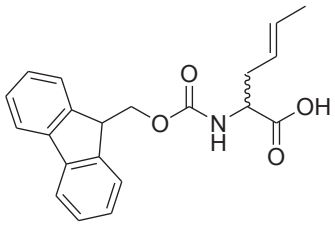
Quantité : 294 mg, **Rendement :** 62%, **Aspect :** solide blanc

RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d^6) δ 2,28-2,33 (m, 2H) ; 4,03 (m, 1H) ; 4,22-4,35 (m, 3H) ; 5,04-5,12 (m, 2H) ; 5,79-5,83 (m, 1H) ; 7,31-7,48 (m, 4H) ; 7,68 (ls, 1H) ; 7,68-7,76 (d, 2H, ^3J = 7,2 Hz) ; 7,90-7,94 (d, 2H, ^3J = 7,4 Hz) ; 12,72 (ls, 1H).

RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d^6) δ 37,6 ; 47,9 ; 57,8 ; 67,1 ; 116,9 ; 121,2 ; 125,0 ; 127,0 ; 127,7 ; 135,3 ; 141,3 ; 143,8 ; 156.1 ; 177,3.

SM (ESI) : *m/z* 338,3 $[M+H]^+$

(*R*,*S*)-(*E*)-Acide 2-[[(9-fluorénylméthoxy)carbonyl]amino]-hex-4-énoique (14)[56]



Formule brute : $C_{21}H_{21}NO_4$

Masse molaire (g/mol) : 351,40

Quantité : 270 mg, **Rendement :** 66%, **Aspect :** solide blanc

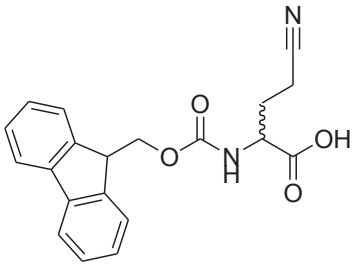
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d^6) δ 1,52 (d, 3H, ^3J = 5,8 Hz) ; 2,27-2,48 (m, 2H) ; 3,98 (m, 1H)

; 4,26-4,38 (m, 3H) ; 5,42-5,59 (m, 2H) ; 7,27-7,49 (m, 4H) ; 7,64 (d, 1H, ^3J = 7,8 Hz) ; 7,68-7,76 (d, 2H, ^3J = 7,4 Hz) ; 7,90-7,94 (d, 2H, ^3J = 7,4 Hz) ; 12,59 (ls, 1H).

RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d^6) δ 18,0 ; 37,1 ; 48,3 ; 55,5 ; 68,6 ; 121,3 ; 124,6 ; 125,4 ; 126,9 ; 128,4 ; 131,7 ; 141,9 ; 144,3 ; 156.7 ; 172,3.

SM (ESI) : *m/z* 352,2 $[M+H]^+$

(*R*,*S*)-Acide 2-[[(9-fluorénylméthoxy)carbonyl]amino]-4-cyanobutanoique (17)



Formule brute : $C_{20}H_{18}N_2O_4$

Masse molaire (g/mol) : 350,37

R$_f$ (Cyclohexane/EtOAc, 0,5% AcOH : 3/7) 0,32

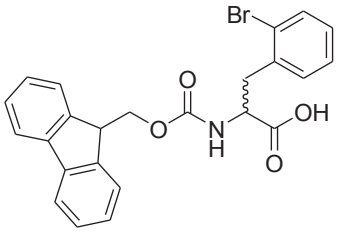
Quantité : 125 mg, **Rendement :** 22%, **Aspect :** solide jaune

RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d^6) δ 2,18-2,29 (m, 2H) ; 2,58-2,67 (m, 2H) ; 3,97 (m, 1H) ; 4,25-4,32 (m, 3H) ; 7,31-7,45 (m, 4H) ; 7,64 (ls, 1H) ; 7,69-7,71 (d, 2H, ^3J = 7,7 Hz) ; 7,84-7,91 (d, 2H, ^3J = 7,9 Hz).

RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d^6) δ 16,3 ; 26,1 ; 47,6 ; 55,1 ; 67,9 ; 120,3 ; 125,6 ; 126,4 ; 128,2 ; 128,7 ; 142,6 ; 145,3 ; 158.7 ; 175,7.

SM (ESI) : *m/z* 351,2 $[M+H]^+$

(*R*,*S*)-Acide2-[[(9-fluorénylméthoxy)carbonyl]amino]-3-(2-bromophényl)propanoique (60)



Formule brute : $C_{24}H_{20}BrNO_4$

Masse molaire (g/mol) : 466,32

Quantité : 606 mg, **Rendement :** 96%, **Aspect :** solide blanc

RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d^6) δ 2,99-8,05 (m, 1H) ; 3,22-3,32 (m, 1H) ; 4,12-4,45 (m, 4H) ; 7,12-7,51 (8H, m) ; 7,55-7,70 (3H, m) ; 7,82-793, (d, 1H, ^3J = 7,6 Hz).

RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d^6) δ 25,2 ; 46,5 ; 53,2 ; 65,6 ; 120,1 ; 123,9 ; 125,1 ; 127,0 ; 127,4 ; 127,5 ; 128,7 ; 131,9 ; 132,3 ; 136,9 ; 140,6 ; 143,9 ; 155,9 ; 172,7.

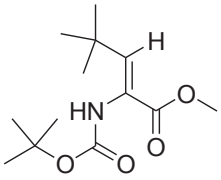
SM (ESI) : *m/z* 466,0 $[M+H]^+$

VII.C .2. Synthèse des intermédiaires et acides aminés protégés *via* la voie HWE

Procédure générale de la réaction de HWE en solution (25), (26)

A une solution de méthyle 2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-2-(diméthoxyphosphoryl)acétate (1,1 éq.) **22** dans du DCM (2 mL/mmol) est additionnée, sous argon, de la DBU (1,05 éq.). Après 10 min sous agitation à température ambiante, l'aldéhyde **23** ou **24** (1 éq.) est ajouté au milieu réactionnel à -20°C. Le mélange est laissé sous agitation à -20°C pendant 2 h puis 4 h à température ambiante. Le milieu réactionel est dilué avec de l'AcOEt et lavé avec une solution aqueuse de H_2SO_4 1M (2x). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée à sec. Le résidu est filtré par chromatographie sur gel de silice (éluant: cyclohexane/AcOEt: 1/1) pour donner l'aminoacide α,*β*-insaturé **25** ou **26**.

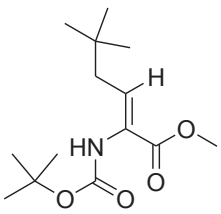
tert-Butyl *(Z)*-1-(méthoxycarbonyl)-3,3-diméthylbut-1-énylcarbamate (25)



Formule brute : $C_{13}H_{23}NO_4$
Masse molaire (g/mol) : 257,33
R_f (cyclohexane/EtOAc: 1/1) 0,80

Quantité : 397 mg, **Rendement :** 17%, **Aspect :** huile incolore
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) *δ* 1,11 (s, 9H) ; 1,39 (s, 9H) ; 3,79 (s, 3H) ; 5,48 (ls, 1H) ; 6,49 (ls, 1H).
RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) *δ* 28,1 ; 29,6 ; 31,8 ; 52,1 ; 80,3 ; 124,8 ; 128,2 ; 154,2 ; 166,3.
SM (ESI) : *m/z* 258,3 $[M+H]^+$; 202,1 $[M+H\text{-}tBu]^+$.

tert-Butyl *(Z,E)*-1-(méthoxycarbonyl)-3,3-diméthylbut-1-énylcarbamate (26)



Formule brute : $C_{14}H_{23}NO_4$
Masse molaire (g/mol) : 271,35
R_f (cyclohexane/AcOEt: 1/1) 0,81/0,85

Quantité : 522 mg, **Rendement :** 83%, **Aspect :** huile incolore, **Ratio Z/E :** 81/19
Isomère *(Z)* :
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) *δ* 0,89 (s, 9H) ; 1,39 (s, 9H) ; 2,05 (d, 2H, ^3J = 7,6 Hz) ; 3,71 (s, 3H) ; 5,83 (ls, 1H) ; 6,59 (t, 1H, ^3J = 7,2 Hz).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 28,1 ; 29,3 ; 41,9 ; 47,4 ; 52,2 ; 80,5 ; 100,5 ; 134,7 ; 165,4 ; 177,4.

Isomère *(E)* :

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,18 (s, 9H) ; 1,33 (s, 9H) ; 2,39 (d, 2H, ^{3}J = 7,6 Hz) ; 3,73 (s, 3H) ; 4,98 (t, 1H, ^{3}J = 7,2 Hz).

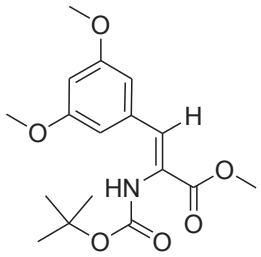
RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 28,1 ; 29,2 ; 43,9 ; 48,0 ; 52,5 ; 80,3 ; 100,6 ; 134,8 ; 165,3 ; 177,3.

SM (ESI) : *m/z* 272,3 $[M+H]^+$; 216,1 $[M+H\text{-}tBu]^+$

Procédure générale de la réaction de HWE au broyeur planétaire (32a-h)

Du méthyle 2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-2-(diméthoxyphosphoryl)acétate **22** (261 mg, 0,87 mmol, 1,1 éq.), de l'aldéhyde **31a-h** (0,79 mmol, 1 éq.) et du Cs_2CO_3 (514 mg, 1,58 mmol, 2 éq.) ou du K_2CO_3 (327 mg, 2,37 mmol, 3 éq.) sont introduits dans un bol de 12 mL avec 5 billes (7 mm de diamètre). Le milieu réactionnel est activé mécaniquement pendant 7h à 550 rpm. Après introduction d'AcOEt, la phase organique est lavée à l'eau (2x), séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée à sec. Le résidu est filtré par chromatographie sur gel de silice (éluant: cyclohexane/acétate d'éthyle: 1/1) pour donner l'aminoacide α,*β*-insaturé **32a-h**. (Les rapports frontaux (Rf) pour cette série de composés **32a-h** se situent entre 0,80 et 0,90).

***tert*-Butyl *(Z)*-1-(méthoxycarbonyl)-2-(3,5-diméthoxyphényl)vinylcarbamate (32a)**



Formule brute : $C_{17}H_{23}NO_6$

Masse molaire (g/mol) : 337,37

Quantité : 253 mg, **Rendement :** 95%, **Aspect :** solide blanc

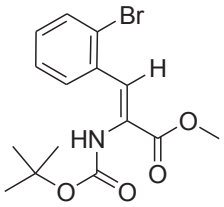
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,30 (s, 9H) ; 3,72 (s, 6H) ; 3,95 (s, 3H) ; 6,37 (t, 1H, ^{4}J = 2,2 Hz) ; 6,63 (d, 2H, ^{4}J = 2,0 Hz) ; 7,09 (s, 1H).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 28,1 ; 52,6 ; 55,3 ; 81,0 ; 101,6 ; 107,4 ; 125,1 ; 129,7 ; 135,7 ; 152,7 ; 160,6 ; 165,9.

SM (ESI) : *m/z* 338,1 $[M+H]^+$.

HRMS (ESI): calculée pour $C_{17}H_{24}NO_6$: 338,1604, observée : 338,1599 $[M+H]^+$.

***tert*-Butyl *(Z)*-1-(méthoxycarbonyl)-2-(2-bromophényl)vinylcarbamate (32b)**



Formule brute : $C_{15}H_{18}BrNO_4$

Masse molaire (g/mol) : 356,21

Quantité : 241 mg, **Rendement :** 85%, **Aspect :** huile incolore

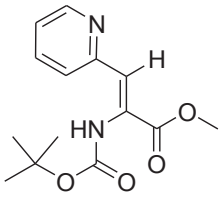
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,35 (s, 9H) ; 3,91 (s, 3H) ; 6,22 (ls, 1H) ; 7,18 (dd, 1H, ^{3}J =5,9 Hz, ^{4}J = 1,6 Hz) ; 7,30-7,34 (m, 3H), 7,62-7,65 (dd, 1H, ^{3}J = 6,9 Hz, ^{4}J = 1,1 Hz).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 28,1 ; 52,3 ; 81,0 ; 124,6 ; 126,3 ; 126,9 ; 129,5 ; 129,6 ; 132,8 ; 134,8 ; 152,3 ; 164,6.

SM (ESI) : *m/z* 356,1 $[M+H]^+$; 300,0 $[M+H\text{-}tBu]^+$.

HRMS (ESI): calculée pour $C_{15}H_{19}BrNO_4$: 356,0497, observée : 356,0485 $[M+H]^+$

***tert*-Butyl *(Z)*-1-(méthoxycarbonyl)-2-(pyridine-2-yl)vinylcarbamate (32c)**



Formule brute : $C_{14}H_{18}N_2O_4$

Masse molaire (g/mol) : 278,30

Quantité : 193 mg, **Rendement :** 88%, **Aspect :** huile orange

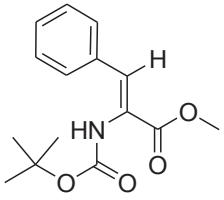
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,42 (s, 9H) ; 3,81 (s, 3H) ; 6,13 (s, 1H) ; 7,06-7,12 (m, 2H) ; 7,58 (m, 1H) ; 8,52 (d, 1H, ^{3}J = 4,9 Hz, CH-6) ; 10,82 (ls, 1H).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 28,1 ; 52,5 ; 81,1 ; 111,8 ; 121,7 ; 125,0 ; 134,3 ; 136,9 ; 148,1 ; 152,6 ; 154,9 ; 165,9.

SM (ESI) : *m/z* 279,2 $[M+H]^+$; 223,1 $[M+H\text{-}tBu]^+$.

HRMS: calculée pour $C_{14}H_{18}N_2O_4$: 279,1345, observée : 279,1355 $[M+H]^+$.

***tert*-Butyl *(Z)*-1-(méthoxycarbonyl)-2-phénylvinylcarbamate (32d)**



Formule brute : $C_{15}H_{19}NO_4$

Masse molaire (g/mol) : 277,1

Quantité : 180 mg, **Rendement :** 82%, **Aspect :** solide blanc

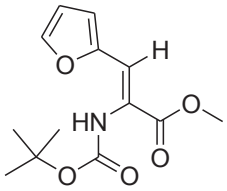
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,32 (ls, 9H) ; 3,78 (s, 3H) ; 6,12 (ls, 1H) ; 7,18 (s, 1H) ; 7,24-7,31 (m, 3H) ; 7,47 (ld, 2H, ^{4}J = 1,37 Hz).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 28,0 ; 52,6 ; 81,0 ; 124,6 ; 128,5 ; 129,2 ; 129,6 ; 130,0 ; 134,14 ; 152,7 ; 166,0.

SM (ESI) : *m/z* 278,2 $[M+H]^+$; 222,1 $[M+H\text{-}tBu]^+$

HRMS: calculée pour $C_{15}H_{20}NO_4$: 278,1392, observée : 278,1398 $[M+H]^+$

***tert*-Butyl *(Z)*-1-(méthoxycarbonyl)-2-(furan-2-yl)vinylcarbamate (32e)**



Formule brute : $C_{13}H_{17}NO_5$

Masse molaire (g/mol) : 267,1

Quantité : 188 mg, **Rendement :** 89%, **Aspect :** huile marron

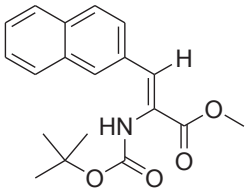
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,48 (ls, 9H) ; 3,76 (s, 3H) ; 6,32 (d, 1H, ^3J = 1,8 Hz) ; 6,48 (d, 1H, ^3J = 3,4 Hz) ; 6,57 (ls, 1H) ; 6,82 (s, 1H) ; 7,48 (ls, 1H).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 28,1 ; 52,5 ; 81,0 ; 112,1 ; 114,6 ; 115,2 ; 123,1 ; 144,1 ; 149,9 ; 152,9 ; 165,7.

SM (ESI) : *m/z* 290,3 $[M+H+Na]^+$; 268,3 $[M+H]^+$; 212,3 $[M+H\text{-}tBu]^+$

HRMS: calculée pour $C_{13}H_{18}NO_5$: 268,1185. Trouvé : 268,1182 $[M+H]^+$

***tert*-Butyl (*Z,E*)-1-(méthoxycarbonyl)-2-(naphtalen-3-yl)vinylcarbamate (32f)**



Formule brute : $C_{19}H_{21}NO_4$

Masse molaire (g/mol) : 327,2

Quantité : 196 mg, **Rendement :** 76%, **Aspect :** solide jaune, **Ratio Z/E :** 82/18

Isomère *(Z)*

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,31 (ls, 9H) ; 3,79 (s, 3H) ; 6,27 (ls, 1H) ; 7,35-7,42 (m, 3H) ; 7,62 (ls, 1H) ; 7,64-7,68 (m, 3H) ; 7,85 (s, 1H).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 28,2 ; 52,3 ; 81,0 ; 122,2 ; 122,4 ; 126,2 ; 126,4 ; 127,0 ; 127,5 ; 127,6 ; 127,9 ; 128,5 ; 130,3 ; 130,3 ; 131,7 ; 152,9 ; 166,1.

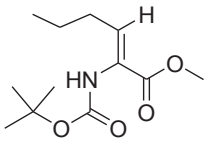
Isomère *(E)*

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,41 (ls, 9H) ; 3,35 (s, 3H) ; 6,75 (ls, 1H) ; 7,15 (s, 1H) ; 7,31-7,42 (m, 3H) ; 7,60 (ls, 1H) ; 7,64-7,68 (m, 3H).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 29,8 ; 51,9 ; 79,9 ; 122,0 ; 122,6 ; 124,7 ; 125,0 ; 127,0 ; 127,5 ; 127,6 ; 127,9 ; 128,5 ; 130,3 ; 130,3 ; 131,7 ; 155,0 ; 165,2.

SM (ESI) : *m/z* 350,1 $[M+H+Na]^+$; 328,2 $[M+H]^+$; 272,2 $[M+H\text{-}tBu]^+$

***tert*-Butyl *(Z)*-1-(méthoxycarbonyl)pent-1-énylcarbamate (32g)**



Formule brute : $C_{12}H_{21}NO_4$

Masse molaire (g/mol) : 243,30

Quantité : 154 mg, **Rendement :** 80%, **Aspect :** huile incolore

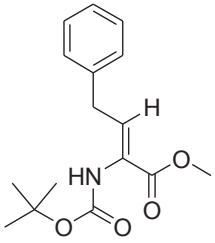
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0,95 (t, 3H, ^3J=7,4 Hz) ; 1,54-1,45 (ls, 11H); 2,19 (td, 2H, ^3J= 7,4 Hz, ^3J= 7,4 Hz) ; 3.782 (s, 3H) ; 5,980 (ls, 1H) ; 6,57 (t, 1H, ^3J = 7,3 Hz).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 13,3 ; 21,5 ; 28,1 ; 30,3 ; 52,2 ; 80,4 ; 120,5 ; 137,0 ; 153,3 ; 165,45.

SM (ESI) : *m/z* 244,3 $[M + H]^+$, 188,2 $[M+H\text{-}tBu]^+$

HRMS (ESI): calculée pour $C_{12}H_{22}NO_4$ $[M + H]^+$ 244,1549, observée 244,1568

***tert*-Butyl *(Z)*-1-(méthoxycarbonyl)-3-phénylprop-1-énylcarbamate (32h)**



Formule brute : $C_{16}H_{21}NO_4$

Masse molaire (g/mol) : 291,34

Quantité : 140 mg, **Rendement :** 61%, **Aspect :** huile incolore, **Ratio Z/E :** 66/44

Isomère *(Z)*

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,52 (s, 9H); 3,52 (d, 2H, ^3J = 7,3 Hz) ; 3,75 (s, 3H) ; 6,65 (t, 1H, ^3J = 7,2 Hz) ; 7,12-7,30 (m, 5H).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 28,0 ; 34,8 ; 52,3 ; 80,8 ; 101,2 ; 125,9 ; 126,7 ; 128,5 ; 134,8 ; 137,9 ; 151,4 ; 156,3.

Isomère *(E)*

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,49 (s, 9H); 3,72 (d, 2H, ^3J = 7,3 Hz) ; 3,76 (s, 3H) ; 6,12 (t, 1H, ^3J = 7,2 Hz) ; 7,12-7,30 (m, 5H).

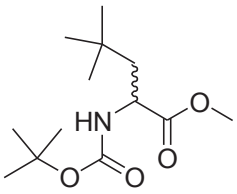
RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 27,9 ; 34,9 ; 52,9 ; 82,8 ; 101,4 ; 126,0 ; 126,6 ; 128,4 ; 134,6 ; 137,9 ; 151,4 ; 156,3.

SM (ESI) : *m/z* 292,2 $[M + H]^+$, 236,1 $[M+H\text{-}tBu]^+$.

Procédure générale de la réaction d'hydrogénation (27), (28)

A une solution d'aminoacide α,*β*-insaturé **25** ou **26** (1éq.) dans du THF (5 mL/mmol) est ajouté, sous argon, du Pd/C (0,15 éq.). Le milieu réactionnel est ensuite placé sous hydrogène et est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit, puis le palladium est filtré sur célite et rincé avec du THF. Le filtrat est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : cyclohexane/AcOEt: gradient 10/0 à 6/4) pour donner le composé **27** ou **28**.

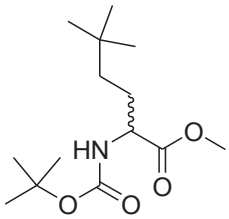
***(R,S)-tert*-Butyl 1-(méthoxycarbonyl)-3,3-diméthylbutylcarbamate (27)**



Formule brute : $C_{13}H_{25}NO_4$
Masse molaire (g/mol) : 259,34
R_f (Cyclohexane/EtOAc: 9/1) 0,31

Quantité : 340 mg, **Rendement :** 85%, **Aspect :** solide blanc
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) *δ* 0,91 (s, 9H) ; 1,32 (s, 9H) ; 1,39-1,42 (m, 1H) ; 1,55-1,62 (m, 1H) ; 3,79 (s, 3H) ; 4,27 (m, 1H) ; 4,77 (ls, 1H).
SM (ESI) : *m/z* 260,2 $[M+H]^+$; 204,1 $[M+H\text{-}tBu]^+$

***(R,S)-tert*-Butyl 1-(méthoxycarbonyl)-4,4-diméthylpentylcarbamate (28)**



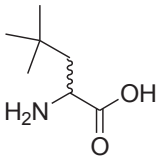
Formule brute : $C_{14}H_{27}NO_4$
Masse molaire (g/mol) : 273,37
R_f (Cyclohexane/AcOEt: 9/1) 0,37

Quantité : 415 mg, **Rendement :** 79%, **Aspect :** solide blanc
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) *δ* 0,80 (s, 9H) ; 1,13 (m, 2H) ; 1,38 (s, 9H) ; 1,68 (m, 1H) ; 1,72 (m, 1H) ; 3,67 (s, 3H) ; 4,20 (m, 1H) ; 4,90 (ls, 1H).
RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) *δ* 27,9 ; 28,3 ; 29,1 ; 30,0 ; 38,9 ; 52,1 ; 53,8 ; 79,8 ; 156,3 ; 171,8.
SM (ESI) : *m/z* 274,4 $[M+H]^+$.

Procédure générale de la réaction d'hydrolyse acide (7), (8)

L'aminoacide protégé **27** ou **28** est mis en suspension dans une solution aqueuse d'HCl (6N) (5 mL/mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 2 h puis évaporé sous pression réduite pour donner le composé **7** ou **8** sous forme de sel chlorhydrate.

***(R,S)*-Acide 2-amino-4,4-diméthylpentanoique (7)[59]**



Formule brute : $C_7H_{15}NO_2$

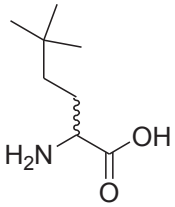
Masse molaire (g/mol) : 145,11

Masse molaire du sel de chlorhydrate : 181,66

Quantité : 201 mg, **Rendement :** 83%, **Aspect :** solide blanc

RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ 0,76 (s, 9H) ; 1,41-1,47 (dd, 1H, ^2J = 14,9 Hz, ^3J = 6,6 Hz) ; 1,74-1,85 (dd, 1H, ^2J = 14,9 Hz, ^3J = 5,2 Hz) ; 3,71 (t, 1H, ^3J = 6,4 Hz).

***(R,S)*-Acide 2-amino-5,5-diméthylhexanoique (8)**



Formule brute : $C_8H_{17}NO_2$

Masse molaire (g/mol) : 159,23

Masse molaire du sel de chlorhydrate : 195,69

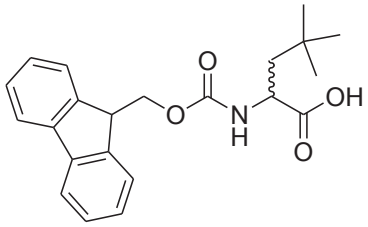
Quantité : 302 mg, **Rendement :** quantitatif, **Aspect :** solide blanc

RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ 0,68 (s, 9H) ; 1,12-1,28 (m, 2H) ; 1,70-1,83 (m, 2H) ; 3,71 (t, 1H, ^3J = 6,0 Hz).

Procédure générale de la réaction de protection Fmoc (29) et (30)

La procédure générale est identique à celle décrite pour la synthèse des composés **11, 14, 17** et **60**, méthode C. Le résidu est purifié par recristallisation dans un mélange cyclohexane/DCM pour donner l'acide aminé protégé **29** ou **30**.

(*R*,*S*)-Acide 2-[[(9H-fluorén9-ylméthoxy)carbonyl]amino]-4,4-diméthylpentanoique (29)



Formule brute : $C_{22}H_{25}NO_4$

Masse molaire (g/mol) : 367,44

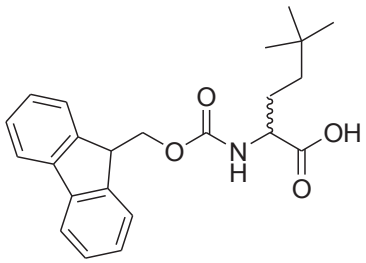
Quantité : 362 mg, **Rendement :** 89%, **Aspect :** solide blanc

RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d^{6}) δ 0,74 (s, 9H) ; 1,48 (m, 2H) ; 3,82 (m, 1H) ; 4,13-4,20 (m, 3H) ; 7,12-7,24 (m, 2H) ; 7,25-7,28 (t, 2H, ^{3}J = 7,4 Hz) ; 7,48 (d, 1H, ^{3}J = 8,4 Hz) ; 7,62 (d, 2H, ^{3}J = 7,4 Hz) ; 7,74 (d, 2H, ^{3}J = 7,4 Hz).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 25,3 ; 26,1 ; 29,4 ; 46,4 ; 54,4 ; 67,2 ; 120,3 ; 125,7 ; 127,0 ; 128,3 ; 141,4 ; 145,1 ; 154,5 ; 172,4.

SM (ESI) : *m/z* 368,3 $[M+H]^+$

(*R*,*S*)-Acide 2-[[(9H-fluorénylméthoxy)carbonyl]amino]-5,5-diméthylhexanoique (30)



Formule brute : $C_{23}H_{27}NO_4$

Masse molaire (g/mol) : 381,46

Quantité : 430 mg, **Rendement :** 77%, **Aspect :** solide blanc

RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d^{6}) δ 0,72 (s, 9H) ; 1,24-1,27 (m, 2H) ; 1,52-1,68 (m, 2H) ; 3,82 (m, 1H) ; 4,22-4,29 (m, 3H) ; 7,26-7,29 (t, 2H, ^{3}J = 7,4 Hz) ; 7,42-7,45 (t, 2H, ^{3}J = 7,4 Hz) ; 7,68 (d, 1H, ^{3}J = 8,2 Hz) ; 7,75 (d, 2H, ^{3}J = 7,4 Hz) ; 7,98 (d, 2H, ^{3}J = 7,4 Hz).

RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d^{6}) δ 25,1 ; 26,1 ; 29,1 ; 30,2 ; 46,4 ; 54,6 ; 65,5 ; 120,0 ; 125,4 ; 127,0 ; 127,9 ; 140,6 ; 144,1 ; 156,2 ; 174,2.

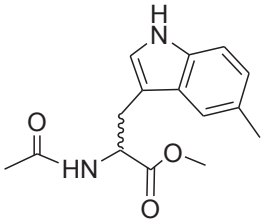
SM (ESI) : *m/z* 382,3 $[M+H]^+$

VII.C .3. Synthèse des intermédiaires et acides aminés protégés *via* la voie d'alkylation de Friedel-Crafts

Procédure générale de la réaction d'alkylation de Friedel-Crafts (53) et (54)

A un mélange de méthyl 2-acétamidoacrylate **50** (1 éq.) et d'indole substitué **51** ou **52** (1,5 éq.) dans du DCM anhydre (2 mL/mmol) est additionné, goutte à goutte, sous argon, à 0°C, une solution d'$EtAlCl_2$ 1M dans de l'hexane (2 éq.). Le milieu réactionné est agité à 0°C pendant 2 h, puis à température ambiante pendant une nuit. Le milieu réactionnel est ensuite versé lentement dans une solution aqueuse saturée de $NaHCO_3$ (5 mL/mmol) à 0°C. La suspension de d'$Al(OH)_3$ est filtrée sur célite et la phase aqueuse est extraite avec du DCM (3x). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et évaporées à sec. le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : cyclohexane/AcOEt: gradient 4/6 à 0/10) pour donner le composé **53** ou **54**.

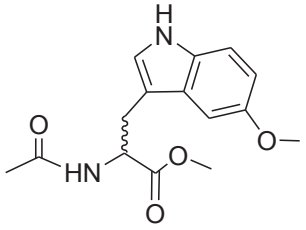
(*R*,*S*)-Méthyl 2-acétamido-3-(5-méthyl-1H-indol-3-yl)propanoate (53)



Formule brute : $C_{15}H_{18}N_2O_3$
Masse molaire (g/mol) : 274,32
R_f (cyclohexane/AcOEt: 3/7) 0,15

Quantité : 430 mg, **Rendement :** 66%, **Aspect :** solide jaune
RMN ^{1}H (300 MHz,$CDCl_3$) δ 1,90 (s, 3H) ; 2,38 (s, 3H) ; 3,21-3,25 (m, 2H, ^3J = 5,3 Hz) ; 3,64 (s, 3H) ; 4,89 (m, 1H) ; 5,93 (ld, 1H, ^3J =7,3 Hz) ; 6,87 (s, 1H) ; 6,94 (d, 1H, ^3J = 8,3 Hz) ; 7,17-7,23 (m, 2H) ; 7,97 (ls, 1H).
SM (ESI) : *m/z* 275,3 $[M+H]^+$

(*R*,*S*)-Méthyl 2-acétamido-3-(5-méthoxy-1H-indol-3-yl)propanoate (53)[60]



Formule brute : $C_{15}H_{18}N_2O_4$
Masse molaire (g/mol) : 290,31
R_f (cyclohexane/AcOEt: 3/7) 0,13

Quantité : 1,7 g, **Rendement :** 44%, **Aspect :** solide marron
RMN ^{1}H (300 MHz,$CDCl_3$) δ 1,85 (s, 3H) ; 3,28 (d, 2H, ^3J = 5,3 Hz) ; 3,63 (s, 3H) ; 3,75 (s,

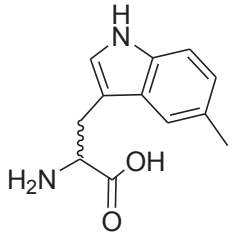
3H) ; 4,83 (m, 1H) ; 5,92 (ld, 1H, ^{3}J =7,9 Hz) ; 6,75-6,92 (m, 3H) ; 7,22 (s, 1H) ; 7,83 (ls, 1H).

SM (ESI) : *m/z* 292,2 $[M+H]^+$

Procédure générale de la réaction d'hydrolyse acide (48) et (49)

L'aminoacide protégé **53** ou **54** est mis en suspension dans une solution aqueuse d'HCl (6N) (5 mL/mmol). Après agitation pendant 5 heures à reflux, le milieu réactionnel est évaporé à sec pour donner l'aminoacide **48** ou **49** sous forme de sel de chlorhydrate.

(*R*,*S*)-Acide 2-amino-3-(5-méthyl-1H-indol-3-yl)propanoique (48)[60]



Formule brute : $C_{12}H_{14}N_2O_2$

Masse molaire (g/mol) : 218,25

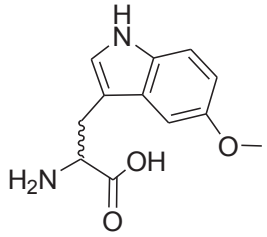
Masse molaire du sel de chlorhydrate : 254,71

Quantité : 231 mg, **Rendement :** 58%, **Aspect :** solide jaune

RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ 2,33 (s, 3H) ; 3,23-3,27 (dd, 1H, ^{2}J = 15,4 Hz, ^{3}J = 7,3 Hz) ; 3,32-3,36 (dd, 1H, ^{2}J = 15,2 Hz, ^{3}J = 5,2 Hz) ; 4,13 (m, 1H) ; 7,01 (d, 1H, ^{4}J = 1,6 Hz) ; 7,18 (s, 1H) ; 7,28 (d, ^{3}J = 8,5 Hz) ; 7,33 (s, 1H).

SM (ESI) : *m/z* 219,2 $[M+H]^+$

(*R*,*S*)-Acide 2-amino-3-(5-méthoxy-1H-indol-3-yl)propanoique (48)[60]



Formule brute : $C_{12}H_{14}N_2O_3$

Masse molaire (g/mol) : 234,25

Masse molaire du sel de chlorhydrate : 270,71

Quantité : 1,67 g, **Rendement :** Quantitatif, **Aspect :** solide marron

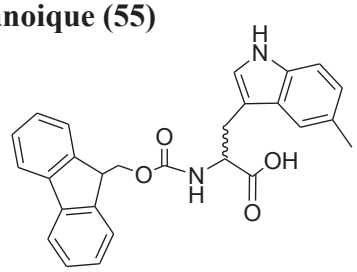
RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ 3,15-3,21 (m, 2H) ; 3,75 (s, 3H) ; 4,02 (m, 1H) ; 6,80 (dd, 1H, ^{3}J = 8,9 Hz, ^{4}J = 2,5 Hz) ; 7,25 (d, 1H, , ^{4}J = 2,3 Hz) ; 7,27 (s, 1H) ; 7,30 (d, 1H, ^{3}J = 8,9 Hz).

SM (ESI) : *m/z* 235,2 $[M+H]^+$

Procédure générale de la réaction de la réaction de protection Fmoc

La procédure générale est identique à celle décrite pour la synthèse des composés **11, 14, 17** et **60**, méthode C. Le résidu est purifié par recristallisation dans un mélange cyclohexane/DCM pour donner l'acide aminé protégé **55** ou **56**.

(*R*,*S*)-Acide2-[[(9-fluorénylméthoxy)carbonyl]amino]-3-(5-méthyl-1H-indol-3-yl) propanoique (55)



Formule brute : $C_{27}H_{24}N_2O_4$

Masse molaire (g/mol) : 440,49

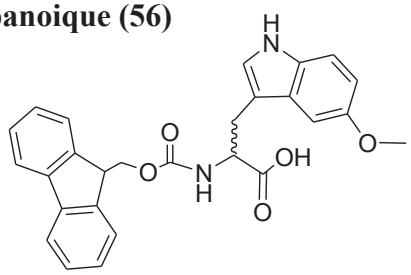
Quantité : 397 mg, **Rendement :** Quantitatif, **Aspect :** solide jaune

RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d^6) δ 2,39 (s, 3H) ; 3,02-3,09 (m, 1H) ; 3,19-3,22 (m, 1H) ; 4,12-25 (m, 4H) ; 6,91 (d, 1H, ^3J = 8,2 Hz) ; 7,12-7,41 (m, 8H) ; 7,61-69 (m, 3H) ; 7,85 (m, 2H), 10,19 (s, 1H).

RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d^6) δ 21,5 ; 26,8 ; 47,1 ; 55,4 ; 66,1 ; 110,1 ; 111,6 ; 118,2 ; 120,6 ; 123,0 ; 124,3 ; 125,8 ; 127,3 ; 127,6 ; 127,8 ; 128,1 ; 135,0 ; 141,2 ; 144,3 ; 156,5 ; 174,3.

SM (ESI) : *m/z* 441,2 $[M+H]^+$

(*R*,*S*)-Acide2-[[(9-fluorénylméthoxy)carbonyl]amino]-3-(5-méthoxy-1H-indol-3-yl) propanoique (56)



Formule brute : $C_{27}H_{24}N_2O_5$

Masse molaire (g/mol) : 456,49

Quantité : 2,7 g, **Rendement :** Quantitatif, **Aspect :** solide jaune

RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d^6) δ 2,99-3,10 (m, 1H) ; 3,12-3,19 (m, 1H) ; 4,12-40 (m, 4H) ; 6,71 (d, 1H, ^3J = 8,7 Hz) ; 7,05-7,49 (m, 8H) ; 7,61-72 (m, 3H) ; 7,89 (m, 2H), 10,56 (s, 1H).

RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d^6) δ 27,4 ; 47,1 ; 55,8 ; 60,2 ; 66,1 ; 100,6 ; 110,5 ; 111,5 ; 112,5 ; 120,6 ; 124,8 ; 125,8 ; 127,5 ; 128,1 ; 131,7 ; 141,1 ; 144,2 ; 153,6 ; 156,5 ; 174,2.

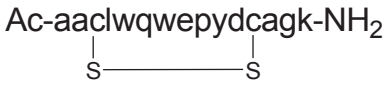
SM (ESI) : *m/z* 457,5 $[M+H]^+$

VII.D. Synthèse d'analogues peptidiques

La procédure générale de synthèse des peptides cycliques ainsi que les techniques mises en oeuvre, la purification et la caractérisation des composés décrits dans ce chapitre sont identiques à celles développées dans le chapitre 2, paragraphe VII.C.méthodes A et B.

IDX18169

Ac-D-Ala-D-Ala-c[D-Cys-D-Leu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Glu-D-Pro-D-Tyr-D-Asp-D-Cys]-D-Ala-D-Gly-D-Lys-NH_2



Formule brute : $C_{81}H_{110}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1780,03
Masse monoisotopique (Da) : 1778,77
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1894,05

Quantité : 18 mg, **Rendement :** 10%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,29 min
SM (ESI) : *m/z* 890,9 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1779,8 $[M+H]^+$

IDX18174

Ac-Lys-Gly-Ala-c[Cys-Asp-Tyr-Pro-Glu-Trp-Gln-Trp-Leu-Cys]-Ala-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{81}H_{110}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1780,03
Masse monoisotopique (Da) : 1778,77
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1894,05

Quantité : 15 mg, **Rendement :** 8%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,30 min
SM (ESI) : *m/z* 890,4 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1779,9 $[M+H]^+$

IDX17849

Ac-Ala-Ala-c[Cys-Leu-Trp-Gln-Trp-Glu-Pro-Tyr-Asp-Cys]-Ala-Gly-Lys-NH_2



Formule brute : $C_{81}H_{110}N_{20}O_{22}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1780,03

Masse monoisotopique (Da) : 1778,77

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1894,05

Quantité : 13 mg, **Rendement :** 7%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

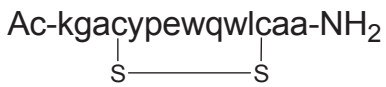
HPLC analytique t_R : 1,21 min

SM (ESI) : *m/z* 891,0 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1779,8 $[M+H]^+$

IDX16760

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{77}H_{105}N_{19}O_{19}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1664,94

Masse monoisotopique (Da) : 1663,74

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1778,96

Quantité : 8 mg, **Rendement :** 5%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

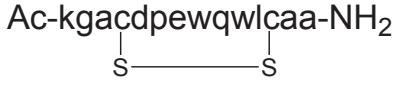
HPLC analytique t_R : 1,29 min

SM (ESI) : *m/z* 833,6 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1664,9 $[M+H]^+$

IDX16488

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{72}H_{120}N_{19}O_{20}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1616,86

Masse monoisotopique (Da) : 1615,71

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1730,88

Quantité : 28 mg, **Rendement :** 16%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

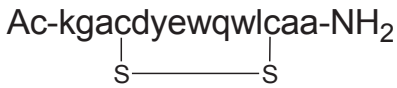
HPLC analytique t_R : 1,32 min

SM (ESI) : *m/z* 808,8 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1616,8 $[M+H]^+$

IDX16486

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{76}H_{103}N_{19}O_{21}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1682,92

Masse monoisotopique (Da) : 1681,72

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1796,94

Quantité : 6 mg, **Rendement :** 4%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

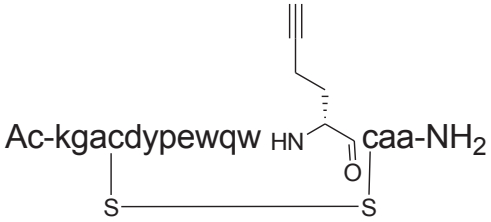
HPLC analytique t_R : 1,36 min

SM (ESI) : *m/z* 842,0 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1682,7 $[M+H]^+$

IDX17524

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-homopropargylglycine-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{81}H_{106}N_{20}O_{22}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1775,94

Masse monoisotopique (Da) : 1774,74

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1889,96

Quantité : 11 mg, **Rendement :** 6%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

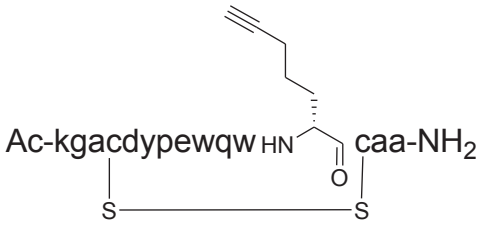
HPLC analytique t_R : 1,23 min

SM (ESI) : *m/z* 888,5 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1797,7 $[M+H+Na]^+$; 1775,7 $[M+H]^+$

IDX17523

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-bishomopropargylglycine-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2

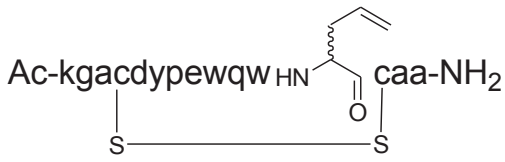


Formule brute : $C_{84}H_{109}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1789,90
Masse monoisotopique (Da) : 1788,75
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1903,92

Quantité : 12 mg, **Rendement :** 6%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,21 min
SM (ESI) : *m/z* 895,5 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1811,7 $[M+H+Na]^+$; 1789,7 $[M+H]^+$

IDX17519-IDX17520

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-(R,S)-allylglycine-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



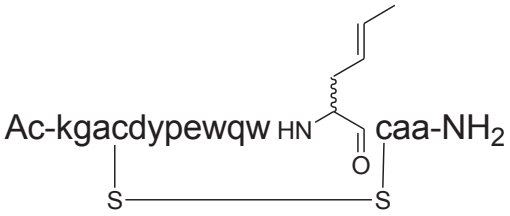
Formule brute : $C_{80}H_{106}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1763,89
Masse monoisotopique (Da) : 1762,74
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1877,91

IDX17519 : Quantité : 9 mg, **Rendement :** 5%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,18 min
SM (ESI) : *m/z* 882,5 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1785,7 $[M+H+Na]^+$; 1763,7 $[M+H]^+$

IDX17520 : Quantité : 12 mg, **Rendement :** 6%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,23 min
SM (ESI) : *m/z* 882,6 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1785,7 $[M+H+Na]^+$; 1763,7 $[M+H]^+$

IDX17521-IDX17522

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-(R,S)-acide 2-aminohex-4-énoique-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



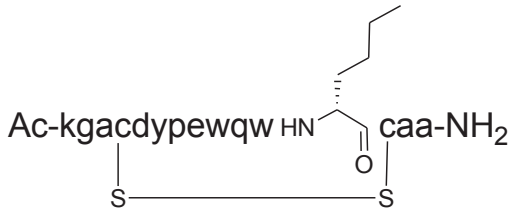
Formule brute : $C_{81}H_{108}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1778,02
Masse monoisotopique (Da) : 1776,75
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1892,04

IDX17521 : Quantité : 6 mg, **Rendement :** 3%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,21 min
SM (ESI) : *m/z* 889,5 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1799,8 $[M+H+Na]^+$; 1777,8 $[M+H]^+$

IDX17522 : Quantité : 9 mg, **Rendement :** 5%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,26 min
SM (ESI) : *m/z* 889,5 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1799,8 $[M+H+Na]^+$; 1777,8 $[M+H]^+$

IDX17717

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-norleucine-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2

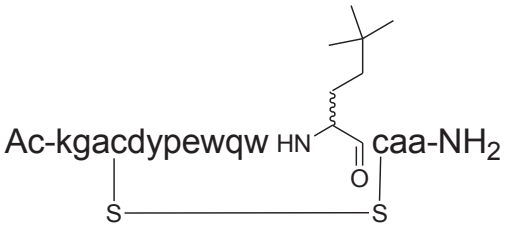


Formule brute : $C_{81}H_{110}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1780,03
Masse monoisotopique (Da) : 1778,77
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1894,05

Quantité : 9 mg, **Rendement :** 5%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,29 min
SM (ESI) : *m/z* 891,0 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1779,9 $[M+H]^+$

IDX17868

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-(R,S)-acide 2-amino-5,5-diméthylhexanoique-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2

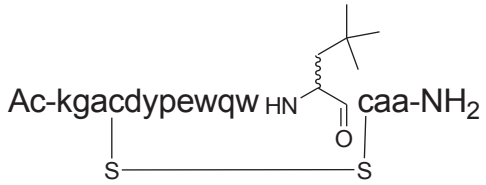


Formule brute : $C_{83}H_{114}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1808,00
Masse monoisotopique (Da) : 1806,80
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1922,02

Quantité : 13 mg, **Rendement :** 7%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,29 et 1,34 min
SM (ESI) : *m/z* 905,3 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1829,8 $[M+H+Na]^+$; 1807,8 $[M+H]^+$

IDX17847-IDX17848

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-(R,S)-néopentylglycine-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



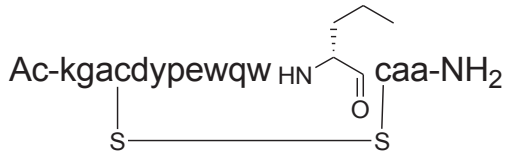
Formule brute : $C_{82}H_{112}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1794,06
Masse monoisotopique (Da) : 1792,78
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1908,08

IDX17847 : Quantité : 3 mg, **Rendement :** 2%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,26 min
SM (ESI) : *m/z* 898,0 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1815,8 $[M+H+Na]^+$; 1793,8 $[M+H]^+$

IDX17848 : Quantité : 5 mg, **Rendement :** 3%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,33 min
SM (ESI) : *m/z* 897,5 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1815,8 $[M+H+Na]^+$; 1793,8 $[M+H]^+$

IDX17722

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-norvaline-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2

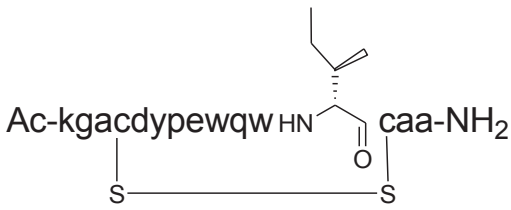


Formule brute : $C_{80}H_{118}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1765,97
Masse monoisotopique (Da) : 1764,77
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1879,99

Quantité : 18 mg, **Rendement :** 10%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,27 min
SM (ESI) : *m/z* 883,5 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1787,8 $[M+H+Na]^+$; 1765,8 $[M+H]^+$

IDX17476

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Ile-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2

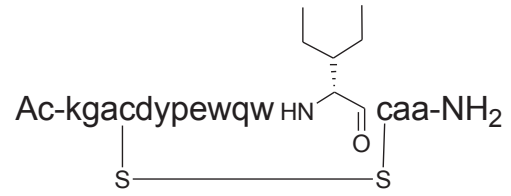


Formule brute : $C_{81}H_{110}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1782,03
Masse monoisotopique (Da) : 1778,77
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1896,05

Quantité : 14 mg, **Rendement :** 7%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,28 min
SM (ESI) : *m/z* 890,9 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1801,8 $[M+H+Na]^+$; 1779,8 $[M+H]^+$

IDX17477

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-acide 2-amino-3-éthyl-pentanoique-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{82}H_{112}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1794,06
Masse monoisotopique (Da) : 1792,79

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1908,08

Quantité : 21 mg, **Rendement :** 11%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

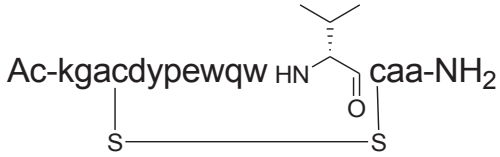
HPLC analytique t_R : 1,31 min

SM (ESI) : *m/z* 897,9 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1815,8 $[M+H+Na]^+$; 1793,8 $[M+H]^+$

IDX18629

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Val-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{80}H_{108}N_{20}O_{22}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1766,01

Masse monoisotopique (Da) : 1764,75

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1880,03

Quantité : 27 mg, **Rendement :** 15%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

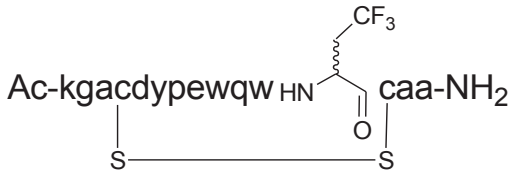
HPLC analytique t_R : 1,28 min

SM (ESI) : *m/z* 883,7 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1765,8 $[M+H]^+$

IDX17715-IDX17716

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-(R,S)-acide 2-amino-4,4,4-trifluorobutanoique-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{79}H_{103}N_{20}O_{22}F_3S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1805,96

Masse monoisotopique (Da) : 1804,72

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1919,94

IDX17715 : Quantité : 8 mg, **Rendement :** 4%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

HPLC analytique t_R : 1,22 min

SM (ESI) : *m/z* 903,9 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1827,7 $[M+H+Na]^+$; 1805,7 $[M+H]^+$

IDX17716 : Quantité : 14 mg, **Rendement :** 7%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

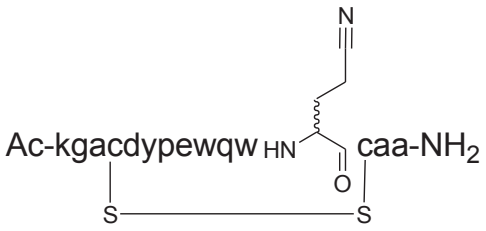
HPLC analytique t_R : 1,26 min

SM (ESI) : *m/z* 903,5 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1827,7 $[M+H+Na]^+$; 1805,7 $[M+H]^+$

IDX17718-IDX17719

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-(R,S)-acide 2-amino-4-cyanobutanoique-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{80}H_{105}N_{21}O_{22}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1776,99

Masse monoisotopique (Da) : 1775,73

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1891,01

IDX17718 : Quantité : 8 mg, **Rendement :** 4%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

HPLC analytique t_R : 1,13 min

SM (ESI) : *m/z* 889,0 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1776,8 $[M+H]^+$

IDX17719 : Quantité : 7 mg, **Rendement :** 4%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

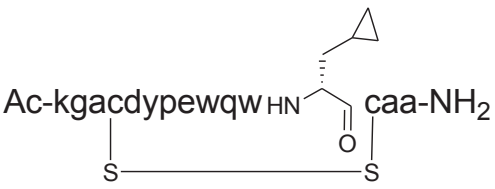
HPLC analytique t_R : 1,19 min

SM (ESI) : *m/z* 889,5 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1776,8 $[M+H]^+$

IDX17475

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-β-cyclopropyl-D-alanine-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{81}H_{108}N_{20}O_{22}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1778,02

Masse monoisotopique (Da) : 1776,75

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1892,04

Quantité : 21 mg, **Rendement :** 11%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

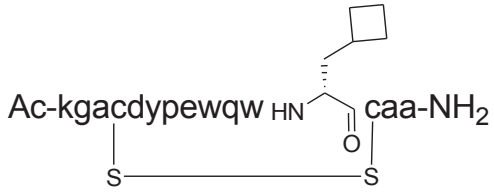
HPLC analytique t_R : 1,26 min

SM (ESI) : *m/z* 890,0 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1799,8 $[M+H+Na]^{+}$; 1777,7 $[M+H]^{+}$

IDX17525

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-β-cyclobutyl-D-alanine-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{82}H_{110}N_{20}O_{22}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1792,04

Masse monoisotopique (Da) : 1790,77

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1906,06

Quantité : 10 mg, **Rendement :** 5%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

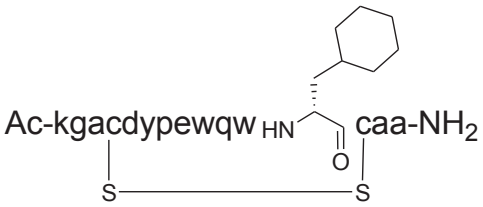
HPLC analytique t_R : 1,31 min

SM (ESI) : *m/z* 897,0 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1813,7 $[M+H+Na]^{+}$; 1791,7 $[M+H]^{+}$

IDX17474

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-β-cyclohexyl-D-alanine-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{84}H_{114}N_{20}O_{22}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1820,10

Masse monoisotopique (Da) : 1818,80

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1934,12

Quantité : 15 mg, **Rendement :** 8%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

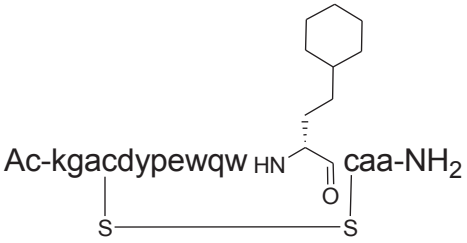
HPLC analytique t_R : 1,36 min

SM (ESI) : *m/z* 910,8 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1841,9 $[M+H+Na]^{+}$; 1819,9 $[M+H]^{+}$

IDX18168

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-β-homocyclohexyl-D-alanine-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2

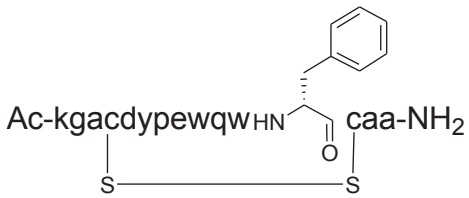


Formule brute : $C_{85}H_{116}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1833,86
Masse monoisotopique (Da) : 1832,84
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1947,88

Quantité : 8 mg, **Rendement :** 4%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,36 min
SM (ESI) : *m/z* 917,5 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1855,7 $[M+H+Na]^+$; 1833,7 $[M+H]^+$

IDX18311

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-Phe-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2

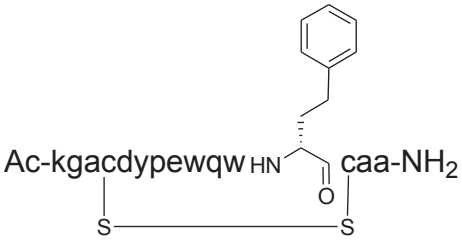


Formule brute : $C_{84}H_{108}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1814,05
Masse monoisotopique (Da) : 1812,75
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1928,07

Quantité : 12 mg, **Rendement :** 6%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,27 min
SM (ESI) : *m/z* 907,6 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1835,7 $[M+H+Na]^+$; 1813,8 $[M+H]^+$

IDX18312

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-D-homophénylalanine-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{85}H_{110}N_{20}O_{22}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1828,08
Masse monoisotopique (Da) : 1826,77

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1942,10

Quantité : 17 mg, **Rendement :** 9%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

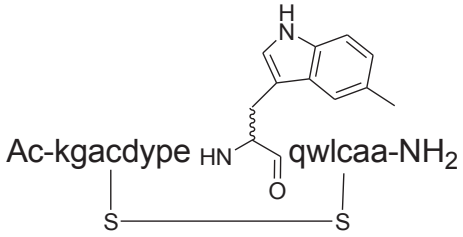
HPLC analytique t_R : 1,32 min

SM (ESI) : *m/z* 914,9 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1849,8 $[M+H+Na]^+$; 1827,8 $[M+H]^+$

IDX18313-IDX18314

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-(R,S)-acide2-amino-3-(5-méthyl-1H-indol-3-yl)propanoique-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{82}H_{112}N_{20}O_{22}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1794,06

Masse monoisotopique (Da) : 1792,79

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1908,08

IDX18313 : Quantité : 5 mg, **Rendement :** 3%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

HPLC analytique t_R : 1,26 min

SM (ESI) : *m/z* 897,5 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1815,8 $[M+H+Na]^+$; 1793,8 $[M+H]^+$

IDX18314 : Quantité : 7 mg, **Rendement :** 4%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

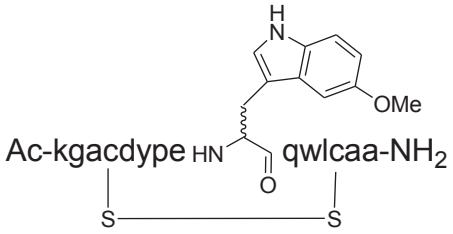
HPLC analytique t_R : 1,29 min

SM (ESI) : *m/z* 898,0 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1815,8 $[M+H+Na]^+$; 1793,8 $[M+H]^+$

IDX18621-IDX18624

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-(R,S)-acide2-amino-3-(5-méthoxy-1H-indol-3-yl)propanoique-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{82}H_{112}N_{20}O_{23}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1810,06

Masse monoisotopique (Da) : 1808,78

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1924,08

IDX18621 : Quantité : 7 mg, **Rendement :** 4%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

HPLC analytique t_R : 1,23 min

SM (ESI) : *m/z* 906,0 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1809,8 $[M+H]^{+}$

IDX18624 : Quantité : 4 mg, **Rendement :** 2%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

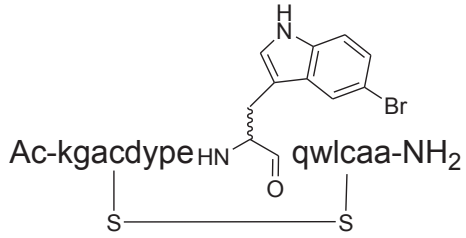
HPLC analytique t_R : 1,27 min

SM (ESI) : *m/z* 905,9 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1809,8 $[M+H]^{+}$

IDX18316-IDX18317

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-(R,S)-acide2-amino-3-(5-bromo-1H-indol-3-yl)propanoique-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{81}H_{109}N_{20}O_{22}S_2Br_1$

Masse molaire (g/mol) : 1858,03

Masse monoisotopique (Da) : 1857,66

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1972,05

IDX18621 : Quantité : 6 mg, **Rendement :** 3%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

HPLC analytique t_R : 1,29 min

SM (ESI) : *m/z* 930,2 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1857,6 $[M+H]^{+}$

IDX18624 : Quantité : 4 mg, **Rendement :** 2%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

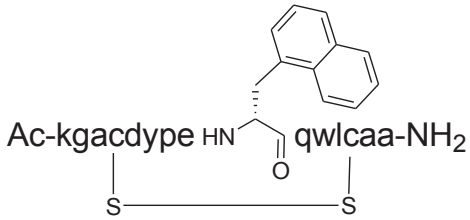
HPLC analytique t_R : 1,31 min

SM (ESI) : *m/z* 930,3 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1857,6 $[M+H]^{+}$

IDX18167

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-1-naphthylalanine-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{83}H_{111}N_{19}O_{22}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1790,77

Masse monoisotopique (Da) : 1789,72

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1904,79

Quantité : 10 mg, **Rendement :** 5%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

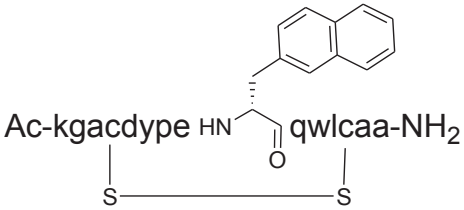
HPLC analytique t_R : 1,35 min

SM (ESI) : *m/z* 896,5 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1812,6 $[M+H+Na]^+$; 1790,6 $[M+H]^+$

IDX18173

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-2-naphthylalanine-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{83}H_{111}N_{19}O_{22}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1790,77

Masse monoisotopique (Da) : 1789,72

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1904,79

Quantité : 7 mg, **Rendement :** 4%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

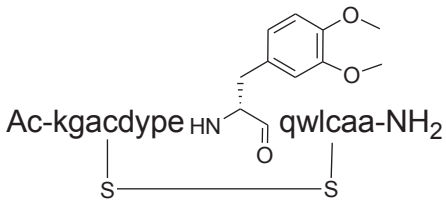
HPLC analytique t_R : 1,33 min

SM (ESI) : *m/z* 895,9 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1812,6 $[M+H+Na]^+$; 1790,6 $[M+H]^+$

IDX18172

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-3,4-diméthoxyphénylalanine-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{81}H_{113}N_{19}O_{24}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1801,05

Masse monoisotopique (Da) : 1799,78

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1916,07

Quantité : 6 mg, **Rendement :** 3%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

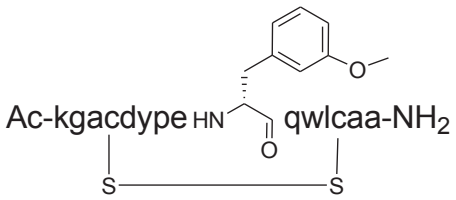
HPLC analytique t_R : 1,22 min

SM (ESI) : *m/z* 901,1 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1822,6 $[M+H+Na]^+$; 1800,6 $[M+H]^+$

IDX18166

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-3-méthoxyphénylalanine-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2

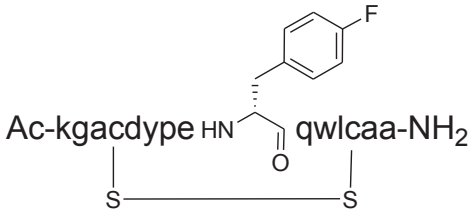


Formule brute : $C_{80}H_{111}N_{19}O_{23}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 1771,02
Masse monoisotopique (Da) : 1769,77
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1885,04

Quantité : 9 mg, **Rendement :** 5%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,27 min
SM (ESI) : *m/z* 886,1 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1792,7 $[M+H+Na]^+$; 1770,7 $[M+H]^+$

IDX18626

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-4-fluoro-D-phénylalanine-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2

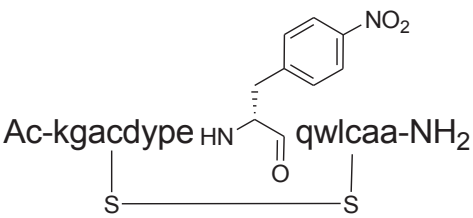


Formule brute : $C_{79}H_{108}N_{19}O_{22}S_2F_1$
Masse molaire (g/mol) : 1758,92
Masse monoisotopique (Da) : 1757.75
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1872,97

Quantité : 16 mg, **Rendement :** 8%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%
HPLC analytique t_R : 1,28 min
SM (ESI) : *m/z* 879,9 $[M+2H]^{2+}$
SM (MALDI) : *m/z* 1758,8 $[M+H]^+$

IDX18171

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-4-nitro-D-phénylalanine-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{79}H_{108}N_{19}O_{24}S_2$
Masse molaire (g/mol) : 17585,75
Masse monoisotopique (Da) : 1784,70
Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1899,77

Quantité : 16 mg, **Rendement :** 8%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

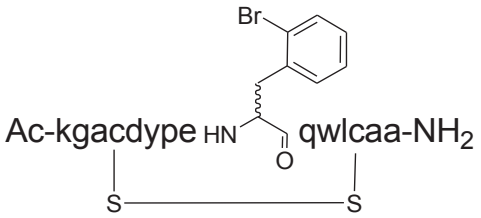
HPLC analytique t_R : 1,29 min

SM (ESI) : *m/z* 893,5 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1785,8 $[M+H]^+$

IDX18627

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-(R,S)-2-bromophénylalanine-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{79}H_{108}N_{19}O_{22}S_2Br_1$

Masse molaire (g/mol) : 1819,76

Masse monoisotopique (Da) : 1818,71

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1933,78

Quantité : 3 mg, **Rendement :** 2%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

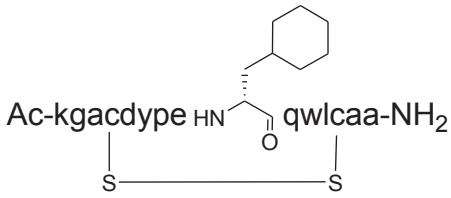
HPLC analytique t_R : 1,31 et 1,34 min

SM (ESI) : *m/z* 910,4 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1818,9 $[M+H]^+$

IDX18625

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-β-cyclohexyl-D-alanine-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{79}H_{114}N_{19}O_{22}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1745,90

Masse monoisotopique (Da) : 1744,84

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1859,92

Quantité : 5 mg, **Rendement :** 3%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

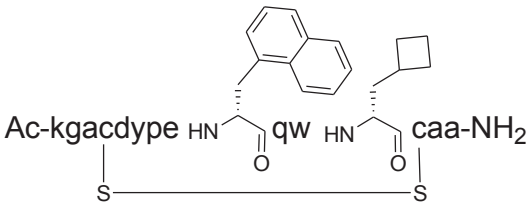
HPLC analytique t_R : 1,34 min

SM (ESI) : *m/z* 873,7 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1767,9 $[M+H+Na]^+$; 1745,9 $[M+H]^+$

IDX18630

Ac-D-Lys-D-Gly-D-Ala-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-1-naphthylalanine-D-alanine-D-Gln-D-Trp-β-cyclobutyl-D-alanine-D-Cys]-D-Ala-D-Ala-NH_2



Formule brute : $C_{84}H_{111}N_{19}O_{22}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 1803,08

Masse monoisotopique (Da) : 1801,82

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1917,10

Quantité : 5 mg, **Rendement :** 3%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

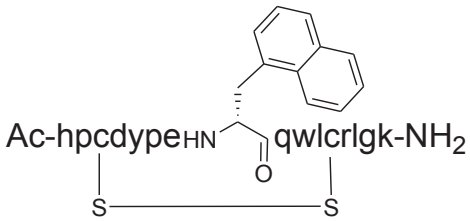
HPLC analytique t_R : 1,39 min

SM (ESI) : *m/z* 902,0 $[M+2H]^{2+}$

SM (MALDI) : *m/z* 1824,8 $[M+H+Na]^+$; 1802,8 $[M+H]^+$

IDX18628

Ac-D--D-Pro-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-1-naphthylalanine-D-Gln-D-Trp-D-Leu-D-Cys]-D-Arg-D-Leu-D-Gly-D-Lys-NH_2



Formule brute : $C_{97}H_{132}N_{25}O_{23}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 2081,42

Masse monoisotopique (Da) : 2079,96

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 2309,46

Quantité : 10 mg, **Rendement :** 4%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

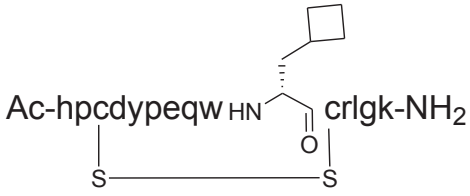
HPLC analytique t_R : 1,34 min

SM (ESI) : *m/z* 1040,9 $[M+2H]^{2+}$; 642,3 $[M+3H]^{3+}$

SM (MALDI) : *m/z* 2080,9 $[M+H]^+$

IDX18631

Ac-D--D-Pro-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-Trp-D-Gln-D-Trp-β-cyclobutyl-D-alanine -D-Cys]-D-Arg-D-Leu-D-Gly-D-Lys-NH_2



Formule brute : $C_{96}H_{132}N_{26}O_{23}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 2082,41

Masse monoisotopique (Da) : 2080,95

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 2310,45

Quantité : 7 mg, **Rendement :** 3%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

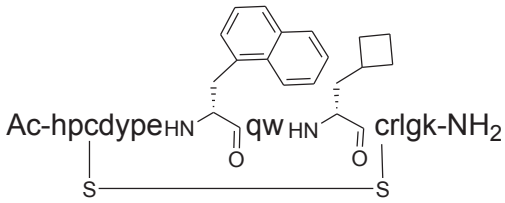
HPLC analytique t_R : 1,30 min

SM (ESI) : *m/z* 1041,5 $[M+2H]^{2+}$; 694,6 $[M+3]^{3+}$

SM (MALDI) : *m/z* 2082,0 $[M+H]^+$

IDX18632

Ac-D--D-Pro-c[D-Cys-D-Asp-D-Tyr-D-Pro-D-Glu-D-1-naphthylalanine-D-Gln-D-Trp-β-cyclobutyl-D-alanine -D-Cys]-D-Arg-D-Leu-D-Gly-D-Lys-NH_2



Formule brute : $C_{98}H_{133}N_{25}O_{23}S_2$

Masse molaire (g/mol) : 2093,44

Masse monoisotopique (Da) : 2091,96

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 2321,48

Quantité : 0,8 mg, **Rendement :** 0,3%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

HPLC analytique t_R : 1,34 min

SM (ESI) : *m/z* 1046,9 $[M+2H]^{2+}$; 698,3 $[M+3H]^{3+}$

SM (MALDI) : *m/z* 2092,9 $[M+H]^+$

Références Bibliographiques

1. Eckert, D. M.; Malashkevich, V. N.; Hong, L. H.; Carr, P. A.; Kim, P. S., Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell* **1999,** *99* (1), 103-15.

2. Welch, B. D.; VanDemark, A. P.; Heroux, A.; Hill, C. P.; Kay, M. S., Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007,** *104* (43), 16828-16833.

3. Kay, M. S.; Welch, B. D. Methods and compositions related to inhibition of viral entry. 2008.WO/2008/098182

4. Fletcher, M. D.; Campbell, M. M., Partially Modified Retro-Inverso Peptides: Development, Synthesis, and Conformational Behavior. *Chem. Rev.* **1998,** *98* (2), 763-796.

5. Goodman, M.; Chorev, M., On the concept of linear modified retro-peptide structures. *Acc. Chem. Res.* **1979,** *12* (1), 1-7.

6. Bohm, H. J., LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1992,** *6*, 593-606.

7. O'Donnell, M. J.; Boniece, J. M.; Earp, S. E., The synthesis of amino acids by phase-transfer reactions. *Tetrahedron Lett.* **1978,** *19* (30), 2641-2644.

8. Lygo, B.; Andrews, B. I., Asymmetric Phase-Transfer Catalysis Utilizing Chiral Quaternary Ammonium Salts: Asymmetric Alkylation of Glycine Imines. *Acc. Chem. Res.* **2004,** *37* (8), 518-525.

9. Lygo, B.; Wainwright, P. G., A new class of asymmetric phase-transfer catalysts derived from Cinchona alkaloids -- Application in the enantioselective synthesis of [alpha]-amino acids. *Tetrahedron Lett.* **1997,** *38* (49), 8595-8598.

10. Corey, E. J.; Xu, F.; Noe, M. C., A Rational Approach to Catalytic Enantioselective Enolate Alkylation Using a Structurally Rigidified and Defined Chiral Quaternary Ammonium Salt under Phase Transfer Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **1997,** *119* (50), 12414-12415.

11. O'Donnell, M. J.; Delgado, F.; Pottorf, R. S., Enantioselective solid-phase synthesis of [alpha]-amino acid derivatives. *Tetrahedron* **1999,** *55* (20), 6347-6362.

12. O'Donnell, M. J., The Enantioselective Synthesis of α-Amino Acids by Phase-Transfer Catalysis with Achiral Schiff Base Esters. *Acc. Chem. Res.* **2004,** *37* (8), 506-517.

13. O'Donnell, M. J.; Polt, R. L., A mild and efficient route to Schiff base derivatives of amino acids. *J. Org. Chem.* **1982,** *47* (13), 2663-2666.

14. Gurjar, M. K.; Talukdar, A., Heck Reaction of (S)-N-Cbz-Allyl Glycine t-Butyl Ester with Aromatic Halides. *Synthesis* **2002,** *2002* (03), 0315,0316.

15. C. G. Biagini, S.; E. GibsoneThomas, S.; P. Keen, S., Cross-metathesis of unsaturated [small alpha]-amino acid derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998,** (16), 2485-2500.

16. Chatterjee, A. K.; Choi, T.-L.; Sanders, D. P.; Grubbs, R. H., A General Model for Selectivity in Olefin Cross Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2003,** *125* (37), 11360-11370.

17. Maryanoff, B. E.; Reitz, A. B., The Wittig olefination reaction and modifications involving phosphoryl-stabilized carbanions. Stereochemistry, mechanism, and selected synthetic aspects. *Chem. Rev.* **1989,** *89* (4), 863-927.

18. Schmidt, U.; Griesser, H.; Leitenberger, V.; Lieberknecht, A.; Mangold, R., et al., Amino acids and peptides. 81. Diastereoselective formation of (Z)-didehydroamino acid esters. *Synthesis* **1992**, 487-90.

19. Kaupp, G., Organic solid-state reactions with 100% yield. In *Organic Solid State Reactions*, Springer-Verlag 2005; Vol. 254, pp 95-183.

20. Toda, F.; Kiyoshige, K.; Yagi, M., NaBH4 Reduction of Ketones in the Solid State. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989,** *28* (3), 320-321.

21. Rodríguez, B.; Bruckmann, A.; Rantanen, T.; Bolm, C., Solvent-Free Carbon-Carbon Bond Formations in Ball Mills. *Adv. Synth. Catal.* **2007,** *349* (14-15), 2213-2233.

22. Kipp, S.; Šepelák, V.; Becker, K. D., Mechanochemie: Chemie mit dem Hammer. *Chem. Unserer Zeit* **2005,** *39* (6), 384-392.

23. Delogu, F.; Orrù, R.; Cao, G., A novel macrokinetic approach for mechanochemical reactions. *Chem. Eng. Sci. 58* (3-6), 815-821.

24. Urakaev, F. K.; Boldyrev, V. V., Mechanism and kinetics of mechanochemical processes in comminuting devices: 1. Theory. *Powder Technology* **2000,** *107* (1-2), 93-107.

25. Urakaev, F. K.; Boldyrev, V. V., Mechanism and kinetics of mechanochemical processes in comminuting devices 1. Theory. *Powder Technol.* **2000,** *107* (Copyright (C) 2010 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 93-107.

26. Colacino, E.; Nun, P.; Colacino, F. M.; Martinez, J.; Lamaty, F., Solvent-free synthesis of nitrones in a ball-mill. *Tetrahedron* **2008,** *64* (23), 5569-5576.

27. Rothenberg, G.; Downie, A. P.; Raston, C. L.; Scott, J. L., Understanding Solid/Solid Organic Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2001,** *123* (36), 8701-8708.

28. Tanaka, K.; Toda, F., Solvent-Free Organic Synthesis. *Chem. Rev.* **2000,** *100* (3), 1025-1074.

29. Tanaka, K.; Toda, F., *Solvent-Free Organic Synthesis*. John Wiley & Sons: 2003; p 300 pp.

30. Nun, P.; Colacino, E.; Martinez, J.; Lamaty, F., Chemistry without solvent. *Tech. Ing., Constantes Phys.-Chim.* **2008,** *51*, K1220/1-K1220/15.

31. Tullberg, E.; Peters, D.; Frejd, T., The Heck reaction under ball-milling conditions. *J. Organomet. Chem.* **2004,** *689* (23), 3778-3781.

32. Tullberg, E.; Schacher, F.; Peters, D.; Frejd, T., Solvent-Free Heck-Jeffery Reactions under Ball-Milling Conditions Applied to the Synthesis of Unnatural Amino Acids Precursors and Indoles. *Synthesis* **2006,** *2006* (07), 1183-1189.

33. Bernhardt, F.; Trotzki, R.; Szuppa, T.; Stolle, A.; Ondruschka, B., Solvent-free and time-efficient Suzuki-Miyaura reaction in a ball mill: the solid reagent system KF-Al2O3under inspection. *Beilstein J. Org. Chem.* **2010,** *6*, No pp. given, No. 7.

34. Schneider, F.; Ondruschka, B., Mechanochemical Solid-State Suzuki Reactions Using an In Situ Generated Base. *ChemSusChem* **2008,** *1* (7), 622-625.

35. Thorwirth, R.; Stolle, A.; Ondruschka, B., Fast copper-, ligand- and solvent-free Sonogashira coupling in a ball mill. *Green Chem.* **2010,** *12*, 985-991.

36. Fulmer, D. A.; Shearouse, W. C.; Medonza, S. T.; Mack, J., Solvent-free Sonogashira coupling reaction via high speed ball milling. *Green Chem.* **2009,** *11*, 1821-1825.

37. Kaupp, G.; Reza Naimi-Jamal, M.; Schmeyers, J., Solvent-free Knoevenagel condensations and Michael additions in the solid state and in the melt with quantitative yield. *Tetrahedron* **2003,** *59* (21), 3753-3760.

38. Raston, C. L.; Scott, J. L., Chemoselective, solvent-free aldol condensation reaction. *Green Chem.* **2000,** *2*, 49-52.

39. Rodríguez, B.; Bruckmann, A.; Bolm, C., A Highly Efficient Asymmetric Organocatalytic Aldol Reaction in a Ball Mill. *Chemistry – A European Journal* **2007,** *13* (17), 4710-4722.

40. Declerck, V.; Nun, P.; Martinez, J.; Lamaty, F., Solvent-Free Synthesis of Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009,** *48* (49), 9318-9321.

41. Balema, V. P.; Wiench, J. W.; Pruski, M.; Pecharsky, V. K., Mechanically Induced Solid-State Generation of Phosphorus Ylides and the Solvent-Free Wittig Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002,** *124* (22), 6244-6245.

42. Yang, J.-X.; Tao, X.-T.; Yuan, C. X.; Yan, Y. X.; Wang, L., et al., A Facile Synthesis and Properties of Multicarbazole Molecules Containing Multiple Vinylene Bridges. *J. Am. Chem. Soc.* **2005,** *127* (10), 3278-3279.

43. Jin, Y. Z.; Yasuda, N.; Inanaga, J., Organic synthesis in solid media. Solvent-free Horner-Wadsworth-Emmons reaction in silica gel. *Green Chem.* **2002,** *4*, 498-500.

44. Ando, K.; Yamada, K., Solvent-free Horner-Wadsworth-Emmons reaction using DBU. *Tetrahedron Lett.* **2010,** *51* (25), 3297-3299.

45. Ranoux, A.; Lemiègre, L.; Benoit, M.; Guégan, J. P.; Benvegnu, T., Horner–Wadsworth–Emmons Reaction of Unprotected Sugars in Water or in the Absence of Any

Solvent: One-Step Access to C-Glycoside Amphiphiles. *European Journal of Organic Chemistry* **2010,** *2010* (7), 1314-1323.

46. Schmidt, U.; Lieberknecht, A.; Wild, J., Amino acids and peptides; XLIII. Dehydroamino acids; XVIII. Synthesis of dehydroamino acids and amino acids from N-acyl-2-(dialkyloxyphosphinyl)glycine esters; II. *Synthesis* **1984,** 53-60.

47. Silverstein, R. M., *Spectral Identification of Organic Compounds: Use of MS, IR, NMR, and UV Methods. 4th Ed*. Tokyo Kagaku Dojin: 1983; p 416 pp.

48. Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S., et al., CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **1983,** *4* (2), 187-217.

49. Angelini, E.; Balsamini, C.; Bartoccini, F.; Lucarini, S.; Piersanti, G., Switchable Reactivity of Acylated α, β-Dehydroamino Ester in the Friedel−Crafts Alkylation of Indoles by Changing the Lewis Acid. *J. Org. Chem.* **2008,** *73* (14), 5654-5657.

50. Porter, J.; Dykert, J.; Rivier, J., Synthesis, resolution and characterization of ring substituted phenylalanines and tryptophans. *Int J Pept Protein Res* **1987,** *30* (Copyright (C) 2010 U.S. National Library of Medicine.), 13-21.

51. Okino, T.; Takemoto, Y., Asymmetric Alkylation of tert-Butyl Glycinate Schiff Base with Chiral Quaternary Ammonium Salt under Micellar Conditions. *Org. Lett.* **2001,** *3* (10), 1515-1517.

52. Kita, T.; Georgieva, A.; Hashimoto, Y.; Nakata, T.; Nagasawa, K., C2-Symmetric Chiral Pentacyclic Guanidine: A Phase-Transfer Catalyst for the Asymmetric Alkylation of tert-Butyl Glycinate Schiff Base. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002,** *41* (15), 2832-2834.

53. Zhang, F.-Y.; Corey, E. J., Highly Enantioselective Michael Reactions Catalyzed by a Chiral Quaternary Ammonium Salt. Illustration by Asymmetric Syntheses of (S)-Ornithine and Chiral 2-Cyclohexenones. *Org. Lett.* **2000,** *2* (8), 1097-1100.

54. Viswanathan, R.; Prabhakaran, E. N.; Plotkin, M. A.; Johnston, J. N., Free Radical-Mediated Aryl Amination and Its Use in a Convergent [3 + 2] Strategy for Enantioselective Indoline α-Amino Acid Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2003,** *125* (1), 163-168.

55. Sugiura, M.; Hirano, K.; Kobayashi, S., α-Aminoallylation of Aldehydes with Ammonia: Stereoselective Synthesis of Homoallylic Primary Amines. *J. Am. Chem. Soc.* **2004,** *126* (23), 7182-7183.

56. Stymiest, J. L.; Mitchell, B. F.; Wong, S.; Vederas, J. C., Synthesis of Oxytocin Analogues with Replacement of Sulfur by Carbon Gives Potent Antagonists with Increased Stability. *J. Org. Chem.* **2005,** *70* (20), 7799-7809.

57. Boger, D. L.; Keim, H.; Oberhauser, B.; Schreiner, E. P.; Foster, C. A., Total Synthesis of HUN-7293. *J. Am. Chem. Soc.* **1999,** *121* (26), 6197-6205.

58. Paleo, M. R.; Castedo, L.; Dominguez, D., Synthesis of 2-[N-(9-phenylfluoren-9-

yl)amino]-1-indanones by anionic cyclization of phenylalanine-derived oxazolidinones. *J. Org. Chem.* **1993,** *58*, 2763-7.

59. Drummond, L. J.; Sutherland, A., Asymmetric synthesis of allylic secondary alcohols: a new general approach for the preparation of [alpha]-amino acids. *Tetrahedron* **2010,** *66* (29), 5349-5356.

60. Irie, K.; Ishida, A.; Nakamura, T.; Oh-Ishi, T., Syntheses of substituted L- and D-tryptophans. *Chem. Pharm. Bull.* **1984,** *32*, 2126-39.

Chapitre 4: Synthèse de pseudopeptides cycliques

I. Objectifs

Toujours dans l'intérêt d'améliorer l'activité antivirale mais également de réduire la nature peptidique des D-peptides, notre travail s'est porté, dans ce dernier chapitre, sur une toute autre approche. Notre objectif a été de synthétiser des macrocycles inédits possédant les quatre résidus essentiels, **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13**, cyclisés *via* un ou deux linkers de nature aliphatique (Figure 66).

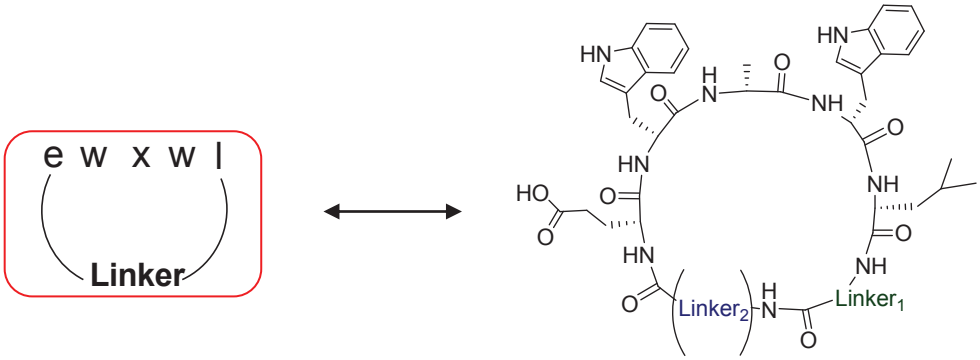


Figure 66. Macrocycles incorporant **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13**

La cyclisation de ces composés a tout d'abord été effectuée par macrolactamisation à haute dilution et a conduit à l'obtention de quatre macrocycles. Les différents macrocycles ainsi que leurs intermédiaires de synthèse ont été évalués biologiquement.

Dans un second temps, nous avons développé une nouvelle méthode de cyclisation/décrochage de peptides par une réaction de métathèse cyclisante faisant intervenir un nouveau linker, le composé *cis*-Apa (Schéma 33).

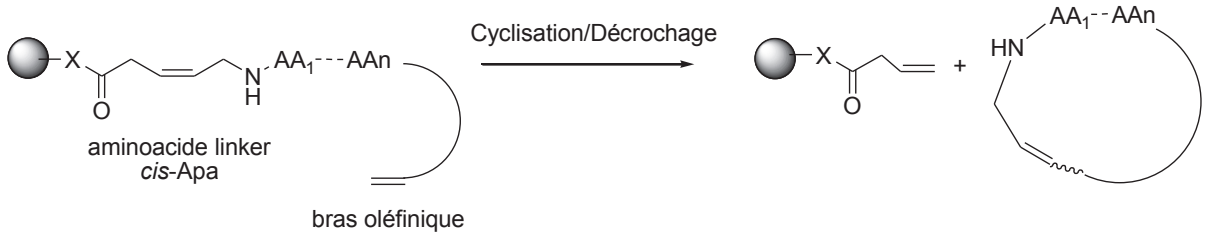


Schéma 33. Cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante

Pour cela, une nouvelle voie de synthèse de ce linker, ainsi que des essais de cyclisation/décrochage sur des séquences RGD, ont été étudiés. L'objectif était d'obtenir des conditions de cyclisation efficaces pouvant être appliquées à nos séquences.

II. Synthèse des macrocycles et évaluation biologique des composés

II.A. Stratégie de synthèse

Dans la recherche de nouvelles molécules bioactives, les peptides cycliques continuent de représenter un intérêt majeur pour les chimistes et biologistes. Ces structures conformationnelles contraintes présentent plusieurs avantages dont une meilleure biodisponibilité, une stabilité métabolique et une meilleure activité/sélectivité pour la cible.[1] Notre objectif ici était de synthétiser des macrocycles constitués des quatre résidus **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13** essentiels à l'activité des D-peptides. Sur la base d'études de modélisation menées par le Dr Thierry Convard au sein des laboratoires Idenix (non décrites dans ce chapitre), notre choix s'est porté sur la cyclisation des extrémités *N*- et *C*-terminales des acides aminés essentiels **D-Glu-9** et **D-Leu-13** *via* une cyclisation homodétique (c'est-à-dire ne contenant que des liaisons peptidiques), de type tête-queue, incorporant des linkers de nature aliphatique (Figure 67).

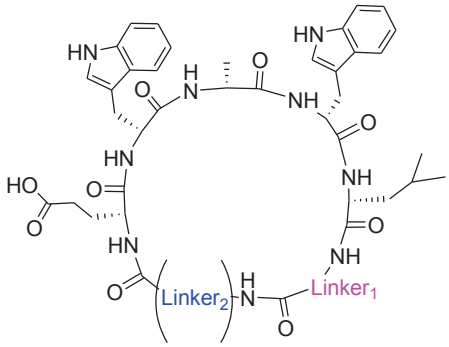


Figure 67

Le choix des acides aminés linkers a été réalisé selon deux critères : *(i)* l'utilisation de linkers commercialement disponibles et *(ii)* des études de modélisation (non décrites dans ce chapitre). Sur la base de ces données, nous nous sommes intéressés à la synthèse de macrocycles incorporant des espaceurs de type acide 8-aminocaprylique (en noir), 6-aminocaproïque (en gris), γ-aminobutyrique (en orange), et *β*-alanine (en violet) (Figure 68).

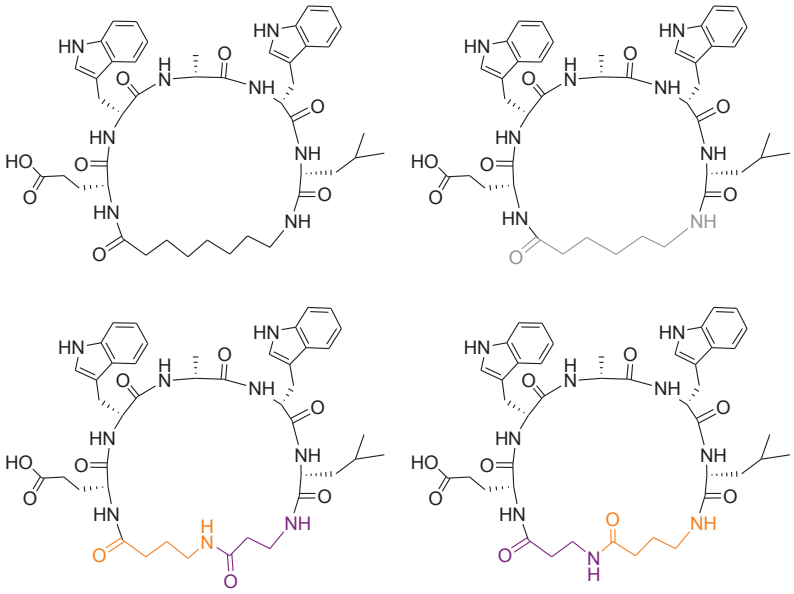


Figure 68. Structures des macrocycles

II.B. Synthèse des macrocycles

La première étape de synthèse des précurseurs linéaires a été réalisée sur phase solide, dans une stratégie Fmoc/tBu, en utilisant les agents de couplage DIC/HOBt (Schéma 34). Le choix de la résine s'est porté sur la résine 2-chloro chlorotrityle, résine pour laquelle les conditions de clivage permettent de conserver les groupements protecteurs tBu et Boc sur les chaînes latérales des acides aminés **D-Glu-9**, **D-Trp-10** et **D-Trp-12**, nécessaires pour la réaction de cyclisation en solution. Afin d'évaluer le taux de fonctionnalisation de la résine, un dosage des groupements Fmoc a été effectué après l'incorporation du premier linker (le protocole de ce dosage est décrit dans la partie expérimentale, paragraphe V.C.). La synthèse a été réalisée manuellement, par agitation oscillatoire, le suivi des étapes de déprotection et de couplage au cours du cycle de synthèse, est contrôlé par les tests colorimétriques de Kaiser et TNBS (ces tests sont décrits dans la partie expérimentale, paragraphe V.C).

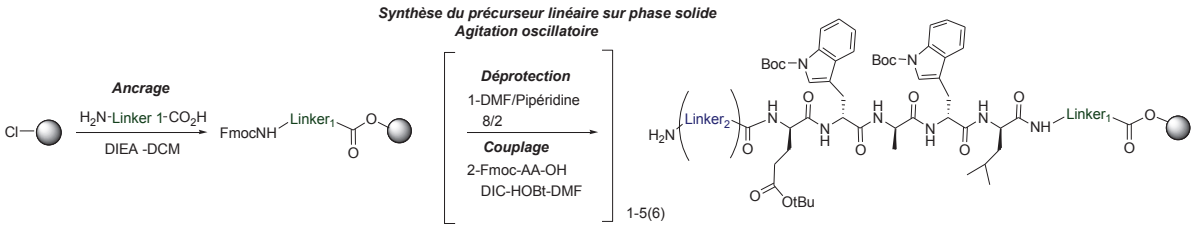


Schéma 34. Synthèse du précurseur linéaire sur phase solide

Trois étapes sont ensuite nécessaires à l'obtention des macrocycles (Schéma 35). Après clivage de la résine (étape 1), le précurseur linéaire protégé est cyclisé par macrolactamisation à haute dilution en utilisant l'agent phosphonium BOP en présence de $NaHCO_3$ (étape 2-a), les conditions de haute dilution étant essentielles pour favoriser le couplage intramoléculaire par rapport au couplage intermoléculaire.

La déprotection des groupements protecteurs sur les chaînes latérales en présence de TFA et de scavengers conduit aux différents macrocycles (étape 3). Parallèlement, les précurseurs linéaires ont eux aussi été déprotégés afin d'isoler les intermédiaires correspondants et tester leurs activités antivirales (étape 2-b).

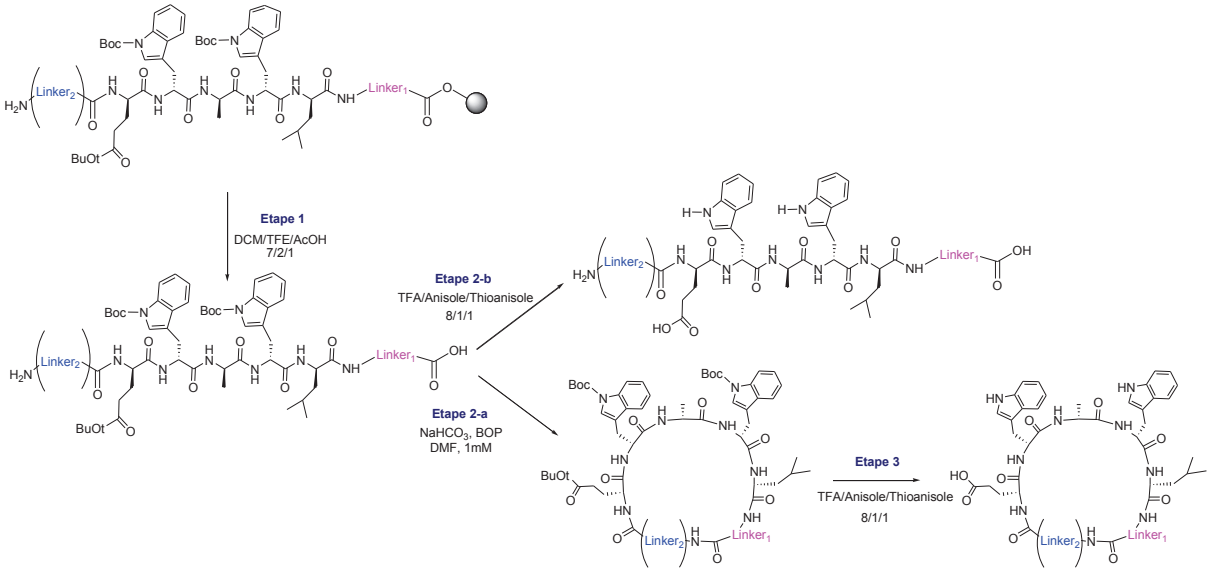
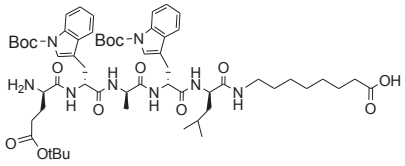
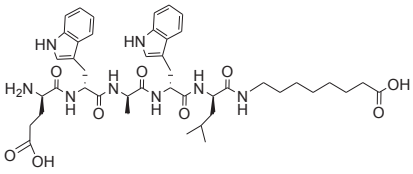
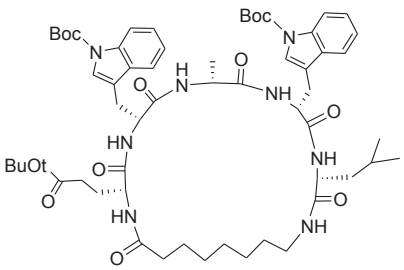
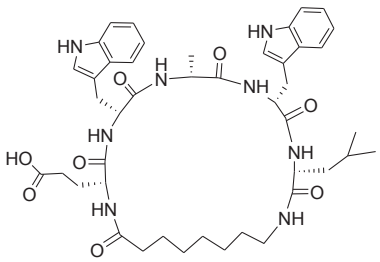
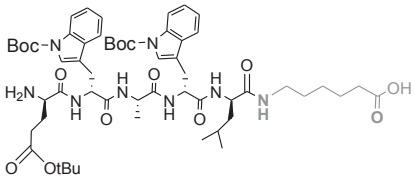
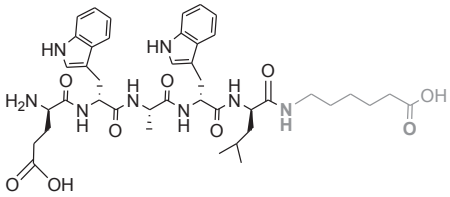
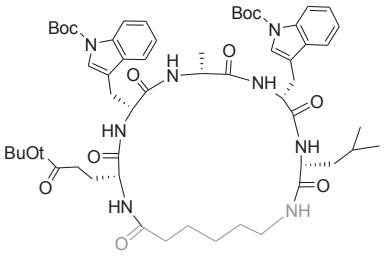
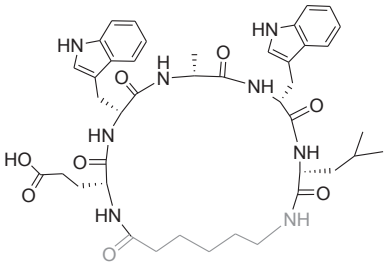


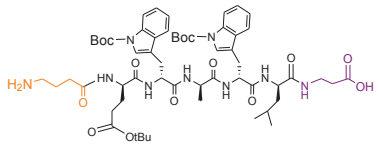
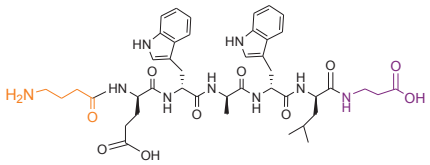
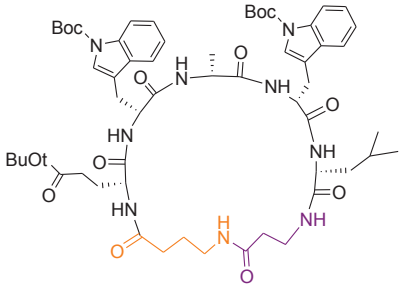
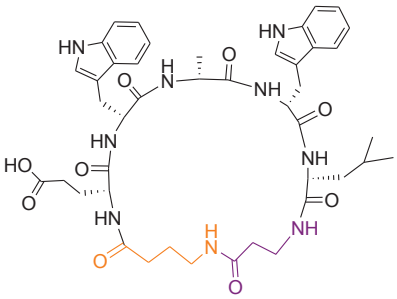
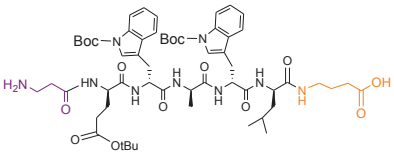
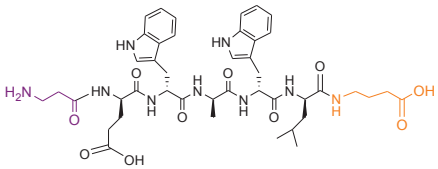
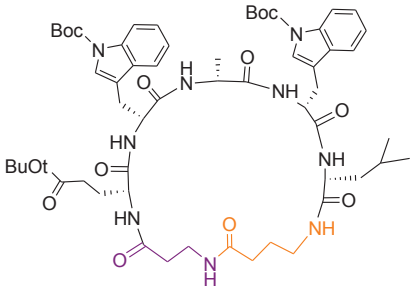
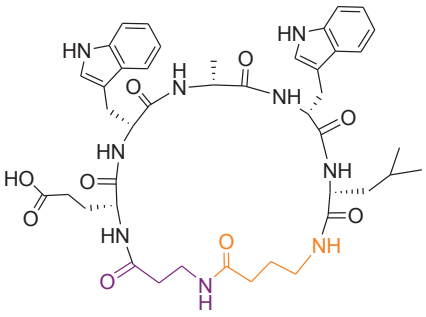
Schéma 35. Synthèse des macrocycles

Ces conditions ont permis l'obtention de quatre macrocycles incorporant des linkers de nature aliphatique, avec des rendements globaux allant de 18 à 28%. Les quatre macrocycles synthétisés et les intermédiaires de synthèse correspondants ont été évalués biologiquement.

II.C. Evaluation biologique des macrocycles

Les études biologiques des différents macrocycles ainsi que leurs intermédiaires ont été menées au sein des laboratoires Idenix (Tableau 30).

Structure	CC_{50}[a] (µM)	CE_{50}[b] (µM)	Structure	CC_{50}[a] (µM)	CE_{50}[b] (µM)
IDX15695 	>75	67	IDX15694 	>75	>75
IDX16195 	3,30	>3,3	IDX15849 	>150	>150
IDX15918 	>150	>150	IDX15710 	>75	>75
IDX16346 	3,23	>3,2	IDX15921 	>150	>150

IDX16119 	>150	>150	IDX16042 	>150	>150
IDX16344 	>150	>150	IDX16315 	>150	>150
IDX16076 	>75	>75	IDX16483 	>150	>150
IDX16043 	85	>85	IDX16077 	>150	>150

[a]Concentration Cytotoxique : concentration nécessaire pour réduire de 50% la viabilité des cellules non infectées

[b] Concentration Effective : concentration nécessaire pour inhiber de 50% la cytopathogénicité induite par le virus dans les cellules MT-4

Tableau 30. Evaluation biologique des macrocycles et de leurs intermédiaires

Il apparaît au travers ces évaluations biologiques qu'aucun peptide n'est actif, laissant supposer que les structures étudiées ne présentent pas les conformations adéquates favorisant des interactions avec la protéine virale. Une étude de stabilité réalisée sur le composé IDX15921, macrocycle incorporant le linker acide 6-aminocaproique a montré que le macrocycle est stable dans le milieu de culture, au cours du temps (le protocole est décrit en partie expérimentale, paragraphe V.E). L'absence d'activité n'est donc pas due à une dégradation des produits. Ainsi, la réduction des D-peptides à des séquences constituées des

quatre résidus essentiels (**D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13**) cyclisées par des linkers de type aliphatique a induit des modifications structurales conséquentes, provoquant une perte d'affinité avec le N-trimère.

III. Synthèse de macrocycles par cyclisation/décrochage par métathèse

Une seconde approche pour la synthèse de macrocycles pseudopeptidiques a consisté à développer une nouvelle méthode de cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante (RCM) incorporant le linker acide *cis*-5-amino-3-penténoique (*cis*-Apa). L'objectif était de développer une nouvelle voie de synthèse de l'acide aminé insaturé et d'étudier ses potentialités en tant que linker pour la réaction de cyclisation/décrochage (Schéma 36). La synthèse de pseudopeptides cycliques par la réaction de cyclisation/décrochage par métathèse a été réalisée à partir de différentes séquences RGD (arginine-glycine-acide aspartique), séquences étudiées au sein du laboratoire, pour la synthèse de peptides cycliques.[2]

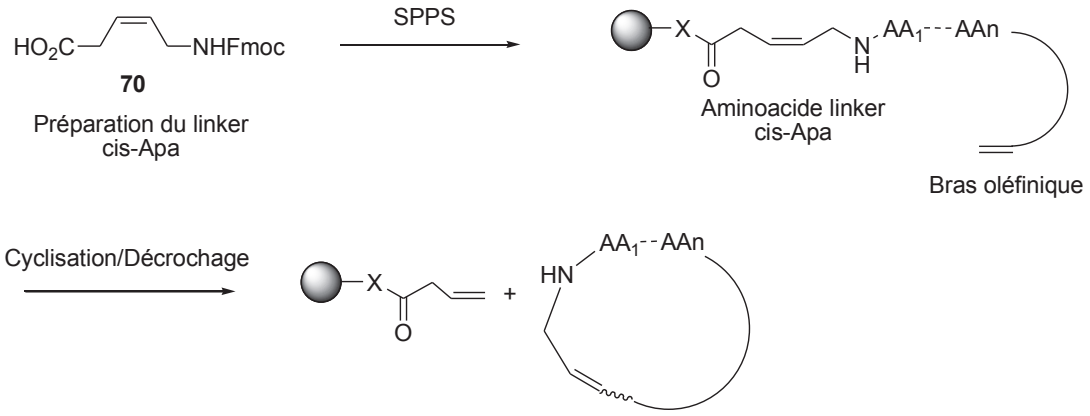


Schéma 36. Stratégie de synthèse

III.A. Réaction de cyclisation/décrochage par métathèse : principe et étude bibliographique

De nombreux travaux ont été consacrés au développement de voies de synthèse de peptides cycliques. Une approche attractive est la réaction de cyclisation/décrochage utilisant la synthèse sur phase solide à partir d'un support polymérique. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir réaliser, en une même étape, la cyclisation du produit et le décrochage du support solide.[3]

Généralement, ce concept de cyclisation/décrochage conduit à l'obtention de liaisons carbone-hétéroatome plutôt que des liaisons carbone-carbone.[4] Une exception est la synthèse de composés cycliques par cyclisation-décrochage par métathèse cyclisante (RCM). Ce procédé passe par la formation de liaisons carbone-carbone dans des conditions de réaction douces et accessibles à une large gamme de groupements fonctionnels (Schéma 37).

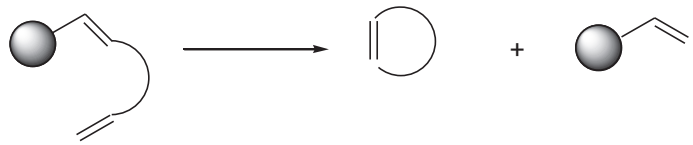


Schéma 37. Principe cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante

Le mécanisme de cette réaction est illustré dans le Schéma 38.[3] Dans un premier temps, pour des raisons d'accessibilité, le catalyseur attaque sélectivement la double liaison terminale (Etape 1). Cette étape initiale qui conduit à **B** se poursuit par une réaction de métathèse cyclisante (RCM) entrainant la libération d'un équivalent du produit cyclique **D** et la formation du complexe métal-carbène/polymère **C** (Etape 2). Enfin, un transfert du complexe métal-carbène **G**, sur la surface du polymère, (Etape 3) permet de poursuivre le cycle de cyclisation/décrochage. Lors de cette étape, Kruse et *coll.* et Rutjes et *coll.* ont montré qu'à des stades avancés du cycle catalytique, ce transfert par métathèse croisée devient plus difficile, ainsi, l'introduction d'un groupement éthylénique co-facteur, tel que le styrène (Etape 3'), réagit par métathèse croisée pour conduire à une espèce au Ruthénium soluble **F**, pouvant ré-incorporer le cycle catalytique (Etape 4') et permettre la poursuite de la réaction.[5,6]

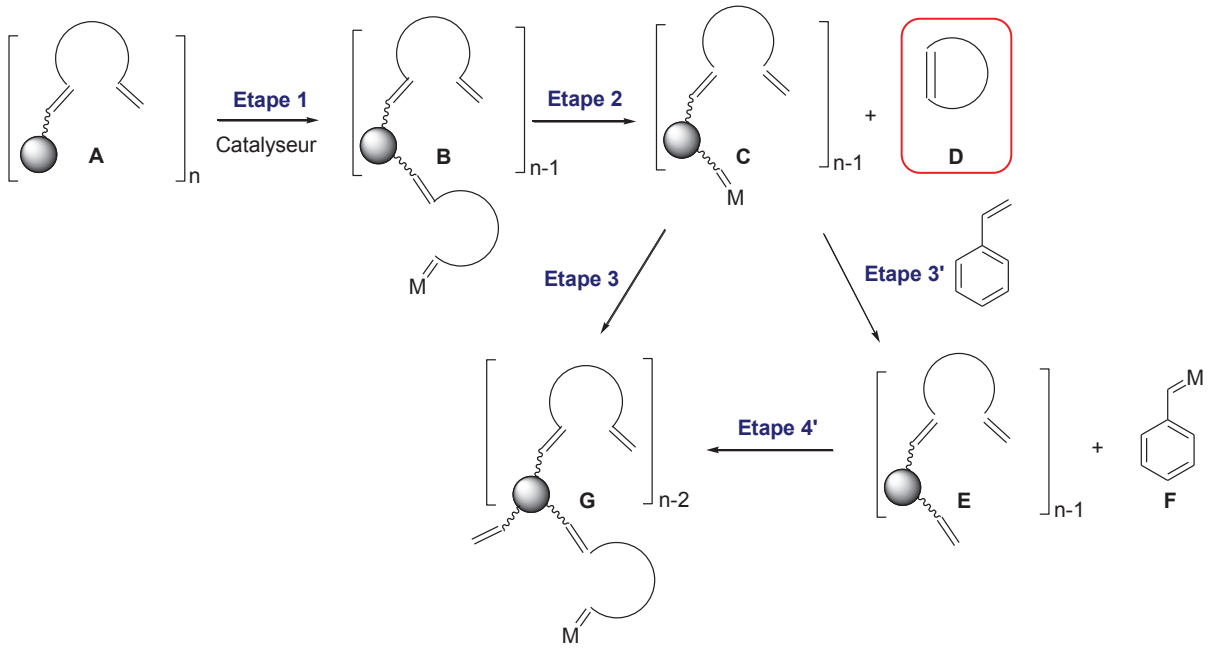


Schéma 38. Mécanisme de la réaction de cyclisation/décrochage par métathèse

L'un des avantages de cette méthode est que les sous-produits de réaction résultant des réactions de métathèses croisées intermoléculaires restent fixés à la résine durant tout le processus. De plus, cette méthode permet de moduler la taille du cycle et les groupements fonctionnels, notamment en faisant varier le groupement éthylénique terminal.

A ce jour, ce type de réaction a été appliqué principalement à la synthèse de petites molécules.[4-9]Ainsi Brown et *coll.* ont réalisé récemment la synthèse de sulfonamides par cyclisation/décrochage par métathèse (Schéma 39).[4] Ils ont proposé la synthèse d'un linker double-bras et ont étudié différents paramètres tels que le rôle du co-facteur ou la quantité de catalyseur et ont obtenu des rendements de 31 à 100%.

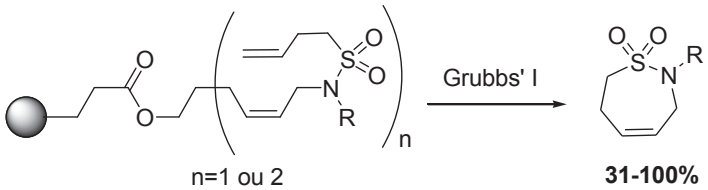


Schéma 39. Synthèse de sulfonamides par cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante

A notre connaissance, seulement deux exemples dans la littérature décrivent la synthèse de macrocycles peptidiques par cyclisation-décrochage par métathèse.

Le premier exemple a été rapporté par Blechert et *coll.*, pour la synthèse de tétrapeptides cycliques (Schéma 40).[3] L'introduction d'un espaceur flexible a permis

d'obtenir des conditions de cyclisation/décrochage efficaces avec des rendements allant jusqu'à 70% pour des puretés entre 65 et 85%.

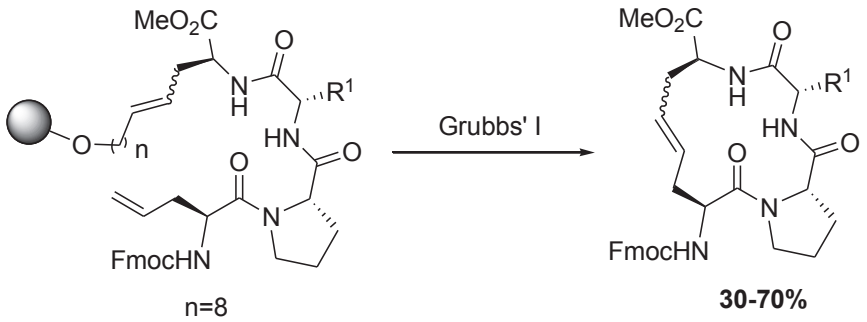


Schéma 40. Synthèse de tétrapeptides cycliques par cyclisation/décrochage par métathèse

Fraser et *coll.* ont proposé la synthèse de macrocycles incorporant un linker.[10] La réaction de cyclisation/décrochage a été réalisée sur une résine de type PS-chlorotrityle, sur une séquence de tripeptides. Les rendements dans cet exemple n'ont pas été précisés.

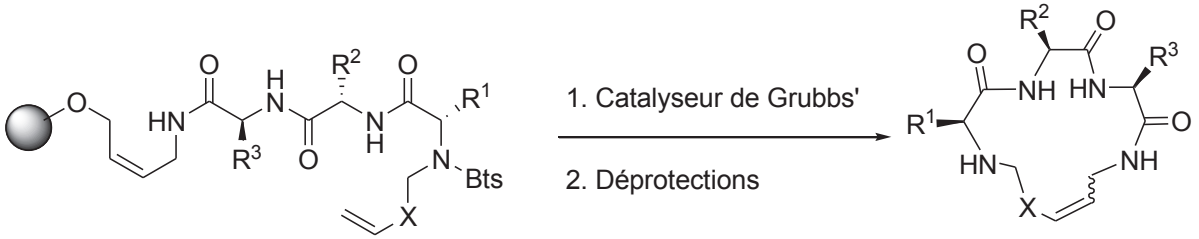


Schéma 41. Synthèse de pseudopeptides cycliques par cyclisation/décrochage par métathèse

III.B. Stratégie de synthèse

Nous proposons de développer une méthode efficace pour la préparation de pseudopeptides cycliques incluant *(i)* la préparation d'un nouveau linker adapté à la synthèse sur phase solide et à l'étape de cyclisation/décrochage (étape 1), *(ii)* la synthèse du précurseur linéaire sur phase solide *via* une activation micro-onde (étape 2), et *(iii)* la réaction de cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante (RCM) (étape 3).

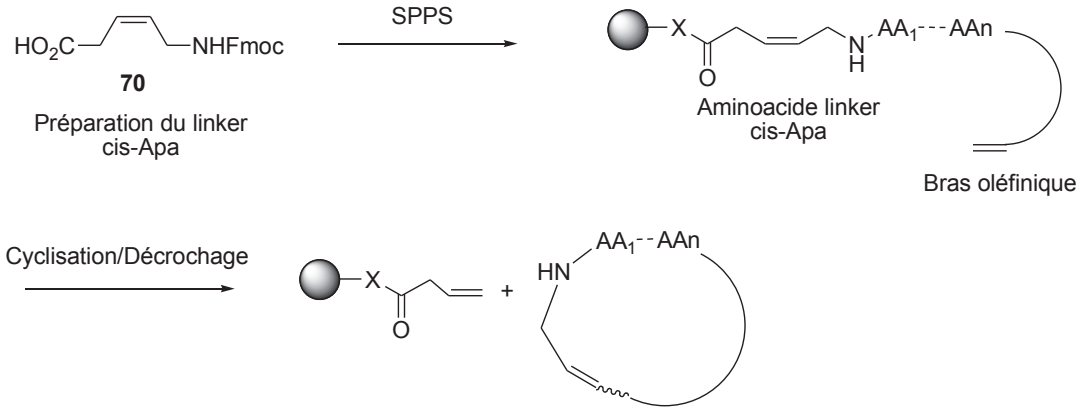


Schéma 42. Stratégie de synthèse

La première étape de ce projet a consisté à préparer un linker adéquat pour la réaction de cyclisation-décrochage et pouvant être introduit facilement dans une synthèse automatique de peptides sur phase solide dans une stratégie Fmoc/tBu.

III.C. Synthèse du linker acide *cis*-5-aminopent-3-énoique (Etape 1)

Le choix du linker aminoacide dépend de critères spécifiques correspondant à *(i)* la présence d'un groupement éthylénique pour la réaction de métathèse, *(ii)* l'accessibilité en grande quantité et *(iii)* la protection de la fonction amine par un groupement Fmoc pour pouvoir être intégrée dans une synthèse automatisée de peptides sur phase solide.

La plus simple structure remplissant ces conditions est l'aminoacide acyclique insaturé acide 5-amino-3-penténoique (Apa). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la synthèse de l'isomère *cis* (Figure 69). En effet, Grubbs et *coll.* ont démontré que les isomères *cis* d'oléfines substituées réagissent plus rapidement que les formes *trans* dans des réactions de métathèse catalysées au ruthénium.[11]



71

Figure 69. Structure du *cis*-Apa

III.C .1. Rappels bibliographiques

Peu de méthodes pour préparer le *cis*-Apa ont été décrites dans la littérature [12, 13, 14, 15] et utilisent généralement une étape d'amination réductrice à partir du diacide correspondant

obtenu par réactions successives d'oxydations du 1,4-cyclohexadiène (Voie A, Schéma 43).[14] Une synthèse différente implique la formation du diacide en deux étapes, à partir du composé hex-3-yne-1,6-diol (Voie B, Schéma 43),[12] les rendements pour les hydrogénations et les réductions correspondantes ne sont pas précisés.

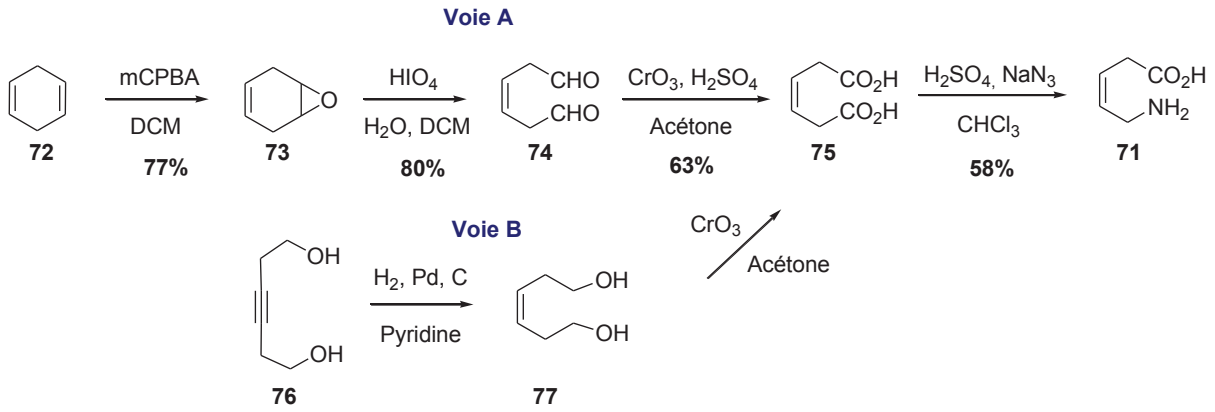


Schéma 43. Voies de synthèse *cis*-Apa

III.C .2. Nouvelle synthèse du *cis*-Apa

Nous avons proposé une nouvelle approche pour la synthèse du *cis*-Apa basée sur une stratégie d'ouverture et de fermeture de cycle à partir de l'amide diéthylénique correspondante **79** (Schéma 44).

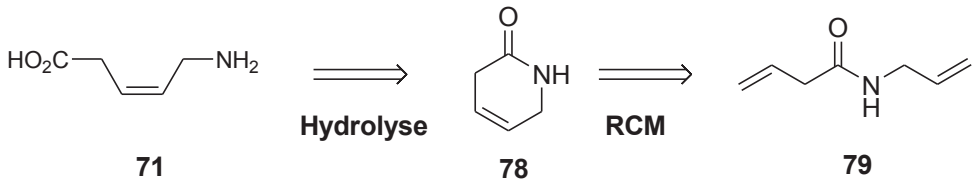


Schéma 44. Rétrosynthèse du *cis*-Apa

Guibé et *coll.* ont été les premiers à décrire la synthèse de composés de type *(Z)*-éthylénique δ-aminoacides utilisant une étape de métathèse cyclisante RCM.[16-18] Ils ont préparé des analogues éthyléniques d'isomérie *Z* de divers dipeptides à partir d'amides diéthyléniques correspondantes portant un groupement auxiliaire sur l'atome d'azote de l'amide (Schéma 45).[17]

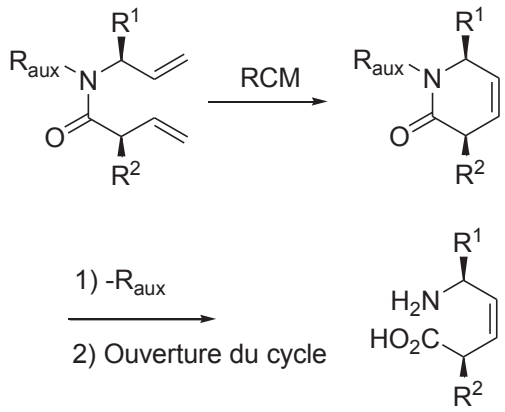


Schéma 45. Synthèse de pseudodipeptides éthyléniques

Sur la base de ces travaux, nous avons proposé une synthèse originale de l'aminoacide protégé *cis*-Apa en quatre étapes (Schéma 46).

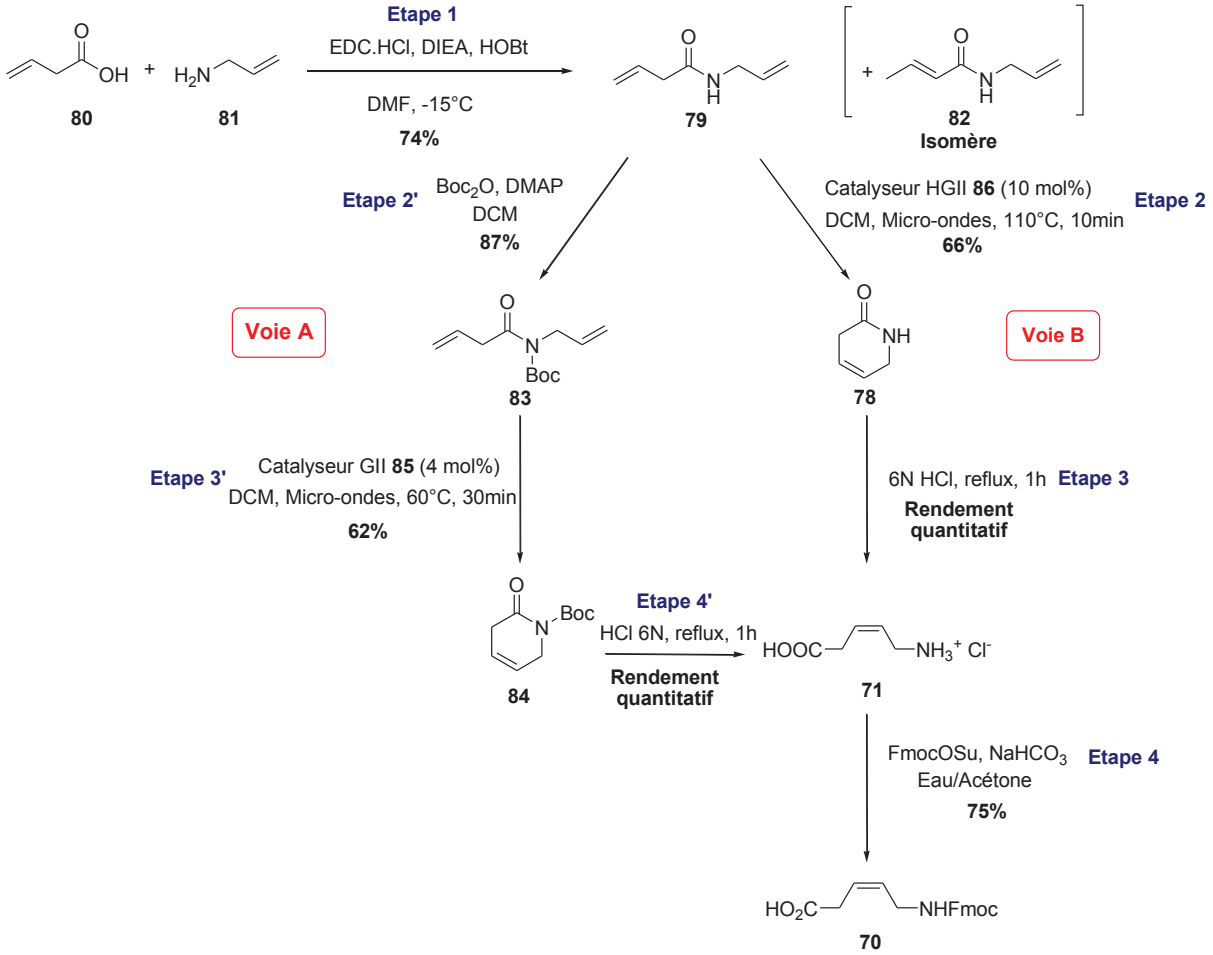
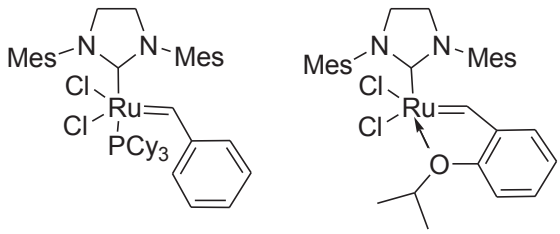


Schéma 46. Synthèse du *cis*-Apa

Différentes conditions réactionnelles ont été étudiées pour la synthèse du *N*-allyl-3-buténamide **79** (étape 1). Les premiers essais, non présentés dans ce manuscrit, ont mis en œuvre des conditions classiques de couplage, utilisant des agents de type phosphonium ou uronium tels que BOP, HBTU et HATU, en milieu basique et à température ambiante. Dans ces conditions, l'amide correspondant **79** a été obtenu ainsi que son isomère secondaire **82**. En utilisant la méthode des anhydrides symétriques (formation de l'anhydride de **80** par réaction avec la DCC et filtration de la DCU avant réaction avec la 2-allylamine **81**), nous avons réussi à éviter la formation de l'isomère **82**. Cependant ces conditions douces et efficaces présentent une limitation majeure. En effet, le rendement ne peut excéder 50% puisque seulement la moitié du diacide est couplée.[19] Finalement un couplage classique avec l'agent de couplage carbodiimide EDC en présence de HOBt,[19] à basse température, nous a permis d'obtenir uniquement l'amide diéthylénique **79** avec un rendement de 75%.

Ensuite, en première approche, une étape de protection de l'amide **79** par un groupement Boc a été effectuée avant la réaction de métathèse (Voie A). L'objectif était de favoriser une proportion suffisante du rotamère *syn* par rapport au rotamère *anti* pour permettre la cyclisation. En effet, selon Guibé et *coll.*, la présence d'un groupement auxiliaire sur l'atome d'azote d'amides diéthyléniques avantage la formation du rotamère *syn* pour la réaction de métathèse cyclisante.[18] Ainsi, l'amide protégé **83** a été isolé avec un rendement de 87% (étape 2'). Après réaction en présence de Boc_2O et DMAP, puis réaction de métathèse en présence du catalyseur de Grubbs' de deuxième génération **85** (Figure 70), sous activation micro-ondes, le dérivé lactame protégé **84** a été obtenu avec un rendement de 62% (étape 3').



85 **86**

Figure 70. Structures des catalyseurs de Grubbs' II **85** et d'Hoveyda Grubbs' II **86**

Sachant que Liebeskind et *coll.* avaient réalisé la réaction de métathèse directement sur le substrat non protégé **79** en utilisant le catalyseur Grubbs' I, dans du DCM, pendant 12 heures avec un rendement de 80%, nous avons réalisé à notre tour cette réaction dans les mêmes conditions et obtenu un rendement moindre de 70%.[20] Finalement, l'utilisation de l'activation micro-ondes avec le catalyseur d'Hoveyda Grubb's II **86** a permis d'obtenir le

lactame **78** pour un temps de réaction plus court, 10 minutes, et avec un rendement équivalent de 66% (Voie B, étape 2).

Par la suite, l'hydrolyse acide a conduit à l'acide aminé **71** avec un rendement quantitatif (étape 3). Enfin, la dernière étape de protection Fmoc (étape 4) a permis d'obtenir l'acide aminé protégé cis-Apa **70**, avec un rendement de 75%. Le rendement global est de 37% sur les 4 étapes et le dérivé cis-Apa ainsi obtenu, est prêt à être engagé dans une stratégie de synthèse peptidique sur phase solide.

III.D. Synthèse des précurseurs linéaires sur phase solide (Etape 2)

III.D .1. Stratégie de synthèse

Pour la mise au point de la réaction de cyclisation/décrochage par métathèse, nous avons choisi comme modèle des peptides dérivés de la séquence RGD, modèle étudié précédemment au sein du laboratoire pour la synthèse de peptides cycliques (Figure 71).[2] La séquence RGD (arginine-glycine-acide aspartique) est connue pour être un inhibiteur des intégrines $\alpha_v\beta_3$, famille de protéines membranaires fortement impliquées dans les processus d'angiogénèse, d'ostéoporose et de rétinopathie.[2, 21-22]

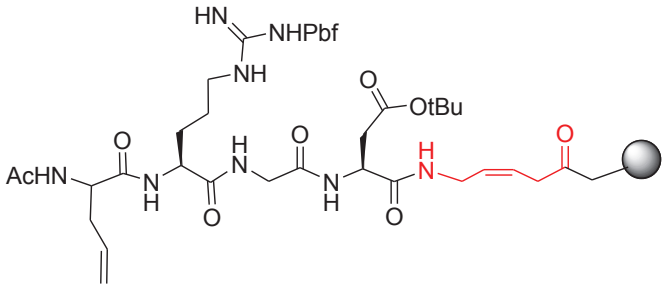


Figure 71. Séquence RGD modèle

Cette stratégie comporte l'incorporation du *cis*-Apa sur la résine puis la synthèse des précurseurs linéaires sur phase solide. Afin d'effectuer la réaction de cyclisation décrochage, l'allylglycine a été introduit en tant que deuxième bras oléfinique, cet acide aminé étant utilisé couramment pour la préparation de peptides cycliques par métathèse cyclisante.[3, 23- 27]

Afin d'obtenir des conditions de cyclisation/décrochage efficaces, deux paramètres ont été étudiés. Tout d'abord, dans le but de réduire les contraintes stériques, nous avons introduit un bras espaceur, la *β*-alanine, précédant le *cis*-Apa (Figure 72).

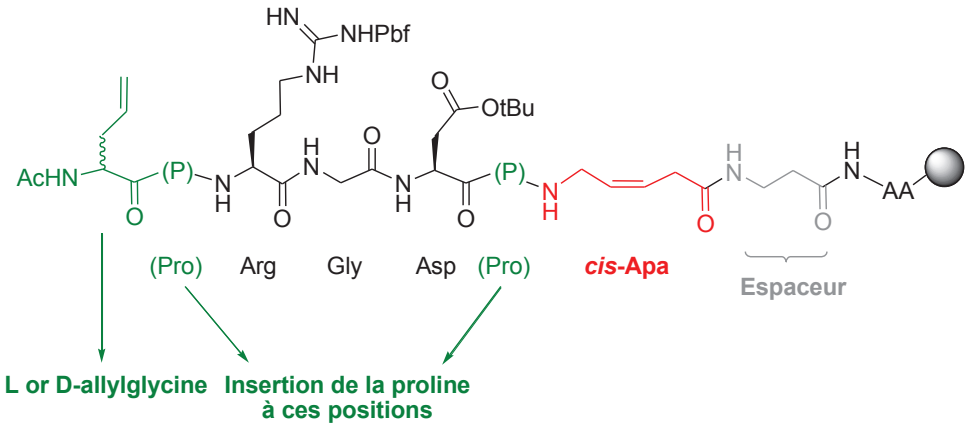


Figure 72. Stratégie de synthèse du précurseur linéaire

L'objectif était d'éloigner l'oléfine de la résine afin d'améliorer l'accessibilité de ce site réactionnel.[3] Blechert et *coll.* ont montré qu'en augmentant la longueur du bras espaceur, leurs rendements ont pu être optimisés de 30 à 70% (Schéma 47).

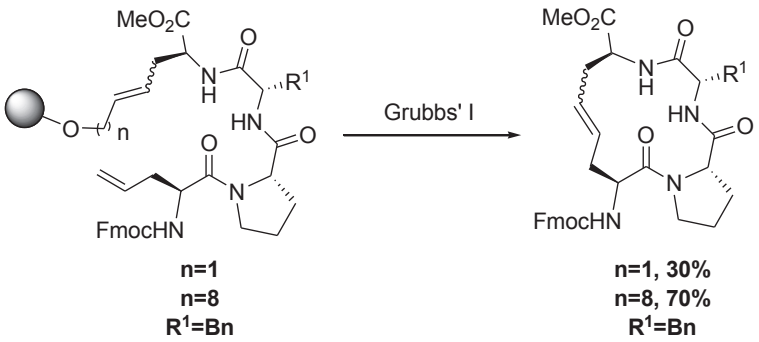


Schéma 47. Synthèse de tétrapeptides par cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante, rôle de l'espaceur

Dans un second temps, nous avons également introduit un *β*-turn à différentes positions du précurseur linéaire afin d'obtenir une conformation favorable à la réaction de métathèse. Kessler et *coll.* ont démontré que l'insertion de la pseudoproline de Mutter dans leur séquence peptidique permettait d'obtenir des taux de conversion allant de 81 à 95% (Schéma 48).[23]

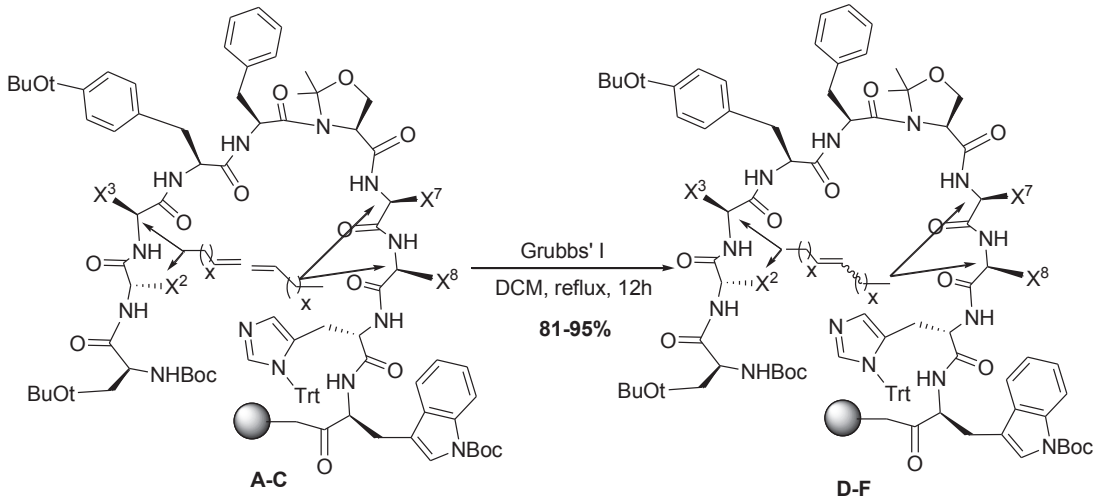


Schéma 48. Exemple de cyclisation par métathèse cyclisante, rôle du *β*-turn

De plus, Liskamp et *coll.* ont prouvé que l'introduction d'un D-aminoacide était une condition favorable pour la cyclisation de peptides (Schéma 49).[28] En induisant une structure de type *β*-turn, ils ont réussi à augmenter leur rendement de 13 à 61%.

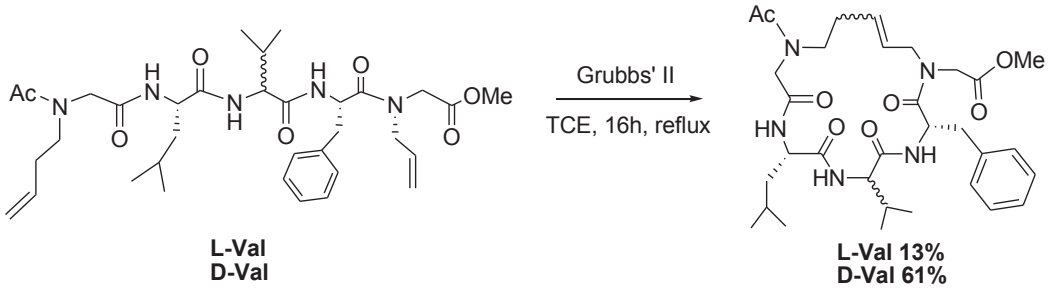


Schéma 49. Exemple de cyclisation par métathèse cyclisante, rôle du *β*-turn

Ainsi, sur la base de ces travaux et dans le but d'induire un *β*-turn, nous avons introduit la D-allylglycine substituant la L-allylglycine, ou la proline de part et d'autre du motif RGD (Figure 72).

III.D .2. Synthèse des précurseurs linéaires

La synthèse des précurseurs linéaires ont été réalisées sur deux résines différentes, la résine Wang, de type polystyrène, hydrophobe (loading, 0.69 $mmol.g^{-1}$) et la résine amphiphile ChemMatrix, de type PEG (loading, 0.47 $mmol.g^{-1}$). En considérant les insertions de *β*-turn et les deux résines étudiées, au total, huit précurseurs linéaires ont été étudiés et synthétisés au micro-onde automatique CEM liberty (Figure 73, **89a/b-92a/b**).

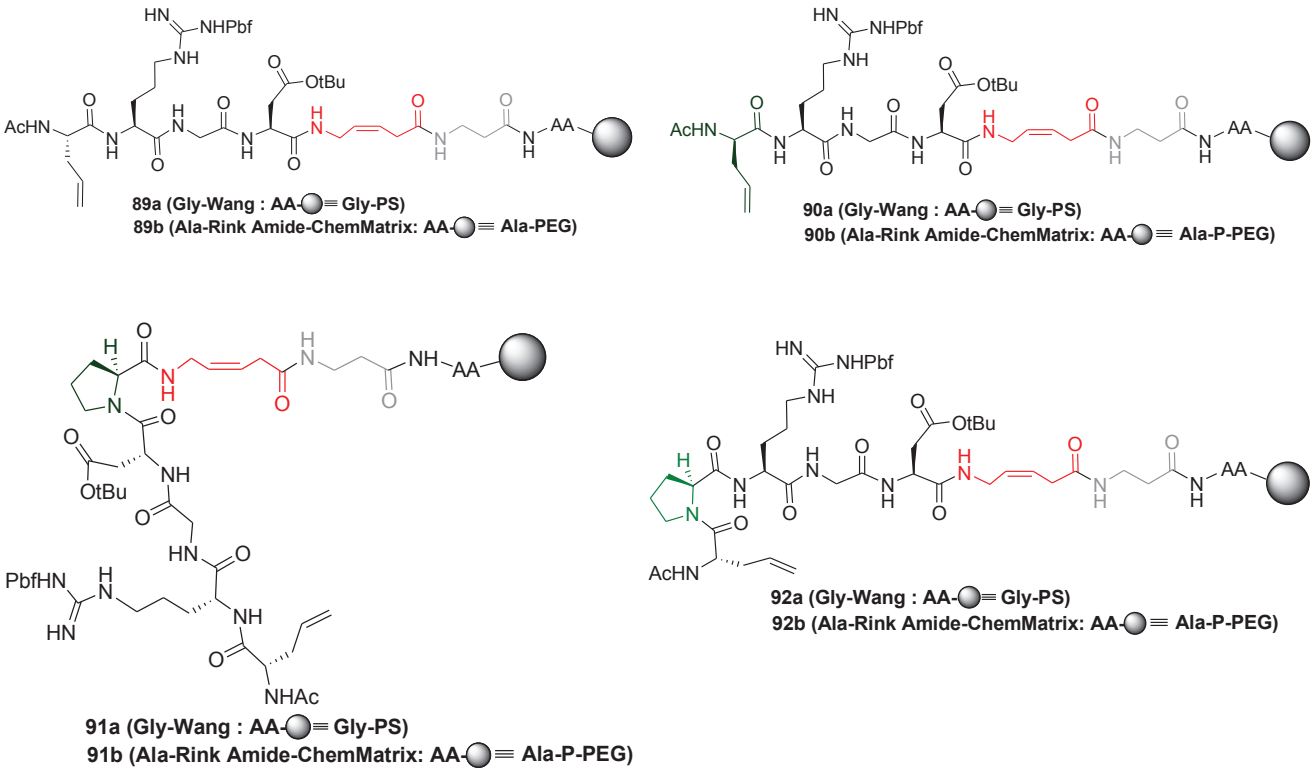


Figure 73. Structure des précurseurs linéaires

Afin d'évaluer rapidement l'efficacité de la synthèse sur phase solide, pour chaque séquence, une aliquote a été prélevée et soumise à des conditions de clivage acide (TFA/H_2O/TIS solution (95/2.5/2.5 v/v/v)), filtrée, évaporée et le résidu analysé par LC/MS. La pureté a été évaluée par HPLC/UV et s'est révélée, dans tous les cas, supérieure à 90%. Aucun sous-produit de délétion n'a été formé durant la synthèse. De plus les rendements bruts sont de l'ordre de 40 à 60%, ce calcul ayant été effectué à partir des charges respectives des résines Wang et ChemMatrix, aucune différence caractéristique entre les deux résines n'a été observée.

III.E. Cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante (Etape 3)

III.E .1. Résultats

Les essais de cyclisation/décrochage ont été réalisés sur un synthétiseur organique semi-automatique (Quest Argonaut) avec une agitation mécanique, à 40°C, pendant 48 heures en utilisant les catalyseurs de Grubbs'II **85** ou d'Hoveyda Grubbs'II **86** (Schéma 50).

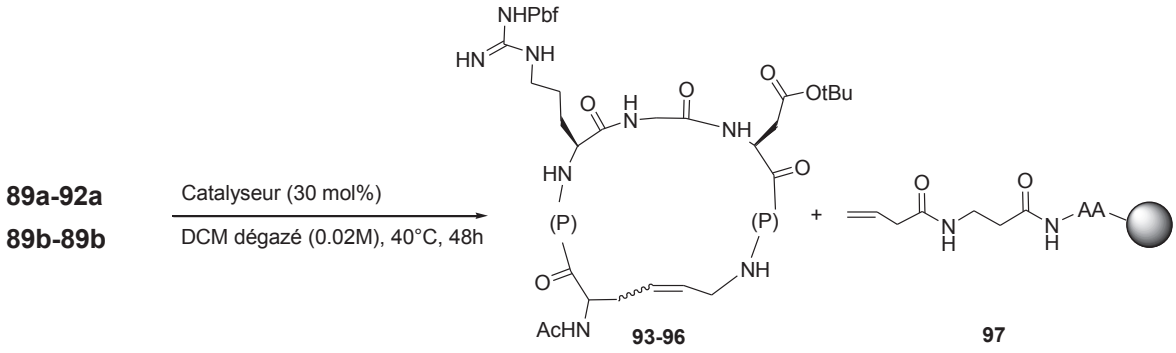


Schéma 50. Cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante

Pour toutes ces expériences, les pseudopeptides cycliques ont été détectés et analysés par LC/MS. Les quatre macrocycles correspondants aux précurseurs linéaires étudiés sont représentés sur la Figure 74 ci-dessous.

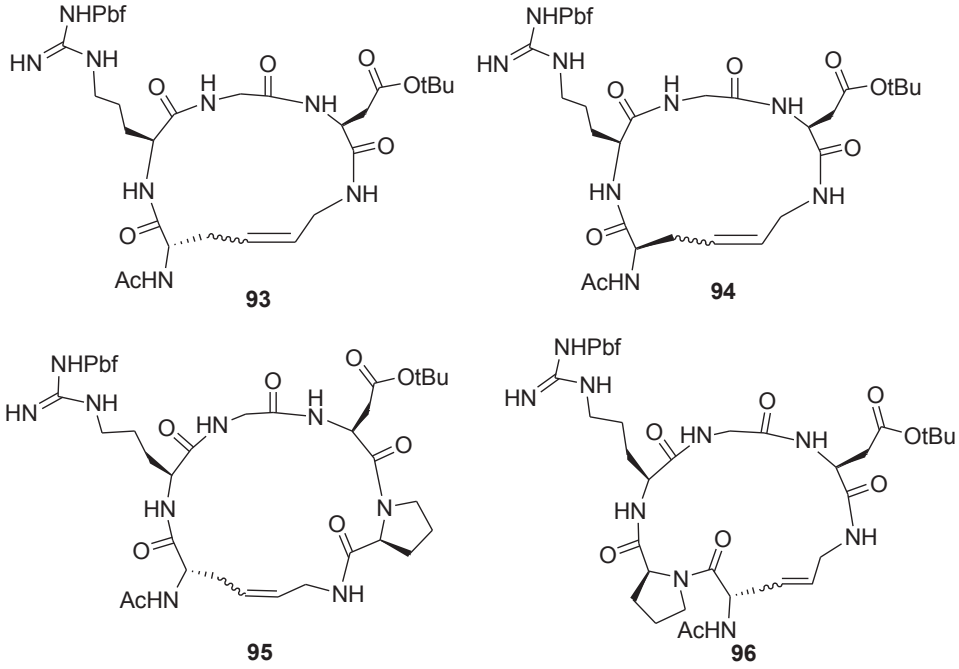


Figure 74. Structure des macrocycles

Afin d'évaluer les rendements, les bruts réactionnels ont été pesés. Entre 20-30 mg ont été récupérés pour la réaction à partir de la résine ChemMatrix, soit des rendements bruts de 35 à 53%, et entre 30-50 mg pour la résine Wang, soit des rendements bruts de 29 à 57%. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues avec les précurseurs linéaires et sont équivalentes entre les résines ChemMatrix et Wang.

Après la réaction de métathèse, la présence de précurseurs linéaires n'ayant pas réagits

sur la résine a été évaluée. Pour ce, les résines correspondantes ont été soumises à un clivage dans des conditions acides (TFA/H_2O/TIS solution (95/2.5/2.5 v/v/v), filtrées, évaporées et les bruts réactionnels ont été analysés par LC/MS, aucun précurseur linéaire n'a été détecté.

Les résultats correspondant aux différents essais de cyclisation/décrochage sont présentés dans le Tableau 31.

Entrée	Précurseur linéaire	Produit	Catalyseur (30 mol%)	Pureté (%)	Dimère cyclique (%)
Résine Wang					
1	**89a**	**93**	**85**	40	0
2	**90a**	**94**	**85**	39	6
3	**91a**	**95**	**85**	31	10
4	**92a**	**96**	**85**	58	5
5	**89a**	**93**	**86**	25	0
6	**90a**	**94**	**86**	25	0
7	**91a**	**95**	**86**	20	15
8	**92a**	**96**	**86**	24	10
Résine ChemMatrix					
9	**89b**	**93**	**85**	50	5
10	**90b**	**94**	**85**	57	7
11	**91b**	**95**	**85**	39	13
12	**92b**	**96**	**85**	65	9
13	**89b**	**93**	**86**	36	0
14	**90b**	**94**	**86**	37	4
15	**91b**	**95**	**86**	25	11
16	**92b**	**96**	**86**	40	13

Tableau 31. Résultats de la réaction de cyclisation/décrochage par métathèse sur les précurseurs linéaires **89a/b-92a/b**

La pureté a été évaluée par des analyses HPLC/UV. De manière générale, il apparaît que pour chaque résine, les meilleurs résultats sont obtenus avec le catalyseur de Grubbs'II **85** (entrées 1-4 et 9-12). De plus, la nature de la résine influence également la réaction, il apparaît qu'avec la résine ChemMatrix, les puretés UV sont supérieures, et ce quel que soit le

catalyseur utilisé (entrées 9-16). La résine ChemMatrix est décrite pour agir efficacement pour la synthèse sur phase solide de peptides hydrophobes, hautement structurés et stériquement encombrés. De part son caractère hydrophile, elle limite les phénomènes d'agrégation et d'association du peptide avec la résine, observés avec les résines de type polystyrène (Chapitre 2, partie III.A.2).[29] De plus, le gonflement de la résine ChemMatrix dans le dichlorométhane, solvant de réaction, est meilleur, favorisant certainement la réaction.

Dans la plupart des cas, la formation de dimères cycliques a été détectée par spectrométrie de masse. Une structure possible des dimères est décrite ci-dessous (Figure 75).

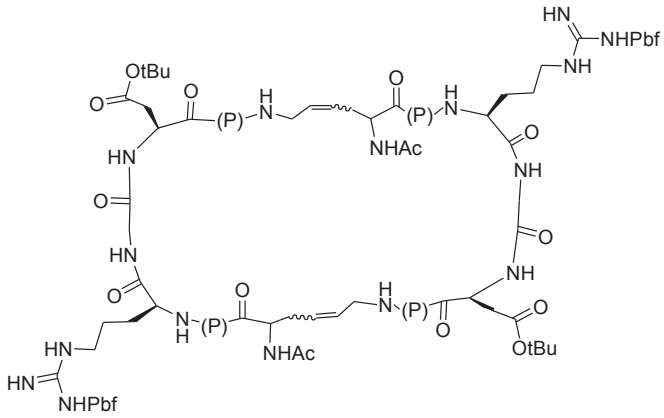


Figure 75. Structure possible des dimères

La réaction de cyclisation se produit pour chaque séquence, même en l'absence des résidus inducteurs de *β*-turn. Le remplacement de la L-allylglycine par la D-allylglycine (entrées 1, 5, 9, 13 par rapport aux entrées 2, 6, 10, 14 respectivement) n'améliore pas la cyclisation, il en est de même pour les séquences présentant la proline du côté *C*-terminal de la séquence RGD (entrées 3, 7, 11, 15 par rapport aux entrées 1, 5, 9, 13 respectivement). Par contre, l'introduction de la proline du côté *N*-terminal du motif conduit à de meilleurs résultats (entrées 4, 12, 16 par rapport aux entrées 1, 9, 13 respectivement). Ainsi, selon ces différentes expériences, la réaction de cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante incorporant la proline sur l'extrémité *N*-terminale, synthétisée sur la résine ChemMatrix et utilisant le catalyseur de Grubbs' II **85** permet d'obtenir le macrocycle **96** avec une bonne pureté (entrée 12).

III.E .2. Optimisation par activation micro-ondes

Afin d'améliorer ces conditions, la réaction de cyclisation/décrochage du précurseur **92b** a été étudiée sous activation micro-ondes,[27] les résultats sont présentés dans le Tableau 32. Ainsi, en utilisant le catalyseur de Grubbs' II **85**, à 60°C pendant 5 heures, une meilleure pureté a été obtenue (entrée 1). Par contre, la réduction du temps de réaction a entraîné une diminution de la quantité de pseudopeptide formée (entrée 2). L'incorporation d'additifs a également été étudiée dans ces conditions, l'ajout de LiCl (entrée 3),[27, 30] afin de diminuer le phénomène d'agrégation, ou de styrène (entrée 4),[6, 31, 32] pour réintroduire le catalyseur complexé à la résine dans le cycle catalytique (mécanisme de la réaction de métathèse paragraphe III.A) n'ont pas eu d'effets positifs sur la conversion. Enfin, l'ajout de catalyseurs en plusieurs fois, décrit par Krausz et *coll.*,[21] sans (entrée 5) ou avec addition de LiCl (entrée 6) n'a pas induit de meilleurs résultats.

Entrée	Condition[a]	Additif	Pureté (%)	Dimère cyclique (%)
1	60°C-5h		73	8
2	60°C-2h		47	8
3	100°C-1h	LiCl (10 mol%)	56	6
4	100°C-1h	Styrene (1éq)	15	2
5	100°C-30min	**85** ajouté en 3x	64	7
6	100°C-30min	**85** ajouté en 3x + LiCl (10mol%)	55	0

[a]30 mol% de catalyseur **85** a été introduit dans du dichlorométhane

Tableau 32. Résultats de la réaction de cyclisation/décrochage par métathèse par activation micro-ondes sur le précurseur **92b**

En comparaison avec le chauffage conventionnel, l'activation micro-ondes, utilisant les conditions initiales (entrée 1) a donné une meilleure conversion pour un temps de réaction plus court. Afin d'évaluer le ratio *cis-trans*, le macrocycle **92**, synthétisé en utilisant les meilleurs conditions (entrée 1) a été purifié par HPLC préparative (rendement global de 9%, pureté >90%). Le faible rendement s'explique certainement par la présence du catalyseur rendant la purification difficile, l'introduction de DMSO complexant les sous-produits du

catalyseur faciliterait la purification.[25] Ces conditions sont actuellement en cours d'étude. La détermination de la configuration a été évaluée par RMN ^{1}H à 600 MHz. Les constantes de couplage correspondant à l'isomère *trans* ont été mesurées (15.5-15.7Hz). Par contre, les constantes correspondant à l'isomère *cis* n'ont pu être observées, les interactions avec les protons allyliques n'ayant pas rendu la mesure accessible. Des études RMN sont actuellement en cours afin de déterminer la configuration.[24,25]

A travers cette étude nous avons développé une nouvelle voie de synthèse du composé *cis*-Apa et avons pu montrer son efficacité en tant que linker pour la réaction de cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante. En effet, à partir d'un modèle RGD, nous avons réussi à synthétiser des pseudopeptides cycliques avec des puretés satisfaisantes.

IV. Conclusion

En conclusion, notre objectif consistait, dans ce chapitre, à synthétiser, dans un premier temps, une série de macrocycles peptidiques inédits constitués des cinq acides aminés essentiels à l'activité des D-peptides, **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13**, et incorporant des linkers de nature aliphatique. L'intérêt était de réduire la nature peptidique tout en améliorant l'activité antivirale. Quatre macrocycles et leurs intermédiaires ont été évalués biologiquement, mais malheureusement aucune activité n'a été observée pour ces composés. Une étude de stabilité sur un macrocycle a montré que ces composés sont stables dans le milieu de culture, au cours du temps. Il apparaît que les modifications structurales proposées dans cette série ne conviennent pas à la protéine.

Par ailleurs, nous avons développé une nouvelle voie de synthèse d'un acide aminé linker particulier, le composé *cis*-Apa, pour la préparation de pseudopeptides cycliques utilisant la réaction de cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante. Cette nouvelle voie de synthèse a conduit en quatre étapes, à l'acide aminé protégé par un groupement Fmoc. Ce linker a été ensuite incorporé dans une stratégie de synthèse peptidique sur phase solide afin d'obtenir une série de peptides cycliques. Basé sur le modèle RGD, l'objectif était de parvenir à une méthode pratique et efficace de cyclisation/décrochage. Différentes séquences incluant des β-turns, tels que la proline ou la D-allylglycine, introduits de part et d'autre de la séquence peptidique, ont été synthétisées sur deux résines. Les peptides obtenus à partir de la résine ChemMatrix ont conduit aux meilleures puretés. Nous avons pu mettre en évidence que

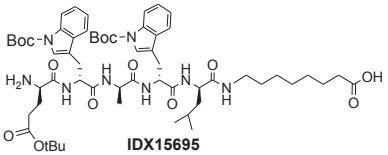
l'incorporation de la proline du côté *N*-terminal favorisait la réaction de métathèse *via* l'activation micro-ondes en présence du catalyseur de Grubbs II. Ainsi, nous avons préparé différents pseudopeptides cycliques *via* une méthode pratique et efficace, de plus, nous avons pu démontrer que l'aminoacide *cis*-Apa se prête parfaitement au procédé de cyclisation/décrochage.

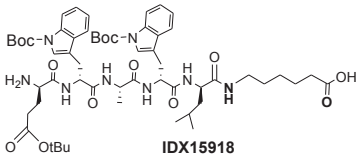
Des essais complémentaires sont actuellement réalisés pour optimiser les conditions de purification et pour déterminer le ratio *cis-trans*. De plus, afin d'exemplifier cette méthode, il serait possible d'envisager d'appliquer ces conditions à d'autres séquences notamment à nos pentapeptides.

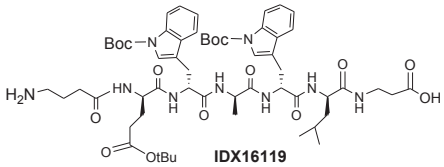
V. Partie expérimentale

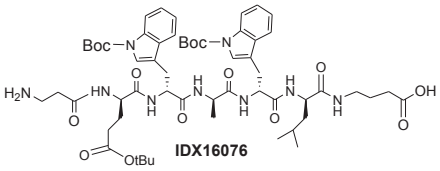
V.A. Index des molécules synthétisées

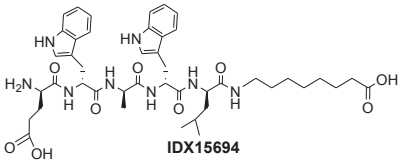
- Composés obtenus lors de la synthèse des pentapeptides cycliques par macrolactamisation

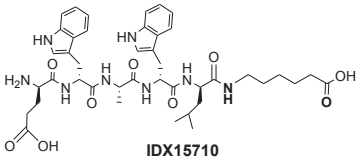

IDX15695

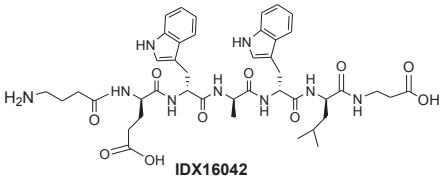

IDX15918

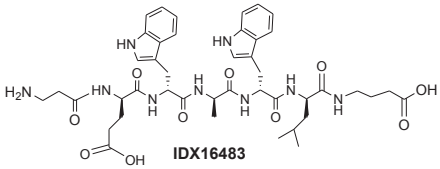

IDX16119

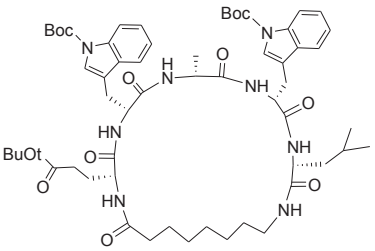

IDX16076

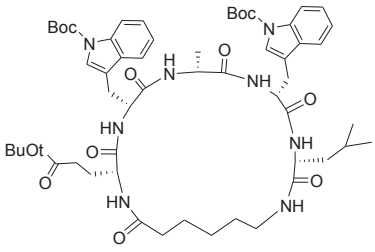

IDX15694

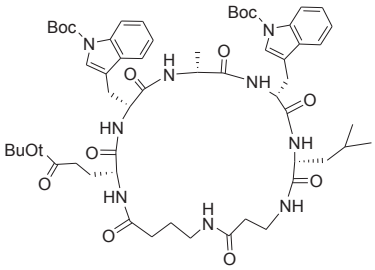

IDX15710

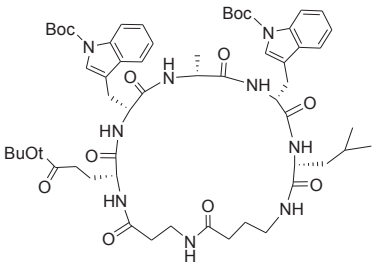

IDX16042

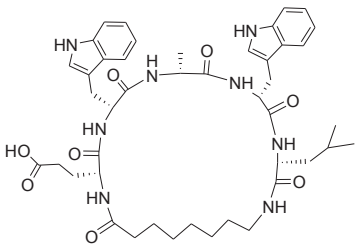

IDX16483

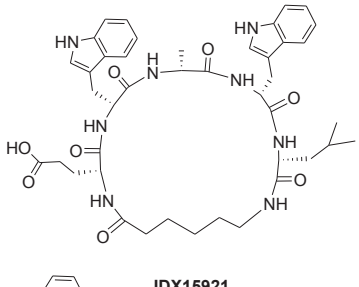

IDX16195

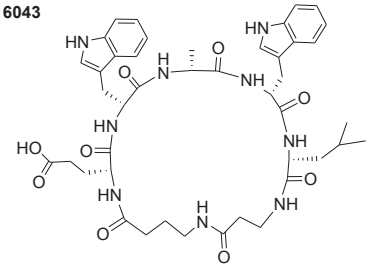

IDX16346

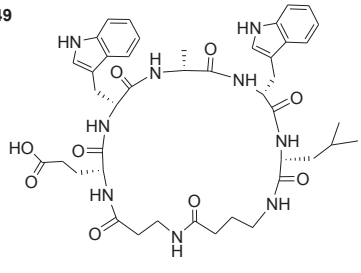

IDX163444


IDX16043

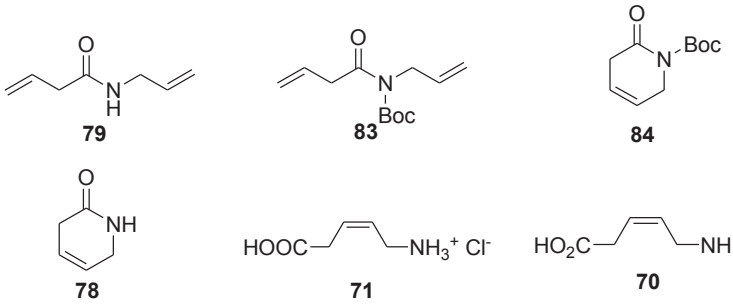

IDX15849

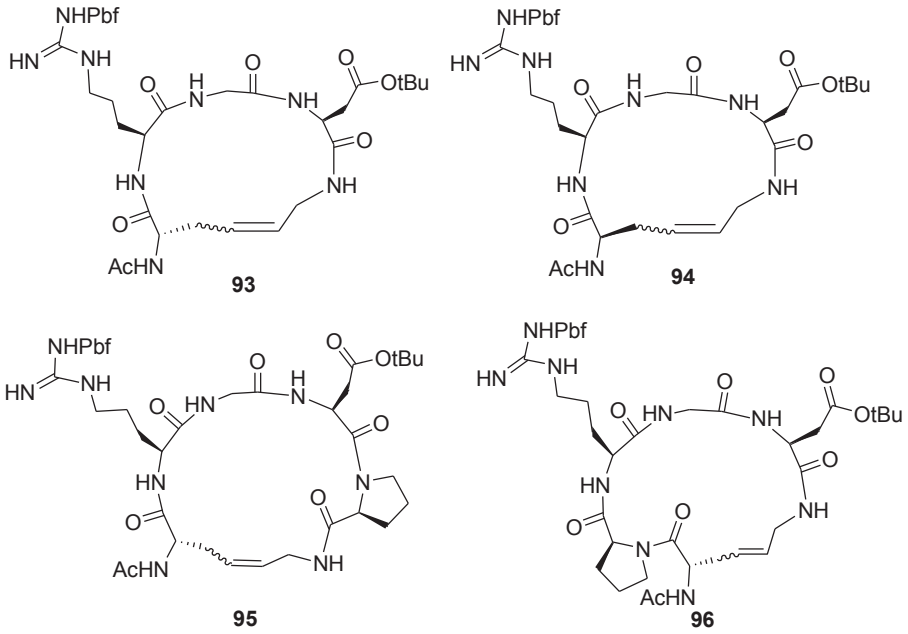

IDX15921


IDX16315


IDX16077

- Composés obtenus au cours de la synthèse de pseudopeptides cycliques par cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante





V.B. Conditions générales

Les solvants, dérivés d'acides aminés et autres réactifs sont commercialisés par IrisBiotech, Merck, Fluka, Riedeil-de Haën, Sigma-Aldrich, Acros Organics, Interchim, NeoMPS, AdvancedChem Tech, Novabiochem, VWR Prolabo. Tous de qualité analytique, ils ont été utilisés sans purification préalable. La résine Rink Amide-ChemMatrix (100-200 mesh dry, 0,47mmol/g), la résine 2-chloro chlorotrityle (100-200 Mesh, 1,55 mmol/g Cl/g résine) et la résine Wang-Gly (100-20 mesh, 0,69 mmol/g) ont été fournies par PCAS Biomatrix et Iris Biotech.

Les synthèses des macrocycles par agitation mécanique ont été réalisées dans des réacteurs cylindriques de taille variable à bouchon à vis. Chaque réacteur est équipé d'un fritté

permettant de filtrer l'excès de réactifs et les solvants en fin de réaction ou lors des lavages.

Les expériences micro-onde effectuées pour la synthèse des intermédiaires du *cis*-Apa ont été réalisées avec un appareil Biotage Initiator 60 EXP®. La température est mesurée avec un détecteur infrarouge.

Les réactions de cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante ont été réalisées sur un synthétiseur organique semi-automatique (Quest Argonaut) avec une agitation mécanique.

Les autres techniques mises en oeuvre, la purification et la caractérisation des composés décrits dans ce chapitre sont identiques à celles développées dans les chapitres 2 et 3.

V.C. Synthèse des pentapeptides cycliques par macrolactamisation

Procédure générale de synthèse des peptides sur phase solide par agitation mécanique

Les synthèses ont été effectuées sur la résine 2-Chloro chlorotrityle (1,55 mmol/g).

Ancrage du premier aminoacide sur la résine 2-chloro chlorotrityle

Le chlore s'hydrolysant relativement facilement en hydroxyle, la résine est tout d'abord traitée par une solution de chlorure de thionyle ($SOCl_2$) à 10% dans le DCM anhydre pendant 2 h afin de s'assurer que la totalité de la résine est sous forme chlorée. Après lavage de la résine par du DCM anhydre, le premier Fmoc-aminoacide (0,2 M, 5 éq.) est ancré en présence de DIEA (10 éq.) dans une solution anhydre de DCM pendant 12 h. La résine est alors lavée par du DMF (3x) puis du DCM (3x).
Un dosage Fmoc est réalisé pour évaluer le taux de fonctionnalisation de la résine après ancrage du premier aminoacide.

Dosage du Fmoc sur support solide

Après lavage, la résine est d'abord séchée sous vide pendant au moins 2 h. Puis, entre 5 et 10 mg de résine sont prélevés et placés dans un tube à hémolyse. 1 mL d'une solution à 20% de pipéridine dans du DMF est ajouté et le tout est agité pendant 30 min. 100 µl de cette solution

sont transférés dans un falcon de 15 mL contenant 10 mL de DMF. L'absorbance de la solution ainsi obtenue est mesurée à 301 nm, longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance de l'adduit dibenzofulvène-pipéridine. Le zéro d'absorbance est déterminé par une solution de DMF/Pipéridine (80/20) diluée au 1/100 dans du DMF.
La concentration du composé est reliée à son absorbance par la loi de Beer-Lambert :

A = ε.l.c avec l = largeur de la cuve (cm) (ici 1 cm)
c = concentration en mol.L^{-1}
ε = coefficient d'extinction molaire du composé ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$) (ici 7800 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$)
A = absorbance mesurée

On retrouve alors la charge de la résine en mmol/g avec la formule ci-dessous :

Charge = $(A.10^5)/(\varepsilon.m.l)$ avec m = masse de résine (mg)
10^5 = volume corrigé par facteur de dilution (L)

Le taux de fonctionnalisation calculé est celui considéré dans les calculs des rendements finaux.

Elongation de la chaîne peptidique

Les déprotections ont été réalisées avec une solution de DMF/Pipéridine (80/20 v/v). Les réactions de couplage ont été effectuées dans du DMF par introduction de l'aminoacide à coupler (150 mM, 3 éq.), de DIC (3 éq.) et d' HOBt (3 éq.).
Chaque déprotection et couplage a été réalisé par agitation oscillatoire sur une durée de 20 min pour l'étape de déprotection et 2h pour l'étape de couplage. Des lavages successifs au DCM (2x) et au DMF (2x) ont été réalisés entre chaque étape.
Le suivi de réaction a été effectué à chaque étape sur quelques grains de résine en vérifiant la présence ou non d'amine libre sur le support grâce aux tests colorimétriques de Kaiser et au TNBS.

Test de Kaiser

Ce test est utilisé pour la détection d'amines libres sur support solide. Le test est composé des solutions suivantes :

5% ninhydrine dans l'éthanol
80% phénol dans l'éthanol

KCN dans la pyridine (1mg KCN dans 10 mL de pyridine).

En fin de réaction, le dernier lavage de la résine est effectué au DCM. Quelques grains de résine sont transférés dans un tube et 2 gouttes de chaque solution sont ajoutées. Le tout est chauffé à 120°C pendant 5 minutes. Une coloration bleue des billes indique la présence de groupements amines libres sur le support.

Test au TNBS (acide 2,4,6-Trinitrobenzènesulfonique)

Ce test est utilisé pour la détection d'amines primaires sur support solide. Il se compose des solutions suivantes :

10% DIEA dans le DMF

1% TNBS dans le DMF

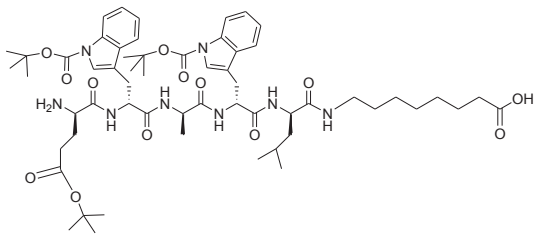
En fin de réaction, le dernier lavage de la résine est effectué au DCM. Quelques grains de résine sont transférés dans un tube et 2 gouttes de chaque solution sont ajoutées. Le tout est laissé à température ambiante pendant 5 minutes. Une coloration rouge des billes indique la présence de groupements amines libres sur le support.

Clivage de la résine 2-chloro chlorotrityle

Le clivage de la résine a été réalisé avec une de solution TFE/AcOH/DCM (7/1/2 v/v/v) (15 mL/g de résine) dans le réacteur de synthèse. Après 50 min, la résine est filtrée et le même volume de solution de clivage est de nouveau ajouté. Après 10 min, la résine est à nouveau filtrée. Les deux filtrats sont rassemblés et concentrés sous pression réduite. Le résidu est précipité dans de l'éther diéthylique, filtré sur fritté et séché sous vide. Une partie du brut réactionnel est utilisé tel quel pour l'étape suivante. L'autre partie est purifiée par HPLC préparative et lyophilisée pour obtenir des sels blancs.

IDX15695-1

H-D-Glu(tBu)-D-Trp(Boc)-D-Ala-D-Trp(Boc)-D-Leu-NH-$(CH_2)_7$-COOH



Formule brute : $C_{58}H_{84}N_8O_{13}$

Masse molaire (g/mol) : 1101,35

Masse monoisotopique (Da) : 1100,62

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1215,37

Quantité : 58 mg, **Rendement :** 19%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

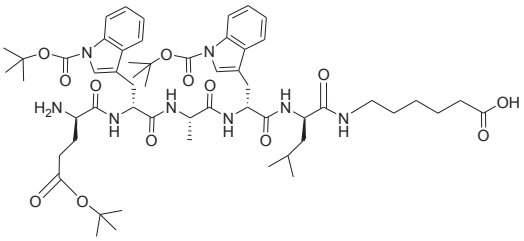
HPLC analytique t_R : 1,71 min

SM (ESI) : *m/z* 1101,9 $[M+H]^+$; 551,5 $[M+2H]^{2+}$; 523,4 $[M+2H\text{-}tBu]^{2+}$; 495,5 $[M+2H\text{-}2tBu]^{2+}$; 467,3 $[M+2H\text{-}3tBu]^{2+}$

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,77 (d, 3H, ^3J = 6,4Hz) ; 0,82 (d, 3H, ^3J = 6,5 Hz) ; 1,12-1,22 (m, 10H) ; 1,23-1,52 (m, 15H) ; 1,53-1,62 (m, 18H) ; 1,92 (m, 2H) ; 2,12 (t, 2H, ^3J =7,4 Hz) ; 2,33 (m, 2H) ; 2,7-3,19 (m, 6H) ; 3,75 (m, 1H) ; 4,22-4,34 (m, 2H) ; 4,62-4,73 (m, 2H) ; 7,12-7,33 (m, 4H, ^3J = 7,4 Hz) ; 7,49 (s, 1H) ; 7,54 (s, 1H) ; 7,63-7,78 (m, 3H) ; 7,93-8,10 (m, 5H) ; 8.48 (d, 1H, ^3J = 7,2 Hz) ; 8,59 (1H, d, ^3J = 7,8 Hz).

IDX15918

H-D-Glu(tBu)-D-Trp(Boc)-D-Ala-D-Trp(Boc)-D-Leu-NH-$(CH_2)_5$-COOH



Formule brute : $C_{56}H_{80}N_8O_{13}$

Masse molaire (g/mol) : 1073,30

Masse monoisotopique (Da) : 1072,58

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1187,32

Quantité : 48 mg, **Rendement :** 33%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

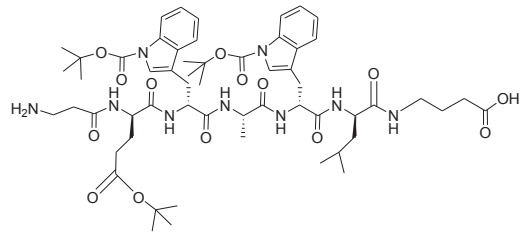
HPLC analytique t_R : 1,54 min

SM (ESI) : *m/z* 1073,8 $[M+H]^+$; 973,8 $[M+H\text{-}Boc]^+$

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,78 (d, 3H, ^3J = 6,3 Hz) ; 0,89 (3H, d, ^3J = 6,4 Hz) ; 1,21-29 (m, 5 H) ; 1,31-1,39 (m, 11H) ; 1,42-1,57 (m, 6H) ; 1,59-1,61 (m, 19H) ; 2,09 (t, 2H, ^3J = 7,5 Hz) ; 2,17 (t, 2H, ^3J = 7,4 Hz) ; 2,91-3,14 (m, 7H) ; 4,25-4,29 (m, 2H) ; 4,63-4,67 (m, 2H) ; 7,12-7,41 (m, 4H) ; 7,52-7,72 (m, 5H) ; 7,90-8,12 (m, 4H) ; 8,42 (d, 1H, ^3J = 7,9 Hz).

IDX16076

NH_2-$(CH_2)_2$-CO-D-Glu(tBu)-D-Trp(Boc)-D-Ala-D-Trp(Boc)-D-Leu-NH-$(CH_2)_3$-COOH



Formule brute : $C_{57}H_{81}N_9O_{14}$

Masse molaire (g/mol) : 1073,30

Masse monoisotopique (Da) : 1115,59

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1230,34

Quantité : 13 mg, **Rendement :** 16%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 90%

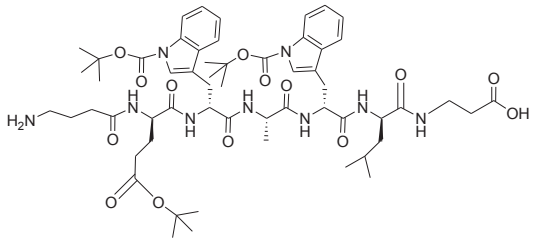
HPLC analytique t_R : 1,65 min

SM (ESI) : *m/z* 1138,8 $[M+H+Na]^+$; 1116,8 $[M+H]^+$; 973,8 $[M+H-Boc]^+$; 558,9 $[M+2H]^{2+}$

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,76 (d, 3H, ^3J = 6,3 Hz) ; 0,80 (d, 3H, ^3J = 6,3 Hz) ; 1,21 (d, 3H, ^3J = 7,1 Hz) ; 1,31 (ls, 9H) ; 1,41-1,52 (m, 3H) ; 1,61 (ls, 18H) ; 1,63-1,78 (m, 2H) ; 2,08 (m, 4H) ; 2,33 (m, 2H) ; 2,84-3,17 (m, 10H); 4,10-4,25 (m, 3H) ; 4,53-4,64 (m, 2H) ; 7,13-7,31 (m, 4H) ; 7,48 (s, 1H); 7,51 (s, 1H) ; 7,58-7,69 (m, 2H) ; 7,98 (m, 4H) ; 8,48 (m, 4H).

IDX16119

NH_2-$(CH_2)_3$-CO-D-Glu(tBu)-D-Trp(Boc)-D-Ala-D-Trp(Boc)-D-Leu-NH-$(CH_2)_2$-COOH



Formule brute : $C_{57}H_{81}N_9O_{14}$

Masse molaire (g/mol) : 1116,32

Masse monoisotopique (Da) : 1115,59

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 1230,34

Quantité : 16 mg, **Rendement :** 20%, **Pureté (HPLC 214 nm)** > 90%

HPLC analytique t_R : 1,67 min

SM (ESI) : *m/z* 1116,3 $[M+H]^+$; 973,8 $[M+H-Boc]^+$; 559,3 $[M+2H]^{2+}$; 530,8 $[M+2H-tBu]^{2+}$; 502,7 $[M+2H-2tBu]^{2+}$; 474,8 $[M+2H-3tBu]^{2+}$

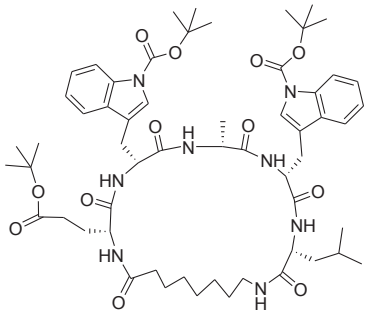
RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,79 (d, 3H, ^3J = 6,5Hz) ; 0,83 (d, 3H, ^3J = 6,5Hz) ; 1,23 (d, 3H, ^3J = 7,1Hz); 1,36-1,42 (m, 12H) ; 1,49-1,81 (m, 18H) ; 2,09-2,25 (m, 6H) ; 2,35 (m, 2H) ; 2,74 (m, 2H) ; 2,78-3,28 (m, 8H) ; 4,18-4,27 (m, 3H) ; 4,58-4,65 (m, 2H) ; 7,13 (t, 1H, ^3J = 7,5 Hz) ; 7,19-7,30 (m, 4H) ; 7,48 (d, 2H, ^3J = 6,4 Hz) ; 7,65 (t, 2H, ^3J = 8,8 Hz) ; 7,91 (m, 1H) ; 8,05 (m, 5H) ; 8,21 (d, 1H, ^3J = 6,9 Hz).

Procédure générale de cyclisation par macrolactamisation

A une solution de peptide linéaire (1 éq.) dans du DMF (1 mM) sont ajoutés du BOP (1 éq.) et du $NaHCO_3$ (5 éq.). Après 12 heures sous agitation à température ambiante, le DMF est évaporé. Le résidu est solubilisé dans de l'AcOEt, lavé à l'eau (2x) et la phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée à sec. Une partie du brut réactionnel est utilisé tel quel pour l'étape suivante. L'autre partie est purifiée par HPLC préparative et lyophilisée pour obtenir des sels blancs.

IDX16195

c[NH-D-Glu(tBu)-D-Trp(Boc)-D-Ala-D-Trp(Boc)-D-Leu-NH-$(CH_2)_7$-CO]



Formule brute : $C_{58}H_{82}N_8O_{12}$

Masse molaire (g/mol) : 1083,32

Masse monoisotopique (Da) : 1082,61

Quantité : 11 mg, **Rendement :** 6% (2 étapes), **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

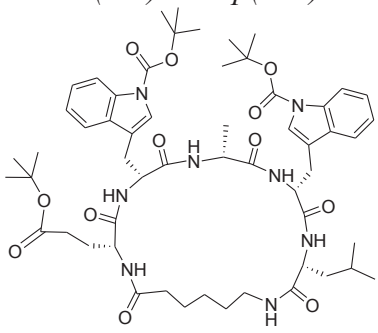
HPLC analytique t_R : 2,35 min

SM (ESI) : m/z 1105,5 $[M+H+Na]^+$; 1083,4 $[M+H]^+$; 458,4 $[M+2H-3tBu]^{2+}$; 436,3 $[M+2H-2tBu-Boc]^{2+}$; 414,1 $[M+2H-tBu-2Boc]^{2+}$.

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ (ppm) 0,71 (d, 3H, ^3J = 6,4 Hz) ; 0,81 (d, 3H, ^3J = 6,6 Hz) ; 1,15 à 1,63 (m, 45H) ; 1,99 (t, 2H, ^3J = 7,6 Hz) ; 2,08 (m, 2H) ; 2,77 (m, 1H) ; 2,90-3,18 (m, 5H) ; 3,86 (q, 1H, ^3J = 6,4 Hz) ; 3,93 (m, 1H) ; 4,13 (q, 1H, ^3J = 6,8 Hz) ; 4,40 (q, 1H, ^3J = 6,5 Hz) ; 4,66 (m, 1H) ; 7,22-7,38 (m, 6H) ; 7,41-7,51 (m, 2H) ; 7,57 (d, 1H, ^3J = 7,8 Hz) ; 7,62 (d, 1H, ^3J = 7,6 Hz) ; 7,69 (d, 1H, ^3J = 7,62 Hz) ; 7,98-8,04 (m, 2H) ; 8,30 (d, 1H, ^3J = 7,78 Hz).

IDX16346

c[NH-D-Glu(tBu)-D-Trp(Boc)-D-Ala-D-Trp(Boc)-D-Leu-NH-$(CH_2)_5$-CO]



Formule brute : $C_{56}H_{78}N_8O_{12}$

Masse molaire (g/mol) : 1055,28

Masse monoisotopique (Da) : 1054,57

Quantité : 9 mg, **Rendement :** 9% (2 étapes), **Pureté (HPLC 214 nm)** > 90%

HPLC analytique t_R : 2,20 min

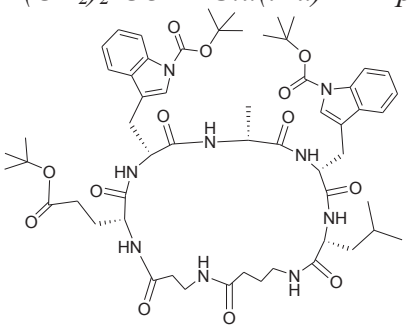
SM (ESI) : m/z 1077,5 $[M+H+Na]^+$; 1055,5 $[M+H]^+$; 999,5 $[M+H-tBu]^+$.

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,74 (d, 3H, ^3J = 6,5 Hz) ; 0,84 (d, 3H, ^3J= 6,6 Hz) ; 1,14-1,45 (m, 20H) ; 1,51-1,75 (m, 21H) ; 2,01 (t, 2H, ^3J= 7,1 Hz) ; 2,10 (m, 2H) ; 2,74 (m, 3H) ; 3,21 (m, 2H) ; 3,41 (m, 1H) ; 3,86 (m, 1H) ; 3,98 (m, 1H) ; 4,16 (m, 1H) ; 4,33 (m, 1H) ; 4,73

(m, 1H, CH α Trp) ; 7,19-7,62 (m, 10H) ; 8,02 (m, 2H) ; 8,13 (d, 1H, ^3J = 7,5 Hz) ; 8,33 (d, 1H, ^3J = 6,2 Hz).

IDX16043

c[NH-$(CH_2)_2$-CO-D-Glu(tBu)-D-Trp(Boc)-D-Ala-D-Trp(Boc)-D-Leu-NH-$(CH_2)_3$-CO]



Formule brute : $C_{57}H_{79}N_9O_{13}$

Masse molaire (g/mol) : 1098,31

Masse monoisotopique (Da) : 1097,58

Quantité : 14 mg, **Rendement :** 9% (2 étapes), **Pureté (HPLC 214 nm)** > 90%

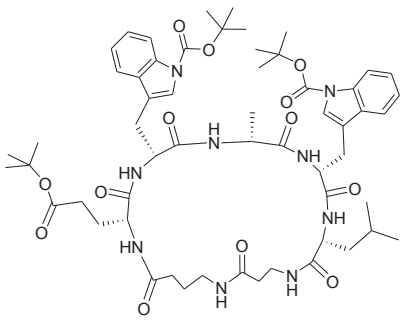
HPLC analytique t_R : 2,20 min

SM (ESI) : m/z 1120,6 $[M+H+Na]^+$; 1098,6 $[M+H]^+$

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,71 (d, 3H, ^3J = 6,4 Hz) ; 0,80 (d, 3H, ^3J = 6,5 Hz) ; 1,22 (d, 3H, ^3J = 7,2 Hz) ; 1,32 (s, 9H) ; 1,33-1,75 (m, 25H); 2,00 (m, 2H) ; 2,19 (m, 2H); 2,32 (m, 2H); 2,57 (m, 2H) ; 2,83-3,35 (m, 8H) ; 3,93 (m, 1H) ; 4,10 (m, 2H) ; 4,35 (m, 1H); 4,70 (m, 1H) ; 7,21-7,39 (m, 5H) ; 7,48 (s, 1H) ; 7,52 (s, 1H) ; 7,58-7,69 (m, 3H) ; 7,71 (d, 1H, ^3J = 8,5 Hz) ; 8,02 (m, 2H) ; 8,12 (d, 1H, ^3J = 6,5 Hz) ; 8,24 (ls, 1H) ; 8,42 (ls, 1H).

IDX16344

c[NH-$(CH_2)_3$-CO-D-Glu(tBu)-D-Trp(Boc)-D-Ala-D-Trp(Boc)-D-Leu-NH-$(CH_2)_2$-CO]



Formule brute : $C_{57}H_{79}N_9O_{13}$

Masse molaire (g/mol) : 1098,31

Masse monoisotopique (Da) : 1097,58

Quantité : 19 mg, **Rendement :** 15% (2 étapes), **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

HPLC analytique t_R : 2,16 min

SM (ESI) : m/z 1120,5 $[M+H+Na]^+$; 1098,4 $[M+H]^+$

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,75 (d, 3H, ^3J = 5,9 Hz) ; 0,82 (d, 3H, ^3J = 5,9 Hz) ; 1,25 (d, 3H, ^3J = 7,2 Hz) ; 1,38 (s, 9H) ; 1,41-1,79 (m, 25H) ; 2,04-2,26 (6H, m); 2,91-3,32 (m,

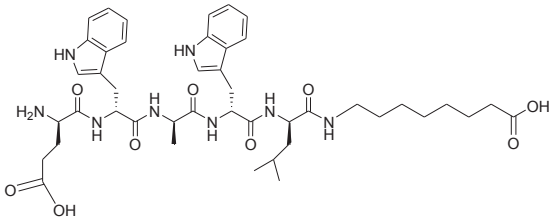
8H) ; 3,91-4,02 (m, 2H); 4,14 (1H, m) ; 4,35 (1H, m); 4,59 (1H, m) ; 7,21-7,38 (m, 4H) ; 7,48-7,78 (m, 5H) ; 8,00-8,16 (m, 4H) ; 8,31 (ls, 1H).

Procédure générale de déprotection

La déprotection des groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales du précurseur linéaire ou cyclique est réalisé par introduction, à 0°C, d'une solution de TFA/anisole/thioanisole (8/1/1 v/v/v) (5 mL/mmol) à 0°C. Après 3 h d'agitation, le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. Le produit brut est précipité par addition d'éther diéthylique, filtré puis purifié par HPLC préparative et lyophilisé pour obtenir des sels blancs.

IDX15694

H-D-Glu-D-Trp-D-Ala-D-Trp-D-Leu-NH-$(CH_2)_7$-COOH



Formule brute : $C_{44}H_{60}N_8O_9$

Masse molaire (g/mol) : 845,01

Masse monoisotopique (Da) : 844,45

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 959,03

Quantité : 14 mg, **Rendement :** 18% (2 étapes), **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

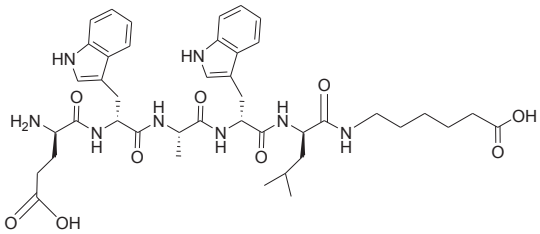
HPLC analytique t_R : 1,25 min

SM (ESI) : *m/z* 845,4 $[M+H]^+$

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6, 400K) : δ (ppm) 0,58 (d, 3H, ^3J = 6,4 Hz) ; 0,63 (d, 3H, ^3J = 6,5 Hz) ; 1,19-1,43 (m, 16H) ; 1,92 (m, 2H, CH_2) ; 2.17 (t, 2H, ^3J = 7,4 Hz) ; 2.33 (m, 2H) ; 2.90-3,10 (m, 4H) ; 3,12-3.18 (m, 2H) ; 3,71 (m, 1H) ; 4,29 à 4,39 (m, 2H) ; 4,57 à 4,62 (m, 2H) ; 6,90 (m, 2H, ^3J = 7,6 Hz) ; 7,03 (m, 2H, ^3J = 7,2 Hz) ; 7,18 (m, 2H) ; 7,51 (m, 2H) ; 7,71 (d, 2H, ^3J = 7,9 Hz) ; 7,96 (d, 1H, ^3J = 7,7 Hz) ; 8,02 (d, 1H, ^3J = 7,8 Hz) ; 8,39 (d, 1H, ^3J = 7,3 Hz) ; 8,53 (d, 1H, ^3J = 7,6 Hz) ; 10,83 (s, 2H).

IDX15710

H-D-Glu-D-Trp-D-Ala-D-Trp-D-Leu-NH-$(CH_2)_5$-COOH



Formule brute : $C_{42}H_{56}N_8O_9$

Masse molaire (g/mol) : 816,95

Masse monoisotopique (Da) : 816,42

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 930,97

Quantité : 37 mg, **Rendement :** 43% (2 étapes), **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

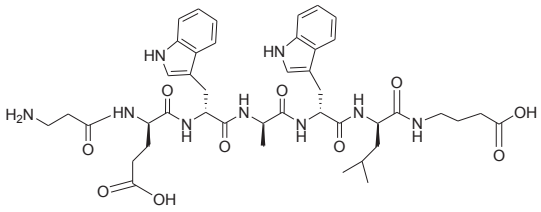
HPLC analytique t_R : 1,25 min

SM (ESI) : *m/z* 817,6 $[M+H]^+$; 409,2 $[M+2H]^{2+}$

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,80 (d, 3H, ^3J= 6,5 Hz) ; 0,85 (d, 3H, ^3J= 6,5 Hz) ; 1,20 à 1,56 (m, 12H) ; 1,95 (m, 2H, ^3J= 6,8 Hz, ^3J= 8,4 Hz) ; 2.17 (t, 2H, ^3J= 7,4 Hz) ; 2.37 (m, 2H) ; 2.89-3.18 (m, 6H) ; 3,76 (m, 1H) ; 4,24 (ddd, 1H, ^3J= 7,7 Hz) ; 4,34 (ddd, 1H, ^3J= 6,9 Hz, ^3J= 7,2 Hz) ; 4,56-4,68 (m, 2H) ; 6,93 à 7,11 (m, 5H) ; 7,18 (dd, 2H, ^3J= 7,7 Hz, ^4J= 2,1 Hz) ; 7,35 (m, 2H) ; 7,58 (m, 2H) ; 7,72 (d, 1H, ^3J= 7,1 Hz) ; 7,94-8,06 (m, 3H, ^3J= 7,9 Hz, ^3J= 7,7 Hz) ; 8,39 (d, 1H, ^3J= 7,2 Hz) ; 8,55 (d, 1H, ^3J= 7,7 Hz) ; 10,82 (s, 2H).

IDX16483

NH_2-$(CH_2)_2$-CO-D-Glu-D-Trp-D-Ala-D-Trp-D-Leu-NH-$(CH_2)_3$-COOH



Formule brute : $C_{43}H_{57}N_9O_{10}$

Masse molaire (g/mol) : 859,98

Masse monoisotopique (Da) : 859,42

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 974,00

Quantité : 19 mg, **Rendement :** 18% (2 étapes), **Pureté (HPLC 214 nm)** > 90%

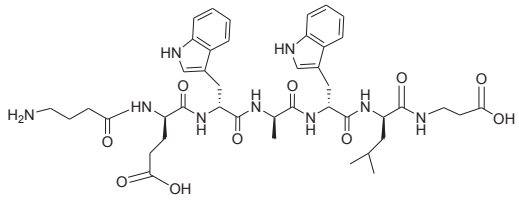
HPLC analytique t_R : 1,18 min

SM (ESI) : *m/z* 860,5 $[M+H]^+$; 430,9 $[M+2H]^{2+}$

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,79 (d, 3H, ^3J= 6,5 Hz) ; 0,84 (d, 3H, ^3J= 6,5 Hz) ; 1,14 (d, 3H, ^3J= 7,1 Hz) ; 1,35-1,58 (m, 5H) ; 1,72 (m, 2H) ; 2,14 (m, 4H) ; 2,44 (m, 2H) ; 2.89-3.19 (m, 8H) ; 4,22 (m, 3H); 4,48 (m, 2H) ; 6,72-7,11 (m, 6H) ; 7,21 (d, 2H, ^3J= 8,4 Hz) ; 7,45 (m, 2H) ; 7,61 (m, 1H) ; 7,94 (d, 1H, ^3J= 7,3 Hz) ; 8,12 (m, 1H) ; 8,18 (d, 1H, ^3J= 6,7 Hz) ; 8,71 (ls, 1H) ; 10,83 (ls, 1H) ; 10,92 (ls, 1H).

IDX16042

NH_2-$(CH_2)_3$-CO-D-Glu-D-Trp-D-Ala-D-Trp-D-Leu-NH-$(CH_2)_2$-COOH



Formule brute : $C_{43}H_{57}N_9O_{10}$

Masse molaire (g/mol) : 859,98

Masse monoisotopique (Da) : 859,42

Masse molaire du sel de TFA (g/mol) : 974,00

Quantité : 35 mg, **Rendement :** 39% (2 étapes), **Pureté (HPLC 214 nm)** > 90%

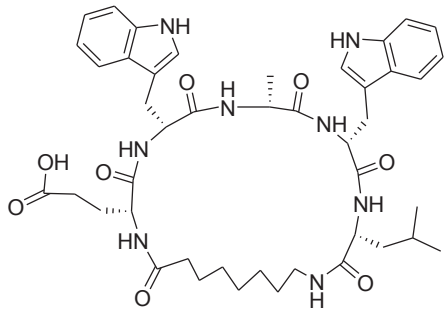
HPLC analytique t_R : 1,15 min

SM (ESI) : *m/z* 860,4 $[M+H]^+$; 430,8 $[M+2H]^{2+}$

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,77 (d, 3H, ^3J = 6,4 Hz) ; 0,82 (d, 3H, ^3J = 6,3 Hz) ; 1,14 (d, 3H, ^3J = 7,0 Hz); 1,43-1,51 (m, 3H); 1,70-1,86 (m, 4H) ; 2,07 à 2,23 (6H, m) ; 2,72 (2H, m) ; 2.92-3.23 (6H, m) ; 4,17-4,23 (3H, m); 4,42-4,51 (2H, m) ; 6,90-7,11 (m, 4H) ; 7,12 (d, 2H, ^3J = 7,2 Hz) ; 7,33 (m, 2H) ; 7,56 (m, 2H) ; 7,70 (ls, 1H) ; 7,94 (ls, 1H) ; 8,17 (d, 1H, ^3J = 6,9 Hz) ; 8,24 (d, 1H, ^3J = 7,8 Hz) ; 8,48 (d, 1H, ^3J = 6,5Hz) ; 10,85 (s, 1H) ; 10,92 (s, 1H).

IDX15849

c[NH-D-Glu-D-Trp-D-Ala-D-Trp-D-Leu-NH-$(CH_2)_7$-CO]



Formule brute : $C_{44}H_{58}N_8O_8$

Masse molaire (g/mol) : 826,98

Masse monoisotopique (Da) : 826,44

Quantité : 17 mg, **Rendement :** 23% (3 étapes), **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

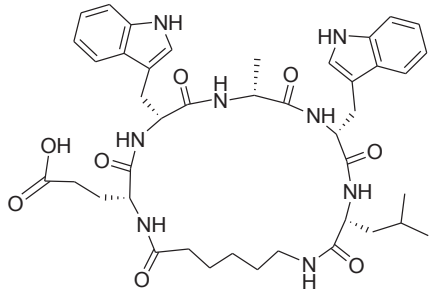
HPLC analytique t_R : 1,42 min

SM (ESI) : m/z 827,6 $[M+H]^+$.

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,75 (d, 3H, ^3J = 6,2 Hz,) ; 0,82 (d, 3H, ^3J = 7,3 Hz) ; 1,12-1,22 (m, 9H) ; 1,31 (m, 3H) ; 1,41-1,61 (m, 4H) ; 1,66 (m, 2H) ; 2,02-2,13 (m, 4H) ; 2,71-3,21 (m, 6H) ; 3,98 (m) ; 4,15 (m, 1H) ; 4,32 (m, 1H) ; 4,49 (m, 1H) ; 6,92-7,19 (m, 5H) ; 7,22 (d, 2H, , ^3J = 7,8 Hz) ; 7,45 (d, 2H, , ^3J = 7,8 Hz) ; 7,61 (ls, 1H) ; 8,11 (ls, 2H) ; 10,85 (s, 2H).

IDX15921

c[NH-D-Glu-D-Trp-D-Ala-D-Trp-D-Leu-NH-$(CH_2)_5$-CO]



Formule brute : $C_{42}H_{54}N_8O_8$

Masse molaire (g/mol) : 798,94

Masse monoisotopique (Da) : 798,41

Quantité : 26 mg, **Rendement :** 28% (3 étapes), **Pureté (HPLC 214 nm)** > 95%

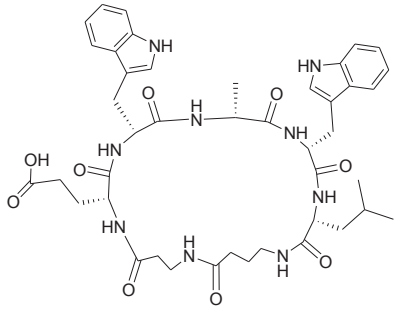
HPLC analytique t_R : 1,38 min

SM (ESI) : m/z 799,5 $[M+H]^+$

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,77 (d, 3H, ^3J = 6,2 Hz) ; 0,79 (d, 3H, ^3J = 6,3 Hz) ; 1,11-1,32 (m, 6H) ; 1,38-1,43 (m, 4H) ; 1,51-1,60 (m, 2H) ; 1,62-1,78 (m, 2H) ; 2,05-2,13 (m, 4H) ; 2,69-3,27 (m, 6H) ; 3,89-4,01 (m, 2H) ; 4,13 (dd, 1H, ^3J = 5,2 Hz, ^3J = 7,7 Hz) ; 4,41 (m, 1H) ; 4,61 (m, 1H) ; 6,93-7,20 (m, 5H) ; 7,22-7,42 (m, 4H) ; 7,52 (d, 2H, ^3J = 7,2 Hz) ; 7,58 (d, 2H, , ^3J = 7,3 Hz) ; 8,01-8,10 (m, 2H) ; 8,45 (ls, 1H) ; 10,83 (ls, 2H).

IDX16077

c[NH-$(CH_2)_2$-CO-D-Glu(tBu)-D-Trp(Boc)-D-Ala-D-Trp(Boc)-D-Leu-NH-$(CH_2)_3$-CO]



Formule brute : $C_{43}H_{55}N_9O_9$

Masse molaire (g/mol) : 841,96

Masse monoisotopique (Da) : 841,41

Quantité : 14 mg, **Rendement :** 18% (3 étapes), **Pureté (HPLC 214 nm)** > 90%

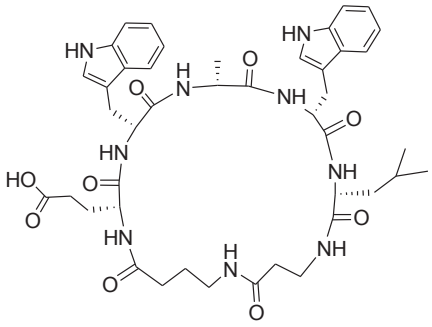
HPLC analytique t_R : 1,30 min

SM (ESI) : *m/z* 864,6 $[M+H+Na]^+$; 842,6$[M+H]^+$

RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,77 (d, 3H, ^3J = 6,3 Hz) ; 0,83 (d, 3H, ^3J = 6,5 Hz) ; 1,17 (d, 3H, ^3J = 7,1 Hz) ; 1,19-1,75 (m, 9H) ; 2,01-2,19 (m, 6H) ; 2,22 (m, 1H) ; 2,73 (m, 1H) ; 2,85-3,20 (m, 5H) ; 3,99 (m, 1H) ; 4,12 (m, 2H) ; 4,30 (m, 1H) ; 4,51 (m, 1H) ; 6,95-7,10 (m, 6H) ; 7,22 (d, 2H, ^3J = 8,1 Hz) ; 7,34 (ls, 1H) ; 7,45 (m, 2H) ; 7,52 (m, 1H) ; 7,63 (ls, 1H) ; 8,10 (ls, 1H) ; 8,22 (ls, 1H) ; 10,82 (s, 2H).

IDX16315

c[NH-(CH$_2$)$_3$-CO-D-Glu(tBu)-D-Trp(Boc)-D-Ala-D-Trp(Boc)-D-Leu-NH-(CH$_2$)$_2$-CO]



Formule brute : $C_{43}H_{55}N_9O_9$

Masse molaire (g/mol) : 841,96

Masse monoisotopique (Da) : 841,41

Quantité : 24 mg, **Rendement :** 25% (3 étapes), **Pureté (HPLC 214 nm)** > 90%

HPLC analytique t_R : 1,29 min

SM (ESI) : *m/z* 864,6 $[M+H+Na]^+$; 842,6$[M+H]^+$

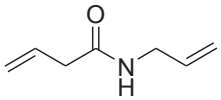
RMN^{1}H (400MHz, DMSO-d^6) δ 0,77 (d, 3H, ^3J = 6,3 Hz) ; 0,83 (d, 3H, ^3J = 6,3 Hz) ; 1,17 (d, 3H, ^3J = 7,2 Hz) ; 1,19-1,75 (m, 9H) ; 2,01-2,19 (m, 6H) ; 2,21 (m, 1H) ; 2,71 (m, 1H) ; 2,92-3,19 (m, 5H) ; 4,05-4,41 (m, 5H) ; 6,82-6,89 (m, 6H) ; 7,12 (s, 2H) ; 7,21 (t, 2H, ^3J = 8,5 Hz) ; 7,34 (d, 1H, ^3J = 7,6 Hz) ; 7,49 (d, 1H, ^3J = 7,8 Hz) ; 7,66 (m, 1H) ; 8,10 (ls, 1H) ; 8,22 (ls, 1H); 8,48 (ls, 1H).

V.D. Synthèse de pseudopeptides cycliques par cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante

V.D.1.1. Synthèse du *cis*-Apa

N-allylbut-3-énamide (79)[20]

A une solution de EDC.HCl (489 mg, 2.55 mmol, 1,1 éq.) dans du DMF (13 mL) est ajoutée lentement à 0°C de la DIEA (197 µl, 2.55 mmol, 1,1 éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 5 min puis sont additionnés à -10°C, de l'acide 3-buténoique (200 mg, 2.32 mmol) et de l'HOBt (426 mg, 2.78 mmol). Après 30 min d'agitation, de l'allylamine (197 µl, 2.55 mmol, 1,1 éq.) est ajoutée à -10°C. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant une nuit à température ambiante puis évaporé. Le résidu est solubilisé dans de l'acétate d'éthyle, lavé successivement avec une solution aqueuse de $KHSO_4$ 10% (2x), de NaCl (2x) et de $NaHCO_3$ (2x). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée à sec pour obtenir l'amide **79**.



Formule brute : $C_7H_{11}NO$

Masse molaire (g/mol) : 125,17

Quantité : 290 mg, **Rendement :** 74%, **Aspect :** huile incolore

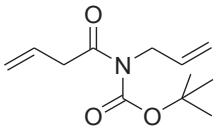
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,01 (d, 2H, ^3J = 7.1 Hz) ; 3.86 (m, 2H) ; 5.24-5.12 (m, 4H) ; 5.99-5.74 (m, 2H).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 41,7 ; 42.0 ; 116.6 ; 120.2 ; 131.3 ; 134.3 ; 170.32.

SM (ESI) : *m/z* 125,9 $[M+H]^+$

tert-butyl allylbut-3-énoylcarbamate (83)

A une solution de N-allyl-3-buténamide **79** (1 g, 8 mmol, 1 éq.) dans du DCM (50 mL) sous azote, est ajouté du Boc_2O (5.24 g, 24 mmol, 3 éq.) et de la DMAP (97.6 mg, 0.8 mmol, 0,1 éq.). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24 h. Le mélange est ensuite extrait avec du DCM (100 mL) et la phase organique est lavée successivement avec une solution aqueuse de $KHSO_4$ 10% (2x), de NaCl (2x) et de $NaHCO_3$ (2x). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et évaporée à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant: cyclohexane/AcOEt: 9/1) pour donner l'amide protégé **83**.



Formule brute : $C_{12}H_{19}NO_3$

Masse molaire (g/mol) : 225,28

R_f (cyclohexane-AcOEt: 9/1) 0,57

Quantité : 1,56 g, **Rendement :** 87%, **Aspect :** huile incolore

RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,51 (s, 9H) ; 3,66 (d, 2H, ^3J = 6.7 Hz) ; 4,28 (d, 2H, ^3J = 7.0 Hz) ; 5,16-5,10 (m, 4H) ; 5.84-5.73 (m,1H) ; 6.05-5.94 (m, 1H).

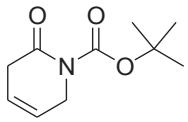
RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 27,7 ; 42,6 ; 46,2 ; 82,8 ; 116,1 ; 117,6 ; 131,3 ; 133,0 ; 152,7 ; 173,4.

SM (ESI) : *m/z* 226,1 $[M+H]^+$

HRMS (ESI): calculée pour $C_{12}H_{20}NO_3$ $[M + H]^+$ 226.1443, observée 226.1440.

***tert*-butyl 5,6-dihydro-6-oxopyridine-1(2H)-carboxylate (84)**

Dans un réacteur micro-onde, une solution d'amide protégé **83** (1.1 g, 4.89 mmol, 1 éq.) et de catalyseur de Grubbs II **85** (166 mg, 0.20 mmol, 0,04 éq.) dans du DCM anhydre (14 mL) sont introduits. Le réacteur est scellé par une capsule puis le milieu réactionnel est irradié à 60°C pendant 30 min. Le milieu réactionnel est extrait à sec puis purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant: cyclohexane/AcOEt: gradient 9/1 à 7/3) pour donner le lactame protégé **83**.

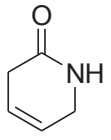


Formule brute : $C_{10}H_{15}NO_3$
Masse molaire (g/mol) : 197,23
R_f (cyclohexane/EtOAc: 1/1) 0,52

Quantité : 595 mg, **Rendement :** 62%, **Aspect :** Huile marron
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1,53 (s, 9H) ; 3.11-3.07 (m, 2H) ; 4.25-4.21 (m, 2H) ; 5.81-5.72 (m,2H).
RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 28.1 ; 35.1 ; 47.0 ; 83.4 ; 121.5 ; 122.2 ; 151.9 ; 168.5.
SM (ESI) : *m/z* 198,1 $[M+H]^+$
HRMS (ESI): calculé pour $C_{10}H_{16}NO_3$ $[M + H]^+$ 198.1130, observée 198.1121.

1,6-dihydropyridin-2(3H)-one (78)[20]

Dans un réacteur micro-onde, une solution d'amide **79** (2 g, 16 mmol, 1 éq.) et de catalyseur d' Hoveyda Grubbs II **86** (1 g, 1.6 mmol, 0,1 éq.) dans du DCM anhydre (72 mL) sont introduits. Le réacteur est scellé par une capsule puis le milieu réactionnel est irradié à 110°C pendant 10 min. Le milieu réactionnel est extrait à sec puis purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant: AcOEt) pour donner le lactame **78**.

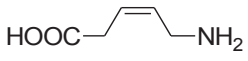


Formule brute : C_5H_7NO
Masse molaire (g/mol) : 97,12
R_f (EtOAc: 1) 0,12

Quantité : 971 mg, **Rendement :** 63%, **Aspect :** solide marron
RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,92-2,96 (m, 2H) ; 3,89-4,01 (m, 2H) ; 5,77 (ls,2H).
RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) δ 31.0 ; 43.6 ; 120.3 ; 121.9 ; 169.2.
SM (ESI) : *m/z* 98,9 $[M+H]^+$

(Z)-acide 5-aminopent-3-énoic (71)[12]

Une solution de lactame **78** (594 mg, 3.03 mmol, 1 éq.) dans une solution aqueuse d'HCl 1N (16 mL) est chauffé à reflux pendant 1 h. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé à sec pour donner l'acide aminé **71** sous forme de sel de chlorhydrate.

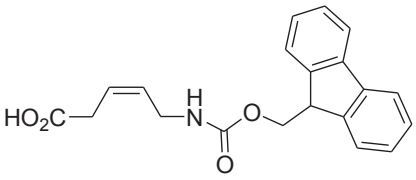


Formule brute : $C_5H_9NO_2$
Masse molaire (g/mol) : 115,13
Masse molaire du sel de chlorhydrate : 151,59

Quantité : 478 mg, **Rendement :** quantitatif, **Aspect :** solide blanc
RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ 3,25 (ld, 2H, ^3J = 6.6 Hz) ; 3,66 (bd, 2H, ^3J = 7.1 Hz) ; 5,64-5,77 (m, 1H) ; 5,87-6,04 (m, 1H).
RMN ^{13}C (300 MHz, D_2O) δ 29,8 ; 33,6 ; 121,5 ; 125,9 ; 173,15.
SM (ESI) : *m/z* 116,2 $[M+H]^+$

(Z)-acide 5-[[(9H-fluoren-9-ylméthoxy)carbonyl]amino]-pent-3-énoique (70)

A une solution d'aminoacides **70** (562 mg, 3,02 mmol, 1 éq.) dans un mélange eau/acétone (1/1) (20 mL) est ajouté du $NaHCO_3$ (277 mg, 9,97 mmol, 3,3 éq.) puis du 9-Fluorénylméthoxycarbonyl-N-hydroxysuccinimide (1,1 g, 3,02 mmol, 1 éq.) solubilisé dans de l'acétone (4 mL). Après 6 h sous agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré, dilué avec de l'AcOEt puis acidifié avec une solution aqueuse d'HCl 1 N, à 0°C, jusqu'à pH=1. La phase aqueuse est extraite trois fois à l'AcOEt et les phases organiques sont regroupées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et évaporées à sec. Le résidu est recristallisé dans un mélange DCM/cyclohexane pour donner l'acide aminé protégé **70**.



Formule brute : $C_{20}H_{19}NO_4$
Masse molaire (g/mol) : 337,37

Quantité : 763 mg, **Rendement :** 75%, **Aspect :** solide blanc
RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d^6) δ 3,08 (bd, 2H, ^3J =6.7 Hz) ; 3,62 (bd, 2H, ^3J = 5.8 Hz) ; 4,21-4,31 (m, 3H) ; 5,43-5,63 (m, 2H) ; 7,30-7,41 (m, 4H) ; 7,67 (d, 2H, ^3J =7,3 Hz,) ; 7,88

(d, 2H , ^{3}J =7,4 Hz,)

RMN ^{13}C (300 MHz, DMSO-d^{6}) δ 25,4 ; 32,8 ; 37,6 ; 46,9 ; 65,6 ; 120,3 ; 124,0 ; 125,4 ; 126,8 ; 127,8 ; 129,4 ; 141,1 ; 156,3 ; 172,5.

SM (ESI) : *m/z* 338,1 $[M+H]^+$.

HRMS (ESI): calculée pour $C_{20}H_{20}NO_4$ $[M + H]^+$ 338.1392, observée 338.1396.

V.D.1.2. Synthèse des pseudopeptides cycliques par cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante

Procédure générale de la synthèse des précurseurs linéaires sur phase solide (89a-92a) et (89b-92b)

La procédure générale de synthèse des peptides ainsi que les techniques mises en oeuvre sont identiques à celles développées dans le chapitre 2, méthode A. Deux types de résine ont été étudiés, la résine Wang-Gly (100-20 mesh, 0,69 mmol/g) **89a-92a** et la résine Rink Amide-ChemMatrix (100-200 mesh dry, 0,47mmol/g) **89b-92b**.

Procédure générale de la réaction de cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante (RCM) au Quest (93a-96a) et (93b-96b)

Après séchage de la résine sous vide pendant une nuit, la résine **89a-92a** ou **89b-92b** (150 mg) est placée dans un réacteur puis mise en suspension dans du DCM dégazé (5 mL/0,1 mmol). Du catalyseur de Grubbs II **85** (30 mol%) ou Hoveyda-Grubbs II **86** (30 mol%) est ajouté et la suspension est chauffée à reflux pensant 48 h sous argon. Après retour à température ambiante, la suspension de résine est filtrée, la résine est lavée au DCM (2x) puis le filtrat est évaporé à sec et analysé en LC/MS.

Procédure générale de la réaction de cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante (RCM) au micro-onde (96b)

Après séchage de la résine sous vide pendant une nuit, la résine **92b** (150 mg, 0,071 mmol) est placée dans un réacteur puis mise en suspension dans du DCM dégazé (3,6 mL). Du catalyseur de Grubbs II **85** (25,5 mg, 0,03 mmol) est ajouté et le milieu réactionnel est irradié à une température et un temps spécifique. Après retour à température ambiante, la suspension de résine est filtrée, la résine est lavée au DCM (2x) puis le filtrat est évaporé à sec et analysé

en LC/MS.

Ac-c[Ag-Arg(Pbf)-Gly-Asp(tBu)-Apa] (93)

SM (ESI) : *m/z* 805,5 $(M + H)^+$; 375,2 $[M+2H-t\text{Bu}]^{2+}$

Ac-c(D-Ag-Arg(Pbf)-Gly-Asp(tBu)-Apa) (94)

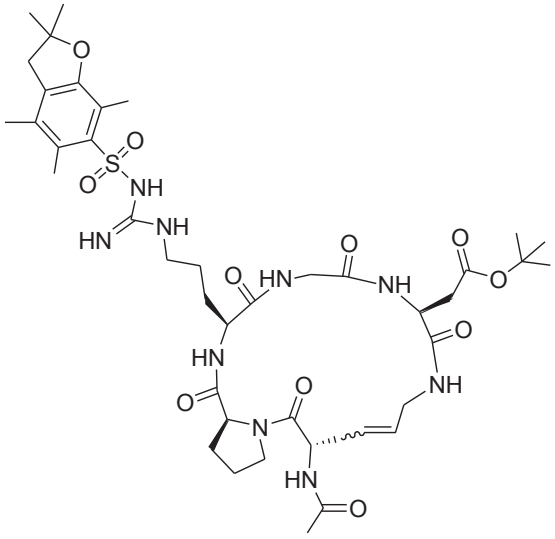
SM (ESI) : *m/z* 805,5 $(M + H)^+$; 375,2 $[M+2H-t\text{Bu}]^{2+}$

Ac-c(Ag-Arg(Pbf)-Gly-Asp(tBu)-Pro-Apa) (95)

SM (ESI) : *m/z* 902,5 $[M + H]^+$, 423,7 $[M+2H-t\text{Bu}]^{2+}$

Ac-c(Ag-Pro-Arg(Pbf)-Gly-Asp(tBu)-Apa) (96)

Le pseudopeptide cyclique **96** a été purifié par HPLC preparative puis lyophilisé.



Formule brute : $C_{42}H_{63}N_9O_{11}S$

Masse molaire (g/mol) : 902,07

Masse monoisotopique (g/mol) : 901,44

Quantité : 6 mg, **Rendement :** 9%, **Aspect :** solide blanc

RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d^6) δ 1,23-1,47 (m, 20H) ; 1,57 (m, 2H) ; 1,66-1,85 (m, 8H) ; 1.98 (s, 3H) ; 2,16 (m, 2H) ; 2,60-2,42 (m, 2H) ; 2,88 (s, 2H) ; 3,06 (m, 2H) ; 3,26-3,32 (m, 4H) ; 3,81 (m, 1H) ; 3,96 (m, 2H) ; 4,30 (m, 1H) ; 4,31 (m, 1H) ; 4,79-4,7 (m, 1H) ; 5,52-5,47 (m, ^3J = 15,7 Hz, 1H) ; 5,54-5,52 (m, ^3J = 15,5 Hz, 1H) ; 6,41 (bs, 1H) ; 7,70 (m, 1H) ; 8,06 (d, ^3J = 9,7 Hz, 1H) ; 8,18 (d, ^3J = 7,5 Hz, 1H) ; 8,55 (s, 1H) ; 8,65 (m, 1H).

SM (ESI) : *m/z* 902,5 $[M + H]^+$, 4237 $[M+2H-tBu]^{2+}$

HRMS (ESI): calculée pour $C_{42}H_{64}N_9O_{11}S$ $[M + H]^+$ 902.4446, obervée 902.4449.

V.E. Protocole des études de stabilité d'IDX15921

Le protocole et les techniques mises en oeuvre pour réaliser cette étude sont identiques à celles développées dans les chapitres 2, paragraphe VII.E.

Après extraction du composé IDX15971 du milieu de culture par une résine de type « catch and release » cartouche OASIS® HLB, Waters, aux différents temps d'incubation, les fractions ont été lyophilisées et analysées en LC/MS. Sur la Figure 76 ci-dessous est représentée les analyses LC/MS des fractions aux temps T_0 et T_{4j}, après traitement. Les analyses LC/MS montrent seulement la présence du macrocycle IDX15921 en plus des signaux correspondant au milieu de culture (CM). Aucun sous-produit de dégradation n'a été observé. Les analyses au temps T_{1j}, T_{2j} et T_{3j} ont présenté le même profil.

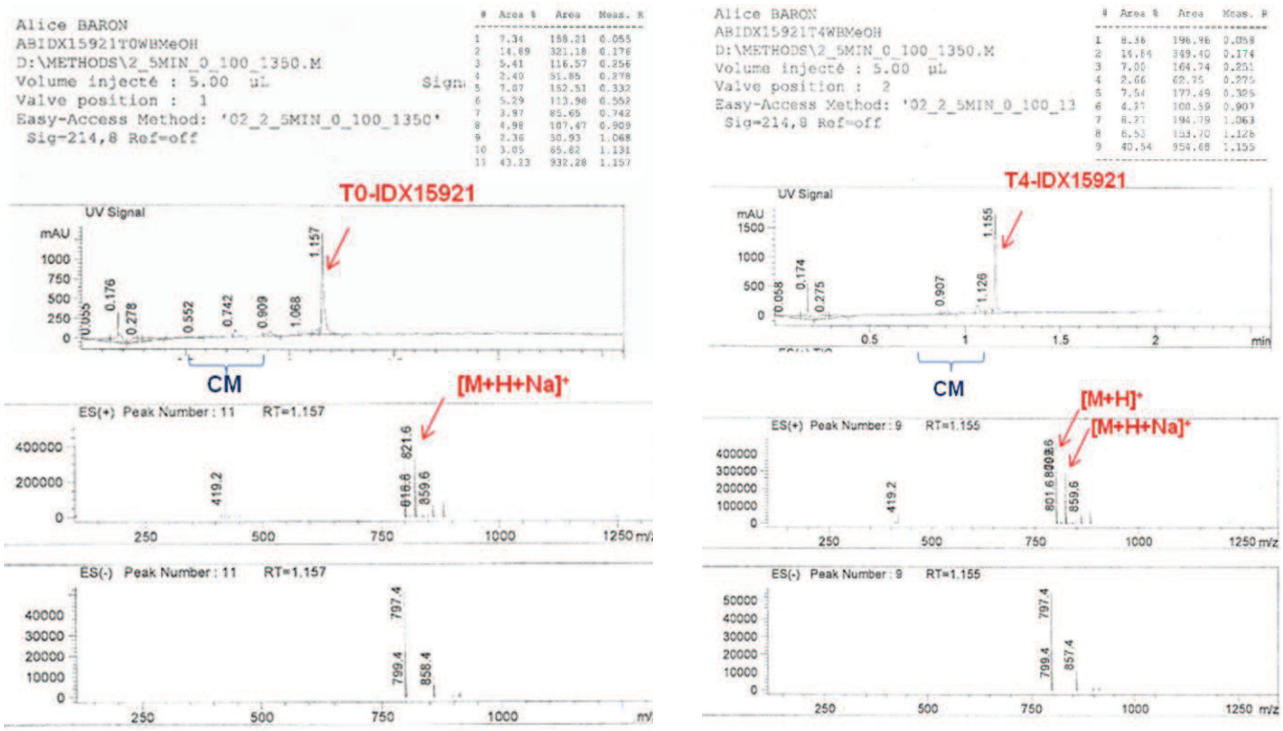


Figure 76. Analyses LC/MS de IDX15921 aux temps T_0 (à gauche) et T_{4j} (à droite)

Références Bibliographiques

1. Lambert, J. N.; Mitchell, J. P.; Roberts, K. D., The synthesis of cyclic peptides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001,** (5), 471-484.

2. Bijani, C.; Varray, S.; Lazaro, R.; Martinez, J.; Lamaty, F., et al., Cyclic RGD peptide by ring-closing metathesis. *Tetrahedron Lett.* **2002,** *43* (20), 3765-3767.

3. Pernerstorfer, J., Cyclisation/cleavage of macrocycles by ring-closing metathesis on solid support-conformational studies. *Chem. Com.* **1997,** (20), 1949-1950.

4. Moriggi, J. D.; Brown, L. J.; Castro, J. L.; Brown, R. C. D., Ring-closing metathesis: development of a cyclisation-cleavage strategy for the solid-phase synthesis of cyclic sulfonamides. *Org. Biomol. Chem.* **2004,** *2* (6), 835-844.

5. van Maarseveen, J. H.; den Hartog, J. A. J.; Engelen, V.; Finner, E.; Visser, G., et al., Solid phase ring-closing metathesis: Cyclization/cleavage approach towards a seven membered cycloolefin. *Tetrahedron Lett.* **1996,** *37* (45), 8249-8252.

6. Veerman, J. J. N.; Maarseveen, J. H. v.; Visser, G. M.; Kruse, C. G.; Schoemaker, H. E., et al., Ring-Closing Metathesis on Solid Support: Elaboration of a Cyclization/Cleavage Strategy Towards Unsaturated &agr;-Ester-Substituted N-Heterocycles. *Eur. J. Org. Chem.* **1998,** *1998* (11), 2583-2589.

7. Piscopio, A. D.; Miller, J. F.; Koch, K., Solid phase heterocyclic synthesis via ring closing metathesis: Traceless linking and cyclative cleavage through a carbon-carbon double bond. *Tetrahedron Lett.* **1997,** *38* (41), 7143-7146.

8. Piscopio, A. D.; Miller, J. F.; Koch, K., Ring closing metathesis in organic synthesis: Evolution of a high speed, solid phase method for the preparation of [beta]-turn mimetics. *Tetrahedron* **1999,** *55* (27), 8189-8198.

9. Park, K. H.; Kurth, M. J., Cycle-elimination release strategies applied to solid-phase organic synthesis in drug discovery. *Drugs of the Future* **2000,** *25* (12), 1265-1294.

10. Marsault, E.; Hoveyda, H. R.; Peterson, M. L.; Saint-Louis, C.; Landry, A., et al., Discovery of a New Class of Macrocyclic Antagonists to the Human Motilin Receptor. *J. Med. Chem.* **2006,** *49* (24), 7190-7197.

11. Ulman, M.; Grubbs, R. H., Relative reaction rates of olefin substrates with ruthenium(II) carbene metathesis initiators. *Organometallics* **1998,** *17* (12), 2484-2489.

12. Allan, R.; Johnston, A.; Kazlauskas, R., Synthesis of Analogues of GABA. XIII. An Alternative Route to (Z)-4-Aminocrotonic Acid. *Aust. J. Chem.* **1985,** *38* (11), 1647-1650.

13. Dickenson, H. W.; Allan, R. D.; Ong, J.; Johnston, G. A. R., GABAB-RECEPTOR ANTAGONIST AND GABAA-RECEPTOR AGONIST PROPERTIES OF A DELTA-AMINOVALERIC ACID-DERIVATIVE, Z-5-AMINOPENT-2-ENOIC ACID. *Neuroscience Lett.* **1988,** *86* (3), 351-355.

14. Perlman, N.; Albeck, A., Efficient and stereospecific synthesis of (z)-Hex-3-enedioic acid, a key intermediate for Gly-Gly cis olefin isostere. *Synthetic Com.* **2000,** *30* (24), 4443-4449.

15. Perlman, N.; Hazan, M.; Shokhen, M.; Albeck, A., Peptidyl epoxides extended in the P ' direction as cysteine protease inhibitors: Effect on affinity and mechanism of inhibition. *Bioorg. Med. Chem.* **2008,** *16* (19), 9032-9039.

16. Garro-Helion, F.; Guibe, F., New potential access to ethylenic pseudodipeptides through catalytic alkene metathesis. *Chem. Com.* **1996,** (5), 641-642.

17. Vo-Thanh, G.; Boucard, V.; Sauriat-Dorizon, H.; Guibe, F., Ring closing metathesis of unsaturated amides as a route to short and medium-sized unsaturated lactams and to ethylenic pseudopeptides. *Synlett* **2001,** (1), 37-40.

18. Boucard, V.; Sauriat-Dorizon, H.; Guibe, F., An access to (Z)-ethylenic pseudodipeptides based on ring-closing metathesis. *Tetrahedron* **2002,** *58* (36), 7275-7290.

19. Montalbetti, C.; Falque, V., Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005,** *61* (46), 10827-10852.

20. Arrayas, R. G.; Alcudia, A.; Liebeskind, L. S., Facile enantiodivergent approach to 5-hydroxy-5,6-dihydro-2(1H)-pyridones. First total synthesis of both enantiomers of pipermethystine. *Org. Lett.* **2001,** *3* (21), 3381-3383.

21. Chaleix, V.; Sol, V.; Guilloton, M.; Granet, R.; Krausz, P., Efficient synthesis of RGD-containing cyclic peptide-porphyrin conjugates by ring-closing metathesis on solid support. *Tetrahedron Lett.* **2004,** *45* (27), 5295-5299.

22. Auzzas, L.; Zanardi, F.; Battistini, L.; Burreddu, P.; Carta, P., et al., Targeting alpha(v)beta(3) Integrin: Design and Applications of Mono- and Multifunctional RGD-Based Peptides and Semipeptides. *Curr. Med. Chem.* **2010,** *17* (13), 1255-1299.

23. Schmiedeberg, N.; Kessler, H., Reversible backbone protection enables combinatorial solid-phase ring-closing metathesis reaction (RCM) in peptides. *Org. Lett.* **2002,** *4* (1), 59-62.

24. Stymiest, J. L.; Mitchell, B. F.; Wong, S.; Vederas, J. C., Synthesis of biologically active dicarba analogues of the peptide hormone oxytocin using ring-closing metathesis. *Org. Lett.* **2003,** *5* (1), 47-49.

25. Stymiest, J. L.; Mitchell, B. F.; Wong, S.; Vederas, J. C., Synthesis of oxytocin analogues with replacement of sulfur by carbon gives potent antagonists with increased stability. *J. Org. Chem.* **2005,** *70* (20), 7799-7809.

26. Brik, A., Metathesis in peptides and peptidomimetics. *Adv. Synth. Catal.* **2008,** *350* (11-12), 1661-1675.

27. Illesinghe, J.; Guo, C. X.; Garland, R.; Ahmed, A.; van Lierop, B., et al., Metathesis assisted synthesis of cyclic peptides. *Chem. Com.* **2009,** (3), 295-297.

28. Reichwein, J. F.; Versluis, C.; Liskamp, R. M. J., Synthesis of cyclic peptides by ring-closing metathesis. *J. Org. Chem.* **2000,** *65* (19), 6187-6195.

29. Garcia-Martin, F.; Quintanar-Audelo, M.; Garcia-Ramos, Y.; Cruz, L. J.; Gravel, C., et al., ChemMatrix, a poly(ethylene glycol)-based support for the solid-phase synthesis of complex peptides. *J. Comb. Chem.* **2006,** *8* (2), 213-220.

30. Robinson, A. J.; Elaridi, J.; Van Lierop, B. J.; Mujcinovic, S.; Jackson, W. R., Microwave-assisted RCM for the synthesis of carbocyclic peptides. *J. Pept. Sci.* **2007,** *13* (4), 280-285.

31. Varray, S.; Gauzy, C.; Lamaty, F.; Lazaro, R.; Martinez, J., Synthesis of cyclic amino acid derivatives via ring closing metathesis on a poly(ethylene glycol) supported substrate. *J. Org. Chem.* **2000,** *65* (20), 6787-6790.

32. Varray, S.; Lazaro, R.; Martinez, J.; Lamaty, F., A New Soluble Polymer-Supported Sulfonyl Linker − Application to the Synthesis of Cyclic α-Amino Acids. *Eur. J. Org. Chem.* **2002,** *2002* (14), 2308-2316.

Conclusion générale

Le travail présenté dans ce mémoire a été consacré à la synthèse d'analogues peptidiques, dans l'espoir de découvrir de nouveaux composés actifs pour la lutte contre le virus de l'immunidéficience humaine.

La génération de D-peptides inhibiteurs de fusion, résistants aux protéases, décrits dans le chapitre 1, constitue une alternative prometteuse dans le développement de nouveaux traitements anti-VIH. Des travaux récents ont permis d'établir une séquence consensuelle de D-peptides $cx_{3/5}$ewxwlc. Ces D-peptides sont constitués d'une partie 10-mer, pour le D-peptide D10-P1-2K, ou 8-mer commune pour les deux D-peptides les plus actifs IDX15971 (PIE7) et IDX16761 (PIE14). Tous sont cyclisés par un pont disulfure et présentent quatre résidus récurrents : **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13** (Tableau 33).

D-Peptide	Séquences 8-mer et 10-mer	Littératue CI_{50} (µM)	SPI-Bio CE_{50} (µM)
D10-P1-2K	Ac-k k g a **c** e a r h r **e w** a **w l c** a a -NH_2	**85**	**-**
PIE7/ IDX15971	Ac- k g a **c** d y p **e w** q **w l c** a a -NH_2	**0,620**	**12,5**
PIE14/IDX16761	Ac- h p **c** d y p **e w** q **w l c** r l g k -NH_2	**0,033**	**0,2**
Par analogie au 10-mer	**1 c 9 10 12 13 c 16**		

Tableau 33. D-peptides 8-mer et 10-mer

Basé sur cette approche, notre travail a consisté dans un premier temps, à mettre en évidence et à comprendre les caractéristiques essentielles à l'activité de ces composés de référence. Cette étude a fait l'objet du chapitre 2. Des études de modélisation ainsi que la synthèse et l'évaluation biologique d'anologues de ces D-peptides ont montré l'importance des quatre aminoacides récurrents **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13**. Les trois résidus **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13** inclus dans la poche hydrophobe de la glycoprotéine virale, et le résidu **D-Glu-9**, interagissent par des interactions de type hydrophobe, π-stacking, cation π ou par liaison hydrogène avec des résidus de la protéine situés dans et aux bords de la poche. De plus, l'importance de la contrainte conformationnelle apportée par la structure cyclique sur l'activité de ces D-peptides a été prouvée et enfin, il est apparu clairement que les extrémités *N*- et *C*- terminales gouvernent les modifications structurales de la partie cyclique.

Par la suite, nos efforts se sont concentrés sur l'optimisation de l'activité du D-peptide de référence IDX15971, puis celle du D-peptide IDX16761. Au total, 40 analogues cycliques ont été synthétisés et évalués biologiquement. Plusieurs modifications ont été envisagées et mises en œuvre par la synthèse de plusieurs composés de chaque série. Ces études sont décrites dans le chapitre 3. Ainsi, nous avons réalisé la synthèse de séquences rétro, inverso, rétro-inverso, et celle d'analogues 7-mer. Par ailleurs, nous avons apporté des modifications au niveau des chaînes latérales de la **D-Leu-13** et du **D-Trp-10** du D-peptide IDX15971, puis du D-peptide IDX16761.

Les séquences rétro, inverso et rétro-inverso n'ont pas montré d'activité antivirale. Il en a été de même pour les séquences 7-mer, nos premiers essais de diminution de la taille de la séquence peptidique n'ont donc pas été concluants.

Par contre, les modifications réalisées au niveau des chaînes latérales de la **D-Leu-13** et du **D-Trp-10** du D-peptide IDX15971 ont conduit à des analogues actifs. Concernant les peptides dont la **D-Leu-13** a été modifiée, les meilleures activités ont été observées pour les composés IDX17525 et IDX17474 qui possédent les groupements cyclobutyle et cyclohexyle sur les chaînes latérales de l'analogue aminoacide (Figure 77). Parmi les analogues du **D-Trp-10** insérés dans le D-peptide de référence, trois des composés ont conduit également à une meilleure activité. Il s'agit des peptides IDX18317 et IDX18627, incorporant un noyau indole bromé en position C5 ou un noyau phényl bromé en position ortho ainsi que du peptide IDX18167 incorporant le groupement 1-naphtyl sur la chaîne latérale de l'aminoacide (Figure 77). En ce qui concerne le composé IDX18627, la séparation des deux diastéréoisomères par HPLC préparative est actuellement en cours et ce, afin d'évaluer l'activité de l'analogue énantiopur.

L'activité du composé IDX18630 a permis de corroborer les résultats précédents puisque l'incorporation des deux analogues les plus actifs dans la séquence du D-peptide IDX15971, a induit une amélioration de l'activité.(Figure 77)

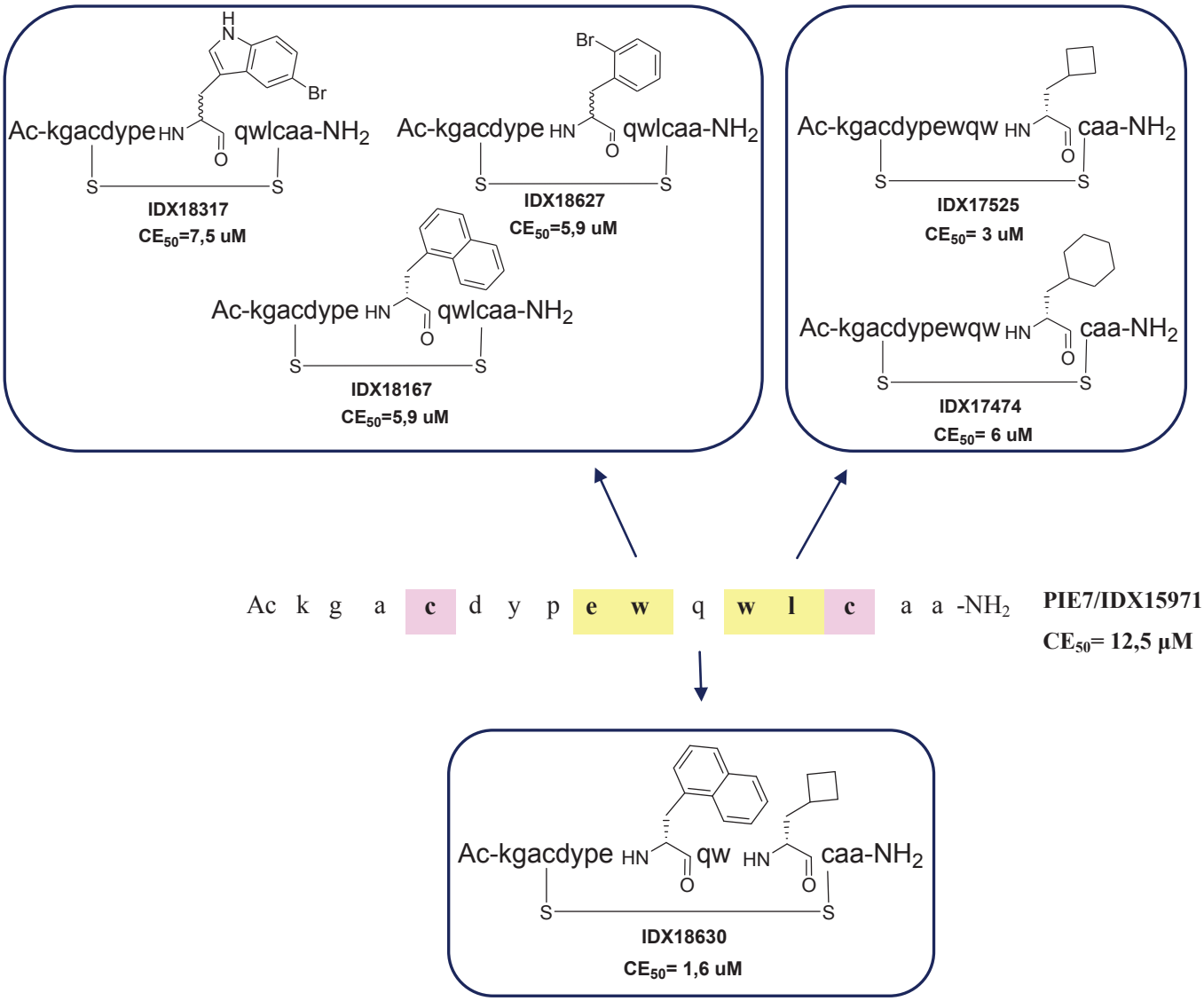


Figure 77. Analogues actifs du D-peptide IDX15971

Par contre, des résultats décevants ont été obtenus lorsque ces mêmes modifications ont été introduites dans le D-peptide IDX16761. En effet, les séquences correspondantes IDX18628, IDX18631, et IDX18632 s'avèrent moins actives que le D-peptide de référence (Figure 78). Une deuxième évaluation biologique du D-peptide IDX18632 est actuellement en cours, afin de confirmer ou infirmer la toxicité observée pour ce composé.

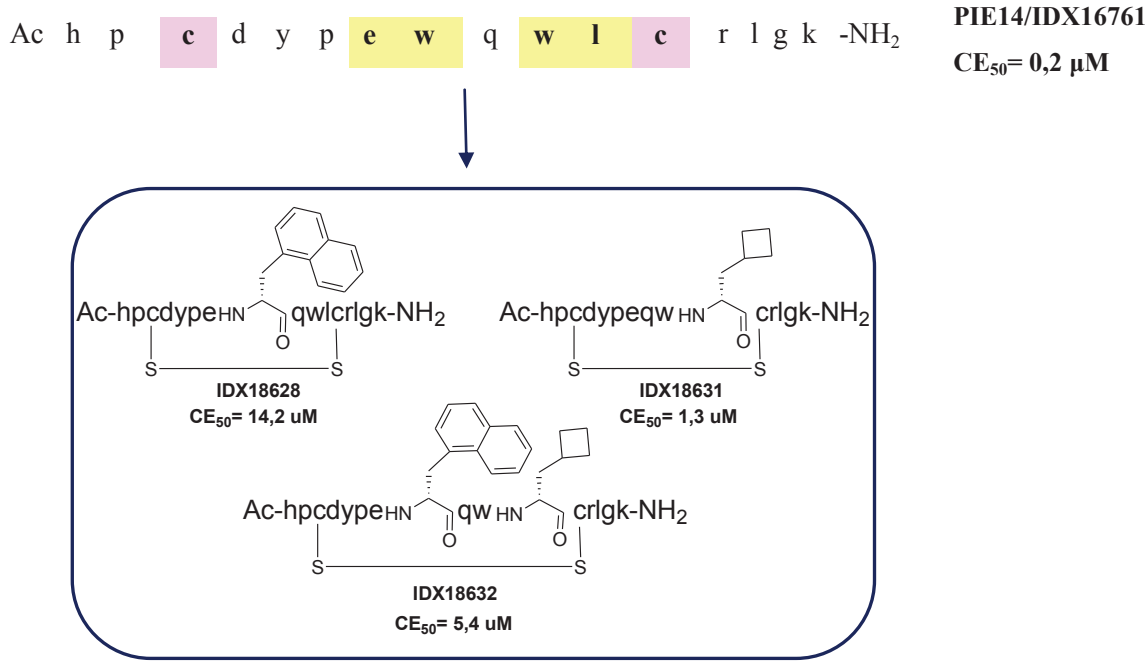


Figure 78. Analogues actifs D-peptide IDX16761

Enfin, dans le chapitre 4, nous avons tenté de réduire la nature peptidique de cette famille d'inhibiteurs en nous intéressant à la synthèse de macrocycles inédits incorporant les quatre résidus essentiels, **D-Glu-9**, **D-Trp-10**, **D-Trp-12** et **D-Leu-13** cyclisés par des linkers de type aliphatique. Quatre macrocycles ainsi que leurs intermédiaires ont été évalués biologiquement, mais malheureusement aucune activité n'a été observée pour ces composés. Par ailleurs, nous avons développé une nouvelle voie de synthèse d'un acide aminé linker particulier, le composé *cis*-Apa, pour la préparation de pseudopeptides cycliques utilisant la réaction de cyclisation/décrochage par métathèse cyclisante (RCM). Basé sur le modèle RGD, nous avons préparé une série de séquences cycliques *via* une méthode pratique et efficace ; de plus, nous avons pu démontrer que l'aminoacide *cis*-Apa se prête parfaitement au procédé de cyclisation/décrochage. L'application de cette méthode à d'autres séquences et notamment à nos pentapeptides est désormais envisagée.

Pour conclure, nous avons réussi à atteindre une partie de nos objectifs, nous avons amélioré l'activité du D-peptide IDX15971 et ouvert la voie vers d'autres études qui permettraient d'améliorer encore plus la séquence d'IDX16761 et par la suite, de réduire sa nature peptidique. Ainsi, des efforts de recherche pour l'optimisation de ces composés méritent d'être poursuivis afin de développer de nouveaux inhibiteurs du VIH.